

**Talidomid analógok hatásának vizsgálata jelölésmentes
szűrőrendszeren és a hepatocelluláris karcinóma egér
modelljén**

Doktori (Ph.D.) értekezés

Nagy Lajos István

Témavezető: Dr. Puskás László

Biológiai Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar



2015.

Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Tudományos közlemények listája.....	5
Tézis alapjául szolgáló közlemények.....	5
További közlemények időrendi sorrendben	5
Konferencia posztterek és könyvrészletek	6
Rövidítések jegyzéke:	8
1. BEVEZETÉS	10
2. IRODALMI HÁTTÉR.....	12
2.1. Kismolekulák hatásának vizsgálata <i>in vitro</i> módszerekkel.....	12
2.1.1 Kismolekulák hatásának vizsgálata biokémiai módszerekkel.....	13
2.2.2. Kismolekulák hatásának vizsgálata jelölésmentes módszerekkel	15
2.2.3. Kismolekulák hatásának vizsgálata toxikogenomikai módszerekkel.....	19
2.3. Az oxidatív stressz jelentősége a májsejtek patofiziológiai folyamataiban	21
2.4. Endoplazmatikus retikulum stressz.....	23
2.5. Hepatocelluláris karcinóma.....	25
2.5.1. Áttétek képződése a hepatocelluláris karcinóma során	26
2.6. Hepatocelluláris karcinóma <i>in vivo</i> modellrendszerei	28
2.7. Talidomid analógok kemoterápiás szerepe	32
3. CÉLKITŰZÉS	35
3.1. Újonnan szintetizált talidomid analóg vegyületek szűrése végpontmérésen alapuló technikákkal.....	35
3.2. Hatásos talidomid analógok vizsgálata valós idejű, jelölésmentes mérési technikával (RT-CES).....	35
3.3 Ac-915 talidomid analóg hatástani vizsgálata toxikogenomikai módszerrel.....	35

3.4. Talidomid analógok intracelluláris lokalizációjának és kölcsönható partnereinek vizsgálata.....	36
3.5. Talidomid analógok <i>in vivo</i> hatásának vizsgálata hepatocelluláris karcinóma egér modellen.....	36
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	37
4.1. Sejtek tenyésztése és fenntartása.....	37
4.2. MTS kolorimetriás végpontmérési technika	37
4.3. Sejtek valós idejű életképességének (RTCA-SP) és migrációs képességének (RTCA-DP) mérése.....	38
4.4. RNS izolálása toxikogenomikai vizsgálatokhoz.....	39
4.5. Génexpressziós profil vizsgálat nagy áteresztőképességű nanokapilláris QRT-PCR módszerrel	40
4.6. Hullámhossz rezonancia eltolódáson alapuló bioszenzor technika	40
4.7. Reaktív oxigén gyökök (ROS) meghatározása	42
4.8. A sejtek glutation tartalmának mérése	42
4.9. Intracelluláris lokalizáció vizsgálata	42
4.10. Kísérleti állatok tartása és kezelése.....	42
4.11. Etikai engedélyek	44
5. EREDMÉNYEK.....	45
5.1. Újonnan szintetizált talidomid analógok jellemzése és szűrése biokémiai vizsgálati módszerekkel.....	45
5.2. Talidomid analógok citotoxicitási vizsgálata RTCA-SP rendszeren	46
5.3. Az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analógok sejtleletképességre kifejtett hatásának vizsgálata.....	47
5.4. Az Ac-2010 talidomid analógok hatásának vizsgálata a humán hepatocelluláris karcinóma sejtek migrációs képességére	48
5.5. Az Ac-915 talidomid analóg toxikogenomikai vizsgálata	49
5.6. Az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analógok intracelluláris lokalizációjának vizsgálata.....	54

5.7. Az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analógok kölcsönható partnereinek vizsgálata	55
5.8. Az Ac-915 és Ac-2010 hatása az intracelluláris antioxidáns rendszerre	56
5.9. A talidomid analógok szöveti eloszlásának vizsgálata	58
5.10. Ac-915 és Ac-2010 <i>in vivo</i> hatása DEN-nel indukált hepatocelluláris karcinóma egér modellen	59
6. DISZKUSSZIÓ.....	62
6.1. <i>In vitro</i> citotoxicitási vizsgálatok összefoglalása.....	62
6.2. Ac-915 talidomid analóg toxikogenomikai vizsgálata.....	63
6.3. Újonnan szintetizált talidomid analógok összetett vizsgálata és alkalmazása a hepatocelluláris karcinóma modelleken	65
7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	69
8. FELHASZNÁLT IRODALOM.....	70
Magyar nyelvű összefoglaló	80
Konklúzió	83
English summary	85
Conclusion.....	88

Tudományos közlemények listája

Nagy Lajos (MTMT azonosító: 10030910)

Tézis alapjául szolgáló közlemények

Nagy L.I., Molnar E., Kanizsai I., Madacsi R., Ozsvári B., Feher L.Z., Fabian G., Marton A., Vizler C., Ayaydin F., Kitajka K., Hackler L. Jr., Mates L., Deak F., Kiss I., Puskas L.G.: Lipid droplet binding thalidomide analogs activate endoplasmic reticulum stress and suppress hepatocellular carcinoma in a chemically induced transgenic mouse model. *LIPIDS IN HEALTH AND DISEASE* 12:(1) Paper 175. 11 p. (2013)

Fabian G., Farago N., Feher L.Z., Nagy L.I., Kulin S., Kitajka K., Bito T., Tubak V., Katona R.L., Tiszlavicz L., Puskas L.G.: High-Density Real-Time PCR-Based in Vivo Toxicogenomic Screen to Predict Organ-Specific Toxicity. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 12:(9) pp. 6116-6134. (2011)

Ozsvári B., Puskas L.G., Nagy L.I., Kanizsai I., Gyuris M., Madacsi R., Feher L.Z., Gero D., Szabo C.: A cell-microelectronic sensing technique for the screening of cytoprotective compounds. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE* 25:(4) pp. 525-530. (2010)

További közlemények időrendi sorrendben

2015

Nagy L.I., Feher L.Z., Szebeni G.J., Gyuris M., Sipos P., Alföldi R., Ozsvári B., Hackler L., Balazs A., Batar P., Kanizsai I., Puskas L.G.: Curcumin and Its Analogue Induce Apoptosis in Leukemia Cells and Have Additive Effects with Bortezomib in Cellular and Xenograft Models. *BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL* Paper 968981. 11 p. (2015)

2014

Szalai Z., Szász A., Nagy I., Puskás L.G., Kupai K., Király A., Magyariné Berkó A., Pósa A., Strifler G., Baráth Z., Nagy L.I., Szabó R., Pávó I., Murlasits Z., Gyöngyösi M., Varga C.: Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS induced colitis in rats: role of NOS/HO/MPO system. *OXIDATIVE MEDICINE AND CELLULAR LONGEVITY* 2014: Paper 925981. 11 p. (2014)

Talapka P., Nagy L.I., Pál A., Poles M., Berkó A., Bagyánszki M., Puskás L.G., Fekete É., Bódi N.: Alleviated mucosal and neuronal damage in a rat model of Crohn's disease. *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY* 20:(44) pp. 16690-16697. (2014)

Tóth A.E., Walter F.R., Bocsik A., Sántha P., Veszélka S., Nagy L., Puskás L.G., Couraud P.O., Takata F., Dohgu S., Kataoka Y., Deli M.A.: Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS One*. 2014 Jul 17;9(7):e100152.

Tóth A.E., Walter F.R., Bocsik A., Veszelka S., Nagy L., Puskás L.G., Dohgu S., Watanabe T., Kataoka Y., Deli M.A.: Az edaravon védi az agyi mikrovaskuláris endotél sejteket a diabetes mellitus egyik patogenetikus faktora, a metilgljoxál okozta károsodásoktól: Edaravone protects cerebral microvascular endothelial cells against damage caused by methylglyoxal, a pathogenic factor in diabetes mellitus. *DIABETOLOGIA HUNGARICA* 22: pp. 138-139. (2014)

2013

Farago N., Kocsis A.K., Lovas S., Molnar G., Boldog E., Rozsa M., Szemenyei V., Vamos E., Nagy L.I., Tamas G., Puskas L.G.: Digital PCR to determine the number of transcripts from single neurons after patch-clamp recording. *BIOTECHNIQUES* 54:(6) pp. 327-336. (2013)

Talapka P., Nagy L., Pál A., Puskás L. G., Poles M., Bagyánszki M., Fekete É., Bódi N. Experimentally provoked recurrent inflammation improves mucosal healing and restoration of impaired morphology of myenteric neurons in a rat model of Crohn's disease. *UNITED EUROPEAN GASTROENTEROLOGY JOURNAL* 1:(Suppl. 1.) p. A205. (2013)

2012

Talapka P., Nagy L., Poles M., Puskás L.G., Fekete É., Bagyánszki M., Bódi N.: Quantitative changes in the density of myenteric neurons and in expression of inflammatory markers in a rat model of Crohn's disease. *IDEGGYÓGYÁSZATI SZEMLE / CLINICAL NEUROSCIENCE* 65:(1. Ksz.) p. 67. (2012)

Talapka P., Nagy L., Poles M., Puskás L.G., Fekete É., Bagyánszki M., Bódi N.: Aligned alteration of enteric neurons, smooth muscle cells and inflammatory markers involved in stricture formation in a rat model of Crohn's disease. *GUT* 61:(3) p. A156. (2012)

Konferencia poszterek és könyvrészletek

2014

Talapka P., Nagy L.I., Pál A., Puskás L.G., Poles M., Bagyánszki M., Fekete É., Bódi N.: Alleviated mucosal and neuronal damage at the acute phase of recurrent inflammation in a rat model of Crohn's disease. *IBRO Workshop: International Brain Research Organization Workshop. Konferencia helye, ideje: Debrecen, Magyarország, 2014.01.16-2014.01.17. Paper P175.*

2013

Talapka P., Nagy L., Pál A., Puskás L.G., Poles M., Bagyánszki M., Fekete É., Bódi N.: Strukturális és molekuláris változások Crohn-beteg patkányok bélidegrendszerében. In: *Keresztes Gábor (szerk.) Tavaszi Szél, 2013: Spring wind, 2013. 659 p. Budapest: Doktoranduszok Országos Szövetsége, 2013. pp. 539-546. 1-2. kötet. (ISBN:978-963-89560-2-6)*

2012

Talapka P., Nagy L., Poles M., Puskás L.G., Fekete É., Bódi N.: Aligned alteration of enteric neurons, smooth muscle cells and inflammatory markers involved in stricture formation in a rat model of Crohn's disease. In: *Bikfalvi Péter (szerk.) PhD hallgatók VIII. Nemzetközi Konferenciája/8th International Conference of PhD Students. Miskolci Egyetem, 2012. (ISBN:978-963-661-994-7)*

Somlyai G., Kovács A., Guller I., Gyöngyi Z., Krempels K., Somlyai I., Nagy L.I., Fábíán G., Puskás L.G.: Deuterium has a key role in tumour development – A new submolecular regulatory system. *In: JESIUM 2012 - Joint European Stable Isotope Users Group Meeting. Konferencia helye, ideje: Leipzig, Németország, 2012.09.02-2012.09.07.p. 227.*

Rövidítések jegyzéke:

ADP- adenzin difoszfát

ATP- adenzin trifoszfát

bFGF- bázikus fibroblaszt növekedési faktor

CCl₄- szén tetraklorid

CI- cell index, sejtinдекс

CYP- citokróm P450

C_T- cycle threshold, ciklus küszöbérték

DCFDA- 2',7'-diklórhidrofluorescein-diacetát

DEN- dietilnitrozamin

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO- dimetil-szulfoxid

EC₅₀- mérhető maximális hatás felét kiváltó dózis

EGF- epidermális növekedési faktor

ER- endoplazmatikus retikulum

F- frekvencia

FADH- flavin-adenin-dinukleotid

FBS- fetal bovin serum, borjú savó

FDA- Food and Drug Administration

GSH- redukált glutation

H₂O₂- hidrogén-peroxid

HCC- hepatocellular carcinoma, hepatocelluláris karcinóma

HIV- emberi immunhiányt előidéző vírus

HSP- Heat Shock Protein, dajkafehérje

IC₅₀- fél-maximális gátló dózis

IGFR1- inzulinszerű növekedési faktor receptor

IL-6- interleukin 6

IL-10- interleukin 10

IκB- inhibitor of kappa B, kappa B gátlója

kHz- kilohertz, frekvencia SI mértékegység

KO- knock out, gén kiütött

LDH- laktát-dehidrogenáz

MAPK- mitogén aktivált protein kináz

mTOR-mammalian target of rapamycin, rapamicin célpontja emlősökben
MTS- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfó-fenil)-2H-tetrazolium
MTT- 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium-bromid
NADH- nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAFLD- nem alkoholos eredetű zsírmáj szindróma
NF- κ B- nuclear factor kappa B, sejtmagi faktor kappa B
PBS- foszfát puffer oldat
PDGF- vérlemezke eredetű növekedési faktor
PI3K- foszfatidil-inozitol-3 kináz
PMS- fenazin-metoszulfát
PTEN- foszfatáz és tenzin homológ fehérje
QRT-PCR- kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
 R_0 - 0. időpillanatban mért ellenállás
 R_{tn} - természetes számú időpontban mért ellenállás
ROS- reaktív oxigéngyökök
RTCA-DP- Real-Time Cell Analyzer-Dual Plate
RTCA-SP- Real-Time Cell Analyzer-Single Plate
RT-CES- Real-Time Cell Electronic Sensing System
Tgf- β - tumor növekedési faktor béta
 T_0 - 0. időpont, mérés kezdetét megelőző időpont
 T_n - természetes számú időpont a mérések során
TNF- α - tumor nekrozis faktor alfa
UPR- unfolded protein response
VEGF- vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
Z- impedancia

1. BEVEZETÉS

Munkánk során újonnan szintetizált molekulákat vizsgáltunk, melyek alapszerkezete hasonló a már klinikumban is ismert és alkalmazott talidomid molekuláéhoz. A kezdetben hányinger és a várandós kismamák reggeli rosszullétének csillapítására alkalmazott gyógyszerről hamar kiderült, hogy súlyos teratogén mellékhatással rendelkezik. Az alkalmazása során csecsemők ezrei születtek végtag rendellenességgel vagy súlyos szív malformitással. Csak a későbbiekben fordult a figyelem az antineoplasztikus és gyulladásgátló hatása felé. Számos kutatás irányult arra, hogy a molekula alapszerkezetét meghagyva illetve azon minimálisan módosítva, például egyéb oldalláncok cseréjével, a hatásosságát növeljék. A különböző kémiai eljárásokkal végzett változtatások során sokféle molekulát nyerhetünk, melyeket ezt követően meg kell vizsgálni különböző sejt alapú szűrőrendszereken a hatékonyságuk megállapítása céljából. A kimagasló hatással bíró tagjaikat további vizsgálatoknak kell alávetnünk, hogy információt kaphassunk a hatásmechanizmusra, s csak ezt követően lesz alkalmas arra, hogy egy vizsgálni kívánt betegség *in vivo* modelljében is tesztelhessük.

Egy potenciális gyógyszer-jelölt molekula létrehozását hosszas fejlesztő munka előzi meg, melynek során az ismert, ám kevésbé hatásosnak bizonyuló molekula alapvázát vagy annak különböző oldalláncait módosítják. Ez történhet célzottan, amikor a jobb oldódás vagy a célspecificitás növelése érdekében csak egy kis részét változtatják meg az alapvegyületnek. A másik lehetőség, hogy egyszerre több részét is átalakítják annak reményében, hogy az új molekula szélesebb körben használható legyen, esetleg más betegségben is alkalmazható legyen. A fejlesztési folyamat során, a sorozatos módosítások eredményeként akár több száz molekulát is tartalmazó ún. molekulakönyvtár keletkezik, mely tagjainak hatását ezt követően meg kell vizsgálni az adott betegséget modellező sejtes rendszeren. Az első lépés minden esetben a citotoxicitás megállapítása annak érdekében, hogy megbecsülhessük a molekula esetleges mellékhatását vagy éppen tumor ellenes tulajdonságát. A kapott eredmények alapján a molekulaszerkezet tovább finomítható annak céljából, hogy a hatásukat és célspecificitásukat növeljék. A hatásosabb és specifikusabb hatóanyagok legtöbb esetben kisebb mellékhatással rendelkeznek és mivel alacsonyabb dózisban kell alkalmazni, a szervezet terhelése is kisebb mértékű. A sorozatos optimalizációnak köszönhetően molekulakönyvtárak kiemelkedő tagjai már alkalmasak lehetnek arra, hogy

megvizsgálják a hatásmechanizmusát molekuláris biológiai módszerekkel illetve különböző humán betegségek állatmodelljeiben teszteljék. A várható mellékhatások és a befolyásolt intracelluláris útvonalak felderítését többek között genomikai és toxikogenomikai módszerekkel lehet tanulmányozni.

A citotoxicitási szűrővizsgálatok széles körben elterjedtek a molekulakönyvtárak citotoxikus tagjainak szűrésére a kutatásban és a gyógyszerfejlesztésben egyaránt, annak érdekében, hogy olyan molekulákat találjanak, amelyek képesek csökkenteni vagy megállítani a tumorsejtek szaporodását. A molekulák hatástani vizsgálatánál alapvető módszer egy kolorimetriás, végpontmérésen alapuló teszt használata, amely eredményeiből következtetni tudunk az élő és halott sejtek arányára. A kezelés hatásosságát a kezelést követő 48-72 órában vizsgáljuk egy olyan reagens alkalmazásával, amelyet a még élő sejtek átalakítanak egy színes vegyületté, amit fotometriásan ki tudunk értékelni. Ilyen kolorimetriás végpontmérési módszer többek között az MTS, MTT vagy az LDH (laktát-dehidrogenáz) életképességet meghatározó tesztek. Ezek alapja egy, a sejtek működésében elengedhetetlen sejtorganelum vagy enzimrendszer érintetlenségének vizsgálata, amely képes valamilyen működésének köszönhetően egy inaktív reagenst fotometriásan aktív formává alakítani, melyet kvantitálni tudunk. Az MTS és MTT tesztek esetében az életben maradt és érintetlen mitokondriális elektron transzportláncsal rendelkező sejtek arányában történik a színreakció. Ezzel szemben az LDH felszabadulás mérésén alapuló teszt esetében a színreakció az elpusztult sejtek arányában fokozódik, mivel a laktát-dehidrogenáz enzim az elpusztult sejtekből kijut a sejttenyésztő tápoldatba.

A vizsgált vegyületek hatásának mérésére egyre elterjedtebben használnak olyan módszereket, amelyek nem igényelnek semmilyen reagens hozzáadását. Az eredményeket pusztán biokémiai, biofizikai illetve fiziológiai változások alapján monitorozzák. Előnye, hogy a vizsgált sejtek (immortalizált sejtvonala, primer sejtek) környezetét csak minimálisan, a vizsgálandó anyag hozzáadásával zavarjuk meg, ezáltal a fiziológiás vagy éppen a patofiziológiás körülmények minimálisan változnak csak meg és így a kapott eredmények közelebb állhatnak a valósághoz.

Doktori értekezésemben egy olyan új, jelölésmentes *in vitro* molekulaszűrési eljárást mutatok be, melyre sikeresen állítottunk be citotoxicitási vizsgálati módszert, amellyel célzottan szintetizált molekula könyvtárakat szűrtünk le. A potenciális gyógyszer-jelölt molekulákat hatékonyan vizsgáltunk tovább toxikogenomikai

módszerekkel, majd *in vivo* hatásvizsgálatot végeztünk a humán hepatocelluláris karcinóma rágcsló modelljén.

2. IRODALMI HÁTTÉR

2.1. Kismolekulák hatásának vizsgálata *in vitro* módszerekkel

Egy kismolekula fejlesztésénél, amelyből remélhetőleg gyógyszer-jelölt lesz, alapvető kíváncsag a hatástani vizsgálat annak kiderítésére, hogy első lépésben miként hat a célsejtekre, hogy egyáltalán rendelkezik-e releváns biológiai hatással és az mennyire specifikus. Továbbá arra a kérdésre is keressük a választ, hogy a kiváltott hatás a későbbi vizsgálati rendszerünknek megfelel-e. Ezen kérdések eldöntésére különböző biokémiai vizsgáló módszereket szoktak alkalmazni, amelyek általában egy élő sejt alapvető biokémiai folyamatának érintettségét vizsgálja. Ilyen módszerek például a mitokondriális légzslánc működésének vizsgálata vagy az élő sejtek energiatermelő folyamatiból származó ATP mérése egy biolumineszcens reakció alkalmazásával.

A biokémiai folyamatok vizsgálata mellett egyre elterjedtebbek a különböző jelölésmentes rendszerek alkalmazása, melyek általában valamilyen fizikai/biofizikai vagy patofiziológiás/fiziológiás paraméter mérésén keresztül adnak információt a sejtek aktuális állapotáról a kezelés időtartama alatt vagy azt követően. Ezek a vizsgálati módszerek nem igényelnek jelölőanyag (fluoreszcens vagy radioaktív reagensek) használatát és így relevánsabb, a fiziológiás körülményekhez közeli állapotot tükrözhetnek az eredmények. Mindemelllett jóval költségkímélőbb is a biokémiai vizsgálatokhoz képest illetve többszöri mintavételt és elemzést is lehetővé tesz.

Egy hatóanyag vizsgálata során, abban az esetben, mikor már ismert a hatás vagy kiegészítő információkra van szükségünk a mellékhatásával kapcsolatban, lehetőség van a molekulák hatástani vizsgálatára genomikai módszerekkel is. Ennek során globális információkat gyűjthetünk a befolyásolt gének halmazáról, vagy pedig koncentrálhatunk olyan alapvető gének csoportjára, melyek egy ismert patofiziológiás állapottal, például gyulladás, apoptózis, citokin aktiváció, függnek össze. Ebben az esetben arra kaphatunk választ, hogy a kezelés hatására hogyan változnak a kiválasztott gének kifejeződése, milyen szignalizációs útvonalak aktiválódnak vagy éppen inaktiválódnak.

A fenti vizsgálatokból származó információk tükrében könnyebben megállapítható, hogy a vizsgált hatóanyag miként fog viselkedni egy összetettebb rendszerben, szerv és szervrendszer szintjén, élő állatban.

2.1.1 Kismolekulák hatásának vizsgálata biokémiai módszerekkel

Az alap- és alkalmazott kutatásban elterjedten használt technika egy molekula élőszervezetekre kifejtett hatásának vizsgálatkor a biokémiai folyamatok vizsgálata, amellyel főképpen a molekula toxikus mellékhatását tudjuk megvizsgálni. Erre a célra széles körben alkalmazzák a különböző végpontmérésen alapuló technikákat különböző célsejteken. Ahogy azt a neve is mutatja a technikának, az információt csak a molekulával való kezelés és a kívánt inkubációs idő leteltével tudjuk kinyerni. Ez általában 24-72 óra a kezelés kezdetétől számítva. Az adatok, amiket ezzel a módszerrel kapunk főként arra vonatkoznak, hogy az alkalmazott kezelés befolyásolja-e a sejtek életképességét illetve, ha hígítási sort használunk kezelés során, akkor információhoz jutunk a kezelőanyag EC_{50} illetve IC_{50} értékeiről is. Az EC_{50} , a mérhető maximális hatás felét kiváltó koncentráció, amely a molekulának (toxin, antitest, hatóanyag) azt a koncentrációját jelenti, amely a maximálisan elérhető hatás felét fejt ki adott idő alatt. Ezzel szemben az IC_{50} , azaz a „fél-maximális gátló dózis” azt a hatóanyag koncentrációt jelenti, amely egy biokémiai folyamat sebességét, intenzitását a felére csökkenti [1]. Ez utóbbit leginkább olyan ismert vagy újonnan fejlesztett és egy feltételezett hatás mechanizmussal rendelkező molekula jellemzésére alkalmazzák, mely egy konkrét biokémiai folyamatot befolyásol.

Az alábbiakban a három legelterjedtebben alkalmazott és a munkánk során is felhasznált végpontmérésen alapuló technikát, az MTS, az MTT és az LDH felszabadulási tesztek működését ismertetem. Az MTS és MTT módszerek esetében a mitokondriális elektrontranszportlánc intaktságát vizsgáljuk. A mitokondriális légzéslánc működésében fellépő zavarok illetve annak sérülése a sejteket visszafordíthatatlanul beletaszítja a sejthalál különböző formáiba. Tehát a mitokondriális elektron áramlás mérése megbízható információt biztosít a sejt aktuális életképességéről. A mitokondriumok a sejtbe bejutó MTT tertazolium só-t (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolium-bromid) kristályos formazánná alakítják, melyet feloldva az élő és még funkcionáló mitokondriummal rendelkező sejtek arányának meghatározására használhatunk. A formazán szolubilis formája fotometriásan mérhető és arányos az élő sejtek mitokondriális működésével. A technika

hátrányaként említhetjük, hogy a kvantifikálható termék nem vízdékony formájú és némi utómunka után lehet mérhető formává alakítani. A tápfolyadék eltávolítását követően szerves oldószerrel, általában dimetil-szolfoxiddal szükséges oldhatóvá tenni a kialakult kristályokat. Emiatt a technika idő és munkaigényes. Ez utóbbi nehézségek kisküszöbölése céljából fejlesztették ki az MTS tesztet, ahol a reakcióhoz egy kiegészítő reagenst adva a mérhető végtermék vízdékony és a tápoldatba távozik. Az MTS szűrőrendszer esetében az MTS reagens (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfopenil)-2H-tetrazolium) PMS (fenazin-metoszulfát) jelenlétében formazán sötét képez, mely a citoszolban feloldódik és a sejtből a tápoldatba spontán kijut. A PMS a reakcióban köztes elektron akceptorként működik közre [2-4]. Előnye a technikának, hogy a vízdékony formazán sötét színét szemmel is láthatjuk és a reakció végbemeneteléről így módon is megbizonyosodhatunk. A harmadik vizsgálati módszer épp az előző két rendszerrel ellentétes információkat ad. Az LDH esszé segítségével elsősorban az elpusztult sejtek arányát tudjuk vizsgálni a kezelt sejtkultúrában. Az elpusztult sejtekből a tápfolyadékba kijutott laktát-dehidrogenáz enzim mennyiségét az enzim szubsztrátjának hozzáadásával mutathatjuk ki. A laktát-dehidrogenáz enzim kijutása az extracelluláris közegbe egyértelmű jele a sejthalálnak [5].

A végpontmérésen alapuló biokémiai vizsgálati módszerek előnye az alacsony költség és a viszonylag nagy áteresztőképesség. A kapott adatokból következtethetünk a kezelés toxikus hatásainak mértékére és a különböző biokémiai paraméterekre. Mindemellett azonban hátrányuk, hogy a hatáskinetikáról, a kezelés kezdete és vége közötti időtartamról, a sejtek aktuális életképességéről nem szolgáltat adatokat. Emellett a kezelés hatásáról csak úgy kaphatunk információkat, ha a sejtes rendszert valamilyen vegyülettel (MTS/PMS illetve MTT) megkezeljük, így fenn áll a veszélye annak, hogy a vizsgálni kívánt molekula és az előhíváshoz használt vegyület egymással is reakcióba léphet és ezzel félrevezető eredményeket kaphatunk. Továbbá, maguk a biokémiai tesztekben használt reagensek is befolyásolhatják a vizsgált sejtes rendszert. Az elmúlt években a hatóanyagok sejtes rendszereken való tesztelésére egyre szélesebb körben alkalmaznak olyan jelölésmentes technikákat, melyek nem a metabolikus útvonalak vizsgálatán keresztül, hanem fizikai paraméter méréssel adnak információt a kezelőanyag hatásáról [6].

2.2.2. Kismolekulák hatásának vizsgálata jelölésmentes módszerekkel

Egy molekula sejtekre kifejtett hatásának vizsgálatában alapvető követelmény, hogy a vizsgálati módszer a lehető legminimálisabban befolyásolja a sejtek működését és ezáltal tisztán az anyaghatásra adott választ regisztráljuk. Ennek céljából a kísérleteinkre és az újonnan szintetizált molekulák vizsgálatára optimalizáltunk egy olyan módszert, amely amellett, hogy nem igényel jelölő molekulák alkalmazását, még valós időben is képes információt adni egy sejtpopuláció aktuális állapotáról, osztódásuk üteméről, kezelésre adott válaszáról, viabilitásáról vagy migrációs hajlamáról. A jelenlegi *in vitro* technikák nagy része, amellyel a citotoxikus molekulák hatását szűrni lehet, valamilyen jelölést igénylő módszerrel működnek. A klasszikus detektálási technikák fluoreszcens, lumineszcens vagy pedig radioizotópos jelölésen alapulnak, vagy pedig optikai abszorbanancia mérésén, amely pedig egy jelölt ligand vagy enzim szubsztrát használatát igényli [4-8]. Ezek a technikák nem csak költségesek, anyag és időigényesek, hanem mivel a jelölő anyag kölcsönhatásba léphet a vizsgálandó molekulával vagy akár fehérjékkel a sejtben, ezért nem zárható ki, hogy a jelölés különböző sejtelettani folyamatokat is befolyásol, s így akár félrevezető eredményeket adhat.

A valós idejű sejteletképes mérés vagy más néven RT-CES (real-time cell electronic sensing system) módszer (xCELLigence; ACEA-Roche, Magyarország) a sejtek által képviselt impedancia (váltakozó áramú ellenállás) értéket illetve annak az anyagkezelésre vagy bármely más környezeti illetve élettani feltételnek a megváltozására bekövetkező változást regisztrálja és elemzi nem-invazív módon. Mivel pusztán a mikroelektronikai paraméterek aktuális eltérése alapján érzékeli a sejtek pillanatnyi állapotát és kémiai vagy radiológiai jelölést nem igényel, a kinyert információk közelebb állnak a fiziológiás körülmények között mérhetőkhöz. Továbbá információt szolgáltat a kezelő anyag hatásának kinetikájáról is [9-11], melynek birtokában a hatásmechanizmus könnyebben prediktálható.

