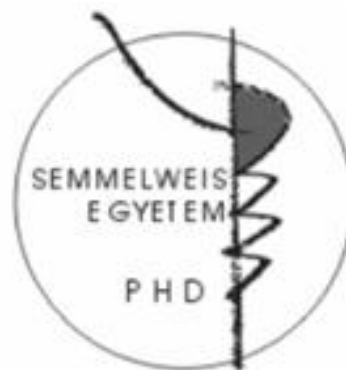


# Kísérletes agymetasztázisok vaszkularizációjának vizsgálata

Doktori tézisek

**Bugyik Edina**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Paku Sándor, D.Sc.

Hivatalos bírálók:

Dr. Banczerowski Péter, c. egyetemi tanár, Ph.D.

Dr. Krizbai István, tudományos főmunkatárs, D.Sc.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sótonyi Péter egyetemi tanár,  
az MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Réz Gábor egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Lotz Gábor egyetemi docens, Ph.D.

Budapest  
**2014**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>I. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR .....</b>	<b>3</b>
<b>I.1. A tumorindukált angiogenezis jelentősége .....</b>	<b>3</b>
<b>I.2. A tumorszerkezet és az ereződés összefüggése .....</b>	<b>4</b>
<b>II. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>6</b>
<b>III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>7</b>
<b>III.1. Állatkísérletek .....</b>	<b>7</b>
<b>III.2. A minták feldolgozása .....</b>	<b>7</b>
<b>III.3. Molekuláris biológiai módszerek .....</b>	<b>8</b>
<b>III.4. E-cadherin csendesítése shRNS-el a HT25 sejtvonalban.....</b>	<b>9</b>
<b>III.5. Statisztikai analízis .....</b>	<b>10</b>
<b>IV. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>11</b>
<b>IV.1. Kísérletes agymetasztázisok ereződésének vizsgálata morfológiai módszerekkel .....</b>	<b>11</b>
<b>IV.2. Molekuláris biológiai módszereken alapuló vizsgálatok.....</b>	<b>12</b>
<b>IV.3. A sebgyógyulás vizsgálata agyszövetben .....</b>	<b>13</b>
<b>IV.4. E-cadherin csendesítése shRNS-el a HT25 sejtvonalban .....</b>	<b>13</b>
<b>V. KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>15</b>
<b>VI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>16</b>
<b>VI.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények.....</b>	<b>16</b>
<b>VI.2. Egyéb témában megjelent közlemények.....</b>	<b>16</b>
<b>VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>18</b>

## I. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI HÁTTÉR

### I.1. A tumorindukált angiogenezis jelentősége

Már 1971-ben felvetették annak a lehetőségét, hogy a tumornövekedés új erek képződését igényli. Ennek bizonyítékait Judah Folkman fogalmazta meg 1989-ben. Megfigyelte, hogy a tumorok vaszkularizáció előtt lassan növekednek, majd az érhálózat megjelenése után már exponenciális növekedést mutatnak, amiből arra következtetett, hogy a tumorok növekedése angiogenezis függő, és felvetette, hogy a tumor növekedésének gátlása esetleg az angiogenezis gátlásán keresztül is elérhető.

Mivel a különböző szövetek és szervek kötőszövetének és kapillárisálózatának szerkezete eltérő, felmerül, hogy másképp zajlik bennük a tumorindukált angiogenezis. A primer tumorok kialakulásának helyén általában nagy mennyiségű kötőszövet található. Kötőszövetes környezetben az angiogenezisnek két fő formája van, ezek az ún. „*sprouting*”, vagy bimbózó és az intusszusceptív angiogenezis. Mindkét folyamat alapvetően endotélsejt proliferációval járó érdenzitás növekedést jelent. A metasztázisképzés fő szervei (máj, agy, tüdő) azonban kevés kötőszövetet, viszont nagy mennyiségű kapillárist tartalmaznak.