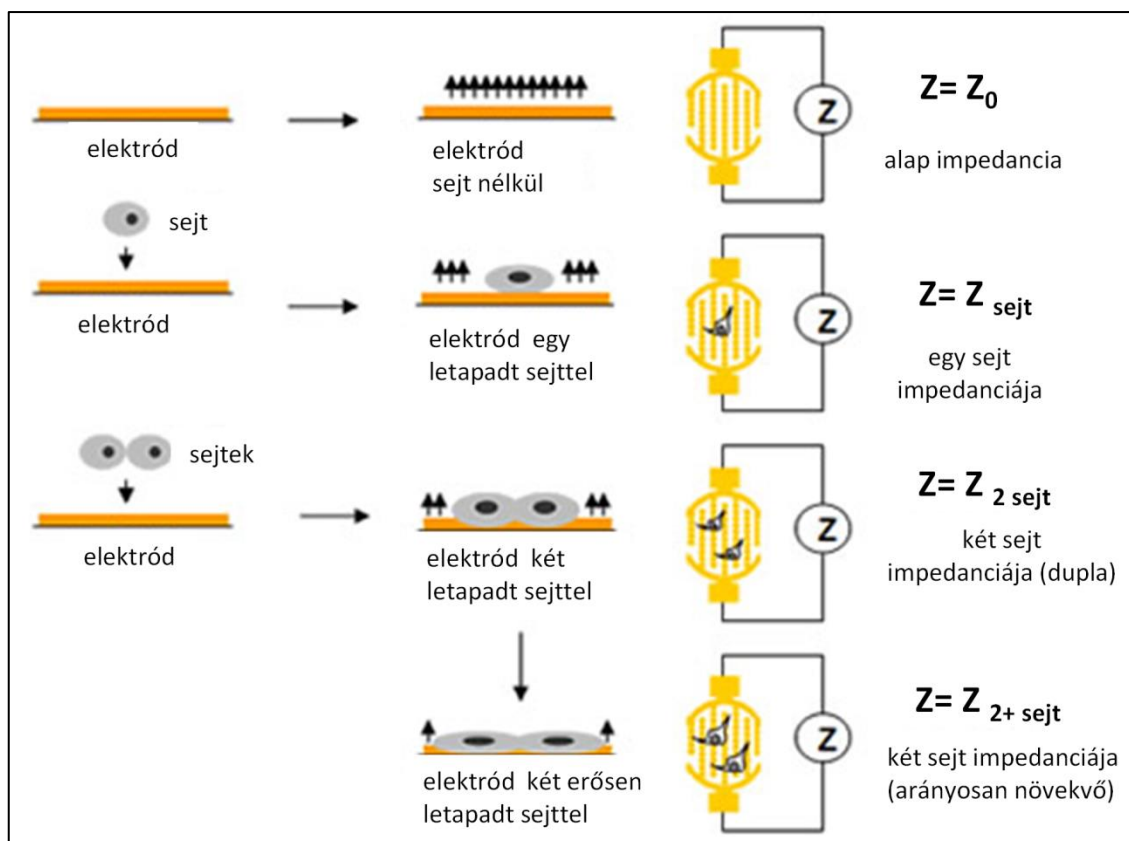
A technika alapja egy mikroelektronikai sejtszenzor rendszer, amely egy speciális 96-lyukú mikrotiter lemez, az E-plate aljába van integrálva. A fiziológiás körülmények biztosítása érdekében a felület zselatinnal van előkezelve. Ahogy a sejtek elkezdnek letapadni a zselatinnal előkezelt felületre, szigetelőként viselkednek, amiktől a mért impedancia növekedni fog. A rendszer a megnövekedett impedanciát egy mértékegység nélküli paraméterre, sejt index (CI, cell index) értékke alakítja át. Azok a letapadt sejtek, amelyeknek a környezet megfelelőnek bizonyul, megfigyelték, hogy a

tenyésztő edény felületén szétterülnek és a felülettel szoros kontaktust alakítanak ki. A letapadt sejtek számának növekedésével a mért impedancia egyenes arányban növekszik, melyet a sejtek felületen való szétterülése tovább fokoz. Ennek eredő értékéből következtetni lehet a sejtek aktuális állapotára. Azzal, hogy a sejtek a mikroelektróda felületén letapadnak, osztódnak, adhéziójuk erősségét változtatják, egyúttal tovább növelik az elektród impedanciáját, amely egyenes arányban áll a sejtek életképességével [7, 8]. Tehát minél több sejt tapad a felülethez, vagy azon minél jobban elterül, annál jobban emelkedik az impedancia (1. ábra).

A vezérlőszoftver előre meghatározott és általunk programozott időközönként, néhány milliszekundum alatt megméri az aktuális impedancia értékeket és azt sejt index formájában folyamatosan kijelzi a vezérlő felületen.

A kísérletek során a sejteket ért bármilyen környezeti hatás (hő sokk vagy anyagkezelés) befolyásolja a sejtek aktuális állapotát, melyet az impedancia görbében bekövetkező változások alapján nyomon követhetünk. Így a valós idejű sejtéletképesség mérésen alapuló technika megbízhatóan alkalmazható különböző hatóanyagok tesztelésére letapadó sejteken. Továbbá az adott hatásmechanizmus karakterisztikus impedancia görbével jól jellemezhető [11-12].

Azáltal, hogy az RT-CES technika a másodperc tört része alatt megméri a sejt indexet, a lehető legminimálisabb mértékben befolyásolja a sejtek élettani paramétereit. Így az elektródák vezetőképességének meghatározása, alkalmas arra, hogy a sejtek életképességét, számát, morfológiáját és a letapadásuk erősségét detektáljuk különböző sejtes kísérleti rendszerekben.



1. ábra. Sejtproliferáció vizsgálatának technikai háttere. Az elektród felületre letapadt sejtek növelik a mikroelektrodák közötti impedanciát (Z), amely egyenes arányban változik a sejtek letapadásának erősségével, a sejtproliferáció sebességének változásával, vagy a sejtek számának növekedésével. Az alapellenállásban bekövetkező eltérést a rendszer sejt indexnek nevezett mértékegység nélküli paraméter formájában jelzi ki időegységekre lebontva. Forrás: <http://www.aceabio.com/theory.aspx> Elérés ideje: 2015. október 5.

Mindezek mellett, a sejtek a kísérlet teljes ideje alatt a 96-lyukú E-plate mikrotiter lemezzel együtt a sejtenyésző inkubátorban tartózkodnak, ami tovább csökkenti a sejteket ért nem kívánt és nem tervezett inzultusok mértékét, ezzel is növelve a kapott információk megbízhatóságát. Mivel a sejtek proliferációjának valós idejű mérése nem igényel jelölő anyag alkalmazását, így a sejteken végzett beavatkozásokat követő ellenállásbeli változások tisztán a sejtválaszt tükrözik [6]. A kapott karakterisztikus impedancia görbe alapján pedig a kezelés időbeni kinetikája jól vizsgálható.

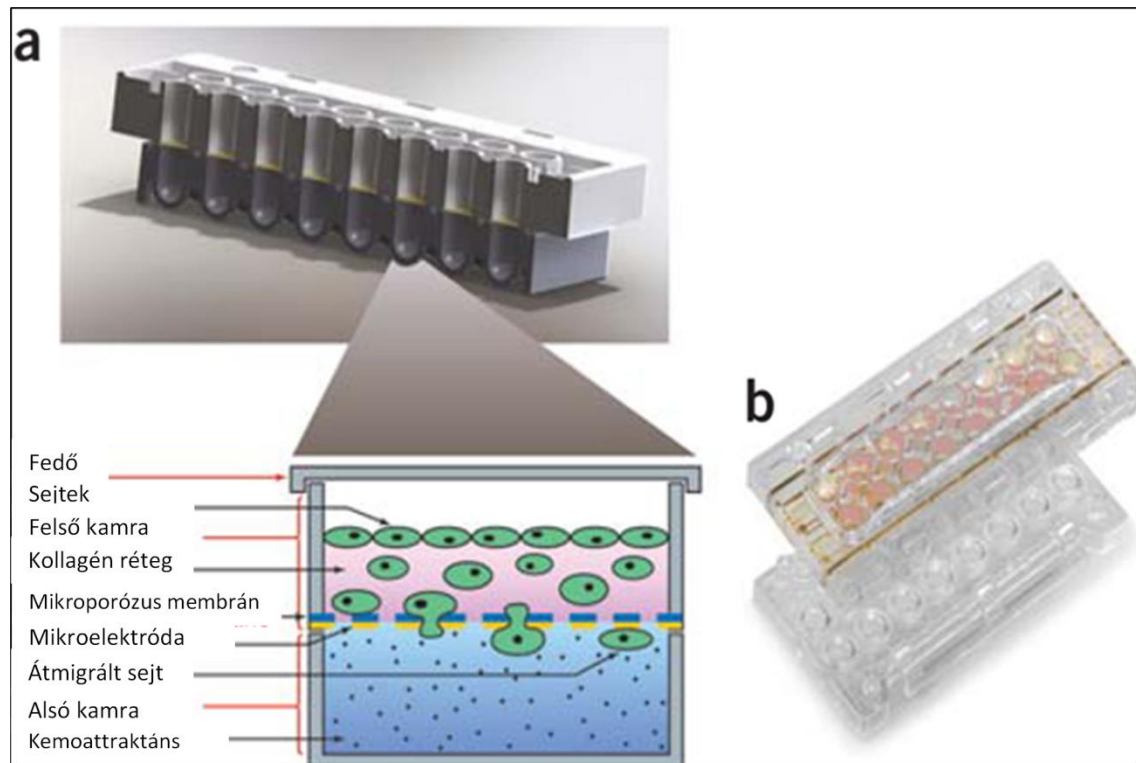
A mért sejt index értékeket az RT-CES vezérlő szoftvere, az ACEA által a rendszerhez biztosított felhasználói kézikönyv 43. oldalán közzétett képlet alapján, a mért impedancia értékekből számolja. A program 3 frekvencia tartományban mér, melyek a következők: Cell Index-I: 10 kHz, Cell Index-II: 25 kHz és Cell Index-III: 50

kHz. Az alkalmazott képlet: $Cell\ Index_i = (R_{in} - R_{i0})/F_i$, ahol $i = 1, 2$ vagy 3 ; $F_1=15$, $F_2=13$ és $F_3=10$; $n = 0, 1, 2, \dots, N$ (időpontok). Az R_0 érték a T_0 időpontban mért ellenállás értéket jelenti, míg az R_n a T_n időpontban mért ellenállás érték. A képlet értelmezése alapján a származtatott sejt index érték egyenlő a mérés aktuális időpontjában mért és a nulladik időpontban mért (tehát háttér) ellenállás értékek különbsége, és a sejtindex mérésére éppen alkalmazott frekvencia értékhez tartozó (F_1 vagy F_2 vagy pedig F_3) szám hányadosával.

A rákos daganatok fontos tulajdonsága daganatsejtek migrációs képessége illetve a távoli metasztázis képzés. Ahhoz, hogy a tumorok metasztatizáljanak a neoplasztikus sejteknek migrálniuk kell a környező szövetekbe. A tumormetasztázisokat teszik főként felelőssé a rák okozta halálokok döntő többségénél [13]. A tumorsejtek migrációjának megértése illetve annak befolyásolása és az egyes kemoterápiás szerek sejtmigrációra kifejtett hatásának vizsgálata elengedhetetlen lépés a rák elleni küzdelemben.

Az RTCA-DP migrációs mérő rendszere az RTCA-SP rendszernél ismertetett mikroelektronikai érzékelő rendszer egy továbbfejlesztett változatát alkalmazza a rákos sejtek vándorlásának detektálására. A sejtek migrációja borjúsavó koncentráció gradiens mentén történik, tehát a működési elve megegyezik a Boyden kamráéval, ahol a sejtek és a kemoattraktáns között egy olyan porózus, polikarbonát membrán állja az utat, amelyen a sejt csak aktív mozgással, a citoszkeleton átrendeződéssel és lamellipodia képzéssel tud csak átjutni [13, 14]. Szemben a Boyden kamrát alkalmazó sejtmigrációt vizsgáló módszerrel, az RTCA-DP migrációs rendszer nem igényli a sejtek fixálását, sem festési eljárást. A rendszer alapja egy két részre osztott, speciális mikrotiter lemez konstrukció. A lemez alsó része tartalmazza a kemoattraktánsal is kiegészített tápoldatot, míg a felső részéből, ahová a sejteket szélesztjük és ahol a kezeléseket végezzük, hiányzik a kemoattraktáns (2.b ábra). Az felső lemezrész alján mikroporózus polikarbonát membrán található, amibe integrálva van a sejtek alsó, kemoattraktáns tartalmazó térrészbe való átjutását érzékelő mikroelektróda hálózat. A sejtmigrációs vizsgálataink során a mikrotiter lemez felső részében, ahonnan a sejtek migrációját várjuk, a tápfolyadék nem tartalmazott borjú savót, míg az alsó részben a megfelelő tápoldat tartalmazta azt. A mikroelektróda hálózat, ami regisztrálja az átjutott sejtek mennyiségét, a savót is tartalmazó térfélen található. A sejtek mozgását az RTCA-SP rendszernél ismertetett módhoz hasonlóan detektáljuk, de ennek a

módszerek az esetben a sejtszám nem a sejtek életképességét, hanem az átjutott sejtek mennyiségét jelenti (2.a ábra).



2. ábra: Sejtmigráció vizsgálatának technikai háttere. (a.) A sejtek a felső lemezzészében vannak szélesztve, ahol a sejtenyésző tápoldat borjú savót nem tartalmaz. A sejteknek az alsó, rezevoárként is működő lemezzészébe kell átjutnia, ahol a tápoldat borjú savót is tartalmaz, ami kemoattraktánsként szolgál. Az alsó és felső térrezt egy porózus polikarbonát membrán és az abba integrált érzékelő elektróda hálózat választja el. (b.) A migrációs vizsgálatot megelőzően a vizsgáló lemez két részre szedhető szét, mely megkönnyíti a felső lemez rész feltöltését borjú savót nem tartalmazó tápfolyadék, míg az alsó lemez részbe borjú savóval kiegészített tápoldat kerülhet. A sejtek szélesztését és a mérést megelőzően a két fél egyesíthető. [15]

2.2.3. Kismolekulák hatásának vizsgálata toxikogenomikai módszerekkel

Egy hatóanyag szervezetbe kerülésekor az elsődleges válaszreakciót génexpressziós szinten váltja ki. A sejtekkel találkozáva specifikusan vagy éppen aspecifikusan kölcsönhatásba lép különböző membrán-integrált vagy intracelluláris receptorokkal, amelyek közvetett vagy közvetlen úton megváltoztatják a célsejt géneinek kifejeződését. Attól függően, hogy a hatóanyag általánosan befolyásolja a sejt működését illetve annak csak egy bizonyos működésére hat vagy az anyag természetéből fakadóan károsító intracelluláris folyamatokat indít be, különböző gének csoportját aktiválja, melyek egy általános, sejtszintű védelmi mechanizmusban

játszanak szerepet vagy egy szignalizációs kaszkádra fűzhetőek fel (pl. apoptózis, gyulladás, hősokk válasz).

A toxikogenomika, mely a hatóanyagok toxikus tulajdonságaira jellemző, génexpresszióra kifejtett hatását vizsgáló tudományterület, alkalmas arra, hogy az általánosan alkalmazott technikák (biokémiai tesztek, affinitás kromatográfia, ELISA) előtt adjon információt a kezelőanyagok különböző mellékhatásairól. A módszer alapján véve a különböző genomi biomarkerekben bekövetkező változásokat vizsgálja jóval azelőtt, hogy az a sejtekben és magában a hatásnak kitett szervben bármi, más módszerrel is detektálható elváltozást okozna. A módszer segítségével már az anyagkezelések korai szakaszában megbízhatóan kimutathatóak a várható mellékhatások, ellentétben a hagyományos patológiai vizsgálatokkal.

A génexpresszió vizsgálata különböző vegyületeknek, hatóanyagoknak és xenobiotikumoknak kitett sejtekben vagy szervekben alapvető módszerre lépett elő az utóbbi időben a toxikológiai analízis során és fontos szerephez jutott többek között a gyógyszerbiztonsági, preklinikai és klinikai vizsgálatokban egyaránt. A technika segítségével olyan áttekintő információk nyerhetők, mellyel jobban értelmezhetőek a hatásmechanizmusok illetve azonosíthatóak azok a molekuláris útvonalak, amelyeket a gyógyszermolekulák befolyásolnak, vagy éppen megakadályozzák a kívánt hatás kialakulását. A legfontosabb előnye a toxikogenomikai vizsgálatoknak, hogy már korai időpontban meghatározható és megjósolható a hatóanyag hatására bekövetkező részleges változások a különböző biomarker gének vizsgálata alapján, még a szöveti károsodás előtt. A legtöbb kutatás eddig csak egy-egy szervre összpontosított, úgymint máj [16-19], vese [20], lép [21], tüdő [22], agy [23] vagy pedig a toxicitás egyes fajtáit vizsgálta, mint például genotoxicitás vagy karcinogenitás [24]. Ezzel szemben az elvárható követelmény egy anyaghatás toxikogenomikai vizsgálata során, hogy a korai fázisban aktiválódó géneket nagy áteresztőképességgel, egyszerre több szerven párhuzamosan és számos, egymással összefüggő markergénre vizsgálható legyen.

A toxikogenomikai vizsgálatok során alkalmazott technikák közül a QRT-PCR nyújtja a legjobban hasznosítható előnyöket, mint például reprodukálhatóság, nagy érzékenység és esetenként a viszonylag nagy áteresztőképesség. Azáltal, hogy akár 50-100 gént is lehet vizsgálni a QRT-PCR technikával, nagy hatékonysággal használható a szervspecifikus toxicitás vizsgálatában. Habár a DNS-chip technika is alkalmas arra, hogy meghatározzuk a genom teljes génjének kifejeződését, a közepes

áteresztőképessége és a magasabb költsége hátrányt jelent a QRT-PCR módszerrel szemben.

A hagyományos QRT-PCR technika jelenleg az arany standard a génexpresszió változás mértékének meghatározásában. A nagy érzékenységének, a reprodukálhatóságának köszönhetően pontosan vizsgálható 10-20 gén expressziós változása, ám a toxikogenomikai vizsgálatok szempontjából hátránya, hogy az áteresztőképessége alacsony illetve viszonylag kevés gén vizsgálható egyidőben több szervben. Ennek kiküszöbölésére kifejlesztettek egy olyan nagy áteresztőképességű, nano-kapillaris alapú QRT-PCR rendszert, mely a nanokapillaritás elvét kihasználva egyidőben akár 12800 reakciót is képes nagy precizitással és pontossággal futtatni párhuzamosan. Az extrém módon lecsökkentett reakció térfogatnak (33 nL) köszönhetően az egyszerre futtatható reakciók száma jelentősen megnövelhető és a csökkentett anyagigény miatt sokkal gazdaságosabban is kivitelezhető.

2.3. Az oxidatív stressz jelentősége a májsejtek patofiziológiai folyamataiban

A reaktív oxigén és egyéb gyököknek (ROS) meghatározó szerepük lehet különböző patológiás folyamatok kialakulásában, mint például a karcinogenezisben, a szív és érrendszeri megbetegedésekben vagy a különböző neurodegeneratív elváltozásokban. A reaktív oxigénszármazékok károsíthatják a lipideket, fehérjéket, a DNS-t és ezáltal a különböző sejtalkotókat. Az oxidatív stressz abban az esetben tud kialakulni, ha felborul az egyensúly a gyöktermelő folyamatok és az ezt kompenzáló antioxidáns rendszerek között, ami bekövetkezhet külső behatás, mint például kemoterápiás szer adása vagy olyan iszkémia/reperfúzióval járó nem környezeti behatásra, mint az infarktus.

Az esetek nagy részében a citokróm rendszeren keresztül történő reaktív oxigéngyök szivárgás miatt a mitokondriumot tartják a legjelentősebb gyökforrásnak. A mitokondriális légzési- vagy elektrontranszportlánc a mitokondriumok belső membrán rendszeréhez köthető, ahol annak komponensei, a redox folyamatokra képes prosztetikus csoportokat tartalmazó fehérjék találhatóak. A folyamatban a két elektrondonor a $\text{NADH} + \text{H}^+$, illetve a FADH_2 , amelyek egyszerre két elektront juttatnak a láncba. A biológiai oxidáció egységének ezt a két redukáló ekvivalenst tekintjük. A elektronok ezt követően a hem-csoportot tartalmazó citokróm molekulákon keresztül haladnak át, míg a protonok kijutnak a mitokondrium plazmaállományába és ott felhalmozódnak. A légzésiláncon áthaladó elektronok energiája lépésről lépésre

csökken, s ez az energia arra fordítódik, hogy a mitokondrium plazmaállományából a protonok a két membrán közötti térbe jussanak. A mitokondrium belső membránjának két oldala között koncentráció különbség alakul ki, melyet az ATP-szintáz molekula ATP szintézise közben csökkent. A mitokondriális légzésláncban a végső elektronakceptor az oxigénmolekula, melynek vízzé redukálásához négy-négy elektron és proton szükséges. Végső soron az oxigén redukálása vízzé jelentős energia felszabadulással jár, melynek egy része hő formájában felszabadul, míg jelentős hányada ADP molekulák ATP-vé alakítására használdik fel az ATP-szintáz működtetése során. Az ATP szintézis során több oxigén származék is keletkezik [25, 26]. A reaktív oxigéngyökök tehetők felelőssé több patológias elváltozás kialakulásáért [27]. A szuperoxid gyökök viszonylagosan hosszú féléletidejük (10^{-10} sec) [28] miatt lehetővé válik, hogy a sejten belül olyan helyekre eljussanak, ahol egyéb molekulákkal kölcsönhatásba tudnak lépni. Ilyenek például a lipidek, enzimek vagy olyan makromolekulák, mint a DNS. A sejtmembrán reaktív oxigéngyökökre adott érzékenysége nagyban függ a telítetlen zsírsav tartalmától. A kettős kötések a többszörösen telítetlen zsírsavakban bizonyos szintig megvédik a membránt a lipidperoxidáció károsító hatásaitól azáltal, hogy a kettős kötés felbomlásával egy elektront átad a gyöknek, ezzel stabilizálva azt. Ha az oxigén gyökök koncentrációja meghaladja a kettős kötések által biztosított védelem szintjét, a lipidperoxidáció tovább képes haladni és ezzel károsítani a membránt. A kettős kötés nélküli vagy csak egy kettős kötést tartalmazó zsírsavak is oxidálódhatnak, de esetükben a lipidperoxidációs reakciólánc nem tud elindulni [29]. A fehérjék szintén célmolekulái lehetnek a reaktív oxigéngyököknek. A fehérjéket ért oxidatív károsodás lehet közvetlen vagy közvetett, attól függően, hogy a gyökös reakció egy konkrét, tiol (-SH) csoportot tartalmazó aminosavat ért vagy pedig a ROS hatására a fehérje negyedleges szerkezetében áll be változás, vagy degradálódik illetve fragmentálódik az. A gyökös reakció végül a fehérje enzim funkciójának károsodásához vezet. A reaktív oxigéngyökök stabilitásuk ellenére kölcsön tudnak hatni a DNS molekulával is, amiben bázismódosításokat, töréseket, a dezoxiribóz cukorvázat illetve a DNS javító mechanizmusokat is károsíthatják [28].

A sejtek folyamatosan ki vannak téve a szabadgyökök károsító hatásainak, ezért a különböző antioxidáns védőmechanizmusok alakultak ki, amellyel hatékonyan tudnak védekezni. Az antioxidáns rendszerek olyan kismolekulák illetve enzimek, melyek képesek kijavítani a gyökös reakciók okozta károsodásokat vagy pedig különféle reakciókban megelőzik, hogy a szabadgyökök a célmolekulákkal kölcsönhatásba

lépjenek. Két nagy csoportját különböztethetjük meg, az antioxidáns enzimrendszereket és a kis molekulásúlyú antioxidánsokat. Az enzimrendszerek olyan közvetlen hatású fehérjéket foglalnak magukba, mint például a kataláz vagy a szuperoxid dizmutáz (SOD). Ez utóbbi az eukarióták esetében két alegységből épül fel és mindkét egységnek aktív antioxidáns működése van. Reakció centrumukban réz és cink atomok foglalnak helyet. A szuperoxid dizmutáz az oxigéngyököket elimináló reakcióban két szuperoxid gyökből H_2O_2 -ot állít elő. A keletkezett H_2O_2 -ot a kataláz enzim illetve a glutation peroxidáz semlegesíti. A kataláz enzimnek viszonylag alacsony az affinitása a H_2O_2 -hoz, melyet csak annak magasabb koncentrációja esetén képes eltávolítani a sejtéből. Ezzel szemben a glutation peroxidáznak már nagyobb az affinitása H_2O_2 -hoz, így azt már annak alacsonyabb koncentrációban való jelenlétekor is képes eliminálni. Ebben a reakcióban az elektron donor általában a glutation nevű kismolekula, amely a glutation peroxidáz kofaktora. A glutation közel millimoláris mennyiségben fordul elő az állati és növényi sejtekben. A glutation peroxidáz a reakció során két glutation felhasználása mellett képes egy H_2O_2 molekulát semlegesíteni [29]. A glutation, mely a kis molekulásúlyú antioxidáns csoport egyik képviselője, egy tiol-t tartalmazó tripeptid (glutaminsav-cisztein-glicin) redukált formája. Oxidációja során két glutation molekula alakít ki egy diszulfid hidat a ciszteinjeik között. Emellett fontos szerepet játszik a fehérjék pontos felcsavarodásánál, az intramolekuláris kötések kialakításánál és degradációjánál is [28, 30].

Az antioxidáns rendszerek elengedhetetlenek a normális sejt működés biztosításához aerob körülmények között. Az oxidatív és redukzív folyamatok szubcellulárisan egy jól szabályozott egyensúlyi állapotban működnek, melynek megbomlása a sejt reverzibilis vagy irreverzibilis károsodásához vezethet. Ennek a rendszernek a befolyásolása hatékony lehet például a rákos sejtek elpusztításában illetve a már fennálló oxidatív stressz során fellépő egyensúlyzavar visszafordítása megvédheti az olyan fontos szerveket, mint az agy vagy a szív.

2.4. Endoplazmatikus retikulum stressz

Az endoplazmatikus retikulum (ER) egy vakon végződő csövekből felépülő sejtalkotó, melyen zsákszerű kitüremkedések figyelhetők meg, amik széles, egymással összefüggő lemezrendszerre állnak össze. Formája és mérete jelentősen függ a sejt funkciójától. Ez a sejtorganelum felelős a fehérjék felcsavarodásáért, a fehérjék poszt-transzlációs módosításaiért, továbbá a lipid anyagcserében is jelentős szerepet tölt be.

Ez utóbbi szükséges például ahhoz, hogy a fehérjék a Golgi-apparátusba szállítódjanak, ahonnan vezikulákba csomagolódva a célhelyre szállítódnak. Az endoplazmatikus retikulum működésének zavara okozza az endoplazmatikus retikulum stresszt, melyről abban az esetben beszélünk, amikor valamilyen sejt belüli vagy kívüli hatás megzavarja a fehérjék felcsavarodását az endoplazmatikus retikulumon belül és így a helytelen konformációjú fehérjék felhalmozódnak. Az evolúció során olyan mechanizmusok alakultak ki, melyek eltávolítják a helytelenül feltekeredett fehérjéket illetve megkísérik visszaállítani az endoplazmatikus retikulum homeosztázisát. Ennek a kulcsfolyamata az angol szakirodalomban az UPR, „unfolded protein response”. Amikor az ER stressz tartósan fennáll illetve az újonnan termelődött fehérjék mennyisége jelentősen meghaladja az endoplazmatikus retikulum kapacitását, a sejt működésében zavar lép fel és akár a sejt halálát is okozhatja. Ha az UPR mechanizmus nem tudja megszüntetni az ER stresszt, abban az esetben aktiválódik az apoptózis belső (intrinszik) és külső (extrinszik) útvonala [31].

Az endoplazmatikus retikulum a kalcium fő tároló sejtorganeluma, mely fontos szerepet játszik különböző jelátviteli útvonalakban, így az ER stresszben is. Az már bizonyított, hogy az ER-ből felszabaduló kalcium olyan jelátviteli útvonalakat indít be, amelyeknek a végső eredménye a sejthalál mitokondriális úton keresztül megvalósuló útvonala [31].

A tumorsejtek jelentősebb növekedési ütemet mutatnak a normál sejtekhez viszonyítva, mely fokozott anyagcserével, metabolizmussal és a fehérjeszintézis felgyorsulásával párosul. Mindemellett a tumorok mikrokörnyezetére jellemző az elégtelen vaszkularizáció, melynek következménye az alacsonyabb oxigénnel való ellátottság illetve az intra- és extracelluláris kémhatás savas irányba való eltolódása. Ezek mind hozzájárulnak az endoplazmatikus retikulum stressz kialakulásához. Annak érdekében, hogy elkerüljék a helytelenül felcsavarodott fehérjék felhalmozódását, a gyorsan növekvő rákos sejtekben, megfigyelték, hogy az UPR mechanizmus jelentős citoprotektív szerephez jut [31]. Ezek a sejtek jellemzően érzékenyebbek is az UPR rendszert érintő károsodásokra is, így az olyan kismolekulákkal való kezelés, mely hozzájárulnak az ER stressz kialakulásához vagy az UPR mechanizmus működését gátolják, jó stratégiája lehet a rákos sejtek elpusztításának.