Egyre több irodalmi adat utal arra, hogy neoangiogenezis helyett a meglévő erek inkorporációja fontos szerepet játszhat a tumorok fejlődésében. Ez a folyamat a szaknyelvben „*vascular co-option*” néven terjedt el. 1987-ben vetették fel először, hogy a tumor a meglévő erek bekebelezésével tesz szert vérellátásra. Ez a nézet sokáig a háttérben maradt, később azonban egyre több kutatócsoport foglalkozott ezzel a lehetőséggel. Pezzella és mtsai. nem kissejtes tüdőrákokból származó humán minták vizsgálatával kimutatták, hogy a nagy sűrűségű kapillárisálózattal rendelkező tüdőben a tumorok neovaszkularizáció nélkül is növekedhetnek. Az angiogén típusú fészkes, papilláris és diffúz növekedési formák mellett elkülönítettek egy feltehetően nem angiogén, más néven alveoláris növekedési formát. A neovaszkularizáció nélküli növekedés tehát a kötőszövet hiánya mellett a sűrű kapillárisálózat miatt is különösen igaz lehet a metasztázisképzés fő szerveire.

## I.2. A tumorszerkezet és az ereződés összefüggése

A szolid tumorokat tumorsejtek, extracelluláris mátrix és sejtes kötőszöveti elemek építik fel. Ezeknek a komponenseknek az aránya és térbeli eloszlása adja a tumorok szerkezetét. Vermeulen és mtsai. a tumorszerkezet vizsgálatával három növekedési mintázatot írtak le májmetasztázisokban. A „*replacement*” növekedési típusnál elmosódott tumor-májparenchima határvonal látható, és a májszerkezet enyhe kötőszövet felszaporodás mellett megtartott. Az ún. „*pushing*” és „*desmoplastikus*” növekedést mutató tumorokra a májszerkezet torzulása jellemző. A „*pushing*” típusban a tumor határvonala éles, körülötte komprimált májparenchima látható. A „*desmoplastikus*” növekedési típusban széles kötőszövetes szaporulat választja el a tumor szélét a májszövetről.

A tumorok szerkezetét, növekedési mintázatát befolyásolhatja a tumorsejtek differenciációs foka is. A differenciált tumorok a kiindulási szövetre jellemző morfológiai képet mutatnak. A differenciálatlan tumoroknál a kiindulási szövet morfológiai jellegek alapján esetenként nem meghatározható. A tumorprogresszió során a sejtek fokozatosan dedifferenciálódhatnak, ennek egy gyakran tanulmányozott folyamata az epiteliális-mezenchimális transzdifferenciáció (EMT), ami az embrionális fejlődés során is jól ismert folyamat. Ez a folyamat leegyszerűsítve az epiteliális markerek elvesztéséből és mezenchimális markerek megjelenéséből áll. Daganatok esetében az EMT folyamatát az inváziós és metastázisképző képesség megemelkedésével hozták kapcsolatba, így a kutatások egyik központi témájává vált. Szabályozása még nem teljesen tisztázott, a benne szerepet játszó egyik legfontosabbnak vélt és legtöbbet vizsgált elem a szoros sejt-kapcsoló struktúrák („*tight junction*”-ok) felépülésében részt vevő E-cadherin transzmembrán glikoprotein.

Az E-cadherin expressziója befolyásolja a tumorsejtek közötti kapcsolat erősségét, ezáltal a tumorok szerkezeti kohézióját. Ezt támasztja alá, hogy az E-cadherin elvesztése és a daganat progressziója között szoros kapcsolat van.

Az E-cadherin fehérjének a tumorokban a fentebbieknek megfelelően invázió és metastázis gátló szerepet tulajdonítottak, elvesztését a tumorok metastázisképző képességével is kapcsolatba hozták, azonban a kérdés, hogy az

E-cadherin hogyan befolyásolja a tumorprogressziót, még sok feltáratlan részletet hagyott maga után.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

1. Agymetasztázisok vaszkularizációs mechanizmusának meghatározása öt különböző szöveti eredetű tumorsejtvonal esetében.
2. A különböző tumorok növekedési mintázatának hatása az agymetasztázisok vaszkularizációjára.
3. Angiogenesis faktorok és receptoraik in vitro és in vivo expressziójának RNS és fehérje szintű analízise, illetve ezek összefüggésének vizsgálata az agymetasztázisok vaszkularizációjával.
4. Az E-cadherin csendesítés hatása az agymetasztázisok növekedési mintázatára és vaszkularizációjára.

### **III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **III.1. Állatkísérletek**

A kísérletekhez a Semmelweis Egyetem, I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet állatházi tenyészetéből származó, standard körülmények között tartott 8 hetes C57Bl/6, ill. SCID hím egereket használtunk.