2.5. Hepatocelluláris karcinóma

A hepatocelluláris karcinóma (HCC) az ötödik legelterjedtebb rákfajta a férfiak körében, míg a nők esetében a kilencedik helyet foglalja el világviszonylatban, illetve az egyik vezető halálok a rákos megbetegedések közül [32, 33]. A hepatocelluláris karcinómák jelentős része idült hepatitisz B vagy hepatitisz C fertőzés által okozott krónikus hepatitisssel vagy májcirrózissal is társul [34]. A számos terápiás megoldás ellenére világviszonylatban a hepatocelluláris karcinóma a harmadik helyen áll a rákos megbetegedések által okozott halálokok között, melynek előfordulása és mortalitása a nyugati társadalomban folyamatosan nő. A vezető rizikófaktorok között szerepelnek a különböző hepatitiszfertőzések, úgymint a hepatitisz B és hepatitisz C, a nagymértékű alkoholfogyasztás és az általa okozott cirrózisok, a nem alkoholos zsírmáj (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD), elhízás vagy számos környezeti tényező, mint például a rákkeltő nitrozamin származékok. A hepatocelluláris karcinóma kialakulása egy több lépcsős folyamat eredménye, melynek hátterében nemcsak környezeti faktorok, hanem genetikai elváltozások is állnak, melyek végső soron együttesen okozzák a szerv kóros elváltozását [35]. Jellemzően a hepatocelluláris karcinóma rosszul reagál a különböző a kemoterápiás eljárásokra, és gyakran kiújul az érintett májlebeny eltávolítását követően is. A klinikai gyakorlatban a hepatocelluláris karcinóma kezelésére az egyik leggyakrabban alkalmazott kemoterápiás szer a doxorubicin. Emellett önálló és kombinációs kezelések formájában alkalmazzák a ciszplatin és fluorouracil szereket is. A kezelések ellenére is csak 10-20% között mozog a sikeresnek tekinthető kezelések aránya [36].

A májtumorokat csoportosíthatjuk az alapján, hogy milyen sejttípusból alakulnak ki. Sejttípust tekintve a mezenchimális illetve az epiteliális sejtekre jellemző, hogy valamilyen külső vagy belső hatásra transzformálódnak. A hepatocelluláris karcinóma a gyulladásos rák típusok közé sorolható. A krónikus gyulladást okozó környezeti faktorok hozzájárulnak a máj mezenchimális és epiteliális eredetű sejteinek a transzformációjához. A folyamatos sérülések és regenerálódások, melyeknek hátterében sokszor közvetve vagy közvetlenül az oxidatív stressz állhat, olyan károsodásokat okozhatnak a májsejtek genetikai állományában, amelyek különböző onkogéneket aktiválnak és/vagy tumorszupresszor géneket inaktiválnak. Ilyen útvonalak lehetnek többek között azok a szignalizációs kaszkádok, amelyek egy receptor tirozin kináz aktivációján keresztül beindítja Ras mitogén aktivált protein

kináz (MAPK) és a foszfatidil-inozitol-3 kináz- Akt-kináz (PI3K-Akt) útvonalakat. Ezen kaszkád mechanizmusok aktiválódása a Ras-Raf-ERK útvonalat indítja be és aktiválja a c-Fos protoonkogént illetve az AP-1 transzkripció faktorát és így okoz fokozott sejtosztódást. Ez az útvonal aktiválódik a hepatocelluláris karcinómák több mint 50%-ában. Emellett az esetek 40-50%-ban igazolták a PI3K-Akt kináz szignalizáció aktiválódását inzulin vagy inzulinszerű növekedési faktor receptoron keresztül (pl.: IGFR1), amely az mTOR (mammalian target of rapamycin) útvonalat gátolja és így inaktiválja a PTEN tumorszuppresszort és a karcinogenezist támogatja. És végül, de nem utolsó sorban a β -katenin aktiváló mutáció, amely aktiválja a Wnt jelátviteli utat a tumoros sejtekben, felelős nemcsak a májsejtek regenerációjáért, hanem a pluripotens és progenitor sejtek megújulásáért és fenntartásáért is egyaránt, ezzel hozzájárulva a májsejtek karcinogeneziséhez [37-39]. Mindezek mellett fontos szerepet játszik a karcinogenezisben, így a HCC kialakulásában is a p53 tumorszuppresszor mutációjának. A különböző forrásokból származó reaktív oxigén illetve nitrogén gyökök DNS károsító hatása jól ismert, melynek során a p53 génje sérülhet és onkogénné válhat. A p53 és a hozzá köthető intracelluláris mechanizmusok fontos szerepet játszanak az apoptózis indukcióban, a DNS sérülését követő javító mechanizmusok szabályozásában illetve a keletkezett mutációk fennmaradásának kivédésében. Működése szigorúan szabályozott többek között a Ras szignál útval irányából és szorosan kapcsolódik a sejtciklus szabályozásához is. Fiziológiai körülmények között a kismértékű DNS károsodás hatására a p53 fehérje indukálja a sejtciklus leállítását és serkenti a károsodás javításához szükséges fehérjék kifejeződését és megindítja a DNS javítást. Jelentősebb mértékű DNS törés hatására a p53 serkenti a proapoptotikus fehérjék kifejeződését és elindítja az apoptózis folyamatát. Patológiai körülmények között a p53 mutációja hozzájárul a mutációk genomban való felhalmozódásához és a klonális növekedéshez azáltal, hogy megakadályozza az apoptózisba való belépést. Emellett növeli a genom instabilitását és hozzájárul a sejtnövekedés szabályozás elvesztéséhez [40, 41].

2.5.1. Áttétek képződése a hepatocelluláris karcinóma során

A metasztázis képzés a különböző rákoknak, így a hepatocelluláris karcinómának is, olyan alapvető tulajdonsága, melynek során az eredeti tumorból egy vagy több daganatos sejt elszabadul és a szöveten belüli, lokális áttéket vagy a véráramba belépve és más szervekbe eljutva távoli áttéket képeznek a tumor

progresszió késői fázisában, amikor a daganat integritása már könnyen megbomlik [42]. A hepatocelluláris karcinóma egyaránt képez intra- és extrahepatikus metasztázisokat, mivel a transzformálódott hepatocitáknak nemcsak a proliferációs, hanem az inváziós képessége és motilitása is kimagasló. A betegséget okozó elsődleges tumor legtöbb esetben a tüdőbe ad távoli áttéteket [43].

A sejtnvázio és migráció végbemenetelének alap feltétele nem csak a citoskeleton aktív és jól szabályozott átalakulása, hanem az extracelluláris mátrix átalakítása is. A daganatos illetve a transzformálódott sejtek képesek megváltoztatni a közvetlen környezetük extracelluláris struktúráját, amely lehetővé teszi azt, hogy a metasztázisképzés során a daganatról leváló sejtek a szöveten belül invazívvá váljanak. Ennek során ezek a sejtek a citoskeletonjukat átrendezve különböző sejtnyúlványokat, lamellipodiumot és filopodiumot képeznek, melyek felületén jellemzően membránkötött proteázok és sejtadhéziós fehérjék találhatók. A migráló sejtek a sejtnyúlványaikat menetiránynak megfelelően előreterjesztve emésztik az extracelluláris mátrix fehérjét és alakítanak ki újabb és újabb sejt-mátrix kapcsolatot, majd aktív citoskeleton átrendezéssel mozdulnak előre. Ez a tulajdonság nem csak a metasztatikus sejtekre jellemző, hanem egészséges, motilis sejtek esetében is megfigyelhető [44]. Az utóbbi idők kutatásai azt mutatták, hogy az emlős sejtek, beleértve a rákos sejteket is, motilitásának, inváziós képességének, adhéziójának és proliferációjának szabályozásában jelentős szerepe lehet az mTOR jelátviteli útvonalnak. Az mTOR egy evolúciósan rendkívül konzervált, szerin/treonin kináz, melynek alapvető szerepe van a sejtnövekedésben, sejtosztódásban, a sejtek differenciálódásában és túlélésében, s mindemellett szabályozza a sejtek migrációját is. Számos tanulmány vizsgálta ennek a szignalizációs útnak a konkrét szerepét a rákos sejtek inváziójában és metasztázis képzésében. Az mTOR molekuláknak két különálló funkciója van, mely két külön komplexhez köthető (mTORC1 és mTORC2). Az mTORC1 szignálút felelős a sejtnövekedésért, a sejtek túléléséért és a sejt motilitásért, míg az mTORC2 a sejt túlélés mellett az aktin citoskeleton felépítéséért [45, 46].

A metasztázis kialakulása egy sor egymással átfedő folyamat eredménye, melynek során az elsődleges tumorból sejtek válnak ki és a szövetközi térben vándorolni kezdenek. A vér- és nyirokereket elérve beléphetnek a keringésbe, majd a szervezet egy távoli pontján egy kapillárisban csapódhatnak és ott mikrometasztázist képezhetnek. Ha a körülmények megfelelőek a kitapadt sejteknek, kolonizálhatnak és makrometasztázist képezhetnek. A daganatos sejtek mozgása hasonlóképpen folyik,

mint amit az egészséges sejteknél megfigyelhetünk olyan fiziológiás működések során, mint az embriógenézis, a sebgyógyulás vagy az angiogenezis. Ám a tumor sejtek esetében nem működnek azok a gátló folyamatok, amelyek az egészséges sejtek esetében leállítják a sejtek mozgását, amikor már arra nincs szükség. A tumorsejtek esetében olyan faktorok termelődése indul be, melyek elősegítik és fenntartják a migráció folyamatát. Ezek olyan autokrín fehérjék, melyeket a daganatos sejtek önmaguknak termelnek, hogy a migrációs működés fennmaradjon. Ezáltal tudnak folyamatosan invazívvá válni és migrálni [47, 48]. Emellett szükséges egyéb szignalizációs molekulák aktiválódása illetve integrinek és egyéb adhéziós fehérjék közreműködése is. Több olyan fehérjét és szignalizációs útvonalat azonosítottak napjainkig az mTOR mellett, amelyeknek szintén jelentős szerepe van a sejtek motilitásában. Ilyenek többek között a Ras jelátviteli útvonal foszfatidilinozitol-3-kináz útvonal, vagy protein-kináz B/Akt útvonalak is, melyek közvetlen vagy közvetett úton aktiválják a Rho útvonal fehérjéit, mint a RhoA vagy B, Cdc42 vagy Rac [44].

2.6. Hepatocelluláris karcinóma *in vivo* modellrendszerei

A hepatocelluláris karcinóma állatokban történő tesztelésére több olyan állatmodellt is kialakítottak, mellyel jól tanulmányozható a karcinogenezis kialakulásának lépései és megfelelő különböző rákellenes hatóanyag vizsgálatára. Az állatmodelleknek két nagy csoportját különböztethetjük meg. A kémiai tumorigenezis során az állatokat olyan kémiai ágenssel kezelik, melyet a máj enzimeit biológiailag aktívvá és így mutagénné és karcinogénné tesznek. Ez képes a máj sejtjeit károsítani azáltal, hogy DNS adduktokat képez, vagy enzimműködést befolyásol. Ennek során valamilyen karcinogén vegyülettel, szén-tetrakloriddal (CCl₄) vagy dietilnitrozaminnal (DEN) indukálják a hepatocelluláris karcinómát. Mind a CCl₄, mind pedig a DEN vegyületekkel való kezelés esetében a májban történő biokonverzió eredményeként létrejövő metabolit az, amely a májban gyulladásos elváltozásokat és a későbbiekben karcinogenezist okoznak. Ezek a modellek jól kombinálhatók a betegség transzgenikus modelljeivel is [49].

A másik nagyobb állatmodell a hepatocelluláris karcinóma tanulmányozására, amikor májtumorból izolált sejteket ültetünk be az állat szervezetébe. A beültetésre kerülő sejtek lehetnek allogén illetve xenogén típusúak. Az allogén eredetű sejtek esetében a tumoros sejt a modell állattal fajazonos. Ezzel szemben a xenogén eredetű rákos sejtekkel kialakított modellben a beültetett sejtek fajidegenek. A

xenotranszplantáció esetén van lehetőség arra, hogy immunhiányos egerek szervezetébe humán eredetű rákos sejtvonalat vagy humán tumorból izolált sejteket ültessünk be. A tumorsejtek beültetésével kialakított állatmodellek esetében megkülönböztetünk ektopikus, azaz nem szövet-azonosan (pl. szubkután), vagy ortotopikusan, azaz szövet-azonosan beültetett modelleket. Az ektopikus modell kivitelezése egyszerűbb, de a beültetett daganat a szövet azonos sejtektől megfosztva növekszik és kevésbé feleltethető meg a humán betegséggel [49]. Továbbá, az a tapasztalat, hogy az ektotopikus tumorok gyorsabban növekednek, de áttéteket ritkábban adnak. Az ortotopikusan kialakított modell már közelebb áll a vizsgálni kívánt humán betegséghez, hisz ebben az esetben a tumor eredetével azonos szövetbe ültetik a rákos sejteket. De ebben az esetben a sejtek növekedését kezdetben korlátozza, hogy a tumor egy egészséges, nem transzformált, tumoros közeggel még nem érintkezett sejtek szomszédságába került, amelyek nem termelik azokat a növekedési faktorokat a számukra, amely az optimális tumor növekedéshez szükséges. Heindryckx és mtsai azt állapították meg, hogy ha a primer tumor vagy a hepatocelluláris karcinóma sejtvonalak valamelyike egy előzőleg CCl₄ kezeléssel fibrotikussá tett májszövetbe ültetették, ott jelentősen jobb növekedési ütemet és jelentősebb metasztatikus hajlandóságot tudtak elérni [49]. Ennek oka abban keresendő, hogy amikor egy szövet fibrotikussá válik, a jelenlévő sztróma sejtekben a sebgyógyulásra jellemző fenotípusos változások játszódnak le. Az ekkor kialakuló miofibroblasztok, fibroblasztok és beáramló immunsejtek a rákos sejtek számára fontos növekedési faktorokat termelnek, mint például vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), tumor növekedési faktor béta (Tgf- β) vagy az epidermális növekedési faktor (EGF). Ezért ez a modell hisztológiaiailag is jobban megközelítette a humán hepatocelluláris karcinómánál tapasztalt elváltozásokat.

A karcinogén vegyületek által indukált modellek esetében a karcinogén anyagoknak két csoportját lehet megkülönböztetni Pitot és Dragan munkássága alapján: (a) olyan genotoxikus vegyületek, melyek önmagukban is képesek a májsejtek DNS állományában hibákat okozni és generálni a karcinogenezist illetve (b) segédanyagok, amelyek önmagukban nem karcinogének, vagy nem elegendőek a neoplasztikus fókusz kialakítására, de tumorképző hatásukat egy hepatotoxikus anyag megnövelheti. Ezekből következően a májban lehetőség nyílik egy preneoplasztikus sejt kialakulására és klonális felszaporodására és végül a hepatocelluláris karcinóma kialakulására. A kémiai ágensek által kialakított modellek nagy előnye az emberi fibrotikus máj elváltozásokhoz

való hasonlóság [49]. A modell kialakításához legelterjedtebben alkalmazott ágensek a dietilnitrozamin és a szén-tetraklorid mellett az aflatoxin és a tioacetamid. Ám a legmegbízhatóbb modellt a DEN kezelés adja. Hátrányaként érdemes megjegyezni, hogy a kialakult tumor heterogén és többnyire ismeretlen genetikai háttérű tumorok képződnek, ami egy célzott tumorelles szer vizsgálatát nehezíti.

Kísérleteinkhez a DEN által indukált modellt alkalmaztuk, egy olyan transzgenikus modellel, amelyben a Matrilin-2 génje mesterségesen ki van ütvé. A DEN használata széles körben elterjedt a kísérletes hepatocelluláris karcinóma állat modelljének kiváltásában. A 2 hetes állatoknak intraperitoneálisan beadott DEN a 8. hónapra tumorokat alakít ki a májban [50]. A DEN-nek önmagában nincs karcinogén hatása, a májban a citokróm-P450 enzim alakítja át aktív formává, ami már képes tumorigenezisre. Az aktív formája DNS adduktokat képez a májsejtekben, amely alkiláción megy keresztül és preneoplasztikus régió kialakulásához vezet [51].

A Matrilin-2 fehérjének (Matn2) fontos szerepe van az extracelluláris mátrix kialakulásában, ám megfigyelték, hogy a fehérjét kódoló gén kiütése még nem okoz jelentős szervrendszeri elváltozást az egerekben sem az embrionális, sem pedig a posztembrionális kori szerv kialakulásban és fejlődésben [52].

Az extracelluláris mátrix átszerveződésének nemcsak a sebgyógyulásban, de a tumor képződésben is jelentős szerepe van. A Matrilin-2 mutáns egerekben, annak ellenére, hogy nem volt fellelhető szervi és szervrendszeri elváltozás vad típusú alomtársaikhoz hasonlítva, azt feltételezték, hogy másként viselkednek egy tumor modellben. Mátés és mtsai hipotézise szerint a felállított mutáns egértörzs jó megfigyelési lehetőséget nyújt a sebgyógyulás, a csonttörés [52] és egyéb olyan patológiás elváltozások tanulmányozásában, ahol elengedhetetlen az extracelluláris mátrix újraszerveződése illetve átrendeződése, így a modell feltételezhetően befolyásolja a tumor-sztróma kölcsönhatást és ezáltal a tumor fejlődését is. A Matn-2 egy olyan nem kollagén típusú glikoprotein adaptor fehérje, melynek fontos szerepe van az extracelluláris mátrix kialakulásában. A májban az ún. ovális sejtek, melyek a máj progenitor sejtjei, termelik a májregenerációja során [53]. A von Willebrand faktor A szerű doménjével képes kölcsönhatni az extracelluláris mátrix-szal és hídszerű keresztkötéseket kialakítani kollagén molekulák és egyéb proteoglikánok között [54]. Ez a fehérje többféle tumorban is expresszálódik, többek közt asztrocitómákban, és más agyi tumorokban [55]. Emellett májcirrózis és hepatocelluláris karcinóma esetén is expressziójának jelentős növekedését figyelték meg [56]. Fiziológias körülmények

között a portális erek falában található meg nagy mennyiségben, ami HCC esetén a tumor ereire jellemző inkább [56].

Azokban az egerekben, ahol a matrilin-2 génjét kiütötték, nem volt jelentős változás a szervek felépítésében és működésében, beleértve a májat is. Bár a mutáns egerek májában a 10. hónap környékén neoplasztikus fókuszok voltak megfigyelhetők, amely arra utalt, hogy ennek a génnek az inaktiválása megnöveli a májsejtek proliferatív képességét [57]. Abban az esetben, amikor ezeket az egereket DEN-nel kezelték, a májtumorok az esetek 100%-bán kialakultak, melyek nem csak számban, hanem méretben is felülmúlták a vadtypusét. Ebből arra lehet következtetni, hogy a *Matn2*^{-/-} egerek jóval érzékenyebbek a DEN-re [57]. Ez alapján a kísérleteink elvégzésére és a májtumor ellenes hatóanyagok szűrésére ezt a modellt találtuk a legalkalmasabbnak.

A DEN egy olyan karcinogén tulajdonságokkal rendelkező molekula, amely a biokonverzióját követően a DNS-t alkilálja és azzal adduktokat képez. Állatmodellekben elterjedten használt karcinogén, ami proliferatív és neoplasztikus léziókat okoz a májban. A DEN indukálta hepatocelluláris karcinóma modell karakterisztikája, proteomikai tulajdonságai jól megfeleltethetők a humán májkarcinóma tulajdonságaival. A DEN önmagában nem vagy csak kismértékben karcinogén. Ahhoz, hogy aktív rákkeltő hatását elérje egy enzimatisz átalakítására van szükség, melyet a citokróm-P450 izoenzimek, többek között a CYP2E1, CYP2A5, CYP2A6 enzimek végeznek. Tulajdonképpen a DEN ((C₂H₅)₂NNO) karcinogén hatása azon alapul, hogy oxidációjának végtermékeként aktív alkil-gyök szabadul fel, mely a DNS valamely bázisához kötődve adduktot képez, és így okoz mutációkat. A DEN aktiválódását az emberi szervezetben is a CYP2E1 illetve a CYP2A6 izoenzimek végzik egy hidroxilációs reakció során [51, 58]. A biokonverzió első lépése a CYP enzimek által katalizált α -hidroxiláció, melynek eredménye egy hidroxil-nitrozamin. A DNS addukt képzés egy köztes etil-diazonium ion kialakulásán és nitrogén átrendeződésen keresztül valósul meg [51]. A biológiai átalakításban résztvevő két izoenzim átfedő szubsztrát specifitással rendelkezik. Ezek az enzimek jelentős szerephez jutnak az emberi szervezetben is egyéb nitrozo-vegyületek metabolizmusában és eliminálásában.

Patkányokban már a kezelést követő 4. hónapban kimutathatóak voltak, olyan májterületek, ahol a hepatociták megváltozott működést mutattak illetve a 8. hónapra már jól azonosítható makroszkópikus tumorok alakultak ki [59]. Megfigyelték, hogy a

DEN egyszeri alkalmazása is megemelte a patkányok májának mezenchimális sejteiben a p53 expresszióját, melyről úgy gondolják, hogy a karcinogenezis korai szakaszában a károsodott sejtek apoptózisba való beléptetése a feladata. A p53 károsodása illetve csökkent működése hosszútávon hozzájárul a tumorsejtek túléléséhez és támogatja a májkarcinóma kialakulását [60]. Hatásmechanizmus szempontjából a kutatások azt találták, hogy a dietilnitrozamin első lépésben α -hidroxilálódik a fentebb említett citokróm P450 különböző izoenzimjei által, s így α -hidroxilnitrozaminná alakul. Ebben a formában képes DNS-t alkilálni és DNS adduktot képezni. A DEN ilyen módú biokonverziója minden olyan szövetben és sejtben megtörténik, amelyben aktív citokróm P450 működés található.

Tehát abból a megfigyelésből kiindulva, hogy a hepatocelluláris karcinóma sejtek jelentősen jobban növekednek cirrotikus körülmények között illetve, hogy a kémiai ágensekkel, kiváltképp DEN-nel indukált hepatocelluláris karcinóma jól modellezi a humán betegséget, arra a döntésre jutottunk, hogy kísérleteinkhez a HCC-t Matn2^{-/-} egértörzsön alakítjuk ki DEN segítségével.

2.7. Talidomid analógok kemoterápiás szerepe

A talidomid ((RS)-2-(2,6-dioxopiperidin-3-il)-1H-izindol-1,3(2H)-dion) először a 1957-ben jelent meg a klinikai alkalmazásban Contergan néven. Nyugtató hatását először a várandós kismamák reggeli rosszulléte és émelygése ellen alkalmazták. Emellett az inszomnia, szorongás kezelésére és görcsoldásra is gyakran alkalmazott szer volt [61]. Az eladást követően hamarosan fény derült a súlyos mellékhatásaira. Bevezetését követő években több ezer gyermek született végtag, szem és szív malformitásokkal. Utólagos vizsgálatok során kiderült, hogy a racém formában formulált hatóanyagnak csak az egyik enantiomerje okozza a mellékhatásokat. A későbbiekben egyre több egyéb hatást is azonosítottak, amelyek különböző betegségeknél hasznosnak bizonyulhatnak. Tanulmányok és klinikai vizsgálatok sora mutatta ki, hogy a talidomid hatásos a lepra, mieloma multiplex kezelésére, HIV kísérő tüneteinek enyhítésére és nem utolsósorban a rák egyes fajtáinak kezelésére [62-65]. A 90-es évek elejétől kezdődött el a komolyabb kutatás a talidomid rákkezelésbe való beillesztésével kapcsolatban. D'Amato és mtsai azt találták, hogy a talidomidnak angiogenezist gátló hatásai is vannak [66]. A feltevésüket sikeresen bizonyították rágszáló modellen. Továbbá kimutatták, hogy angiogenezist gátló hatását a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) mediálta útvonal gátlásán keresztül éri el [64]. A

talidomid érképződést és tumor növekedést gátló hatása tovább volt növelhető, ha dexametazonnal vagy nem-szteroid gyulladáscsökkentőkkel kombinálva alkalmazták [67, 68]. A talidomid pontos hatásmechanizmusa teljességében még nem ismert, de az érképződést gátló hatása mellett az oxidatív stressz indukálását tartják az egyik fontos hatásának. mRNS szinten gátolja a tumor nekrosis faktor- alfa (TNF- α) termelődését, azáltal, hogy indukálja a TNF- α mRNS-ének degradációját. Továbbá az I κ B kináz aktivitásának gátlásán keresztül blokkolja az NF- κ B útvonalat is, mellyel befolyásolja a sejtek életképességét, proliferációját, túlélését, citokinek termelődését [69]. A klinikai vizsgálatok a mielóma multiplex esetében tudtak jelentősebb pozitív hatást kimutatni a talidomid molekulával való kezelést követően. A kutatási eredmények alapján indokoltta vált talidomid alkalmazása és analógjainak vizsgálata a rákkutatásban. Az érképződést gátló, oxidatív stresszt okozó és immunválasz moduláló hatásai alapján az FDA (Food and Drug Administration, USA) az alap molekulát 1998-ban engedélyezte az újonnan kialakult mielóma multiplex kezelésére, s ettől fogva kezdődött el a törekvés a potensebb illetve kisebb mellékhatásokkal rendelkező analógok kutatására és fejlesztésére.

A jelenleg forgalomban lévő talidomid analógok (lenalidomid, pomalidomid, apremilast) teljes hatásmechanizmusa szintén nem ismert, de feltehetőleg több támadásponton és több kaszkádméchanizmus befolyásolásán keresztül fejtik ki a hatásukat. Ilyen támadáspontok lehetnek az angiogenezis befolyásolása, a gyulladás mediátor citokinek termelődésének megváltoztatása, a T-sejtek aktiválásán keresztül az immunválasz modulálása vagy az apoptózis kaszkád rendszerének beindítása. Számos tanulmány foglalkozott a talidomid és főképp az analógjainak az érképződésre kifejtett hatásával. Vizsgálták többek között a VEGF-re kifejtett hatását. A VEGF egy olyan autokrín módon is hatni képes növekedési faktor, melyet a tumorok nagy mennyiségben képesek termelni és a hatására létrejövő új ereknek köszönhetően fenntartani a nagyütemű növekedésüket, kielégíteni a magasabb oxigén és tápanyagigényüket. Emellett az endotél sejtek migrációjának lefolyásában résztvevő egyéb molekulák, mint a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) és az interleukin-6 (IL-6) molekulákra kifejtett hatását is vizsgálták. A bFGF a lamina bazalis termelésének szabályozását végzi a fibroblaszt sejtekben illetve felelős a szubendoteliális extracelluláris mátrix kialakulásáért. A tumorsejtek és a környezetükben lévő sztróma sejtek között különleges kapcsolat áll fenn. Gyakori, hogy a tumorok átprogramozzák a környezetükben lévő fibroblasztokat és ezekben a tumor asszociált sejtekben

jelentősebb lehet a bFGF illetve az IL-6 jelmolekulák termelődése illetve kifejeződése [70]. Megfigyelték, hogy a talidomid analógok gátolják az NF- κ B normális működését az IL-6 útvonal megzavarásán keresztül, mellyel tovább csökkentik a kóros angiogenezis lefolyását [71, 72], míg az immunrendszer működését befolyásoló hatásuk során különböző pro- és antiinflammatorikus citokinek termelődését, úgymint az IL-1 és IL-6, IL-10 vagy a TNF- α . Továbbá kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között a talidomid és analógjai a kaszpáz-8 útvonalat aktiválja és belépteti a sejtet az apoptózisba. Emellett a kaszpáz-9 aktivitását is megnöveli [73].

Jelenlegi eredmények alapján megalapozottnak látszott a talidomid molekula analógjainak szintézise és hatástani vizsgálata annak érdekében, hogy a hatásmenyevelés mellett az esetleges mellékhatásokat csökkentse. Az Avidin Kft –ben 60 különböző talidomid analógot szintetizáltak. Munkánk során célunk volt olyan talidomid alapú molekula könyvtár szűrése, melynek tagjai közül olyan molekulák kerülhetnek ki, melyek az alapvegyület hatását felülmúlják és/vagy a célspecificitását növelik, és amelyek kiindulópontjai lehetnek új, tumorellenes hatóanyagok kifejlesztésének.

3. CÉLKITŰZÉS

Doktoranduszi munkám során célul tűztük ki újonnan szintetizált talidomid analógok hatástani vizsgálatát különböző típusú nagy áteresztőképességű vizsgálati módszerekkel. A végpontmérésen alapuló biokémiai tesztekkel kiszűrt és hatásosnak bizonyuló molekulák kinetikáját egy valós idejű mérést lehetővé tevő citotoxicitási panelen (RTCA SP, Real-time Cell Analyzer; Roche) is tesztelni kívántuk. Majd végül a leghatásosabb molekulákat *in vivo*, egér tumor modellen is terveztük megvizsgálni. A vizsgálataink öt részre oszthatóak:

3.1. Újonnan szintetizált talidomid analóg vegyületek szűrése végpontmérésen alapuló technikákkal

A kismolekulák szintézisének eredményképpen keletkező molekula könyvtár tagjairól első lépésben meg kell bizonyosodni, hogy valóban rendelkeznek biológiai aktivitással, illetve meg kell állapítani a hatásos koncentrációt. Erre a célra elterjedten alkalmazzák a különböző végpontmérési technikákat, melynek során a molekulákat növekvő koncentrációban tesztelik a vizsgálni kívánt sejteken. Munkám során a különböző talidomid analógok hatását MTS kolorimetriás végpontméréssel vizsgáltam.

3.2. Hatásos talidomid analógok vizsgálata valós idejű, jelölésmentes mérési technikával (RT-CES)

A hatásos talidomid származékokat célunk volt tovább vizsgálni egy olyan rendszeren, amely információt szolgáltat a molekula hatásának időbeli lefutásáról is és nem igényel kémiai jelölést. Erre a célra optimalizáltunk egy olyan valós idejű mérést lehetővé tevő rendszert, amely akár perces felbontással is képes adatokat nyújtani a sejtek kezelésre adott válaszáról. Több, a biokémiai paraméterek mérése alapján toxikusnak bizonyuló talidomid analóg vizsgálatát követően két molekulát, az Ac-915-öt és Ac-2010-et elemeztük részletesebben a későbbi kísérleteinkben.

3.3 Ac-915 talidomid analóg hatástani vizsgálata toxikogenomikai módszerrel

Célunk volt megvizsgálni nagy áteresztőképességű toxikogenomikai vizsgálati módszerekkel az Ac-915 talidomid analóggal való kezelés különböző létfontosságú szervek génexpressziójára kifejtett hatását.

3.4. Talidomid analógok intracelluláris lokalizációjának és kölcsönható partnereinek vizsgálata

Az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analógok intracelluláris célmolekuláinak meghatározását hullámhossz rezonancia eltolódás mérésén alapuló (Resonant Waveguide Biosensor) technikával kívántuk meghatározni.

A kölcsönható partnerekhez kötődő molekuláris mechanizmusok megismerése céljából célunk volt megvizsgálni az Ac-915 és Ac-2010 sejteken belüli lokalizációját is. Illetve az előzetes ismeretek alapján célunk volt az intracelluláris antioxidáns rendszerre kifejtett hatásukat is meghatározni.

3.5. Talidomid analógok *in vivo* hatásának vizsgálata hepatocelluláris karcinóma egér modellen

A különböző kemoterápiás szerek *in vivo* modell rendszeren való vizsgálatára széles körben állnak rendelkezésre különféle karcinogén vegyülettel indukált májtumor rágszáló modellek. Az előzetes eredmények alapján célunk volt megvizsgálni az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analóg hatását a hepatocelluláris karcinóma DEN vegyülettel kiváltott Matn2^{-/-} egér modelljén is.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Sejtek tenyésztése és fenntartása

A kísérleteinket Hep3B, HepG2 és Huh7 (ATCC, USA) humán hepatocelluláris karcinóma sejteken végeztük. A hepatocelluláris karcinóma sejtek Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, high glucose) (Gibco, Carlsbad, CA, USA) és Nutrient Mixture F-12 Ham (Sigma, St. Louis, MO, USA) médiumok 1:1 arányú keverékében nőttek, melyet Penicillinnel (50 IU/ml), Streptomycinnel (50 mg/ml) és 10% borjú savóval (Fetal Bovine Serum, FBS) (Gibco, Carlsbad, CA, USA) egészítettünk ki. A sejteket sejtenyészítő inkubátorban 10 cm² felületű szövettenyészítő csészékben növesztettük és tartottuk fenn, ahol az atmoszféra 5% CO₂ –ot tartalmazott és a hőmérséklet 37°C –ra volt beállítva. A sejteket a végpontmérésen alapuló vizsgálati módszerekhez 96-lyukú mikrotiter lemezekbe szélesztettük a kezelést megelőző napon és a sejtek kezelését követően 72 órán át inkubáltuk a különböző tesztelendő anyagokkal. A valós-idejű sejtleletképeség méréshez a sejteket speciális 96-lyukú mikrotiter lemezekre (E-plate) szélesztettük. A sejtek szélesztését megelőzően az E-plate alján található elektróda hálózatot 0,2% I-es típusú kollagénnel (PBS-ben oldva) felület kezeltük 30 perc időtartamra. A háttérmerést követően a sejteket 6000 sejt/lyuk koncentrációban raktuk ki az E-plate-re. Egy nap növekedést követően a sejteket a kívánt vegyületekkel kezeltük és 72 órán át regisztráltuk az életképeségüket.

4.2. MTS kolorimetriás végpontmérési technika

A citotoxicitási vizsgálatokhoz és a valós idejű sejtleletképeség mérés validálásához CellTiter 96 MTS kolorimetriás sejtproliferációs tesztet használtunk. A mérésekhez az Ac-915 és Ac-2010 anyagokból 10 mM-os törzsoldatot készítettünk DMSO-val (Sigma-Aldrich Kft., Magyarország). A kezelést megelőző napon 96-lyukú szövettenyészítő lemezekbe kirakott sejteket mikromoláris és szubmikromoláris koncentrációban kezeltük meg a referencia vegyületekkel (lenalidomid, doxorubicin, ciszplatin) vagy talidomid analógokkal. 72 óra növekedést követően az alkalmazott anyagok toxikus hatásának mértékét CellTiter 96 (Promega, Bio-science Kft. Magyarország) MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazolium) kolorimetriás sejtproliferációs esszével mértük meg. A sejtek 1 órát voltak inkubálva az MTS/PMS eleggyel sejtinkubátorban, majd pedig a

keletkezett formazán mennyiségét 690 nm-en mértük Powerwave spektrofotometriás készülékkel (Biotek, Winooski, USA).

4.3. Sejtek valós idejű életképességének (RTCA-SP) és migrációs képességének (RTCA-DP) mérése

A valós idejű sejtéletképesség méréshez a Roche xCELLigence SP és DP (ACEA-Roche, Roche Magyarország Kft., Magyarország) készüléket használtuk, mely a sejtek vezetőképességének változása alapján ad információt a sejtek életképességéről. A sejtek szélesztését megelőzően a speciális 96-lyukú mikrotiter (E-plate) és a 16-lyukú migrációs lemezeket 0,2%-os I-es típusú kollagénnel fedtük, majd 30 percig a sejtinkubátorban állni hagytuk. A sejtmentes háttér ellenállást 10 percig mértük 1 perces időközönként. A sejtek kiszélesztését követően 1 órát állni hagytuk az RTCA-SP rendszer esetén az E-platet, hogy a sejtek letapadjanak, majd megkezdtük a méréseket. A sejtek kezelését minden esetben a szélesztést követő nap reggelén végeztük el. A talidomid analógokat mikromólos és nanomólos koncentrációban alkalmaztuk az *in vitro* méréseink során. A méréseket 72 órán át folytattuk.

A citotoxicitási kísérletekhez HepG2, Hep3B és Huh7 humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonalakat alkalmaztunk. A kísérletet megelőző napon a már fentebb említett módon előkészített E-plate-be 4000 sejt/lyuk koncentrációban szélesztettük ki a sejteket, majd egy éjszakán át hagytuk növekedni inkubátorban, mialatt 5 perces időközönként regisztráltuk a sejtek letapadásának erősségét. Másnap a sejteket megkezeltük különböző, előre meghatározott koncentrációjú tesztanyaggal 10 µl térfogatban. A kísérletet 72 órás utókövetési szakasz zárta le, mely alatt az első 12 órában 5 percenként, majd a 13. órától 10 percenként regisztráltuk a sejtek életképességét.

Az RTCA-DP rendszerrel végzett migrációs mérések esetében 16000 sejtet szélesztettünk ki lyukanként 150 µl savómentes tápoldatban a speciális migrációs lemezre. A sejtek szélesztését megelőzően, a szérumentes tápoldatba belemértük a kezelő anyagokat, majd ezt követően azonnal elkezdtük a sejtek migrációjának mérését. A sejtek mozgását az első 24 órában percenként, majd az ezt követő 48 órában 5 percenként regisztráltuk.

4.4. RNS izolálása toxikogenomikai vizsgálatokhoz

Szívszövetből az RNS izolálást Faragó és mtsai publikációja alapján végeztük [74]. Az alkalmazott eljárás a High Pure miRNA Isolation Kit (Roche Magyarország Kft., Cat. No. 05080576001) továbbfejlesztett, javított változata, melynek során több új lépést is beillesztettek. A szívszövetet folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és azon a hőmérsékleten homogenizáltuk. A porított szövet 50 mg-jához 190 µl proteináz K oldatot adtunk és 30 percig 50°C-on inkubáltuk. Ezt követően 325 µl kötő pufferrel (Binding buffer, Roche Magyarország Kft.) és 320 µl kötődés segítő puffer (Binding enhancer, Roche Magyarország Kft.) hozzáadása mellett a mintákat filter oszlopra kötöttük fel. Az oszlop két lépésben, először 500 µl, majd 300 µl mosó pufferrel (Wash buffer, Roche Magyarország Kft.) volt mosva és végül 40 µl elúciós pufferrel volt eluálva. A minőségi és mennyiségi ellenőrzést Nanodrop spektrofotometriás eszközzel végeztük. Az elfogadható minőséget 260/280 abszorpciós hányados esetében > 1,8 határoztuk meg.

Az agyszövetet Trizol (Sigma-Aldrich Kft.) reagensben, míg a máj és vese szövetet RA1 pufferben (Macherey-Nagel, Biotech Hungary Kft., Magyarország) homogenizáltuk. Teljes RNS-t (kontroll és anyagkezelt mintákból egyaránt) AccuPrepTM RNS tisztító kittel (Bioneer, Korea) izoláltuk a gyártó által előírt protokoll alapján, azzal a különbséggel, hogy a mintákon DNáz kezelést hajtottunk végre. Ehhez első lépésként a homogenizátumot NucleoSpin szövetszűrő (Macherey-Nagel) oszlopra vittük fel és 13000 rpm fordulaton centrifugáltuk 3 percig. A csapadékot β-merkaptóetanollal kiegészített RA-1 lízis pufferben oldottuk fel újra. Az extrakciós oszlopra (Bioneer Viral RNA Extraction Kit, Bioneer, Korea) való felkötést megelőzően megegyező mennyiségű 70%-os etanollal vortexeltük össze. Ezt követően 80%-os etanollal mostuk, majd szobahőmérsékleten 15 percig kezeltük DNáz oldattal. Reakciót RA1: EtOH (1:1) oldattal állítottuk le, majd centrifugáltuk a mintákat. Végül kétszer mostuk az oszlopokat mosó pufferrel (Wash buffer 2, Bioneer) és 50 µl RNáz mentes vízzel eluáltuk.

QRT-PCR reakcióhoz 750 ng totál RNS-t írtunk át cDNS-sé High-Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies Magyarország Kft., Magyarország) segítségével.

4.5. Génexpressziós profil vizsgálat nagy áteresztőképességű nanokapilláris QRT-PCR módszerrel

A minták amplifikációját OpenArrayNT Cyclor készülékkel (BioTrove, Woburn, MA; Thermo Scientific, MA, USA) valós időben vizsgáltuk. Vizsgálatainkhoz Taqman próbákat állítottunk össze (2. táblázat). Az OpenArray lemezek elkészítéséhez a Taqman próbákat és a hozzájuk tartozó primer párokat megküldtük a BioTrove cég részére, ahol az igény szerinti mintázatban legyártották a lemezeket. A Taqman assay reakció keveréket kiegészítettük ROX fluoreszcens festékkel is, annak céljából, hogy ellenőrizni tudjuk a reakciók összeállításának hibátlanságát.

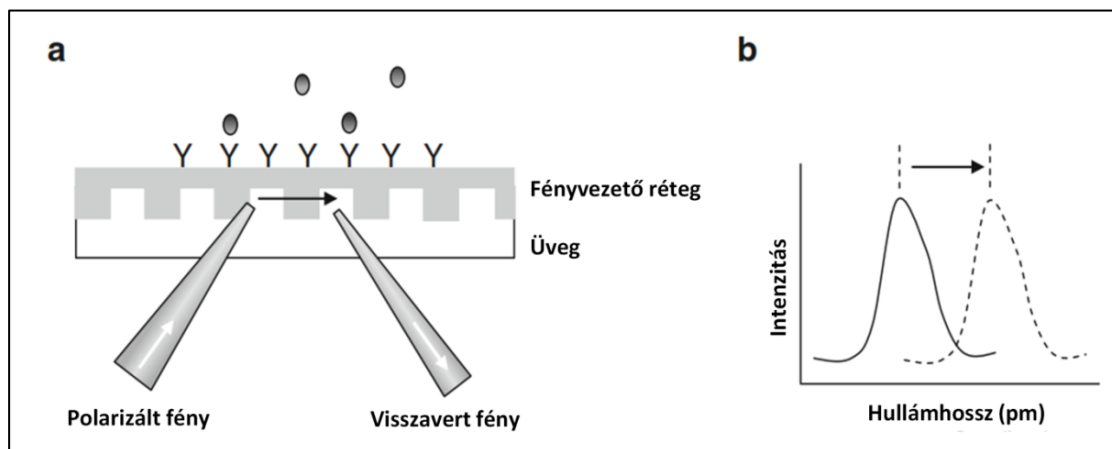
A reverz transzkripcióval előállított mintákat (vagy a templatmentes kontrollhoz a vizet) 384 lyukú lemezekbe mértük be. Minden lyuk tartalmazta a reakciók futásához szükséges GenAmp Fast PCR Master Mix oldatot (Life Technologies Magyarország Kft.) és az OpenArray DLP 5x Remix oldatot (BioTrove). Az OpenArray feltöltő egység segítségével, kapillaritás elvén alapulva, a vizsgáló nanokapilláris lemez lyukait a megfelelő mintával és reakció keverékkel töltöttük fel. A lemez minden egyes almatríxa 5 µl reakciós keveréket és 1,2 µl cDNS mintát tartalmazott. A mintafelvétel után egy speciális tartókeretbe helyeztük a lemezt, majd optikailag inert olajjal töltöttük fel és ultraibolya fényre szilárduló ragasztóval lezártuk. Az amplifikációs reakciók az OpenArray NT készülékben történtek az alábbi körülmények között: 50°C 15 másodperc, 91°C 10 perc, majd 50 ismétlésben 54°C 170 másodperc és 92°C 45 másodperc követte egymást.

A Biotrove OpenArrayNT Cyclor System szoftvere tartalmaz egy algoritmust, amellyel meghatározható a C_T érték (Cycle threshold) a számított C_T konfidencia (megbízhatóság) értékek alapján. A QRT-PCR kísérlet kiértékelése során azokat az értékeket tekintettük pozitív eredménynek és analizáltuk tovább, melyek C_T konfidencia értéke legalább 300 volt. Az ez alatti értékeket háttérnek tekintettünk. Az eredményeinket három háztartási gén (*pipa*, *pgk1* és *rplp0*) átlagához normalizáltuk és a gén kifejeződéseket négy biológiai ismétlés átlagából számítottuk. Az átlag értékeket akkor fogadtuk el, ha standard deviancia értéke alatta volt az átlag érték félszeresének.

4.6. Hullámhossz rezonancia eltolódáson alapuló bioszenzor technika

A két talidomid analóg kölcsönható partnereit rezonancia eltolódáson alapuló bioszenzor (Resonant Waveguide Optical Biosensor; Perkin Elmer, Per-form Kft, Magyarország) technikával vizsgáltuk. A vizsgálat során a speciális 384-lyukú optikai

lemez lyukainak felületéhez 10 μ l 50 μ g/ml humán rekombináns HSP70 (Sino Biological, Peking, Kína) vagy 100 μ g/ml humán rekombináns HSP60 vagy HSP90 (Sino Biological) hősokk fehérjét kötöttünk ki. A hősokk fehérjék 20 mM pH 5.5 kémhatású nátrium-acetát oldatban oldottuk. Az optikai mikrotiter lemezbe mért fehérjéket egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk, majd másnap háromszor mostuk az esszé pufferrel (PBS, pH 7,4; 0,005% Tween 20; 3% DMSO). A háttér mérést 25 perc hőmérséklet ekvilibrálás előzte meg, melynek során az optikai lemezt az Enspire Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) készülék kamrájába helyeztünk, amelyet állandó hőmérsékletre állítottunk be. Végül 15 μ l reakció pufferben oldott különböző koncentrációjú Ac-915 vagy Ac-2010 anyagot mértünk a kikötött fehérjékhez. A rendszer alapja egy speciális optikai lemez, melynek aljára egy optikai/fényvezető réteg van fektetve, mely ismert fénytörő képességgel rendelkezik. A készülék a visszavert fény hullámhosszának fehérje-fehérje kölcsönhatás eredményeként történő eltolódását méri és az adatokat pikométer (pm) egységben adja meg. Az affinitási adatokat (K_d értékeket) a standard telítési görbére illesztett pontok alapján számoltuk ki GraphPad Prism 4 program segítségével (3. ábra).



3. ábra: Hullámhossz rezonancia eltolódáson alapuló bioszenzor technika alapelve.

A hullámhossz rezonancia eltolódás mérésén alapuló technika esetén a prizma felület fénytörő képességének és a visszavert fény hullámhosszának változását mérjük. (a.) A beeső polarizált fény a fényvezető rétegben a hullámhosszának megfelelő távolságra képes eljutni, majd fénytörést követően reflektált fény formájában elhagyja azt. A fényvezető felülethez kovalensen kötött fehérje (Y) befolyásolja a fény által megtett út hosszát és megváltoztatja a reflexió helyét. Vizsgált fehérje kölcsönható partnerek tovább változtatják a fényút hosszát. (b.) A fehérje felülethez való kikötésekor és a kölcsönható partner bekötését követően mérhető hullámhosszok közötti fényút eltolódásból kiszámítható a fehérje és a kölcsönható partnere közötti kölcsönhatás erőssége [75].

4.7. Reaktív oxigén gyökök (ROS) meghatározása

A ROS meghatározása HepG2 humán hepatocelluláris karcinóma sejteket használtunk. Ac-915 vagy Ac-2010 molekulákkal végeztük a kezelést, majd a DCFDA (2',7'-diklorohidrofluoreszcein-diacetát, Sigma-Aldrich Kft.) mennyiségét FACS technikával mértük. A kezelést megelőzően a sejteket egyszeres PBS-sel mostuk, majd 1% -os borjú szérum albuminnal kiegészített Hanks féle pufferelt só oldatban (BSA-HBSS, Sigma-Aldrich Kft.) vettük fel. A sejtszám 10^6 sejt volt milliliterenként. A sejteket 60 perccel az összegyűjtésük előtt DCFDA festékkel kezeltük $2\ \mu\text{M}$ végkoncentrációban és az intracelluláris ROS termelődés FACS készülékkel mértük.

4.8. A sejtek glutation tartalmának mérése

HepG2 sejteket (20.000 sejt/ lyuk) Ac-915 talidomid analóggal inkubáltunk 96-lyukú sejttenyésztő lemezekben, $50\ \mu\text{l}$ végtérfogatban, 2 órán keresztül. Az inkubációs idő lejártá után a sejtekhez $50\ \mu\text{l}$ kétszeres töménységű GSH-GloTM reagenst (GSH-GloTM Glutathione assay; Promega, Bio-science Kft) adtunk és további 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ekvivalens mennyiségű ($100\ \mu\text{l}$) Luciferin detektáló reagenssel kezeltünk meg minden lyukat és 15 perc várakozást követően a lumineszcens fényreakciót fotométerrel detektáltuk. A kísérlet során negatív és vak reakciókat is készítettünk.

4.9. Intracelluláris lokalizáció vizsgálata

HepG2 hepatocelluláris karcinóma sejtvonalat növesztettünk üvegaljú sejttenyésztő csészében (MatTek, Ashland, MA). Az ER-ot ER-Tracker Green (Life Technologies Magyarország Kft.) festékkel festettük meg. A festést követően a sejteket HBBS-ben oldott $10\ \mu\text{M}$ Ac-2010 talidomid analóggal kezeltük meg, majd 5 perc inkubációt követően Olympus Fluoview FV1000 konfokális lézer szkennig mikroszkóppal, 20x-os és 40x-es nagyításon vizsgáltuk. Az ER-Tracker festéket 543 nm hullámhosszon, az Ac vegyületet 405 nm hullámhosszon vizsgáltuk.

4.10. Kísérleti állatok tartása és kezelése

Az állatkísérletek során az egerek az általános laborállat táphoz és a vízhez szabadon hozzáférhettek (*ad libitum*) a tartásuk teljes időtartama alatt. A hőmérsékletet és a páratartalmat egy standard értéken tartottuk. A sötét/világos ciklus 12 órás periódusban váltakozott. A toxikogenomikai vizsgálatokhoz csoportonként 4-4 nőstény Balb/C egeret alkalmaztunk. A szöveti eloszlás vizsgálatához Balb/C hím egereket

használtunk. A hepatocelluláris karcinóma modellen végzett kísérleteinkhez hím Matn2-deficiens (Matn2^{-/-}), 129/Sv háttérű egereket alkalmaztunk [48].

A toxikogenomikai vizsgálatokhoz az anyagkezelések intraperitoneálisan történtek 400 µl hordozó oldatban oldva (10% DMSO, 25% Solutol (BASF, Németország), 65% fiziológiás sóoldat). A kontroll csoport tagjai csak a hordozó oldószert kapták a kezeléskor, míg a többi csoportban az állatok a hordozó oldószerben oldott kezelőanyagot. Az alkalmazott dózisok anyagokra lebontva a következők voltak: doxorubicin (Sigma-Aldrich Kft.): 5 mg/kg és 20 mg/kg; ciszplatin (Sigma-Aldrich Kft.): 8 mg/kg; Ac-915 (Avidin Kft., Szeged): 30 mg/kg. 16 órával az oltást követően az állatokat az etikai kódexnek megfelelő módon túlaltattuk és a vizsgálandó szerveit (szív, máj, vese és agy) eltávolítottuk és RNA-Later RNS konzerváló oldatba helyeztük. A szerveket egy éjszakára 4°C-ra raktuk, míg az oldat átjárta.

Hím Balb/C egereket Ac-915 vagy Ac-2010 (20 mg/kg) kezeltük intravénásan és különböző időpontokban leöltük, szerveiket (szív, vese, máj, agy, izom) eltávolítottuk, PBS-sel mostuk és Tissue-Tek® O.C.T™ műgyantába ágyaztuk. Gyors fagyasztást követően -20 °C-on tároltuk a metszés időpontjáig. Leica CM1950 cryostat szövetmetsző készülékkel 20 µm vastag natív metszeteket készítettünk. Minden felsorolt szervből három, különböző rétegből származó metszetről Olympus Fluoview FV1000 konfokális lézer szkennig mikroszkóppal 20x-os nagyítású képeket készítettünk, melyeket Olympus Fluoview 1.6 programmal elemeztünk.

A hepatocelluláris karcinóma egér modelljének kialakításához 15 napos egereket kezeltünk egyszeri, 25 mg/kg dózisú DEN –nel (Sigma-Aldrich) intraperitoneálisan. A DEN fiziológiás sóoldatban oldottuk fel. Az egereket 4 hónap várakozást követően kezdtük el kezelni vagy Ac-915 talidomid analóggal 3 hónapig (n=15), vagy Ac-2010 talidomid analóggal 1 hónapig (n=10). A kísérletet a hepatocelluláris karcinóma kiváltásától számított 8 hónapra termináltuk, majd a tumor számot illetve a máj tömeg indexet meghatároztuk.

$$\text{Máj tömeg index} = \left(\frac{\text{májtömeg}}{\text{testtömeg}} \right) * 100$$

Az Ac-915 talidomid analóggal heti 3 alkalommal kezeltük az állatokat 10 mg/kg dózisban, intraperitoneálisan, 3 hónapig. Az Ac-2010 talidomid analóggal heti 3 alkalommal kezeltük az állatokat 4 mg/kg dózisban, intraperitoneálisan, 1 hónapig.

A statisztikai elemzést Student's t-tesztel végeztük és az értékeket p <0,05 esetén tekintettük szignifikánsnak.

4.11. Etikai engedélyek

Az állatkísérletek során törekedtünk az állatok szenvedését minimálisra csökkenteni. Az állatok tartásakor és a kísérletek folyamán mindvégig betartottuk a XVI/03047-2/2008 –as és XXIX./3610/2012-es számú etikai engedélyek követelményeit.

5. EREDMÉNYEK

Munkacsoportunk célul tűzte ki olyan molekula könyvtár kialakítását, amelynek az alap molekulája egy amino-trifluor-ftálimid. Számos kémiai eljárás során több olyan módosított ftálimid vegyületet szintetizáltunk, melyek citotoxikusak voltak különböző tumoros sejtvonalon, többek között humán eredetű máj tumor sejtvonalakon. A talidomid analógok előállítását Dr. Kanizsai Iván vezetésével az Avidin Kft. vegyészei végezték, melyből két szabadalom is született [76, 77]. Munkánk során számos talidomid analóg szűrését végeztük el. A vizsgálatokhoz kialakítottunk egy *in vitro* citotoxicitási panelt különböző humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonalakkal. A két leghatékonyabbnak bizonyuló molekulát ezt követően további vizsgálatoknak vetettük alá. Toxikogenomikai módszerekkel meghatároztuk azokat a géneket, amelyek a talidomid analógokkal való kezelés hatására kifejeződésbeli változásokat mutatnak. Meghatároztuk az intracelluláris lokalizáció helyét, a kölcsönható partnereket, a kölcsönhatás erősségét, a feltételezhető hatásmechanizmust. *In vivo* adminisztrációja során meghatároztuk a szöveti eloszlást és tumorelles hatását a hepatocelluláris karcinóma transzgenikus egér modelljén is.

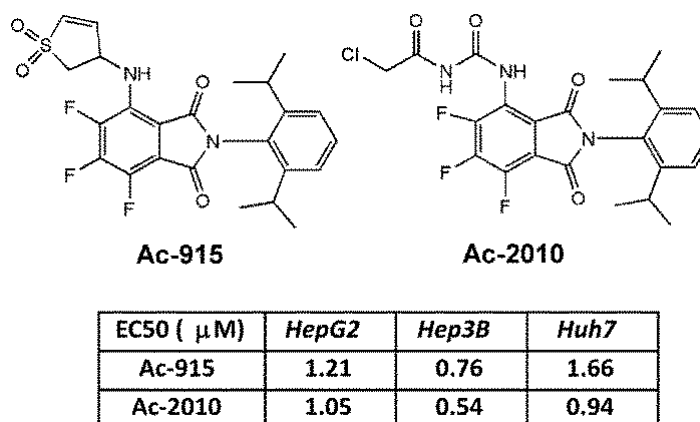
5.1. Újonnan szintetizált talidomid analógok jellemzése és szűrése biokémiai vizsgáló módszerekkel

Kísérleteink során számos talidomid analógot vizsgáltunk meg és hasonlítottunk össze egy már forgalomban lévő talidomid származékkal, a lenalidomiddal. Első lépésben hagyományos biokémiai végpont esszé (MTS) segítségével, majd ezt követően a kimagaslóan hatékony molekulákat tovább vizsgáltuk a valós idejű rendszeren beállított citotoxicitási panelünkön, ahol az alkalmazott sejteink különböző hepatocelluláris karcinóma sejtvonalak voltak. Az MTS esszé a sejtek mitokondriális légzési láncának működését mutatja. Azok a sejtek, melyek nem károsodtak az MTS reagenst egy fotometriásan mérhető, barna színű formazán vegyületté alakítják át és kijuttatják a sejtenyésző tápoldatba. Úgy tapasztaltuk méréseink során, hogy a lenalidomid molekula az alkalmazott 20 μ M koncentrációig sem a Hep3B, sem pedig a HepG2 sejteken nem fejtett ki citotoxikus hatást. Ezzel szemben a szintetikusan előállított analóg molekulák közül 10 és 20 μ M koncentráció között többnél is tapasztaltunk citosztatikus hatást, mely megalapozta további analógok szintézisét (1. táblázat).

Hep3B	Sejt növekedés (%)	20 μ M	10 μ M	5 μ M	2,5 μ M	1 μ M
	Lenalidomid	99.90	99.70	102.35	98.05	106.38
	Ac-177	48.06	64.93	92.93	87.97	86.68
	Ac-194	48.49	93.19	90.19	89.51	87.54
	Ac-197	96.70	94.47	91.56	89.93	86.34
	Ac-198	52.77	70.75	91.39	94.04	96.87
	Ac-1041	91.31	86.61	84.84	90.30	85.73

1. táblázat: A lenalidomid és talidomid analógok sejtnövekedésre kifejtett hatásainak összehasonlítása MTS vizsgálat segítségével.

Számos fejlesztési és szűrési lépés eredményeként két jelentősebb citotoxikus hatással bíró talidomid analógot, az Ac-915-öt és Ac-2010-et választottuk ki vezérmolekulának. A citotoxikus hatásukat MTS esszével humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonalakon igazoltuk, melynek az EC_{50} értékeit 72 órás kezelést követően számoltuk ki (4. ábra). Úgy találtuk, hogy mindkét molekula mikromoláris és nanomoláris koncentrációban a tumorsejtek pusztulását okozta máj karcinóma sejtvonalakon.



4. ábra: Az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analógok szerkezete és a hozzá tartozó EC_{50} értékek különböző hepatocelluláris karcinóma sejtvonalakon. Az Ac-915 és Ac-2010 nanomoláris és mikromoláris tartományba toxikus a hepatocelluláris karcinóma sejtekre.