Egér C38 kolorektális karcinóma, humán HT25 kolorektális karcinóma, HT-1080 fibroszarkóma, H-1650 tüdő adenokarcinóma, valamint ZR-75-1 emlő karcinóma sejtvonalakat használtunk.

Agymetasztázisok létrehozásához - a megfelelő tumorméret elérése érdekében - a tumorsejteket közvetlenül az egerek agyába injektáltuk. Az agyba történő direkt oltás által okozott történések vizsgálatára a metasztázisok létrehozásával azonos módon sebzést végeztünk, sejtek és szérum-mentes tápfolyadék beoltása nélkül.

A kísérletek terminálása 7-10 nappal a C38 és HT-1080, illetve 21-28 nappal a HT25, H-1650, valamint ZR-75-1 sejtek oltását követően történt meg. A sebgyógyulás folyamatának vizsgálatához az állatokat a sebzést követő 2., 3., 4., 5., 7., 9., 14. és 21. napon öltük le.

#### **III.2. A minták feldolgozása**

Az állatok leölése (cervikális diszlokáció) előtt egy órával 200mg/kg BrdU-t (bróm-dezoxi-uridin, Sigma-Aldrich, Kat. szám: B5002) adtunk intraperitoneálisan. A DNS-be beépült BrdU-t indirekt immunhisztokémiai reakcióval tettük láthatóvá. BrdU mellett laminin jelölést alkalmaztunk, a sejtmagok festésére DAPI-t (diamino-fenilindol) használtunk. A metszeteket Nikon TE300 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, 100x-os objektív használatával. Intratumorálisan és peritumorálisan (a tumor szélétől számított 200 $\mu$ m = egy látótérnyi szélesség) az erek bazális membránját jelző laminin által meghatározott területen belül elhelyezkedő BrdU jelölt és jelöletlen sejtmagokat (endotélsejtek és periciták) számoltuk le.

CD31 és laminin jelölt metszetekről 10x-es objektívvel készítettünk képeket, melyeken minden intratumorális és peritumorális (a tumor szélétől

számított 200 $\mu\text{m}$ -en belül) ér figyelembe vételével meghatároztuk az érzékenységet (db/mm<sup>2</sup>), érátmérőt (mm), valamint az erek elágazási pontjainak számát. A mérésekhez a Quick Photo Micro 2.2 szoftvert (Olympus) használtuk.

A tumoros minták egy részét elektronmikroszkópos vizsgálatok céljára készítettük elő. Ezt követően a mintákból félvékony (0,5 $\mu\text{m}$ , Reichert OmU2 Mikrotóm, Ausztria), majd ultravékony (70-100nm, RMC MT-7 Ultramikrotóm, USA) metszeteket készítettünk. Az ultravékony metszetek vizsgálata Philips CM10 (Philips Research, Eindhoven, Netherlands) elektronmikroszkóppal történt.

### **III.3. Molekuláris biológiai módszerek**

Mind az öt sejtből fehérjelizátumot készítettünk. A fehérjéket poliakrilamid-gélelektroforézissel választottuk szét, PVDF-membránra blottoltuk, majd a VEGF-A és  $\beta$ -actin expresszióját vizsgáltuk. Az ECL-reagenssel történő előhívást követően a kapott jeleket rögzítettük (Kodak IS4000MM Digital Imaging System) majd a Kodak Molecular Imaging Software 4.0.3 segítségével denzitometráltuk a képet. A program által az egyes csíkokhoz megadott intenzitásértékeket vettük figyelembe.

Az *in vitro* fenntartott sejt kultúrák mindegyikéből Trizol módszerrel izoláltunk RNS-t, melynek minőségét és mennyiségét Nanodrop ND1000 spektrofotométerrel ellenőriztük. A tumorszövetet tartalmazó egér agyakból készített 15 $\mu\text{m}$ -es fagyasztott metszetekből peritumorális (a tumor szélétől számított 200 $\mu\text{m}$ -en belül eső terület), valamint intratumorális területeket mikrodisszekáltunk (PALM MicroBeam, Zeiss). RNS izolálást Ambion kit segítségével végeztünk, a gyártó ajánlása szerint (RNAqueous-Micro Kit, Ambion, Kat.szám: AM1931). A cDNS szintéziséhez a cDNA High Capacity Archive kit-et (Applied Biosystems, Kat.szám: 4368813) használtuk a gyártó ajánlása szerint. 1 $\mu\text{g}$  RNS (lézer mikrodisszekcióval nyert minták esetén a teljes izolált RNS mennyiség) kvantitatív konverzióját hajtottuk végre 100 $\mu\text{l}$  végtérfogatban.

A kvantitatív valós idejű (*real-time*) PCR vizsgálatokhoz az Applied Biosystems TaqMan Gene Expression Assay<sup>TM</sup> rendszerét használtuk. A kiértékeléshez a GAPDH háztartási gént választottuk referenciaként. Minden mintát triplikátumban futtattunk, 20 $\mu\text{l}$  reakciótérfogatban. A leggyakrabban



vizsgált angiogén faktorok és receptoraik közül mi a VEGF-A, PDGF-B, ANG-1, VEGFR-2, PDGFR- $\beta$ , TIE-2 expresszióját vizsgáltuk.

#### **III.4. E-cadherin csendesítése shRNS-el a HT25 sejtvonalban**

Az E-cadherin csendesítéshez egy gyári shRNS-t kódoló plazmidot használtunk (SureSilencing shRNA Plasmid for Human CDH1, SA Biosciences, Kat. szám: KH00135N), melynek szekvencia adatait a gyártó nem bocsátotta rendelkezésünkre. A plazmid DNS-t kémiai transzfekcióval (PEI, Polyethyleneimine, Sigma-Aldrich, Kat. szám: 764604) juttattuk be a HT25 sejtekbe. A transzfektált sejtek szelekcióját a 2. napon kezdtük meg a 0,75mg/ml dózisu genecinnel (100mg/ml-es törzsoldat).

A transzfekció sikerességének ellenőrzésére immuncitokémiai vizsgálatokat végeztünk. A vad típusú és az E-cadherin csendesített sejteket fedőlemezekre növesztettük, majd ezeken végeztük el az indirekt immunhisztokémiai reakciót. Az említett sejtekből fehérje preparátumokat készítettünk, így az immuncitokémiai vizsgálatok mellett Western-blottal is ellenőriztük az E-cadherin expressziójának változását.

Monoklonális E-cadherin csendesített HT25 sejtvonal létrehozása érdekében a transzfektált sejteket 96 lyukú tenyésztőedénybe tettük úgy, hogy lyukanként 1 db sejt legyen. Az ennek megfelelő lyukakat megjelöltük, végül a morfológiai jellemzők alapján 3 klónt választottunk ki további fenntartásra. A 3 klónból immuncitokémiai reakció alapján a 3.-at választottuk ki a további kísérletek elvégzésére.

Az immuncitokémia és Western-blot alapján megfelelőnek minősülő E-cadherin csendesített HT25 klónt felszaporítottuk, és beoltásukkal kísérletes agyemetasztázisokat hoztunk létre. Kontroll kísérletnek vad típusú HT25 sejtekkel is oltottunk.

A megfelelő immunhisztokémiai és morfológiai vizsgálatokat a vad típusú és az E-cadherin csendesített sejtek tumorain is elvégeztük. Vizsgálataink során a tumorok növekedési mintázatát (panCK-FITC), az intratumorális érdenzitást (CD31, laminin), érátmérőt (CD31, laminin), és az ereket alkotó sejtek proliferációs rátáját (BrdU, laminin, DAPI) mértük le.

### **III.5. Statisztikai analízis**

A mérések statisztikai kiértékeléséhez kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Szignifikancia szint: eredményeinket  $p < 0,05$  értékek esetén tartottuk szignifikánsnak.