5.2. Talidomid analógok citotoxicitási vizsgálata RTCA-SP rendszeren

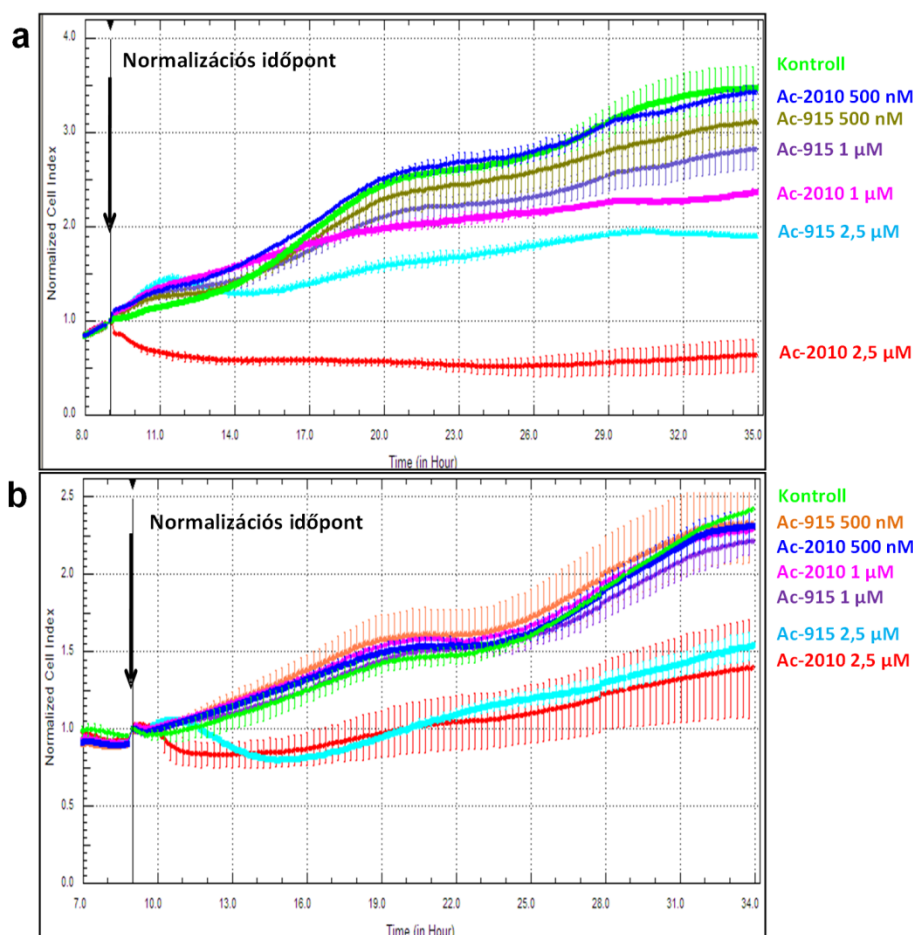
Céljainknak megfelelően következő lépésként az RT-CES rendszeren beállítottunk egy, a citotoxikus anyagok szűrésére alkalmas modellrendszert, melyen az MTS alapú szűrések során kimagasló citotoxicitással rendelkező Ac-915 és Ac-2010

talidomid analógok hatását valós időben is vizsgálni tudtuk különböző humán eredetű hepatocelluláris karcinóma sejtvonalakon (HepG2, Hep3B és Huh7).

Az MTS mérések során alacsonyabb hatású molekulák esetében is dóziszfüggő csökkenést tapasztaltunk a sejtek mikroelektronikai paramétereinek mérése során, amely a mért vegyületek citosztatikus hatására utal. A hatáskinetika során azt tapasztaltuk, hogy a magasabb (10 μM) koncentráció néhány órán belül a sejteken mért ellenállás értékek rohamosan csökkentek. Alacsonyabb, 1 μM közeli koncentrációk esetében úgy tapasztaltuk, hogy habár a sejtek számára a kezelés nem volt letális, morfológiai változások már rövid időn belül bekövetkeznek. A tesztelt anyagaink 2,5-5 μM koncentrációban, a sejtekhez adásukat követően hozzávetőlegesen 20-25%-os azonnali sejtdex csökkenést okoztak, de további csökkenést nem tapasztaltunk.

5.3. Az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analógok sejttéletképességre kifejtett hatásának vizsgálata

Előzetes kísérletek és az *in vitro* MTS és RT-CES rendszerrel való szűrések alapján két talidomid analóg esetében találtunk kimagasló citotoxikus aktivitást humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonalakon (HepG2, Hep3B és Huh7). Az Ac-915 és az Ac-2010 molekulák citotoxikus hatását valós idejű sejttéletképesség mérési technikával RTCA-SP rendszerrel is megvizsgáltuk két hepatocelluláris karcinóma sejtvonalon is (Huh7 és HepG2). Ahogy az az 5. ábra a. és b. részén is látható, mindkét molekula esetén citotoxikus hatást tapasztaltunk a két hepatocelluláris sejtvonalon a vivőanyaggal kezelt kontroll sejtekhez viszonyítva. Mind az Ac-915, mind pedig az Ac-2010 talidomid analóg esetében dóziszfüggést láttunk a mikroelektronikai paraméterek változásai alapján. A Huh-7 hepatocelluláris karcinóma sejtek nagyobb érzékenységet mutattak a kezelése során, a HepG2 sejtekhez hasonlítva. Emellett úgy tapasztaltuk, hogy az Ac-2010 hatékonyabban csökkentette a vizsgált sejtek sejtdexét. A Huh-7 sejtek kezelése során az Ac-2010 már 1 μM koncentrációban hozzávetőlegesen hasonló sejttéletképességbeli csökkenést okozott, mint az Ac-915 2,5 μM koncentrációban alkalmazva. Eredményeink korrelációban állnak az előzetesen mért biokémiai tesztek (MTS mérés) eredményeivel is.

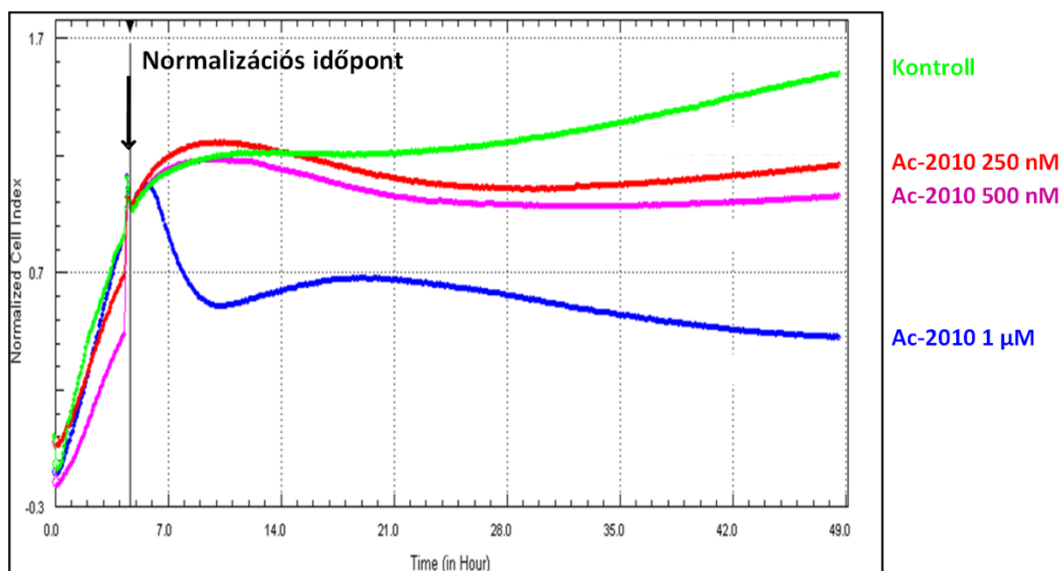


5. ábra: Az Ac-915 és Ac-2010 citotoxikus hatásának valós idejű vizsgálata Huh-7 (a) és HepG2 (b) sejteken. Az ábrákon a nyíl jelöli a kezelés kezdetét. Minden sejt index értéket erre az időpontra normalizáltunk. A normalizációs időpont az az xCELLigence szoftver által kialakított időpont, melyhez viszonyítva a kísérlet további részében százalékosan meghatározható a sejtek életképességbeli változása a kezelés hatására. A szoftver a normalizáció időpontjában az összes sejthez tartozó életképességi görbét 1-es sejt index értékre állítja virtuálisan (a mért adatok nem változnak, csak az elemzéshez egységesíti az egyes értékeket átmenetileg). Az ábra a. részén a HepG2, míg a b. részén a Huh-7 sejteken végzett vizsgálatok eredményeit ábrázoltuk. A sejt indexek átlagait 4 biológiai ismétlésből számoltuk.

5.4. Az Ac-2010 talidomid analógok hatásának vizsgálata a humán hepatocelluláris karcinóma sejtek migrációs képességére

Az Ac-2010 talidomid analóg sejtmigrációra kifejtett hatását RTCA-DP rendszer segítségével vizsgáltuk HepG2 humán hepatocelluláris sejtvonalon. Úgy tapasztaltuk, hogy a molekula dózisfüggő módon befolyásolta a vizsgált sejtek migrációs képességét a kemoattraktánsként alkalmazott borjúsavót tartalmazó

sejttenyésztő tápoldat irányába. Az Ac-2010 már 250 nM koncentrációban csökkentette a sejtek migrációjának ütemét (HepG2) (6. ábra). Összevetve a sejtproliferációs kísérletek eredményeivel, ez a koncentráció még nem bizonyult toxikusnak a sejtek számára.



6. ábra. *Ac-2010 hatásának vizsgálata HepG2 sejtek migrációs képességére.* Az Ac-2010 talidomid analóg dóziszfüggően csökkentette a HepG2 sejtek migrációs képességét. A sejt indexek átlagait 4 biológiai ismétlésből számoltuk.

5.5. Az Ac-915 talidomid analóg toxikogenomikai vizsgálata

A gyógyszerfejlesztés során a nem kívánt toxikus mellékhatások a gyógyszer-jelölt molekulák egyharmadánál a fejlesztésük terminálását jelenti. Habár a hepatotoxicitás a legfőbb oka hatóanyagok piaci visszavonásának, az egyéb szerveket, vese, szív, agy stb. ért toxikus hatás is jelentős lehet, melyre komoly figyelmet kell fordítani egy molekula fejlesztése során. Jelen kísérletünk során nemcsak a májat érintő génkifejeződésbeli változásokat kívántuk megvizsgálni, hanem más létfontosságú szerv esetében fellépő génszintű eltéréseket is.

A magas számú (56 darab) markergén, a több vizsgálandó szerv és a tesztelt állatok száma miatt olyan génexpressziós szűrési módszert választottunk, amely alkalmas volt nagy áteresztőképességű génaktivitás meghatározására. Ezt egy nagy áteresztőképességű, nanokapillaritáson alapuló QRT-PCR rendszeren oldottuk meg, mellyel lehetőségünk nyílt az összes előszűrt gén kifejeződésének vizsgálatára párhuzamosan, több szerven egy időben.

Kísérleteink során először a toxikogenomikai panel és a nagy áteresztőképességű QPCR technika validálására több toxikus anyag hatását is megvizsgáltuk (az eredmények nem lettek a dolgozatban feltüntetve) [78]. Majd a már validált rendszerünkön összehasonlítottuk az Ac-915 molekula és a klinikumban rutinszerűen alkalmazott gyógyszermolekulák kifejtett hatását különböző szervek toxikológiai markergénjeinek expressziójára. A kísérletekhez nőstény Balb/C egereket alkalmaztunk. Az egyedek szintjén megjelenő biológiai variabilitás kiküszöbölése céljából csoportonként 4 állatot használtunk fel. Minden egyedből 4 szervet, a májat, vesét, szívet és agyat használtuk azok génexpressziós profiljának megállapításához.

Az Ac-915 anyagunk várható mellékhatásait összevetettük különböző, a klinikumban is alkalmazott referencia vegyületekkel, kemoterápiás szerekkel (doxorubicin és ciszplatin). A markergénjeink, melyek a májat, vesét, szívet vagy agyat ért károsító hatást követően expressziós változást mutatnak (56 darab), DNS-chip technikával és irodalmi információk alapján válogattuk össze, melyek az alábbi módon oszlottak meg a kódolt fehérjék funkcionális csoportosítása alapján: akut fázis reakcióban résztvevő gének (*saa3*, *anxa2*, *fga*, *ftl1*), gyulladásos reakciókban résztvevő gének (*tubb5*, *reg3a*, *serpine1*, *fabp4*, *serpinci*, *fas*), oxidatív stressz során aktiválódó gének (*gadd153*, *nox3*, *ldh3b*, *prdx3*, *alox12b*, *akr1b8*, *prdx1*, *sod1*, *nqo1*, *cfos*), metabolikus folyamatokért felelős gének (*oazi*, *timp3*, *pepck*, *hsd3b4*, *odc1*, *kap*, *rbp4*, *aadat*, *pgam2*, *ndufa5*, *ptpmt1*, *timp2*, *klk1b3*), hősokk válaszáért felelős gének (*dnaja2*, *hspcb*, *hspa1a*), sejtciklust és/vagy apoptózist szabályozó gének (*clu*, *spp1*, *vim*, *ccng1*, *egf*, *psmb8*, *ubc*, *pcna*) illetve detoxifikációban szerepet játszó enzimek génjei (*gstp2*, *oat*, *hsd17b4*, *cyp1a1*, *cyp7a1*, *ephx1*, *slc25a6*). Emellett három olyan háztartási gént is kiválasztottunk, melyek átlagolt kifejeződéséhez hasonlítva az eredményeink normalizálhatók voltak (*ppia*, *pgk1* és *rplp0*) (2. táblázat).

#	Gén	Gén neve		Taqman próba	Szervi kifejeződés
1	GADD153	DNA-damage-inducible transcript 3	DNS károsodás indukált transzkript 3	Mm00492097_m1	máj
2	SAA3	serum amyloid A 3	Szérum amiloid A 3	Mm00441203_m1	máj, tüdő
3	TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	TIMP metalloproteináz inhibitor 3	Mm00441827_m1	máj, tüdő
4	PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	Foszfoenolpiruvát- karboxikináz 1	Mm00440636_m1	máj
5	NOX3	NADPH oxidase 3	NADPH oxidáz 3	Mm01339132_m1	vese
6	Hsd3b4	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase	Hidroxi-delta-5-steroid dehidrogenáz	Mm00843753_s1	máj
7	Ciu	clusterin	Klaszterin	Mm00442773_m1	vese
8	Spp1	secreted phosphoprotein 1	Szekretált foszoprotein 1	Mm00436767_m1	vese
9	vim	vimentin	Vimentin	Mm01333430_m1	vese
10	Anxa2	annexin A2	Annexin A2	Mm00500307_m1	vese
11	Tubb5	tubulin, beta 5	β-tubulin 5	Mm00495804_m1	vese
12	Gstp2	glutathione S-transferase, pi 2	Glutathion S-transzferáz P 2	Mm00839138_g1	vese
13	Fga	fibrinogen alpha chain	Fibrinogén alfa lánc	Mm00802584_m1	vese
14	Ccng1	cyclin G1	Ciklin G1	Mm00438084_m1	vese
15	Klk1b3	kallikrein 1-related peptidase b3	Kallikrein-1-függő peptidáz β3	Mm01203825_gH	vese
16	Odc1	ornithine decarboxylase, structural 1	Ornitin dekarboxiláz	Mm01964631_g1	vese
17	Kap	kidney androgen regulated protein	Vese androgén-függő fehérje	Mm00495104_m1	vese
18	Oat	ornithine aminotransferase	Ornitin aminoszferáz	Mm00497544_m1	vese
19	Rbp4	retinol binding protein 4, plasma	Retinol kötő plazmafehérje 4	Mm00803266_m1	vese
20	Aadat	aminoacidate aminotransferase	Aminoacidpát aminoszferáz	Mm00496169_m1	vese
21	Egfr	epidermal growth factor	Epidermális növekedési faktor	Mm01316968_m1	vese
22	Pgam2	phosphoglycerate mutase 2	Foszfoglicerát-mutáz 2	Mm00450782_g1	szív
23	Hsd17b4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	17-béta-hidroxiszteroid- dehidrogenáz	Mm00500443_m1	szív
24	Idh3B	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta	Izocitrát dehidrogenáz 3 β	Mm00504589_m1	szív
25	Ndufa5	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex, 5	NADH dehidrogenáz 1 α alkomplex 5	Mm00471676_g1	szív
26	Prdx3	peroxiredoxin 3	Peroxiredoxin 3	Mm00545848_m1	szív
27	Alox12b	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	Arachidonát 12-lipoxigenáz	Mm00507782_m1	szív, agy
28	Reg3a	regenerating islet-derived 3 alpha		Mm00441121_m1	szív, máj
29	Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	Citokróm P450 1-es család 1 a alcsalád	Mm00487218_m1	szív
30	SERPINE1	serine peptidase inhibitor, clade E, member 1	Szerin peptidáz inhibitor E 1	Mm00435860_m1	szív, vese
31	CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	Citokróm P450 7-es család a alcsalád	Mm00484152_m1	szív, máj
32	Akr1b8	aldo-keto reductase family 1, member B8	Aldo-keto reduktáz 1-es család, B8-as tagja	Mm00484314_m1	lép
33	FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	Zsírsv kötő fehérje 4	Mm00445878_m1	lép
34	Ptpmt1	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1	Mitokondriális protein-tirozin foszfátáz 1	Mm00458631_m1	lép
35	HINT1	histidine triad nucleotide binding protein 1	Mitokondriális hisztidin triád foszfátáz	Mm00801722_m1	lép
36	PSMB8	proteasome subunit, beta type 8	Proteasóma alegység β8	Mm00440207_m1	lép
37	Hoxa2	homeobox A2	Homeobox A2	Mm00439361_m1	agy
38	DNAJA2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2		Mm00444898_m1	tüdő
39	OAZ1	antizyme inhibitor 1	Antizim-inhibitor	Mm00497630_m1	tüdő
40	SLC25A6	solute carrier family 25, member 6		Mm00470958_m1	tüdő
41	SERPINC1	serpin peptidase inhibitor, clade C member 1	Szerpin peptidáz inhibitor	Mm00446573_m1	tüdő
42	HSPCB	heat shock protein 90 alpha class B member 1	Hő sokk fehérje 90 B osztálya	Mm00833431_g1	tüdő
43	UBC	ubiquitin C	Ubikvitin C	Mm01201237_m1	tüdő
44	TIMP2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	Metalloproteináz szöveti inhibitora 2	Mm00441825_m1	tüdő
45	FAS	Fas (TNF receptor superfamily member 6)		Mm01204974_m1	máj
46	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	Proliferáló sejtek sejtmagi antigénje	Mm00448100_g1	máj
47	PRDX1	peroxiredoxin 1	Peroxiredoxin 1	Mm01621996_s1	tüdő
48	Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal	Epoxid hidroxiláz (mikroszómális)	Mm00468752_m1	lép
49	Hspa1a	heat shock protein 1A	Hő sokk fehérje 1A	Mm01159846_s1	máj
50	SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	Szuperoxid-dizmutáz 1	Mm01344233_g1	agy
51	Ftl1	ferritin light chain 1	Ferritin könnyűlánc	Mm03030144_g1	máj
52	Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NAD(P)H dehidrogenáz	Mm00500821_m1	máj
53	c-Fos	FBI osteosarcoma oncogene	FBI oszteosarkóma onkogén	Mm00487425_m1	máj
54	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	Peptidilpropil izomeráz A	Mm02342430_g1	háztartási gén
55	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	Foszfoglicerát-kináz 1	Mm00435617_m1	háztartási gén
56	RPLP0	ribosomal protein, large, P0	P0 nagy ribiszómális fehérje	Mm00725448_s1	háztartási gén

2. táblázat: A vizsgált markergének megoszlása szervekre lebontva. 56 darab gyulladásos reakciókban, immunválaszban, detoxifikálásban, oxidatív stresszben, metabolikus folyamatokban érintett markergén vizsgálatát végeztük 6 különböző (máj, vese, szív, tüdő, lép és agy) szervben.

Bulera és mtsai patkányban azt találták, hogy a különböző hepatotoxinokkal való kezelést követően a különböző időpontokban vett mintákban a vizsgált gének a

kezelés időtartamától függetlenül, a kezelőanyag hatásmechanizmusa alapján klasztereződtek, ami arra enged következtetni, hogy egy toxikogenomikai kísérletben nem annyira a meghatározott kezelési időpontok, mint inkább a jól meghatározott kezelési koncentrációk alkalmazása vezet célra [79]. A kezeléseink 16 óráig tartottak, miután a vizsgálni kívánt szerveket eltávolítottuk. A szerveket RNA later -ben (4°C, 16 órára) stabilizáltuk. Az RNS izolálást és cDNS-sé való átírását követően a különböző szervekből származó mintákat az OpenArray lemez egyes almátrixaira vittük fel.

A QRT-PCR analízis során azt tapasztaltuk, hogy az Ac-915 anyag az agyszövetben 2 gén, a *pepck* (foszfoenolpiruvát-karboxikináz) és az *slc25a6* aktivitását változtatta meg, míg a szívszövet esetében csupán 1 gén, a glutation S-transzferáz aktivitását növelte kis mértékben. A vesében és a májban több sejtciklus és apoptózis függő (*ccng*, *clu*, *ubc*), oxidatív stresszel kapcsolatos (*gstp2*, *prdx3*, *sod1*) és hőshock függő (*hspb*) gén aktiválódott. A májszövet esetében azt találtuk, hogy az oxidatív stressz hatására aktiválódó jelátviteli útvonalakban résztvevő markergének kis mértékben gátlódtak és ezzel párhuzamosan kismértékű növekedés volt megfigyelhető a sejtciklus és apoptózis függő jelátviteli mechanizmusok génjeiben. A vese- és májszövetben a változást mutató gének mindegyike a gátlás irányába mozdult el (3. táblázat).

Az egyik referencia molekula, a doxorubicin (20 mg/kg) kezelés esetében, amely a DNS molekulával interkalálódik és meggátolja a replikációt, úgy tapasztaltuk, hogy az indukált gének legtöbbje a szív és vese- és májszövetben volt kimutatható, ami összhangban áll a doxorubicin toxikus hatását leíró cikkekkel [80, 81]. Annak érdekében, hogy kimutathassuk a doxorubicin dóziszfüggő hatását, alacsonyabb, 5 mg/kg dózisban is alkalmaztuk. Az elvártaknak megfelelően a dózis csökkentésével a befolyásolt gének száma is jelentősen csökkent (az adatokat nem ábrázoltuk). Az agyszövet esetében 15-ről 7-re, míg a májszövetnél 7-ről 4-re esett vissza a változó gének száma. Az agyszövet esetében ebben az esetben is csak alacsony számú gén aktiválódása volt megfigyelhető.

A másik referencia molekulánk a ciszplatin volt, mely egy platina tartalmú kemoterápiás szer, melyet széles körben alkalmaznak különböző daganatos betegségek gyógyítására és radioterápia mellé kiegészítő kezelésként. Hatásmechanizmusát tekintve a DNS molekulával kereszt köt, meggátolja a DNS polimerizációt és beindítja a programozott sejthalált. Vese- és neurotoxikus hatását részben sikerült kimutatnunk a toxikogenomikai génpanelünk segítségével. Úgy találtuk, hogy a ciszplatin (8 mg/kg) kezelés hatására számos gén kifejeződésében jelentős aktivitásbeli változást okozott. A

vese szövetben 3 gén aktivitása növekedett jelentősen, míg 4 gén aktivitását csökkentette. Az agyszövet esetében 2 gén (*gstp2* és *fabp4*) aktivitása növekedett kiugróan.

Gén név	Doxorubicin (20 mg/kg)				Cisplatin (8mg/kg)				Ac-915 (30mg/kg)			
	Agy	Máj	Szív	Vese	Agy	Máj	Szív	Vese	Agy	Máj	Szív	Vese
<i>Anxa2</i>	-1,00	-0,01	-0,76	-2,30	0,25	-1,58	-0,99	0,33	-0,43	-0,58	0,45	-0,99
<i>Ccng1</i>	-0,81	-1,64	-1,69	-3,41	-0,25	-0,34	-1,47	1,66	-0,64	1,03	0,20	-1,37
<i>Clu</i>	-0,87	-0,55	0,11	-2,36	0,16	-1,14	-0,27	-0,08	-0,42	-0,60	-0,09	-1,18
<i>DNAJA2</i>	-0,75	-1,14	-1,34	-2,03	-0,05	-0,85	-1,60	0,16	-0,18	-0,91	0,35	-0,62
<i>FABP4</i>	N.D	-1,46	-1,92	-1,22	3,40	-3,59	-1,53	0,66	N.D	-1,58	-0,49	-0,91
<i>Ftl1</i>	-0,57	-0,80	-0,87	-2,49	-0,10	-0,29	-1,00	-0,07	-0,39	-0,99	-0,26	-1,14
<i>GADD153</i>	-0,86	-0,74	-1,08	-2,47	-0,01	-0,87	-1,45	1,28	-0,66	-1,42	0,41	-1,41
<i>Gstp2</i>	N.D	0,59	0,10	N.D	4,34	-0,11	-1,09	2,47	N.D	1,12	1,12	N.D
<i>HINT1</i>	-1,06	-1,16	-1,65	-2,52	-0,28	-0,50	-0,91	0,41	-0,46	-0,94	-0,70	-0,58
<i>Hsd17b4</i>	-0,72	-0,58	-1,07	-2,62	0,07	-0,95	-1,79	0,19	-0,20	-0,70	0,00	-0,73
<i>HSPCB</i>	-0,85	-1,35	0,33	-2,82	0,09	-0,95	-1,56	-0,04	-0,33	-1,59	0,17	-1,09
<i>Ldh3B</i>	-0,51	-0,75	-1,51	-2,54	-0,20	-0,65	-1,82	-0,09	-0,17	-0,89	0,27	-0,53
<i>Nqo1</i>	0,06	N.D	-1,87	-1,73	0,35	0,92	-1,63	0,74	-0,03	N.D	0,39	-0,09
<i>Oat</i>	0,24	-0,50	-1,44	-1,58	-0,10	-1,79	-1,25	-0,19	0,26	0,18	-0,28	-0,02
<i>OAZ1</i>	0,56	0,06	-2,29	-2,23	0,84	-1,34	-1,61	0,18	0,47	-0,60	-0,16	-0,18
<i>Odc1</i>	-0,71	0,93	0,05	-0,88	-0,17	-0,92	-1,58	0,02	-0,17	0,49	0,70	0,09
<i>PCNA</i>	-0,10	0,02	-0,37	-0,52	-0,26	-1,10	-1,58	0,08	0,07	0,70	0,62	0,36
<i>Pck1</i>	-2,53	N.D	N.D	-1,78	-0,61	-1,01	1,35	-1,49	-2,38	N.D	N.D	-1,83
<i>PRDX1</i>	0,18	0,52	-2,13	-0,29	-0,37	-0,75	-1,19	-1,21	-0,06	0,62	0,55	0,27
<i>Prdx3</i>	0,41	-0,74	-1,26	-1,26	-0,04	-0,84	-1,75	0,32	0,07	-1,21	-0,08	-0,25
<i>Ptpmt1</i>	-0,69	-0,96	-1,27	-2,03	-0,13	-0,99	-1,15	0,12	-0,45	-0,52	0,68	-1,21
<i>Rbp4</i>	0,18	-1,01	N.D	-0,82	-0,38	-0,40	-0,17	-1,58	0,59	-0,79	N.D	-0,03
<i>SLC25A6</i>	-1,53	-0,36	N.D	-0,91	0,70	-1,29	-1,69	0,46	-1,80	-1,14	N.D	0,35
<i>SOD1</i>	-0,20	-0,90	-1,19	-2,17	-0,38	-0,53	-1,02	-0,12	0,00	-1,56	-0,11	-0,21
<i>TIMP2</i>	-0,51	-0,35	-0,97	-1,73	0,47	-1,33	-0,69	0,19	-0,21	0,05	-0,21	0,14
<i>TIMP3</i>	0,39	-1,29	-1,37	-3,52	0,10	-1,53	-0,86	0,10	0,07	-0,76	-0,81	-1,19
<i>Tubb5</i>	-1,58	-0,50	N.D	N.D	0,56	-1,06	-1,22	1,27	-1,07	-0,98	N.D	N.D
<i>UBC</i>	0,35	-0,68	-1,85	-1,46	-0,16	-0,73	-1,46	-0,30	0,39	1,25	-0,05	-0,09
<i>vim</i>	0,13	-1,51	-1,38	-0,84	-0,25	-1,64	-0,41	-0,36	-0,09	-0,82	-0,11	0,33
	3	7	17	21	2	11	20	7	3	9	1	7

3. táblázat: Különböző referencia anyagok hatása a vizsgált markergének kifejeződésére. A adatok átlagolt ΔCt érték formájában vannak szerepeltetve és normalizálva lettek a háztartási génekre. A zöld szín jelzi a gén kifejeződésének csökkenését a párhuzamos, oldószerral kezelt kontroll mintához viszonyítva, míg a piros szín jelöli a gén kifejeződésének növekedését. N.D.: nem detektálható.

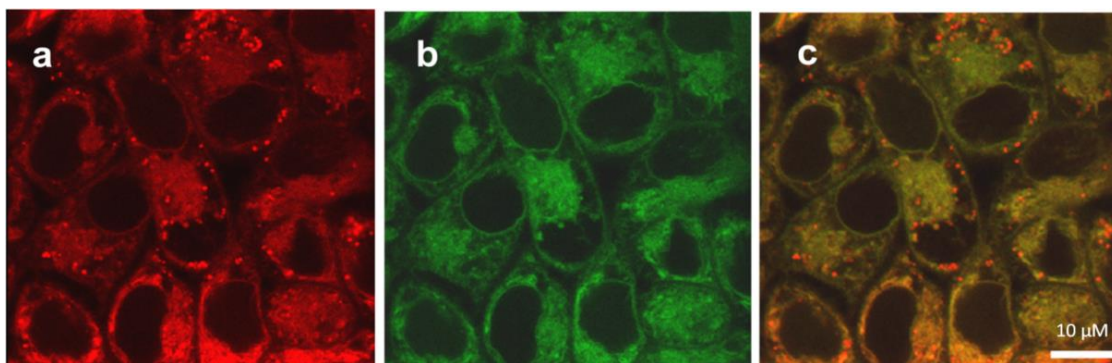
A májszövet esetében azt találtuk, hogy a talidomid analóg molekulánk az oxidatív stressz hatására aktiválódó jelátviteli útvonalakban résztvevő markergének kifejeződését kis mértékben gátoltak és ezzel párhuzamosan kismértékű növekedés volt megfigyelhető a sejtciklus és apoptózis függő jelátviteli mechanizmusok génjeiben.