## IV. EREDMÉNYEK

### IV.1. Kísérletes agymetasztázisok ereződésének vizsgálata morfológiai módszerekkel

Az agymetasztázisokat H&E festett metszetek átnézeti képei alapján soroltuk különböző növekedési mintázatú osztályokba. Különböző antigénekre jelölt fluoreszcens metszeteken a tumor és az agyszövet struktúráinak viszonyát állapítottuk meg. A vizsgált tumorok közül a két kolorektális karcinóma, azaz a C38, valamint a HT25 sejtvonal, illetve a HT-1080 fibroszarkóma tumorai ún. „*pushing*” típusú növekedést mutattak. Ennek jellemzője az éles tumor-parenchima határvonal, és az egymással szoros kapcsolatban növekvő tumorsejtek. A H-1650, illetve a ZR-75-1 tumorok invazívabb növekedési mintázatúak voltak. A H-1650 esetében kohezív sejtcsoportok türemkedtek az agy parenchimájába, így ezt a karéjózott növekedési mintázatot a „*pushing*” és az invazív növekedés közötti átmeneti formának tekintjük. A ZR-75-1 tumorai esetében egyenként elszórt, kerek sejtek voltak láthatók a tumor széli részén.

Az asztrocitákat a tumorsejtek mindegyik vizsgált tumortípusban leválasztották az erek felszínéről, így intratumorálisan csak kevés GFAP pozitív sejt volt látható. Az invazív ZR-75-1 emlőkarcinóma tumorain belül volt megfigyelhető a legtöbb asztrocita.

A bazális membránnal fedett dezmin pozitív periciták az erekhez kapcsolódva maradtak. Az ereket a pericitákkal a felszínükön kebelezték be a tumorok, tehát ezek a sejtek megtartották eredeti helyzetüket a saját, valamint az endotélejt bazális membránja között.

A tumorsejtek a növekedés során az agy parenchimáját elnyomták, az ereket inkorporálták, így azok egyfajta szubsztrátként szolgáltak a tumorsejtek számára. Ahogy a tumorsejtek az erek bazális membránjával kapcsolatba kerültek, saját bazális membránt szintetizáltak az ér bazális membránjának felszínére.

A peritumorális területeken nem volt érdenzitásbeli növekedés a kontroll (tumormentes) állatokhoz képest. Mindegyik vizsgált tumor esetében a peritumorális területekhez képest csökkent az intratumorális érdenzitás. Az erek tágulása nem volt megfigyelhető a peritumorális részeken. Egyetlen kivétel a C38

kolorektális karcinóma volt, ahol a tumor felszínével érintkező erek már számottevően tágultak a peritumorális értékekhez képest.

Az intratumorális erek átmérői mindegyik tumorban szignifikánsan magasabbak voltak a környező parenchimához képest, de számottevő emelkedést csak a két kolorektális karcinóma esetében mutatott. Ez a megfigyelés összhangban van azzal, hogy az intratumorális ereket alkotó sejtek BrdU beépülés alapján meghatározott jelzési indexe csak a „*pushing*” típusú növekedést mutató tumoroknál emelkedett számottevően. A jelzési index a C38 esetében a tumor felszínével éppen érintkező erekben is magasabb volt. A két invazív tumorban (ZR-75-1, H-1650) a jelzési indexek mérsékelten alacsony szinten maradtak. A peritumorális erek jelzési indexe elhanyagolhatóan alacsony volt minden tumortípusnál.

#### **IV.2. Molekuláris biológiai módszereken alapuló vizsgálatok**

A VEGF-A, PDGF-B és ANG-1 relatív expresszióját határoztuk meg az 5 tumorsejtvonalban, valamint mikrodisszekált intratumorális területeken. Az mRNS expresszió a sejtvonalak és a tumor minták között jól korrelált. Érdekes módon a C38 egér kolon karcinóma és a HT-1080 humán fibroszarkóma sejtek mutatták a legalacsonyabb intratumorális angiogén faktor szintet, ugyanakkor ezekben volt a legmagasabb a BrdU beépülés alapján mért jelzési index az erekben. A HT25 mikrodisszekált intratumorális mintában volt a legmagasabb VEGF-A és ANG-1 expresszió. A PDGF-B-t illetően a ZR-75-1 intratumorális mintákban volt a legmagasabb az mRNS expressziós szint.

Az angiogén faktor receptor expresszió vizsgálatánál a VEGFR-2, PDGFR- $\beta$  és a Tie-2 mRNS szintet határoztuk meg a mikrodisszekált intra- és peritumorális mintákban. A receptor expresszió minden esetben magasabb volt intratumorálisan.

A VEGF-A esetében fehérje expressziós szintet vizsgáltunk a tenyésztett sejtek mintáiból Western-blottal. Az mRNS expressziótól eltérően a fehérje expresszió csak kis különbségeket mutatott a sejtvonalak között.