Összehasonlítva a klinikumban hepatocelluláris karcinóma kezelésére alkalmazott két kemoterápiás szer hatásaival és mellékhatásaival, megalapozottnak

láttuk további vizsgálatok elvégzését, melyben fényt deríthetünk a kölcsönható fehérje partnerekre, a szöveti eloszlására illetve *in vivo* modellen az antitumorális hatására.

5.6. Az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analógok intracelluláris lokalizációjának vizsgálata

Vizsgálataink során fontosnak tartottuk, hogy meghatározzuk a molekuláink vajon a sejten kívül fejtik ki a hatásukat, például a biológiai membránok direkt károsításával, esetleg egy receptorhoz való kötődéssel, vagy pedig bejutnak a sejten belülre és ott okoznak valamiféle változást, amely végső soron a kezelt sejt pusztulásához vezet. A molekulakönyvtár fejlesztése során azt a megfigyelést tettük, hogy a molekulacsalád számos tagjának saját kék fluoreszcenciája van. Ez a jelenleg tárgyalt két molekulánkra is igaznak bizonyult. Az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analógok is erős kék fluoreszcenciát mutatnak, így az intracelluláris lokalizációját könnyen vizsgálhatjuk élő sejteken. A szubcelluláris lokalizációt fluoreszcens mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a humán máj tumor sejtvonalakon. Előzőleg már megállapítottuk, hogy egyéb talidomid analógjaink kölcsönhatásban lépnek a lipid cseppecskékkel és az endoplazmatikus retikulumban dúsulnak [82, 83]. Ezt jelen kísérleteink során is sikerült alátámasztanunk, ahogy az 7. ábrán az Ac-2010 esetében is látszik. Az Ac-2010 a fluoreszcens képeken mesterségesen vörös színnel jelenítettük meg, melyet, ha átfedünk az endoplazmatikus retikulumra jellemző zöld fluoreszcens képpel, a talidomid analóg és az endoplazmatikus retikulum színei sárga színű kolokalizációs képet adnak (7.a-c. ábra). A sejten belül látható piros foltok a lipid cseppecskéket jelölik, amelyeket csak a talidomid analóg jelölt meg és az endoplazmatikus retikulum specifikus festés nem.



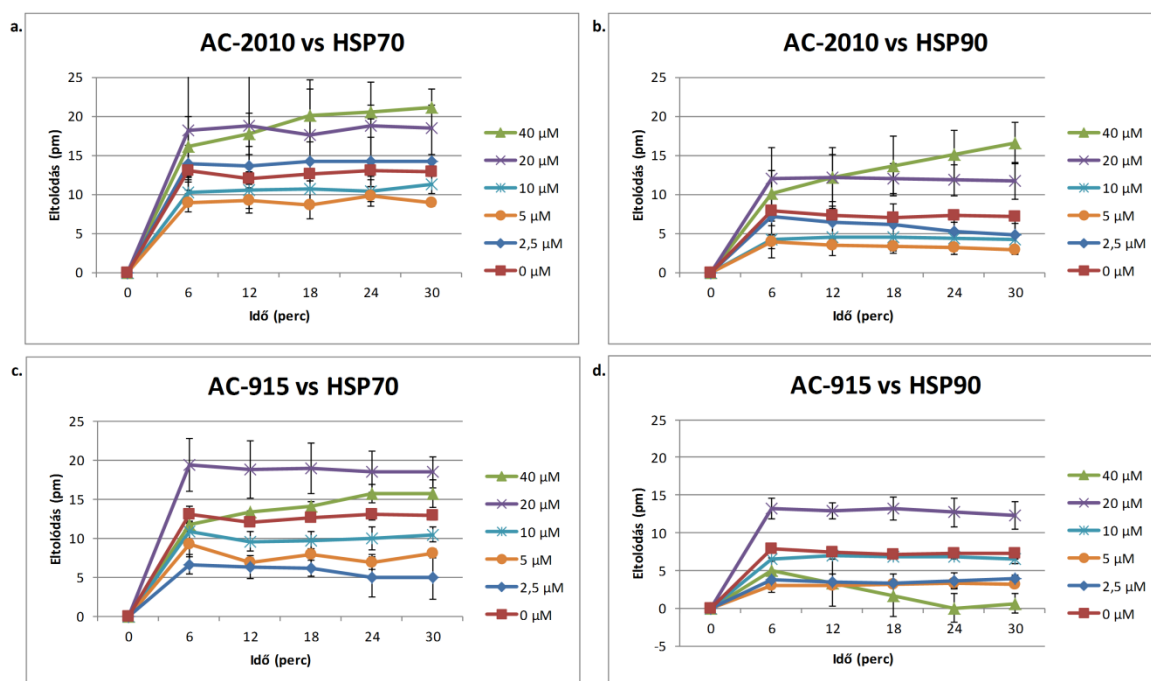
7. ábra. Az Ac-2010 intracelluláris lokalizációja. (a) A HepG2 humán hepatocelluláris karcinóma sejteket 10 μ M Ac-2010 anyaggal kezeltük meg, melynek kék fluoreszcenciája van (a képen piros álszínezetet kapott). (b) Az ER-on endoplazmatikus retikulum specifikus festést végeztünk ER-TrackerTM Green festékkel. (c) A narancs színezet az Ac-2010 és az ER-TrackerTM-mel készült képek átfedéséből származik. A vörös pontok a lipid dropleteket jelölik. Az ER-Tracker festék nem jelöli a lipid cseppeket, míg az Ac-2010 igen.

5.7. Az Ac-915 és Ac-2010 talidomid analógok kölcsönható partnereinek vizsgálata

Előzetes kutatómunkánk során affinitás kromatográfiai módszerrel számos olyan fehérjét sikerült kimutatnunk, melyek a lehetséges intracelluláris kölcsönható partnerei lehetnek a vizsgált két molekuláknak. A részletes eredmények ezzel kapcsolatosan Dr. Molnár Eszter (SZTE-TTIK, Biológiai Doktori Iskola, 2013.) doktori disszertációjában szerepelnek illetve a jelen tézis alapjául szolgáló közleményben olvasható [84].

A már azonosított kölcsönható partnerek közül azokat a fehérjéket választottuk ki, melyeknek fontos szerepe lehet a tumor sejtek metabolizmusában. A vizsgálathoz egy olyan új technikát alkalmaztunk, mellyel jelölésmentesen, a polarizált fény hullámhossz eltolódásának mérése alapján detektálja a vizsgált molekulák között kialakuló kölcsönhatást. Alapállapotban, fehérjék kikötése nélkül, az optikai lemez speciális felületének van egy alap fénytörő képessége. Az optikai réteghez kovalensen kikötött fehérjék a tömegváltozás miatt megváltoztatják a felület törésmutatóját, melyet a visszavert fény hullámhosszának eltolódásából érzékelünk. Amennyiben a vizsgált fehérje kölcsönhatásba lép egy partnerrel, a mért hullámhossz eltolódás tovább nő. A mérhető hullámhossz eltolódásból kiszámítható a fehérje és a kölcsönható partnere közötti kölcsönhatás erőssége egy telítési görbe alapján. A hullámhossz rezonancia eltolódás mérésén alapuló technika segítségével megvizsgáltuk a közvetlen molekuláris

kapcsolatot a két talidomid analóg, Ac-915 és Ac-2010, és a tisztított humán HSP70, HSP90 hőszok fehérjék (HSP) között. Kikötött hőszok fehérjéket különböző koncentrációjú Ac-915 vagy Ac-2010 talidomid analógokkal kezeltünk meg (0 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM vagy 40 μM). A talidomid analógok és a fehérjék közötti kölcsönhatás telítési görbét mutatott (8. a-d ábra). Az alkalmazott koncentráció lépcsők alapján ki tudtuk számolni az Ac-915 és Ac-2010 kötődés K_D értékeit. A következő affinitás értékeket (K_D) mértük az Ac-915 esetében: HSP70 K_D : 14 μM , HSP90 K_D : 11,5 μM ; az Ac-2010 esetében: HSP70 K_D : 16 μM , HSP90 K_D : 16 μM .

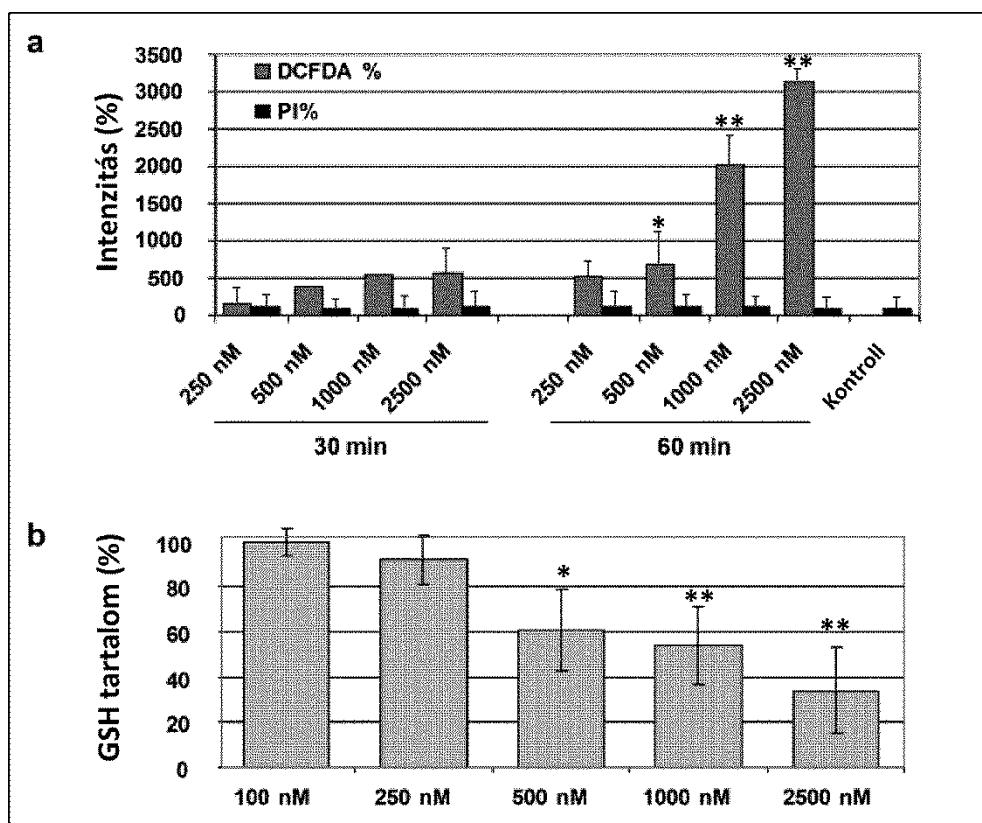


8. ábra: Az Ac-915 és Ac-2010 kölcsönható partnereinek vizsgálata hullámhossz rezonancia eltolódás mérés alapján. Az optikai lemez felületére kikötött HSP70 és HSP90 fehérjéket az Ac-915 és Ac-2010 különböző koncentrációival kezeltük meg. A mért értékek gyors telítési görbét mutattak.

5.8. Az Ac-915 és Ac-2010 hatása az intracelluláris antioxidáns rendszerre

A toxikus anyagok és számos rák ellenes hatóanyag kölcsönhat a dajka fehérjékkel és/vagy az endoplazmatikus retikulummal, amelyeknek károsodott működése intracelluláris stresszhez vezet, ami megemelkedett reaktív oxigén gyöktermelődésben és az antioxidánsok, redukált glutation (GSH) drámai lecsökkenésében manifesztálódhat. Előzetesen megállapítottuk, hogy a talidomid analógjaink bejutva a sejtbe kölcsönhatásba lépnek a lipid cseppecskékkel és az endoplazmatikus retikulummal, ezért megvizsgáltuk, hogy az Ac-915 és az Ac-2010 anyagoknak van-e oxidatív stresszt kiváltó hatása, ahogy azt Ge és mtsai munkájuk

során találták az ún. „redox-reaktív” talidomid analógokról [85]. Megmértük a két talidomid analógunkkal való kezelést követően a ROS szintet Hep3B sejtekben (9.a ábra). A reaktív oxigén gyök termelődés és a redukált glutation mennyiségének csökkenése közötti kapcsolat feltárása érdekében megmértük az intracelluláris redukált glutation szintjét is a két talidomid analóggal való kezelést követően. Várakozásainknak megfelelően, az Ac-915 és Ac-2010 anyagok dózisfüggően indukáltak oxidatív stresszt és ezzel fordított arányban csökkentették a sejtek redukált glutation tartalmát (9.a és b ábra).

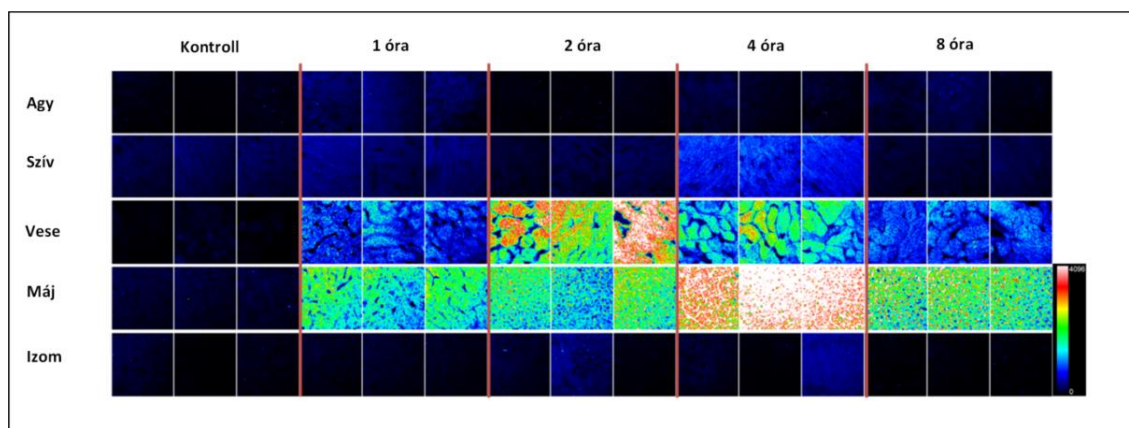


9. ábra. ROS és GSH szint meghatározása. **a,** A két talidomid analóg intracelluláris oxidatív stresszt indukáló hatását DCFDA felhalmozódás FACS technikával való mérése alapján vizsgáltuk 30 és 60 perc elteltével az anyagkezelést követően. Az Ac-915 és Ac-2010 anyagok idő- és dózisfüggő módon indukálták a ROS szintet. Szignifikáns különbségeket tudunk kimutatni az azonos koncentrációkon belül a két vizsgálati időpontban. **b,** Párhuzamosan az intracelluláris oxidatív stressz mérésével, megvizsgáltuk az intracelluláris antioxidáns rendszer GSH tagjának a két talidomid analóggal történő kezelést követően. A GSH tartalom dózisfüggően csökkent a kezelt Hep3B sejtekben. Az alkalmazott koncentrációk növekedésével szignifikáns csökkenést találtunk a sejtek GSH tartalmában. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

5.9. A talidomid analógok szöveti eloszlásának vizsgálata

Továbbiakban kísérleteinket állatmodelleken folytattuk, hogy fényt derítsünk a talidomid analógok hatására összetett szervezetekben is. Elsőként az anyag szöveti eloszlását vizsgáltuk meg, választ keresve arra, hogy a szervezetbe jutást követően észlelhető-e feldúsulás valamilyen szervben, tapasztalható-e nem kívánt mellékhatás és legfőképp, hogy eléri-e azt a szervet, esetünkben a májat, ahol szeretnénk, hogy a hatását kifejtse. A toxikogenomikai vizsgálataink alapján, úgy feltételeztük, hogy a májban és a vesében várható dúsulás az alapján, hogy az aktiválódott gének száma ezekben a szervekben volt a legjelentősebb.

Az Ac-915 és Ac-2010 szöveti eloszlásának vizsgálatához Balb/C egereket kezeltünk Ac-915 anyaggal intravénásan, majd az állatokat különböző időpontokban leöltük és különböző szerveikből natív metszeteket készítettünk, melyeket fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A fentebb említett két molekula erős kék fluoreszcenciával rendelkezik, így a relatív szöveti eloszlást 405 nm hullámhosszú lézertífénnyel gerjesztve, DAPI konfigurációval, fluoreszcens mikroszkópiás technikával meg tudtuk határozni. Mivel az összes vizsgált szövet rendelkezett különböző mértékű kék háttér fluoreszcenciával, a kezeletlen kontroll állatok szöveteit hasonlítottuk a kezelt szövethez. Az 10. ábrán összefoglaltuk a szöveti eloszlás eredményeit. Egy órával az Ac-915 beadását követően csak kismértékű fluoreszcencia növekedés volt megfigyelhető az agyban, amely arra enged következtetni, hogy az anyag nem vagy csak korlátozottan lépi át a vér-agy gátat. Emellett még szintén kismértékű fluoreszcenciát találtunk a szívszövet esetében is, ami 4 órát követően lecsengett. Az Ac-915 célszerveként a vesét és főképp a májat találtuk. A májnál jelentős dúsulás volt megfigyelhető, melynek csúcspontja a beadástól számított 4. órára volt tehető. Ehhez hasonló erős szignált sikerült regisztrálnunk a vesében is a kezeléstől számított 2. és 4. órában. Ezzel jól korreláltatható a nagy áteresztőképességű QRT-PCR rendszerrel mért génexpressziós eredmények is, melynek során az előbbi két szervet tudtuk azonosítani, mint génexpressziósan aktív célszervet.



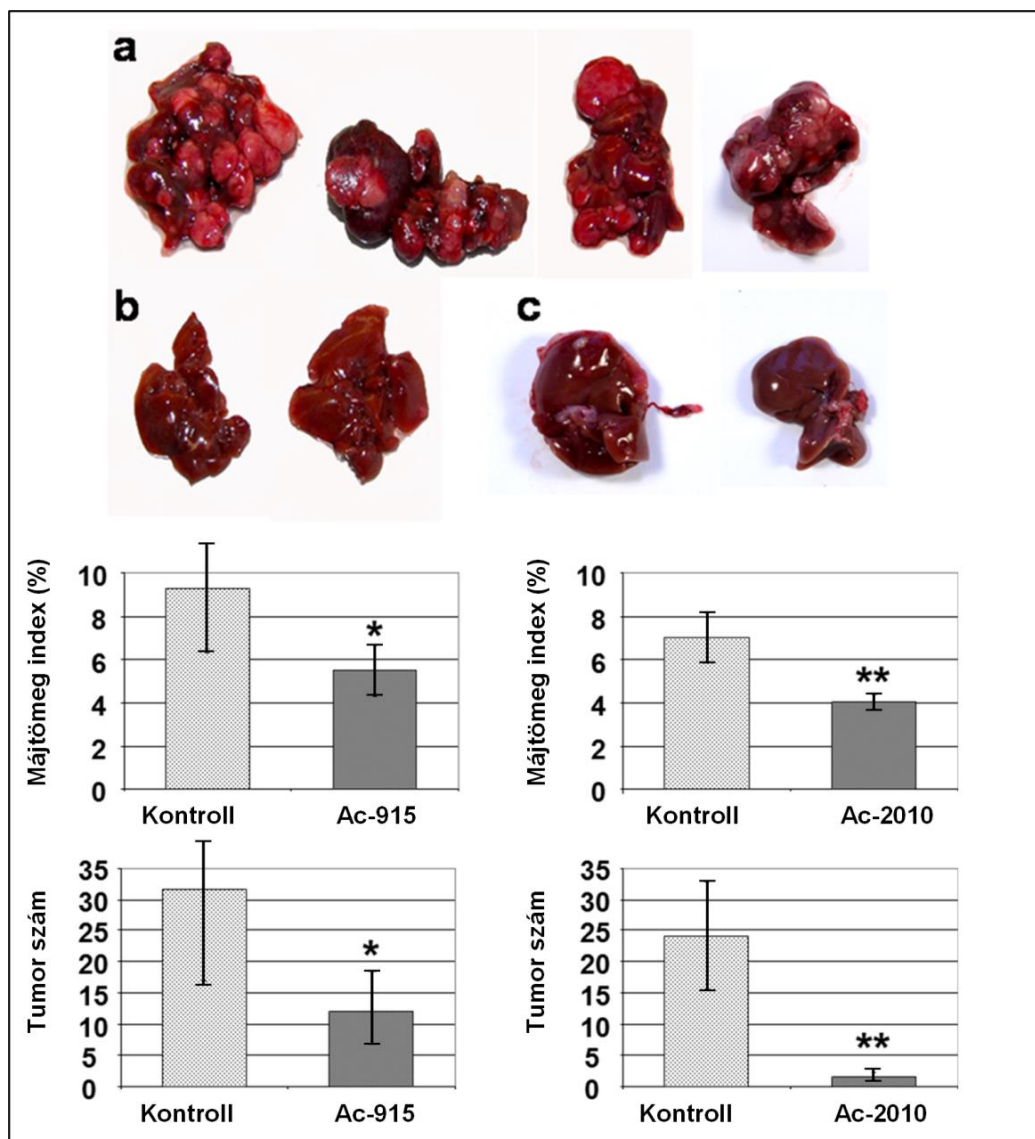
10. ábra. Az Ac-915 szöveti eloszlása. Az Ac-915 szöveti eloszlását fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk natív metszeteken, intravénás alkalmazás után. Minden kép 125x125 μm szövetrészt jelenít meg.

5.10. Ac-915 és Ac-2010 *in vivo* hatása DEN-nel indukált hepatocelluláris karcinóma egér modellen

A májtumor modell kialakításához 15 napos *Matn2*^{-/-} genotípusú egereket kezeltünk egyszeri dózis DEN-nel, ahogy azt már előzetesen leírták [50]. Az Ac-915-tel kezelt csoport (n=15) 3 hónapig kapta intraperitoneálisan, 10 mg/kg dózisban az anyagot a DEN indukciótól számított 4. hónaptól, majd a 8. hónapban a kísérletet termináltuk és a máj tumorok számát és méretét meghatároztuk. A reprezentatív fényképek a DEN-nel indukált, de nem kezelt illetve a DEN-nel indukált és Ac-915 anyaggal kezelt csoportok májáról a 11. a és b ábrán láthatóak. A máj tumorok kiértékelése során szignifikánsan kevesebb daganatot találtunk a kezelt csoportban a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva. A kezelt csoportban nemcsak a tumorok száma volt alacsonyabb, de a tumor méret is kisebb volt, mely a változásokat a májtömeg index számításával is alá tudtuk támasztani.

Az Ac-2010 talidomid analóg vizsgálatakor is a fentebb már ismertetett állatkísérletes modellt állítottuk be. Ám annak ismeretében, hogy az *in vitro* tesztek során is jobb hatást tapasztaltunk alacsonyabb dózis mellett is, úgy döntöttünk, hogy a 3 hónapos kezelés sorozat helyett az állatokat 1 hónapig kezeljük. Az Ac-2010 molekulával kezelt állatcsoport (n=10) 4 hónappal a DEN indukciót követően csak 1 hónapig kapta az anyagot intraperitoneálisan, 4 mg/kg dózisban, heti 3 alkalommal. Az alacsonyabb dózis mellett azért döntöttünk, mert az Ac-2010 oldékonysága és tumorelles hatása is jobb volt az Ac-915-höz hasonlítva. A kísérletet szintén a 8. hónapban termináltuk és meghatároztuk mind a tumor számot és tumor mérete, mind

pedig a májtömeg indexet. A kezeletlen csoporttal összevetve az eredményt, az Ac-2010 molekula esetében is szignifikánsan ($p < 0,01$) kevesebb tumor alakult ki és a tumorok méretében is szignifikáns csökkenést tapasztaltunk (11. c ábra).



11. ábra. Az Ac-2010 (c) és Ac-915 (b) talidomid analógok *in vivo* hatása hepatocelluláris karcinóma dietil-nitrozaminnal indukált egérmodelljén: Az előzőleg DEN-nel kezelt egereket 4 hónap várakozást követően Ac-915 talidomid analóggal 3 hónapig vagy Ac-2010 talidomid analóggal 1 hónapig kezeltük. A kísérletet a hepatocelluláris karcinóma kiváltásától számított 8 hónapra termináltuk, majd a tumor számot, a máj tömeg indexet meghatároztuk. Az Ac-2010 és az Ac-915 molekulák esetében szignifikánsan (Ac-915: * $p < 0,05$; Ac-2010: ** $p < 0,01$) kevesebb tumor számot és kisebb tumor méretet tudtunk kimutatni. Emellett számottevően csökkent a májtömeg index is a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva. A tumor szám, tumor méret és májtömeg index meghatározásakor a kezeletlen kontroll (a) máj mintáihoz hasonlítottuk az Ac-915 (b) és az Ac-2010 (c) anyaggal kezelt csoportok máj mintáit.

Az anyagkezeléseket 4 hónappal a DEN indukció után kezdtük, amikor a karcinogenezis korai szakasza lezárult és a pre-neoplasztikus fókusz már megjelent. Az eredményeinkből arra következtethettünk, hogy a Ac-915-tel vagy az Ac-2010-zel való kezelés az egérmodellben csökkentette a sejt proliferációt és a tumorok fejlődését a máj tumor kialakulásának késői fázisában. Ezek az eredmények egy új csapásvonalat jelenthetnek a máj tumorok gyógyítására és így kiinduló pontot jelenthetnek új típusú kemoterápiás szerek kifejlesztésében illetve ezek az analógok hasznosak lehetnek a hepatocelluláris karcinóma kialakulásának megakadályozásában is.

6. DISZKUSSZIÓ

6.1. *In vitro* citotoxicitási vizsgálatok összefoglalása

Munkánk során olyan hatóanyag-szűrési rendszert állítottunk be, amely fiziológiailag megbízhatóbb és emellett gyors vizsgálati eredményeket szolgáltat. A jelölésmentes sejtműködést vizsgáló módszerek használatával a kapott eredmények közelebb állnak a természetes állapothoz, amellyel növelhető a kinyert információk relevanciája és lecsökkenthetők az aspecifikus eredmények. Munkám során az RT-CES (xCelligence) rendszert használtam különböző citotoxikus talidomid analógok hatásainak szűrésére.

Munkánk során beállítottunk egy olyan valós idejű mérésen alapuló technikát a citotoxikus talidomid analóg anyagok hatásának szűrésére, amely a sejtek vezetőképességének mérésén keresztül ad információt a kezelésre adott válaszról. Az így kapott eredmények jól korrelálnak a standard, végpontmérésen alapuló technikák eredményeivel. Az így nyert információk biológiailag relevánsak, mivel a jelölő anyagok elhagyásával a sejteket a fiziológiás környezetet megközelítő körülmények között tudtuk vizsgálni. A sejtek mikroelektronikai módszerrel való vizsgálata nem invazív módon kvázi folyamatos leolvasást tud biztosítani, és így a kapott kinetikai adatok kiegészítő információként szolgálhatnak a vizsgálatok során, amelyeket a végpontmérésen alapuló technikák nem tesznek lehetővé. Az eredmények fényében a jelenlegi molekula szűrési technológia megbízható lehetőséget biztosít az újabb hatóanyagok szűrésére a hepatocelluláris karcinóma *in vitro* sejttes modelljén.

Összefoglalásként elmondható, hogy a valós idejű sejt életképesség mérésével sikeresen vizsgáltuk tovább a biokémiai vizsgálati rendszerrel előszűrt talidomid analógok hatásait. Méréseink során sikeresen mutattunk ki dózisfüggő hatásokat az Ac-929, Ac-1041, Ac-915 és Ac-2010 anyagok esetében. Az anyaghatás időbeli kinetikájának vizsgálatával úgy találtuk, hogy a vizsgált molekulák 10 μ M feletti koncentrációban rövid időn belül a sejtek halálát okozza, amelyet biokémiai paraméterek és a mikroelektronikai ellenállás változás mérésén keresztül is tapasztaltunk. A magasabb koncentrációban alkalmazott talidomid analógok hatására a sejtek feltételezhetően felkerekedtek, felülethez való adhéziója lecsökkent, a sejt-sejt kapcsolatok felbomlottak és a sejtek eltávolodhattak egymástól illetve a mikrotiter lemez aljában elhelyezkedő elektróda hálójával való kapcsolatuk gyengült vagy meg is szűnt, így a mért ellenállás értékek drasztikusan lecsökkent. Ezzel szemben az

alacsonyabb koncentrációk esetében a mért ellenállás értékekben nem történt drasztikus csökkenés, ám a sejtinдекс értékek ebben az esetben is 20-25%-kal lecsökkentek, melyből arra tudunk következtetni, hogy a sejtekben morfológiai változások következtek be, felkerekedtek, a lemez alján elfoglalt fajlagos területük lecsökkent, ám a felületről nem váltak fel. Ebből arra következtethetünk, hogy az anyagkezelés hatására hosszabbtávú események indulnak el, melynek végpontja többek között a programozott sejthalál is lehet. A valós idejű sejtleletképeség mérésén alapuló kísérleteink eredményei jól korrelálthatók a hagyományos biokémiai tesztekkel kapott eredményeinkkel. Az előszűrési kísérleteink során két olyan analóg molekulát, az Ac-915-öt és Ac-2010-et, sikerült azonosítanunk a molekulakönyvtárból, melyek hatása jelentősen kimagaslott a többi molekulák közül. A hatásos dózis jelentősen felülmúlta a többi molekuláét és emiatt a további kísérleteinket ezekkel a talidomid analógokkal folytattuk.

Annak meghatározására, hogy az Ac-2010 talidomid analógnak csak a sejtproliferációra vagy a sejtek migrációjára is hatása van, az RTCA-DP sejtmigrációs méréstechnikát alkalmaztuk, amely szintén a mikroelektronikai paraméterek mérése alapján ad információt a sejtmigráció üteméről. Az Ac-2010 már olyan koncentrációban (250 nM) is csökkentette a sejtmigráció ütemét a HepG2 sejtek esetében, amely előzetes mérések alapján nem találtuk toxikusnak. Úgy gondoljuk, hogy ez a koncentráció olyan sejten belüli folyamatok elindulását idézi elő, amely sejt morfológiájában még nem jelenik meg, ám a sejtek motilitását befolyásolhatja.

6.2. Ac-915 talidomid analóg toxikogenomikai vizsgálata

Talidomid analógjaink fejlesztése során fontosnak tartottuk, hogy megvizsgáljuk okoz-e mellékhatást az általunk kiválasztott négy létfontosságú szerv, a szív, vese, máj és az agy működésében. Ennek céljából egy nagy áteresztőképességű, a nanokapillaritás elvét kihasználó QRT-PCR rendszert választottuk, mellyel 56 toxikológiailag releváns markergén kifejeződési mintázatát vizsgáltuk meg. A kísérleteink során egereket kezeltünk Ac-915 anyaggal vagy két, a klinikumban hepatocelluláris karcinómára rutinszerűen alkalmazott kemoterápiás szerrel, a doxorubicinnel és a ciszplatinnal, majd megvizsgáltuk a génexpressziós változásokat. Vizsgálataink során arra a következtetésre jutottunk, hogy az Ac-915 talidomid analóggal való kezelés hatására a vizsgált szervekben néhány toxikológiailag releváns gén aktivitása megváltozik. Az agyszövetben két gén aktivitása változott meg. Az egyik gén a foszfoenolpiruvát-

karboxikináz kódoló *pepck*, mely fontos szerepet játszik a glükoneogenezisben és metabolikus folyamatokban. A másik aktivált gén az *slc25a6* volt, mely a sejtek energia ellátásában játszik szerepet. A gén terméke csatornaként működik a mitokondrium membránjában és az ADP-t a mitokondrium mátrixába, az ATP-t pedig a citoszolba transzportálja [86]. A szívszövet esetén egy gén, a *gstp2* kifejeződése növekedett meg. A GST enzimnek fontos szerepe van a detoxifikációban és részt vesz az oxidatív stressz kivédése során is. Ám az utóbbi időben kimutatták, hogy apoptózisban és nitrogén-oxid metabolizmusban is szerepet játszhat [87, 88]. A vesében és a májban több sejtciklus és apoptózis függő (*ccng*, *clu*, *ubc*), oxidatív stresszel kapcsolatos (*gstp2*, *prdx3*, *sod1*) és hő sokk függő (*hspb*) gén aktiválódott. Vizsgálataink eredménye alapján úgy találtuk, hogy az Ac-915 a legjelentősebb hatást a májszövetre fejtette ki, melyben csökkentette az oxidatív stressz ellen védő mechanizmusokkal kapcsolatos gének működését, úgymint például a *sod1*-ét vagy a *gadd154*-ét. Emellett csökkentette a HSP90 dajkafehérjét kódoló gén kifejeződését és serkentette az apoptózisban és sejtciklus szabályozásban is érintett ubiquitin C-t kódoló *ubc* gént. Az Ac-915 és Ac-2010 jelentősen csökkentették az intracelluláris antioxidáns rendszer működését is, melyet toxikogenomikai szűrésekkel is sikeresen előre jeleztünk az Ac-915 molekula esetében, mely represszálta a szuperoxid dizmutáz gén, a *sod1* kifejeződését.

Az már eddig is ismert volt, hogy a HCC kezelésében is alkalmazott két kemoterápiás szer, a doxorubicin és ciszplatin, jelentős mellékhatásokkal rendelkezik, melyet a most bemutatott toxikogenomikai vizsgálatok eredményeivel is sikeresen alátámasztottunk. A doxorubicin és ciszplatin kezelés hatására számos anyagcsere, oxidatív stressz illetve sejtciklus és apoptózis függő gén aktiválódott több létfontosságú szervben is. Ezzel szemben az Ac-915 jelentősen kevesebb gén aktivitását befolyásolta.

Összehasonlítva az eredményeket a doxorubicin és ciszplatin anyagokkal való kezelés során kapottakkal, úgy tapasztaltuk, hogy az Ac-915 leginkább a májszövetben és a vesében okozott génexpressziós változás szemben a referencia vegyületekkel. A doxorubicin és a ciszplatin egyaránt magasabb számú markergén működését befolyásolta több szervben is. Ezekből arra következtethetünk, hogy az Ac-915 hatása leginkább a máj illetve veseszövetre korlátozódik, és kevésbé toxikus, mint a referenciaként használt két kemoterápiás szer, tehát a várható mellékhatások kisebbek lehetnek és a hatás is szerv specifikus.

6.3. Újonnan szintetizált talidomid analógok összetett vizsgálata és alkalmazása a hepatocelluláris karcinóma modelleken

Már előzetes tanulmányaink során fényt derítettünk arra, hogy a különböző talidomid analógjaink a sejteken belül lipid cseppecskékkel és intracelluláris fehérjékkel lépnek kapcsolatba, továbbá a sejten belül szabadgyök képződést okoznak és endoplazmatikus stresszt váltanak ki. Jelen tanulmányunkban megvizsgáltuk az Ac-915 és Ac-2010 kapcsolatát különböző dajka-fehérjékkel. Azt találtuk, hogy a talidomid analógjaink a citotoxikus hatásukat dajkafehérjékkel való kölcsönhatáson keresztül, reaktív oxigén gyökök termelésével és az intracelluláris glutation szint csökkentésével érik el. Hullámhossz rezonancia eltolódás mérésén alapuló technikával közvetlen kölcsönhatást tudtunk kimutatni a HSP70 és HSP90 fehérjék illetve a két vizsgált talidomid analógunk között. A megnövekedett hősokk-fehérje aktivitás, ahogy azt több rákfajtánál is vizsgálták, beleértve a májrak különböző típusait is, arra utalhat, hogy szerepe lehet a karcinogenezisben [89-91]. Állat modellekben [92] és klinikai mintákon is kimutatták [89-91, 93], hogy a HSP60, HSP70 és HSP90 hősokkfehérjék expressziója kapcsolatba hozható a különböző rák típusok kialakulásával.

A hősokkfehérjék túltermelődésének hátterében valószínűsíthető, hogy a tumor mikrokörnyezetében fennálló magasabb környezeti stressz állhat, melyet a tumor sejtek a HSP-k túltermeltetésével igyekeznek kompenzálni és kihasználni a chaperon funkciójuk citoprotektív hatásait. Ez végső soron a tumor további növekedését, majd később az esetleges metasztázis képzést is támogatja. Kölcsönhatás vizsgálataink során továbbá úgy találtuk, hogy a fenti két molekulánk kölcsönhatásba lép nem csak a hősokkfehérjékkel és lipid cseppecskékkel asszociált fehérjékkel, de a protein diszulfid izomerázzal is. A protein diszulfid-izomeráz működésének gátlása a helytelenül feltekeredett, ún. misfold fehérjék felszaporodását okozhatja az endoplazmatikus retikulumban, amely végső soron aktiválja az apoptotikus útvonalakat és a kaspáz-függő apoptózist, mint azt Hashida és mtsai vizsgálták [94].

Egyre több eredmény utal arra, hogy az endoplazmatikus retikulum stressz alapvető szerepet játszik az apoptózis szabályozásában mind a rákos, mind pedig az egészséges sejtek esetében [95]. Az endoplazmatikus retikulum stressz során a helytelen konformációjú, vagy rosszul feltekeredett fehérjék felhalmozódnak a sejtben. Ennek következtében megnövekszik a különböző dajkafehérjék, ún. chaperonok termelődése, hogy kompenzálják azt. Ezzel egy időben számos pro-apoptotikus útvonal

is aktiválódik és az endoplazmatikus retikulum stressz mértékétől függően a sejt beléphet az apoptózisba [96]. Az eredményeink is tovább erősítik a fenti hipotézist, mivel az Ac-915 és az Ac-2010 talidomid analógok interakcióba lépnek az endoplazmatikus retikulummal és az endoplazmatikus retikulummal kapcsolt fehérjékkel. Indukálják az endoplazmatikus retikulum stresszt és reaktív oxigén gyökök termelődését, illetve ezzel egy időben csökkentik a redukált glutation intracelluláris szintjét és végül sejthalált okoznak. A lipid cseppecskék a talidomid analógok egyik intracelluláris célpontjai. Quintero és mtsai úgy találták, hogy a lipid cseppecskék a pre-nekrotikus rákos sejtekben felhalmozódnak intracellulárisan, így megfelelő markerei lehetnek a rákos daganatoknak [92]. Továbbá a lipid homeosztázisban fellépő egyensúlyzavar sejtmembrán sérüléshez és végső soron úgy nevezett lipoapoptózishoz is vezethet [97]. A lipid cseppecskék az endoplazmatikus retikulumban alakulnak ki. Az azokhoz kötődő kismolekulák pedig képesek befolyásolni illetve megváltoztatni a lipid cseppecskékhez köthető homeosztázist és az endoplazmatikus retikulum stresszen keresztül beindítani az apoptózist [82].

A tumorok nagy része, mint ahogy a hepatocelluláris karcinóma is, jóval érzékenyebb az endoplazmatikus retikulum stresszre és a reaktív oxigén gyökök termelődését előidéző természetes anyagok, mint például a többszörösen telítetlen zsírsavak jelenlétére [82, 98], mint a normál sejtek, mivel a stresszválasz rendszerük folyamatosan terhelve van, s ezáltal könnyebben aktiválódnak különböző pro-apoptotikus jelátviteli útvonalak, ami végül is a tumoros sejt halálához vezethetnek. Az eddigi eredményeink és irodalmi adatok alapján a daganatos sejtekben indukált oxidatív stressz illetve az oxidatív stresszt kompenzáló mechanizmusok befolyásolása jó támadáspontnak mutatkozik a tumorelles terápia során.

A talidomid analógok relatív szöveti eloszlását a különböző szervekből készített natív metszeteken vizsgáltuk meg konfokális mikroszkópia segítségével, különböző időpontokban. Célszervekként főleg a májat és a vesét azonosítottuk, mely jól korrelált a toxikogenomikai méréseink eredményével, mivel a legjelentősebb génkifejeződésbeli változásokat főképp a májban és másodsorban a vesében tapasztaltuk. A leghosszabb ideig tartó dúsulás a májban volt kimutatható az Ac-915 talidomid analógunk esetében. Ezt az is magyarázza, hogy a legtöbb fajban a máj a színhelye többek között a zsírsavak bioszintézisének és ebben a szervben a legjelentősebb a zsírcseppecskék akkumulációja is [99]. A szívben, agyban és izomszövetben nem vagy csak minimális dúsulást találtunk, amely gyorsan le is csengett.

Az eddigi eredményeink alapján arra a következésre jutottunk, hogy az általunk vizsgált két talidomid analóg hatékonyan gátolja a hepatocelluláris karcinóma sejtek osztódását *in vitro* körülmények között. Ezért logikusnak találtuk megvizsgálni az *in vivo* hatását patológiás körülmények között is. A vizsgálatainkhoz olyan modellt kerestünk, mely jól összevethető az emberben kialakuló hepatocelluláris karcinómával. Kritériumaink között szerepelt, hogy a tumor kialakulása fokozatos legyen illetve a neoplasztikus léziók megjelenése időben is jól prediktálhatóak legyenek. Ennek fontossága abban rejlik, hogy az emberi szervezetben is egy hosszabb folyamat eredménye a kór kialakulása, melyet az alkalmazott állatmodellnek is jól kell modelleznie. Erre a célra a legalkalmasabbnak egy olyan egértörzset találtunk, melyben a matrilin-2 gén ki van ütve. Ebben az egértörzsben a nitrozaminok hatékonyabban indukálnak tumorokat és a tumor mérete is nagyobb, mint a vad típusú egereknél. Előzetes tanulmányok kimutatták, hogy a *Matn2*^{-/-} egerekben jelentősebb a tumorok mérete és száma a DEN indukálta máj tumor modellben összehasonlítva a vad típussal [50, 57].

A májat érintő karcinogenezis kezdeti szakaszában a lipid cseppecskék mennyiségének csökkenését figyelték meg a máj stellat sejtekben, illetve ezzel párhuzamosan a retinil-észter mennyisége is drasztikus módon visszaesett. Feltételezhetően ez lehet az első lépése a májat érintő elváltozásoknak, amely később hepatocelluláris karcinómához vezethet [100]. Meglepő módon Blaner és mtsai. azt találták, hogy az *Lrat* knock-out mutáns egerekben, amelyekben a retinil-észter szintézis hiányzik, szignifikánsan kevesebb máj tumor alakult ki, mint a vad-típusú állatokban. Emellett a tumor mérete kisebb és a karakterisztikája különböző volt [101]. Ezzel szemben a *Matn2*^{-/-} egerekben, melyekben a hepatocelluláris karcinómát DEN szerrel váltották ki, a vad-típushoz viszonyítva mind a tumor mérete, mind pedig a tumorok száma jelentősen nagyobb. Ezekre az információkra alapozva *in vivo* hatástanulmányainkhoz *Matn2*^{-/-} egereket alkalmaztunk, melyekben DEN-nel májtumor képződést indukáltunk és a fentebb leírt módon és ideig kezeltük a két talidomid analóggal. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a talidomid analógjaink a májszövetben a lipid cseppecskékben felhalmozódva serkentik az oxidatív és endoplazmatikus stressz kialakulását, mely a hepatocelluláris karcinóma egér modelljében hozzájárul a tumor méret és tumor szám jelentős csökkenéséhez.

A szintetikus kémia számos újításának (pl. kombinatorikus könyvtárkészítés, új típusú katalizátorok bevezetése) és kiváltképp a nagy áteresztőképességű

szűrőrendszerek megjelenésének és fejlődésének köszönhetően az utóbbi évtizedekben ugrásszerűen megnövekedtek az olyan kismolekulák száma, melyek kiindulópontjai lehetnek számos patológiás elváltozás gyógyításában, melyek napjainkban népbetegségnek számítanak. Az életvitelbeli változások és a jóléti társadalom kiszélesedése miatt vezető betegségekkel léptek elő a metabolikus, a keringési rendszert érintő betegségek illetve a rákos elváltozások. A nagyütemben előállított gyógyszer-jelölt molekulák hatástani vizsgálatának felgyorsítása és a kapott eredmények megbízhatósága mellett egyre nagyobb lett az igény a kísérletek során kapott adatok könnyebb értelmezhetőségére is. A gyors és egyszerűen kielemezhető eredmények gyorsabb és hatékonyabb molekulafejlesztést biztosítanak a kis, közepes és nagy gyógyszerfejlesztő csoportok számára. A technika fejlődésével rohamosan nőtt a kutatásfejlesztésben is a technikai újdonságok megjelenése. A kezdetben kolorimetriás hatástani szűréseket napjainkra felváltani látszanak olyan technikai újdonságok, melyeket gyűjtőnéven jelölés-mentes vagy az angol szakirodalom alapján label-free technikáknak nevezünk. Az eredmények validálásánál legtöbb esetben nem lehet véglegesen elhagyni a klasszikus technikákat, de mivel az új irányvonal nagyobb áteresztőképessége több információt szolgáltat, a hagyományos módszerek egyre jobban háttérbe szorulnak. Az így nyert adatok jóval közelebb is állnak a fiziológiásan tapasztaltakhoz.

Eredményeinket a szakirodalmi adatokkal összevetve úgy véljük, hogy a talidomid analógok alkalmasak lehetnek egy tumor ellenes terápiában kiegészítő kezelésként alkalmazva. Illetve támogatják egy rutinszerűen alkalmazott kemoterápiás szer hatását is. Ez utóbbi további vizsgálatokat igényel, ahol a kemoterápiás szer és a talidomid analógok különböző kombinációit is érdemes megvizsgálni. A dolgozatomban ismertetett vizsgálati módszerek együtt vagy külön-külön is megfelelő lehetőséget biztosítanak a további vizsgálatok elvégzésére.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A jelenlegi munka megvalósításához az anyagi háttérrel részben a Jedlik Ányos „Avinomid”, az NKTH „Glinolid” és az Asbóth Oszkár program, illetve a GOP-1.3.1-10/B-2010-0016, GOP-1.1.1-11-2011-0003 és GOP-1.1.1-11-2012-0015 pályázatok biztosították.

Köszönetemet szeretném kifejezni a doktori munkám elkészítésével kapcsolatban:

- Témavezetőmnek, **Dr. Puskás Lászlónak**, aki mindvégig messzemenően támogatott mind a kutatás, mind az eredmények publikálása során.
- **Dr. Ózsvári Bélának** a sejtes és a RTCA-CES rendszeren végzett munkákban nyújtott segítségét, valamint, hogy munkám során nemcsak szakmailag, de barátilag is mindvégig támogatott.
- **Dr. Faragó Nórának**, aki a nagy áteresztőképességű nanokapilláris QRT-PCR vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítsége mellett barátilag is támogatott.
- **Dr. Fehér Liliánának**, aki szakmai segítséget nyújtott az *in vitro* MTS vizsgálatok kivitelezése során.
- **Dr. Hackler Lászlónak** az Enspire rendszeren végzett munkámhoz nyújtott tanácsaiért és segítségéért.
- **Lehőcz Istvánné „Mosoly”** asszisztensnek a sejtenyésztési munkákban nyújtott segítségét.
- **Juhász Judit** asszisztensnek a kísérleti állatokkal végzett lelkiismeretes és odaadó munkáját.
- **Marton Annamáriának**, aki áldozatos munkájával segítette az állatkísérletek elvégzését.
- **Dr. Mátés Lajosnak**, **Dr. Kiss Ibolyának** és **Dr. Deák Ferencnek**, akik áldozatos munkával sikeresen létrehozták a Matn2 KO egértörzseket.
- **Dr. Ferhan Ayaydinnak**, aki szaktudásával hozzájárult a dolgozatomban bemutatott mikroszkópos képek elkészítéséhez.
- **Az Avidin Kft vegyészeinek.**
- **Dr. Lénárt Nikolettnek**, **Gyimesi Mónikának**, **Mán Imolának**, **Bognár Juditnak** és **Alföldi Róbertnek**, hogy munkám során barátilag támogattak.
- Végül, de nem utolsó sorban köszönet illeti **családomat** munkám során nyújtott támogatásukért, türelmükért és biztatásukért.

8. FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Neubig R.R., Spedding M., Kenakin T., Christopoulos A.; 2003. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol. Rev.*; 55 (4):597-606.
2. van Meerloo J., Kaspers G. J., Cloos J.; 2011. Cell sensitivity assays: The MTT assay; *Methods. Mol. Biol.*; 731:237-45.
3. Buttke T.M., McCubrey J.A., Owen T.C.; 1993. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines; *J. Immunol. Methods.*;157(1-2):233-40.
4. Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G.; 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture; *Cancer Commun.*;3(7):207-12.
5. Fotakis G., Timbrell J.A.; 2006. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride; *Toxicol. Lett.*; 160(2):171-7.
6. Vistejnova L., Dvorakova J., Hasova M., Muthny T. et al.; 2009. The comparison of impedance-based method of cell proliferation monitoring with commonly used metabolic-based techniques. *Neuro Endocrinol Lett.*; 30 (Suppl): 121-127.
7. Ózsvári B., Puskás L.G., Nagy L.I., Kanizsai I., Gyuris M., Madácsi R.; 2010. A cell-microelectronic sensing technique for the screening of cytoprotective compounds. *Int. J. Mol. Med.*; 25:525–530.
8. Kürti L., Veszélka S., Bocsik A., Dung N.T., Ozsvári B., Puskás L.G.; 2010. The effect of sucrose esters on a culture model of the nasal barrier. *Toxicol. In Vitro*; 26: 445–454.
9. Solly K., Wang X., Xu X., Strulovici B., Zheng W.; 2004. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev. Technol.*; 2: 363-372.

- 10. Boyd J.M., Huang L., Xie L., Moe B. et al.; 2008.** A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals. *Anal. Chim. Acta.*; 615: 80-87.
- 11. Boyd J.M., Huang L., Xie L., Moe B., Gabos S., Li X.F.; 2008.** A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals. *Anal. Chim. Acta.*; 615: 80-87.
- 12. Yu N., Atienza J.M., Bernard J.; 2006.** Real-time monitoring of morphological changes in living cells by electronic cell sensor arrays: an approach to study G protein-coupled receptors. *Anal. Chem.*; 78: 35-43.
- 13. Hood J.D., Cheresch D.A.; 2002.** Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer*; 2: 91- 100.
- 14. Boyden, S.V.; 1962.** The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.*; 115 (3): 453.
- 15. Bird, C., Shelli, K.; 2009.** Real-time, label-free monitoring of cellular invasion and migration with the xCELLigence system. *Nature methods*; 6: 8 .
- 16. Burczynski M.E., McMillian M., Ciervo J., Li L. et al.; 2000.** Toxicogenomics-based discrimination of toxic mechanism in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol. Sci.*; 58: 399–415.
- 17. Kier L.D., Neft R., Tang L., Suizu R. et al.; 2004.** Applications of microarrays with toxicologically relevant genes (tox genes) for the evaluation of chemical toxicants in Sprague Dawley rats in vivo and human hepatocytes in vitro. *Mutat. Res.*; 549: 101–113.
- 18. Glass K.Y., Newsome C.R., Tchounwou P.B.; 2005.** Cytotoxicity and expression of c-fos, HSP70, and GADD45/153 proteins in human liver carcinoma (HepG2) cells exposed to dinitrotoluenes. *Int. J. Environ. Res. Public Health*; 2: 355–361.
- 19. Franc M.A., Moffat I.D., Boutros P.C., Tuomisto J.T. et al.; 2008.** Patterns of dioxin-altered mRNA expression in livers of dioxin-sensitive versus dioxin-resistant rats. *Arch. Toxicol.*; 82: 809–830.

- 20. Wang E.J., Snyder R.D., Fielden M.R., Smith R.J. et al.; 2008.** Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. *Toxicology*; 246: 91–100.
- 21. Rokushima M., Omi K., Imura K., Araki A. et al.; 2007.** Toxicogenomics of drug-induced hemolytic anemia by analyzing gene expression profiles in the spleen. *Toxicol. Sci.*; 100: 290–302
- 22. Malard V., Berenguer F., Prat O., Ruat S. et al.; 2007.** Global gene expression profiling in human lung cells exposed to cobalt. *BMC Genomics*; 8: 147.
- 23. Dam K., Seidler F.J., Slotkin T.A.; 2003.** Transcriptional biomarkers distinguish between vulnerable periods for developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: Implications for toxicogenomics. *Brain Res. Bull.*; 59: 261–265.
- 24. Ellinger-Ziegelbauer H., Aubrecht J., Kleinjans J.C., Ahr H.J.; 2009.** Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. *Toxicol. Lett.*; 186: 36–44.
- 25. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M.; 1995.** Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys. Acta*; 1271: 165–170.
- 26. Fleury C., Mignotte B., Vayssier J.L.; 2002.** Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*; 84: 131–141.
- 27. Brown N.S., Bicknell R.; 2001.** Hypoxia and oxidative stress in breast cancer: Oxidative stress: Its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.*; 3: 323–327.
- 28. Halliwell B., Gutteridge J M.; 1999.** Free Radicals in Biology and Medicine. Third edition. *Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England*.
- 29. Chance B., Sies H., Boveris A.; 1979.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*; 59: 527–605.
- 30. Gul M., Kutay F.Z., Temocin S., Hanninen O.; 2000.** Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J. Exp. Biol.*; 38: 625–634.

- 31. Sano R., Reed J.C.; 2013.** ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1833 (12):3460-70.
- 32. Trevisani F., Cantarini M.C., Wands J.R.; 2008.** Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*; 29:1299–1305.
- 33. El-Serag H.B.; 2011.** Hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*; 365:1118–1127.
- 34. Perz J.F., Armstrong G.L., Farrington L.A., Hutin Y.J., Bell B.P.; 2006.** The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatol.*; 45:529–538.
- 35. Farber E.; 1984.** The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.*; 44: 4217–4223.
- 36. Cao H., Phan H., Yang L.X.; 2012.** Improved chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.*; 32 (4):1379-86.
- 37. Aravalli R.N., Steer C.J., Cressman, E. N.; 2008.** Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*; 48: 2047–2063.
- 38. Arzumanyan A., Reis H.M., Feitelson M.A.; 2013.** Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *Nat. Rev. Cancer*; 13: 123–135.
- 39. Roberts L.R., Gores G.J.; 2005.** Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin. Liver Dis.*; 25: 212–225.
- 40. Hussain S.P., Schwank J., Staib F., Wang X. W., Harris C.C.; 2007.** TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*; 26: 2166–2176.
- 41. Chen G.G., Merchant J.L., Lai P.B.S., Ho R.L.K.; 2003.** Mutation of p53 in Recurrent Hepatocellular Carcinoma and Its Association with the Expression of ZBP-89. *Am. J. Pathol.*; 162(6): 1823–1829.
- 42. Hu L., Lau S.H., Tzang C.H., Wen J.M. et al.; 2004.** Association of Vimentin overexpression and hepatocellular carcinoma metastasis; *Oncogene*; 23: 298–302.

- 43. Li Y., Tian B., Yang J., Zhao L. et al.; 2004.** Stepwise metastatic human hepatocellular carcinoma cell model system with multiple metastatic potentials established through consecutive in vivo selection and studies on metastatic characteristics. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*; 130: 460–468.
- 44. Yamazaki D., Kurisu S., Takenawa T.; 2005.** Regulation of cancer cell motility through actin reorganization; *Cancer Sci.*; 96: 379-86.
- 45. Laplante M., Sabatini D.M.; 2012.** mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*; 149 (2): 274-293.
- 46. Zhou H., Huang S.; 2010.** mTOR signaling in cancer cell motility and tumor metastasis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.*; 20: 1-16.
- 47. van Zijl F., Krupitza G., Mikulits W.; 2011.** Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat. Res.*; 728: 23-34.
- 48. Valastyan S., Weinberg R.A.; 2011.** Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*; 147 (2): 275-292.
- 49. Heindryckx F., Colle I., Van Vlierberghe H.; 2009.** Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int. J. Exp. Pathol.*; 90 (4): 367–386.
- 50. Goldfarb S., Pugh T.D., Koen H., He Y.Z.; 1983.** Preneoplastic and neoplastic progression during hepatocarcinogenesis in mice injected with diethylnitrosamine in infancy. *Environ. Health Perspect.*; 50: 149–161.
- 51. Verna L., Whysner J., Williams G.M.; 1996.** N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther.*; 71: 57–81.
- 52. Mátés L., Nicolae C., Mörgelin M., Deák F., Kiss I., Aszódi A.; 2004.** Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities. *Matrix Biol.*; 23: 195-204.
- 53. Deak F., Wagener R., Kiss I., Paulsson M.; 1999.** The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.*; 18: 55–64.

- 54. Wagener R., Ehlen H.W., Ko Y.P., Kobbe B., Mann H.H.; 2005.** The matrilins-adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS Lett.*; 579: 3323–3329.
- 55. Sharma M.K., Watson M.A., Lyman M., Perry A., Aldape K.D.; 2006.** Matrilin-2 expression distinguishes clinically relevant subsets of pilocytic astrocytoma. *Neurology*; 66: 127–130.
- 56. Szabo E., Korpos E., Batmunkh E., Lotz G., Holczbauer A.; 2008.** Expression of matrilin-2 in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol. Oncol. Res.*; 14: 15–22.
- 57. Fullár A., Baghy K., Deák F., Péterfia B., Zsák Y.; 2014.** Lack of Matrilin-2 Favors Liver Tumor Development via Erk1/2 and GSK-3 β Pathways In Vivo. *PLoS ONE*; 9 (4): e93469.
- 58. Chowdhury G., Calcutt M.W., Nagy D.L., Guengerich F.P.; 2012.** Oxidation of Methyl and Ethyl Nitrosamines by Cytochromes P450 2E1 and 2B1. *Biochemistry*; 51(50): 9995–10007.
- 59. Li B., Cao C.P., Mao G.P.; 2005.** Effect of proapoptosis protein on hepatocarcinogenesis. *Chin. J. Dig. Dis.*; 6:93–97.
- 60. Lim I.K.; 2002.** Spectrum of molecular changes during hepatocarcinogenesis induced by DEN and other chemicals in Fischer 344 male rats. *Mech. Ageing Dev.*; 123: 1665–1680.
- 61. Miller M.T., Marylin T.; 1991.** Thalidomide Embryopathy: A Model for the Study of Congenital Incomitant Horizontal Strabismus. *Transaction of the American Ophthalmological Society*; 81: 623–674.
- 62. Shetty K.; 2007.** Current role of thalidomide in HIV-positive patients with recurrent aphthous ulcerations; *Gen. Dent.*; 55 (6): 537-542.
- 63. Palumbo A., Facon T., Sonneveld P., Bladè J. et al.; 2008.** Thalidomide for treatment of multiple myeloma: 10 years later. *Blood*; 111 (8): 3968-3977.
- 64. Teo S., Resztak K.E., Scheffler M.A., Kook K.A. et al.; 2002.** Thalidomide in the treatment of leprosy; *Microbes Infect.*; 4 (11):1193-1202.

- 65. Singhal S., Mehta J., Desikan R., Ayers D. et al., 1999.** Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*; 341 (21): 1565–1571.
- 66. D'Amato R.J., Loughran M.S., Flynn E., Folkman J.; 1994.** Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 91: 4082–4085.
- 67. Alexanian R., Weber D., Giralt S., Delasalle K.; 2002.** Consolidation therapy of multiple myeloma with thalidomide-dexamethasone after intensive chemotherapy. *Ann. Oncol.*; 13 (7):1116-1119.
- 68. Verheul H.M.W., Panigrahy D., Yuan J., d'Amato R.J.; 1999.** Combination oral antiangiogenic therapy with thalidomide and sulindac inhibits tumour growth in rabbits. *Br. J. Cancer*; 79 (1): 114–118.
- 69. Eleutherakis-Papaiakovou V., Bamias A., Dimopoulos M.A.; 2004.** Thalidomide in cancer medicine; *Ann. Oncol.*; 15(8):1151-60.
- 70. Guddo F., Fontanini G., Reina C., Vignola A.M., Angeletti A., Bonsignore G.; 1999.** The expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in tumor-associated stromal cells and vessels is inversely correlated with non-small cell lung cancer progression; *Hum. Pathol.*; 30 (7):788-94.
- 71. Huang Y.T., Hsu C.W., Chiu T.H.; 2008.** Thalidomide and Its Analogs as Anticancer Agents. *Tzu Chi Medical Journal*; 20 (3): 188–195.
- 72. Kotla V., Goel S., Nischal S., Heuck C. et al.; 2009.** Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J. Hematol. Oncol.*; 12;2:36.
- 73. Martiniani R., Di Loreto V., Di Sano C., Lombardo A., Liberati A.M.; 2012.** Biological Activity of Lenalidomide and Its Underlying Therapeutic Effects in Multiple Myeloma. *Adv. Hematol.*; 2012: 1–11.
- 74. Faragó N., Zvara Á., Varga Z., Ferdinandy P., Puskás L.G.; 2011.** Purification of high-quality microRNA from the heart tissue. *Acta Biol. Hung.*; 62 (4): 413-425.
- 75. Fang Y.; 2010.** Resonant Waveguide Grating Biosensor for Microarrays; Optical Guided-wave Chemical and Biosensors II; ISBN 978-3-642-02827-4, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

- 76. Avidin Kft.; 2010.** Phthalimide derivatives that influence cellular vesicular systems, pharmaceutical compositions, and use thereof. *US Patent; 184,762, 2010.*;
- 77. Avidin Kft.; 2012.** Use of trifluoro phtalimides for the treatment of cancerous diseases. *WO Patent; 85,608, 2012.*
- 78. Fabian G., Farago N., Feher L.Z., Nagy L.I. et al.; 2011.** High-density real-time PCR-based in vivo toxicogenomic screen to predict organ-specific toxicity; *Int. J. Mol. Sci.*; 12: 6116-6134.
- 79. Bulera S.J., Eddy S.M., Ferguson E., Jatkoe T.A. et al.; 2001.** RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology*, 33, 1239–1258.
- 80. Olson R.D., Mushlin P.S.; 1990.** Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses; *FASEB J.*; 4 (13): 3076-3086.
- 81. Lahoti T.S., Patel D., Thekkemadom V., Beckett R., Ray S.D.; 2012.** Doxorubicin-induced in vivo nephrotoxicity involves oxidative stress-mediated multiple pro- and anti-apoptotic signaling pathways. *Curr. Neurovasc. Res.*; 9 (4): 282-295.
- 82. Puskás L.G., Fehér L.Z., Vizler C., Ayaydin F., Rásó E., Molnár E.; 2010.** Polyunsaturated fatty acids synergize with lipid droplet binding thalidomide analogs to induce oxidative stress in cancer cells. *Lipids. Health. Dis.*; 9:56.
- 83. Molnár E., Kuntam S., Cingaram P.K., Peksel B. et al.; 2013.** Combination of small molecule microarray and confocal microscopy techniques for live cell staining fluorescent dye discovery. *Molecules*; 20: 9999–10013.
- 84. Nagy L.I., Molnár E., Kanizsai I., Madácsi R. et al.; 2013.** Lipid droplet binding thalidomide analogs activate endoplasmic reticulum stress and suppress hepatocellular carcinoma in a chemically induced transgenic mouse model. *Lipids Health Dis.*; 22; 12:175.
- 85. Ge Y., Montano I., Rustici G., Freebern W.J. et al.; 2006.** Selective leukemic-cell killing by a novel functional class of thalidomide analogs. *Blood*; 108:4126–4135.

- 86. Yang Z., Cheng W., Hong L. et al.; 2007.** Adenine Nucleotide (ADP/ATP) Translocase 3 Participates in the Tumor Necrosis Factor–induced Apoptosis of MCF-7 Cells. *Mol. Biol. Cell.*; 18 (11): 4681–4689.
- 87. Cho S.G., Lee Y.H., Park H.S., Ryoo K. et al.; 2001.** Glutathione S-Transferase Mu Modulates the Stress-activated Signals by Suppressing Apoptosis Signal-regulating Kinase 1. *J. Biol. Chem.*; 276, 12749-12755.
- 88. Harrison D.G., Bates J.N.; 1993.** The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation.*; 87: 1461-1467.
- 89. Joo M., Chi J.G., Lee H.; 2005.** Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma. *J. Korean Med. Sci.*; 20: 829-834.
- 90. Chuma M., Sakamoto M., Yamazaki K., Ohta T. et al.; 2003.** Expression profiling in multistage hepatocarcinogenesis: identification of HSP70 as a molecular marker of early hepatocellular carcinoma. *Hepatology*; 37: 198-207.
- 91. Lim S.O., Park S.G., Yoo J.H., Park Y.M. et al.; 2005.** Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J. Gastroenterol.*; 11: 2072-2079.
- 92. Quintero M., Cabanas M.E., Arus C.; 2007.** A possible cellular explanation for the NMR-visible mobile lipid (ML) changes in cultured C6 glioma cells with growth. *Biochim. Biophys. Acta.*; 1771: 31-44.
- 93. Luk J.M., Lam C.T., Siu A.F., Lam B.Y. et al.; 2006.** Proteomic profiling of hepatocellular carcinoma in Chinese cohort reveals heat-shock proteins (HSP27, HSP70, GRP78) up-regulation and their associated prognostic values. *Proteomics*; 6: 1049–1057.
- 94. Hashida T., Kotake Y., Ohta S.; 2011.** Protein disulfide isomerase knockdown-induced cell death is cell-line dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. *J. Toxicol. Sci.*; 1:1–7.

- 95. Moenner M., Pluquet O., Bouchecareilh M., Chevet E.; 2007.** Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res.*; 67: 10631–10634.
- 96. Wu J., Kaufman R.J.; 2006.** From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response. *Cell Death Differ.*; 13: 374–384.
- 97. Borradaile N.M., Han X., Harp J.D., Gale S.E. et al.; 2006.** Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J. Lipid Res.*; 12: 2726–2737.
- 98. Wang W.B., Feng L.X., Yue Q.X., Wu W.Y. et al.; 2012.** Paraptosis accompanied by autophagy and apoptosis was induced by celastrol, a natural compound with influence on proteasome, ER stress and Hsp90. *J. Cell. Physiol.*; 227: 2196–2206.
- 99. Nguyen P., Leray V., Diez M., Serisier S., Le Bloc'h J., Siliart B., Dumon H.; 2008.** Liver lipid metabolism; *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*; 92(3):272-83.
- 100. Blaner W.S., O'Byrne S.M., Wongsiriroj N., Kluwe J. et al.; 2009.** Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim. Biophys. Acta*; 1791: 467–473.
- 101. Shirakami Y., Gottesmann M.E., Blaner W.S.; 2012.** Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis is suppressed in lecithin:retinol acyltransferase-deficient mice primarily through retinoid actions immediately after carcinogen administration. *Carcinogenesis*; 33: 268–274.

Magyar nyelvű összefoglaló

Doktori értekezésemben egy olyan új, jelölésmentes *in vitro* molekulaszűrési eljárást mutatok be, melyre sikeresen állítottunk be citotoxicitási vizsgálati módszert, amellyel célzottan szintetizált talidomid analógokat szűrtünk le. A potenciális gyógyszer-jelölt molekulákat sikeresen vizsgáltunk tovább különböző molekuláris, mikroszkópiás és toxikogenomikai módszerekkel, majd *in vivo* hatásvizsgálatot végeztünk a humán hepatocelluláris karcinóma rágcsló modelljén.

A hepatocelluláris karcinóma (HCC) az egyik vezető halálok a rákos megbetegedések közül. A számos terápiás megoldás ellenére világviszonylatban a hepatocelluláris karcinóma a harmadik helyen áll a rákos megbetegedések által okozott halálokok között. A vezető rizikófaktorok között szerepelnek a különböző hepatitiszfertőzések, a nagymértékű alkoholfogyasztás és az általa okozott cirrózisok mellett számos környezeti tényező, mint például a rákkeltő nitrozamin származékok. A hepatocelluláris karcinóma kialakulása egy több lépcsős folyamat eredménye, melynek hátterében nemcsak környezeti faktorok, hanem genetikai elváltozások is állnak, s melyek végső soron együttesen okozzák a szerv kóros elváltozását. Jellemzően a hepatocelluláris karcinóma rosszul reagál a különböző a kemoterápiás eljárásokra, és gyakran kiújul az érintett májlebeny eltávolítását követően is. A klinikai gyakorlatban a hepatocelluláris karcinóma kezelésére az egyik leggyakrabban alkalmazott kemoterápiás szer a doxorubicin illetve a ciszplatín, melyeknek a jelentős mellékhatásai közismertek. A hepatocelluláris karcinóma a gyulladásos rák típusok közé sorolható. A krónikus gyulladást okozó környezeti faktorok hozzájárulnak a máj mezenchimális és epiteliális eredetű sejtjeinek a transzformációjához. A folyamatos sérülések és regenerálódások, melyeknek hátterében sokszor közvetve vagy közvetlenül az oxidatív stressz állhat, olyan károsodásokat okozhatnak a májsejtek genetikai állományában, amelyek különböző onkogéneket aktiválnak és/vagy tumorszupresszor géneket inaktiválnak.

A metasztázis képzés a különböző rákoknak, így a hepatocelluláris karcinómának is, olyan alapvető tulajdonsága, melynek során az eredeti tumorból egy vagy több daganatos sejt elszabadul és a szöveten belüli, lokális áttéket vagy a véráramba belépve és más szervekbe eljutva távoli áttéket képeznek a tumor progresszió késői fázisában. A metasztázis kialakulása egy sor egymással átfedő folyamat eredménye, melynek során az elsődleges tumorból sejtek válnak le és a

szövetközi térben vándorolni kezdenek. A vér- és nyirokereket elérve beléphetnek a keringésbe, majd a szervezet egy távoli pontján egy kapillárisban csapódhatnak és ott mikrometasztázist képezhetnek. Ha a körülmények megfelelőek a kitapadt sejteknek, kolonizálhatnak és makrometasztázist alakíthatnak ki. A daganatos sejtek mozgása hasonlóképpen folyik, mint amit az egészséges sejteknél megfigyelhetünk olyan fiziológiás működések során, mint az embriógenesis, a sebgyógyulás vagy az angiogenesis. Ám a tumor sejtek esetében nem működnek azok a gátló folyamatok, amelyek az egészséges sejtek esetében leállítják a sejtek mozgását, amikor már arra nincs szükség. Ezzel szemben a tumorsejtek esetében olyan faktorok termelődése indul meg, melyek elősegítik és fenntartják a migráció folyamatát és ezáltal tudnak invazív válni és migrálni.

A hepatocelluláris karcinóma állatokban történő tesztelésére több olyan állatmodellt is kialakítottak, mellyel jól tanulmányozható a karcinogenesis kialakulásának lépései és megfelel különböző rákellenes hatóanyagok vizsgálatára. A kémiai tumorigenezissel létrehozott modell rendszer esetében az állatokat olyan vegyülettel kezelik, melyet a máj enzimeit biológiailag aktívvá és így mutagénné tesznek. Ez képes a máj sejtjeit károsítani azáltal, hogy DNS adduktokat képez vagy enzimműködést befolyásol. Ennek során valamilyen karcinogén vegyülettel, széntetrakloriddal (CCl_4) vagy dietilnitrozaminnal (DEN) indukálják a hepatocelluláris karcinómát. Mind a CCl_4 , mind pedig a DEN vegyületekkel való kezelés esetében a májban történő biokonverzió eredményeként létrejövő metabolit az, amely a májban gyulladásos elváltozásokat és a későbbiekben karcinogenezist okoznak. A DEN használata széles körben elterjedt a kísérletes hepatocelluláris karcinóma állatmodelljének kiváltásában. A DEN-nek önmagában nincs karcinogén hatása, a májban a citokróm-P450 enzim alakítja át karcinogén tulajdonságúvá, ami már képes a tumorigenezisre. A DEN metabolitja DNS adduktokat képez a májsejtekben és preneoplasztikus régió kialakulásához vezet. Kísérleteinkhez a dietil-nitrozamin (DEN) által indukált modellt alkalmaztuk, egy olyan transzgenikus egérmodellen, amelyben a Matrillin-2 génje mesterségesen ki van ütve. A Matrillin-2 fehérjének (Matn2) fontos szerepe van az extracelluláris mátrix kialakulásában, a sebgyógyulásban és tumor képződésben.

Munkánk során újonnan szintetizált talidomid analógokat vizsgáltunk a HCC különböző *in vitro* és *in vivo* modell rendszerein. A talidomid és a napjainkban forgalomban lévő analógjainak pontos hatásmechanizmusa eddig nem ismert, de

tanulmányok sora mutatta ki, hogy az angiogenezist gátló hatását a VEGF által közvetített útvonalon keresztül fejt ki. Továbbá antiproliferatív és antiangiogén hatása van, mivel az I κ B kináz aktivitásának gátlásán illetve az IL-6 útvonal megzavarásán keresztül gátolja az NF- κ B útvonalat. Számos talidomid analógról sikerült kimutatni, hogy oxidatív stresszt vált ki a kezelt sejtes rendszerekben, illetve indukálja az apoptózis kaszkád beindulását a kaszpáz 8 és 9 aktiválásán keresztül.

Munkánk során beállítottunk egy olyan valós idejű mérésen alapuló technikát a citotoxikus talidomid analógok hatásának szűrésére, amely a sejtek vezetőképességének mérésén keresztül ad információt a sejtek kezelésre adott válaszáról. Az így kapott eredmények jól korrelálnak a standard, végpontmérésen alapuló technikák eredményeivel. A valós idejű sejtéletképesség méréssel sikeresen vizsgáltunk meg a biokémiai vizsgálati rendszerrel előszűrt talidomid analógok hatásait. Méréseink során sikeresen mutattunk ki dózisfüggő hatásokat az Ac-929, Ac-1041, Ac-915 és Ac-2010 anyagok esetében. Az anyaghatás időbeli kinetikájának vizsgálatánál úgy találtuk, hogy a vizsgált molekulák 10 μ M feletti koncentrációban rövid időn belül a sejtek halálát okozza, amelyet biokémiai paraméterek és a mikroelektronikai ellenállás változás mérésén keresztül is tapasztaltunk. Ezzel szemben az alacsonyabb koncentrációk esetében a mért ellenállás értékekben nem történt drasztikus csökkenés, ebből arra következtethetünk, hogy az anyagkezelés hatására hosszabbtávú események indulnak el, melynek végpontja többek között a programozott sejthalál is lehet. A valós idejű sejtéletképesség mérésén alapuló kísérleteink eredményei jól korrelálathatók a hagyományos biokémiai tesztekkel kapott eredményeinkkel. Az előszűrési kísérleteink során két olyan talidomid analóg molekulát, az Ac-915-öt és Ac-2010-et, sikerült azonosítanunk a molekulakönyvtárból, melyek hatása jelentősen kimagaslott a többi molekulák közül. Az Ac-2010 talidomid analóg sejt migrációra kifejtett hatásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az Ac-2010 már olyan koncentrációban (250 nM) is csökkentette a sejt migráció ütemét a HepG2 sejtek esetében, amelyet előzetes mérések alapján nem találtunk toxikusnak.

Toxikogenomikai kísérletünk során a talidomid kezelés várható mellékhatásait vizsgáltuk. Az Ac-915 talidomid analóg mellett a ciszplatin és a doxorubicin kemoterápiás szereket alkalmaztuk referencia vegyületekként. Mint az már ismert a HCC kezelésében is alkalmazott két kemoterápiás szer jelentős mellékhatásokkal rendelkezik. A doxorubicin és ciszplatin kezelés hatására számos anyagcsere, oxidatív stressz illetve sejtciklus és apoptózis függő gén aktiválódott több létfontosságú szervben

is. Ezzel szemben az Ac-915 jelentősen kevesebb gén aktivitását befolyásolta és azokat is főleg a májban és vese szövetben. Tehát a várható mellékhatások kisebbek lehetnek és a hatás is szerv specifikus. Továbbá a májszövet esetében azt találtuk, hogy az oxidatív stressz hatására aktiválódó jelátviteli útvonalakban résztvevő markergének kis mértékben gátlódtak és ezzel párhuzamosan kismértékű növekedés volt megfigyelhető a sejtciklus és apoptózis függő jelátviteli mechanizmusok génjeiben.

A talidomid analógjaink a citotoxikus hatásukat dajkafehérjével való kölcsönhatáson keresztül, reaktív oxigén gyökök termelésével és az intracelluláris glutation szint csökkentésével érik el. Hullámhossz rezonancia eltolódás mérésén alapuló technikával közvetlen kölcsönhatást tudtunk kimutatni a HSP70 és HSP90 fehérjék illetve a két vizsgált talidomid analógunk között.

A talidomid analógok relatív szöveti eloszlását a különböző szervekből készített natív metszeteken vizsgáltuk meg konfokális mikroszkópia segítségével, különböző időpontokban. Célszervekként főleg a májat és a vesét azonosítottuk, mely jól korrelált a toxikogenomikai méréseink eredményével, mivel a legjelentősebb génkifejeződésbeli változásokat főképp a májban és másodsorban a vesében tapasztaltuk. A leghosszabb ideig tartó dúsulás a májban volt kimutatható. Az agyban és izomszövetben nem, a szívben csak minimális dúsulást találtunk, amely gyorsan le is csengett.

A HCC DEN-nel indukált in vivo modelljén végzett hatástani kísérleteink során azt az eredményt kaptuk, hogy az Ac-915 és Ac-2010 szignifikánsan csökkentette a májtumorok számát és a méretét a kontroll csoporthoz hasonlítva, melyet májtömeg index mérésével is alá tudtunk támasztani. Az Ac-2010 esetében szintén szignifikáns csökkenés tapasztaltunk a tumor számban, méretben és tömegben, de nemcsak a kontroll csoporthoz hasonlítva, hanem az Ac-915-tel kezeltékhez viszonyítva is.

Konklúzió

Kísérleti eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a kiszűrt két talidomid analógunk, az Ac-915 és Ac-2010, a citotoxikus hatását a reaktív oxigén gyökök termelésén és a sejtek antioxidáns rendszerének redukált glutation tagjának csökkentésén keresztül fejti ki. A citotoxicitást tovább támogatja a talidomid analógok endoplazmatikus retikulummal és hősokk fehérjékkel való kölcsönhatása. Ezeket az eredményeket látszik alátámasztani a sejtek életképességének mérése és a sejtek migrációjának vizsgálata során kapott adatok is. Továbbá feltételezhetően ezek a

tulajdonságok állhatnak a talidomid analógjaink májtumor méretet és számot csökkentő hatásai mögött is a HCC Matn2 KO DEN-nel indukált modellben.

English summary

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the leading cause of cancer death. The majority of HCC cases are associated with chronic hepatitis or cirrhosis induced by persistent infection with hepatitis B or hepatitis C virus and caused by carcinogens such as diethylnitrosamine. Despite advances in different chemotherapies which are often associated with toxic side effects, liver cancer has limited treatment options.

Here, we demonstrated that Ac-915 and Ac-2010, novel amino-trifluoro-phtalimide analogs with novel substitutions also interfere with lipid droplets and the endoplasmic reticulum (ER), and induce intracellular reactive oxygen species (ROS) at lower concentrations than the previously observed analogue compounds. The upregulation of HSPs, as observed in various cancers, including liver cancer suggests that they might be involved in carcinogenesis. Lipid droplets (LDs) are one of the main intracellular targets of amino-trifluoro-phtalimide analogs. As LDs are formed in the ER, we were able to show that specific LD-binding drugs could interfere with LD homeostasis and ER-membrane integrity and could trigger apoptosis through ER stress. Tumors, including hepatocellular carcinoma are more sensitive to ER stress and reactive oxygen species (ROS) than normal cells as their stress response is continuously engaged due to their chronic stress situation, thereby leading to activation of pro-apoptotic signals and finally tumor cell death.

DEN is widely used as a carcinogen in experimental animal models. The liver of matrilin-2 KO ($\text{Matn2}^{-/-}$) mice contained macroscopic tumors of both larger number and size than the wild-type liver after diethylnitrosoamine (DEN) treatment. Upon intraperitoneal administration into weaning mice at 2 weeks after birth, hepatic tumors are formed 8 month later. Since DEN itself does not exert carcinogenicity, it needs to be bioactivated by cytochrome P450 enzymes in the liver, resulting in DNA-adducts that form through an alkylation mechanism locally, which induce the formation of putative preneoplastic lesions. Owing to the increased number and size of the DEN-induced liver tumors in the transgenic $\text{Matn2}^{-/-}$ mice, we used this in vivo model to assess the efficacy of our novel amino-trifluoro-phtalimide analogs.

Two novel amino-trifluoro-phtalimide analogs Ac-915 and Ac-2010 showed superior cytotoxic activity in cancer cells and therefore were selected to the present study. Their cytotoxic effects on human hepatocellular carcinoma cell lines (namely: HepG2, Hep3B and Huh7) were measured by using the MTS assay. Both Ac-915 and

Ac-2010 induced cell death of liver cancer cells at sub- or low micromolar ranges. Cytotoxic effects of Ac-915 and Ac-2010 compounds were also tested by the real-time cell electronic sensing, xCELLigence System (RT-CES) on two different hepatocellular carcinoma cell lines (Huh7, HepG2). Both analogs exerted micromolar cytotoxic effects on both liver cancer cell lines used. These results are in good correlation with data obtained by using the biochemical assay.

To determine whether our novel compounds have only effects on cell proliferation or they inhibit cell migration, the same technology was used. Cell migration was followed in real-time by using the RTCA DP xCELLigence System (Acea-Roche). Ac-2010 inhibited migration even at 250 nM, where no cytotoxicity could be detected in case of HepG2 cells. At higher concentration the drug completely inhibited cell migration 2 h after administration.

Direct biomolecular interactions were determined between human recombinant and purified HSP60, HSP70, HSP90 proteins and Ac-915 and Ac-2010 with resonant waveguide optical biosensor technology in a biochemical binding assay. The technology is based on a microplate with resonant waveguide optical biosensors integrated into each well and a high throughput screening-compatible optical reader. The biochemical interaction between the small molecule and the protein was measured as a shift in reflected wavelength and is expressed in picometers (pm). The binding of both analogs to each of the protein was specific and saturable with the dose response. The affinity (KD) values were calculated as follows for Ac-915: HSP70 KD: 14 μ M, HSP90 KD: 11.5 μ M; for Ac-2010: HSP70 KD: \approx 16 μ M, HSP90 KD: \approx 16 μ M and PDI KD: \approx 6 μ M. The upregulation of HSPs as observed in various cancers, including liver cancer suggests that they might be involved in carcinogenesis. Because of the stressful cancerous microenvironment, tumor cells strived to increase the expression of chaperone proteins for cytoprotective function and to enhance tumor growth and metastasis.

As thalidomide analogs possess strong inherent blue fluorescence, intracellular localization can be easily performed on live cells. The subcellular localization of the new thalidomide analogs Ac-915 and Ac-2010 was determined by fluorescent microscopy in human liver cancer cells. Previously we determined that amino-trifluorophthalimides stain lipid droplets and some of their derivatives were co-localized to ER. In order to assess the localization of the two novel compounds, we incubated HepG2

human HCC cells in culture medium containing Ac-915 or Ac-2010 and performed fluorescent microscopy. Both compounds showed ER-specific localization.

Intracellular localization studies were in good concordance with our target identification results, where most of our hits were localized to ER or lipid droplets. Toxic compounds and numerous anticancer agents interfere with chaperone and ER functions leading to cellular stress which is manifested by elevated reactive oxygen species (ROS) and dramatic decrease in the anti-oxidant, glutathione (GSH) level. To investigate whether Ac-915 and Ac-2010 exert a pro-oxidative effect as determined earlier for other amino-trifluoro-phthalimides, we measured the presence of ROS in human hepatocellular carcinoma cells (Hep3B). To reveal the correlation of depletion of glutathione and ROS production of the analogs we determined the intracellular concentrations of glutathione. To determine whether Ac-915 and Ac-2010 affect intracellular GSH levels Hep3B cells were treated with compounds and GSH levels were recorded. According to our expectations, by inducing oxidative stress both compounds also depleted intracellular GSH levels (for Ac-915) GSH levels.

The expected side-effects were determined by high-throughput QRT-PCR techniques on different organs (heart, liver, brain, kidney) where the effects of Ac-915 was compared with doxorubicin and cisplatin. It is an understood thing that cisplatin and doxorubicin have serious side-effects on many organs even in gene expression level. Our reference agents, doxorubicin and cisplatin, influenced the expression of many important genes play roles in apoptosis, oxidative stress, cell-cycle or metabolism in the observed organs. In contrast with it treatment with Ac-915 activated fewer genes in specific organs and the fluctuation in the gene expression levels focused on liver and kidney. These results suggest that Ac-915 has more moderate side-effects compared to the reference molecules and they are concentrated mainly on liver.

To determine the tissue distribution of trifluor-amino-phthalimides, compounds were administered by i.v. injection into mice, the animals were killed at different time points and different organs were dissected. Native microscope sections were prepared and analyzed under fluorescent microscope. Because our analogs have strong inherent blue fluorescence, relative tissue distribution can be determined by using fluorescent microscopy with 405 nm laser with DAPI configuration. As all tissues possess inherent blue fluorescence at different intensities, fluorescent signals of untreated control animal samples were compared with those of treated samples. There was only a slight fluorescence increase 1 h after administration of Ac-915 in the brain, which implies that

these analogs cannot penetrate to the brain. There was minor fluorescence increase in the heart, but only 4 h after administration. The target organs of Ac-915 seemed to be the kidney and preferentially the liver (in a good correlations with gene expression data). Ac-915 exhibited strong fluorescent signals in the liver with a peak at 4 h. Similarly, 2 and 4 h after administration strong signals could be recorder in the kidney. From these results we concluded that the novel trifluor-amino-phtalimides indeed accumulate in the liver, the target organ of our study. For studies of liver tumor development, 15-day-old *Matn2*^{-/-} mice were treated with a single dose of DEN. Mice in the Ac-915 treated group were treated 4 months after DEN treatment for an additional 3 months. Treatments were conducted by i.p. injection of Ac-915 at a dose of 10 mg/kg or Ac-2010 4 mg/kg. Mice were killed 8 months after DEN administration and the number and size of tumors and liver mass index were determined. Upon assessment of liver tumors, we found significantly less tumor development in the livers of the treated mice compared with that of control mice, as evaluated by less liver tumor incidence, fewer tumors and smaller tumor size. Ac-2010 may exhibit similar activity the same experiment was replicated, but instead of applying the drug for 3 months Ac-2010 was administered only for 1 month. Liver samples were analyzed at the same time point, 8 months after DEN administration. Because of higher acute toxicity and better solubility, Ac-2010 was injected at a lower dose (4 mg/kg). Even with this protocol we obtained better result, than with Ac-915. Significantly ($p < 0.01$) less liver tumor incidence, fewer tumors and lower liver mass index was obtained compared to the untreated control group. Drug administration was started 4 months after DEN administration, when the early stages of carcinogenesis ended and pre-neoplastic foci already appeared.

Conclusion

The present study demonstrated a potent cell death-inducing effect of two novel amino-trifluoro-phtalimide analogs, Ac-915 and Ac-2010, which bind lipid droplets, induce intracellular ROS formation and ER-stress. Both Ac-915 and Ac-2010 compounds induced cell death of liver cancer cells at sub or low micromolar ranges detected by classical biochemical end-point assay as well as with real-time measurements. Besides cell proliferation inhibition, analogs exert cell migration inhibition even at 250 nM. Cytotoxic effects of the novel analogs were mediated by affecting chaperone functions, induction of oxidative stress and depletion of

intracellular GSH. The novel thalidomide analogues interacted with several proteins that localized into lipid droplets and ER. Among their candidate protein targets are the different heat-shock proteins (HSP60, HSP70, and HSP90). Direct biomolecular interactions between human HSP70, HSP90 proteins and Ac-915 and Ac-2010 were confirmed with resonant waveguide optical biosensors. The activity of PDI was inhibited by both Ac-915 and Ac-2010 at micromolar concentrations.

Relative biodistribution of the analogs was analyzed in using native tissue sections of different organs after administration of drugs, and fluorescent confocal microscopy based on the inherent blue fluorescence of the compounds. The target organs of the analogs were the liver and the kidney. No, or minimal penetration could be detected into the brain, the muscle or the heart.

We used the *Matn2*^{-/-} mice and DEN treatment for induction of tumors in the liver. Mice were treated either with Ac-915 (10 mg/kg) for 3 months, or Ac-2010 (4 mg/kg) for 1 months, following 4 months of DEN treatment. Liver tumor assessment was conducted 8 months after DEN administration. Significantly less tumor development was found in the livers of the Ac-915- or Ac-2010-treated groups compared with those of control mice, and were characterized by less liver tumor incidence, fewer tumors and smaller tumor size. These results indicate that treatment with either Ac-915 or with Ac-2010 affected tumor progression at later stages, which implies that these amino-trifluoro-phthalimide analogs influence ER-stress could serve potent clinical candidates against HCC.