Az intratumorális angiogén faktor, illetve angiogén faktor receptor szintek, valamint a sejtlizátumokban talált VEGF-A fehérje expressziók nem korreláltak az intratumorális erek proliferációs indexével.

### **IV.3. A sebgyógyulás vizsgálata agyszövetben**

Nem észleltünk érdenzítés növekedést a seben belül vagy körülötte egyik vizsgált időpontban sem. Az érdenzítások szignifikánsan alacsonyabbak voltak a 9. napig, majd elérték a kontroll értéket, az érátmérők nem változtak a kontroll agyban mértekhez képest. Proliferáló vaszkuláris sejteket a 2. és 5. nap között találtunk, melynek maximuma a 3. napnál volt, de a jelzési index csak elhanyagolható emelkedést mutatott (3%).

### **IV.4. E-cadherin csendesítése shRNS-el a HT25 sejtvonalban**

A transzfekciót követően az antibiotikumos szelekción átesett sejteken az E-cadherin csendesítés eredményességét immuncitokémiai vizsgálatokkal igazoltuk, monoklonális tenyészetet hoztunk létre 96 lyukú plate-re kirakott sejtekből induló tenyésztéssel. Összesen 3 klón további fenntartását és szaporítását végeztük el. Már fénymikroszkópban látható volt a sejtek eltérő viselkedése. Míg a vad típusú HT25 sejtek koherens csoportokat alkotva nőttek, az E-cadherin csendesített sejtek tenyészeiben kerek, egymással nem kapcsolódó, szétszórtan növő sejteket láhattunk. Az immuncitokémiai reakció alátámasztotta, hogy az E-cadherin csendesítés sikeres volt. Az immuncitokémiai reakció alapján további kísérletekre a 3. klónt választottuk ki. A továbbiakban Western-blottal is igazoltuk, hogy az E-cadherin fehérje nem mutatható ki a csendesített sejtvonalban.

Az *in vivo* vizsgálatokhoz létrehozott kísérletes agymetasztázisok mintáiból készített metszeteken immunhisztokémiai jelöléseket végeztünk. A panCK-FITC, laminin kettős jelöléssel a tumorok növekedési mintázatát vizsgáltuk. Eredményeink szerint a HT25 sejtvonal két variánsa között növekedésbeli eltérés volt megfigyelhető. A vad típusú HT25 sejtek tumorai a korábban is látott ún. „*pushing*” típusú növekedés jellemzőit mutatták. Éles tumor-parenchima határvonal, illetve egymás szoros közelségében növekvő sejtek alkotta tumor alakult ki. Ezzel szemben az E-cadherin csendesített sejtek tumoraiban a sejtek közötti kapcsolat hiánya miatt a tumor fellazult, széli részét, egyesével elhelyezkedő kerek sejtek jellemezték.

A morfolometriai vizsgálatok során az intratumorális érdenzítást és az érátmérőt határoztuk meg. Eredményeink azt mutatták, hogy az E-cadherin

csendesített sejtek tumoraiban szignifikánsan magasabb volt az érdenzítés és alacsonyabb az érátmérő az eredeti sejtvonal tumoraihoz képest ( $p \leq 0,05$ ).

Az intratumorális ereket alkotó sejtek proliferációs rátája a vad típusú HT25 tumoraiban mértékhez képest ( $6,27 \pm 1,05\%$ ) szignifikánsan ( $p \leq 0,05$ ) alacsonyabb volt az E-cadherin csendesített sejtek tumoraiban ( $3,32 \pm 0,79\%$ ).

## V. KÖVETKEZTETÉSEK

A dolgozat fő megállapításai a következők:

1. A vizsgált kísérletes agymetasztázisok környezetében nem figyelhető meg bimbózó angiogenezis, a tumorok a meglévő erek bekebelezésével tették szert saját vérellátásra.
2. A tumorszerkezet vizsgálata során három növekedési típust különítettünk el: 1. „*pushing*”, 2. átmeneti (karéjzott) és 3. invazív forma.
3. Az agymetasztázisok intratumorális érdenzitása összefüggést mutatott a tumorok növekedési mintázatával. A kompakt szerkezetű differenciáltabb tumorok kevesebb eret inkorporáltak, mint a lazább szerkezetű differenciálatlanabb tumorok. Az intratumorális erek átmérője és a vaszkuláris sejtek proliferációja fordított arányú összefüggést mutatott az érdenzitással.
4. Eredményeink szerint nincs korreláció az erek proliferációs rátája és a VEGF-A mRNS-, illetve fehérje-, valamint a PDGF-B, és ANG-1 mRNS expressziók között. A PDGFR- $\beta$ , TIE-2 és VEGFR-2 mRNS expressziója az intratumorális területeken az összes tumortípusban növekedett, mely arra utal, hogy a vizsgált faktorok nem az érképződésben, hanem inkább az intratumorális erek stabilizációjában játszanak szerepet.
5. A tumorok differenciáltsági foka szoros összefüggésben van a kialakított növekedési mintázattal. Ugyanazon sejtvonal E-cadherin csendesítéssel kialakított alacsonyabb differenciáltsági fokú változatának tumoraiban a magasabb érdenzítés a vaszkuláris sejtek alacsonyabb proliferációs rátájával, és alacsonyabb érátmérővel párosul.

## **VI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE**

### **VI.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények**

1. Dezso K, Bugyik E, Papp V, László V, Döme B, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Paku S. (2009) Development of arterial blood supply in experimental liver metastases. *Am J Pathol*, 175:835-43.
2. Paku S, Dezso K, Bugyik E, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Laszlo V, Klepetko W, Döme B. (2011) A new mechanism for pillar formation during tumor-induced intussusceptive angiogenesis: inverse sprouting. *Am J Pathol*, 179:1573-85.
3. Bugyik E, Dezso K, Reiniger L, László V, Tóvári J, Tímár J, Nagy P, Klepetko W, Döme B, Paku S. (2011) Lack of angiogenesis in experimental brain metastases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70:979-91.

### **VI.2. Egyéb témában megjelent közlemények**

1. Turányi E, Dezso K, Bugyik E, Szurián K, Paku S, Nagy P. (2010) The primary mitogen (TCPOBOP)-induced hepatocyte proliferation is resistant to transforming growth factor- $\beta$ -1 inhibition. *Liver Int*, 30:1505-10.
2. Bugyik E, Szende B. (2011) [Dr. Antal Genersich M. D. and the "Spis -- then and now"]. *Orv Hetil*, 152:236-7.
3. Bugyik E, Dezso K, Turányi E, Szurián K, Paku S, Nagy P. (2012) 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzene induces substantial hyperplasia in fibrotic mouse liver. *Int J Exp Pathol*, 93:125-9.
4. Dezső K, Papp V, Bugyik E, Hegyesi H, Sáfrány G, Bödör C, Nagy P, Paku S. (2012) Structural analysis of oval-cell-mediated liver regeneration in rats. *Hepatology*, 56:1457-67.
5. Hajósi-Kalcakosz S, Dezső K, Bugyik E, Bödör C, Paku S, Pávai Z, Halász J, Schlachter K, Schaff Z, Nagy P. (2012) Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) is a reliable immunohistochemical marker to differentiate malignant and benign hepatic tumors. *Diagn Pathol*, 7:86.



6. Papp V, Rókus A, Dezső K, Bugyik E, Szabó V, Pávai Z, Paku S, Nagy P. (2014) Expansion of hepatic stem cell compartment boosts liver regeneration. *Stem Cells Dev*, 23:56-65.

## VII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik segítségemre voltak PhD munkám során.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Paku Sándornak, akihez bármikor bizalommal fordulhattam, köszönöm a gyakorlati, és elméleti munkában nyújtott segítségét, támogatását, útmutató tanácsait.

Köszönöm Prof. Dr. Matolcsy András igazgató úrnak, hogy lehetővé tette, és támogatta kutatásaimat az I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben. Köszönöm a Semmelweis Egyetem Patológiai Doktori Iskola volt, és jelenlegi vezetőjének, Prof. Dr. Kopper Lászlónak, és Prof. Dr. Kovalszky Ilonának ösztöndíjas éveim alatti nagylelkű támogatását.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Nagy Péternek a szakmai támogatásért, a májregeneráció témájában folyó színvonalas kutatásaiban való részvétel lehetőségéért. Köszönet illeti Dr. Dezső Katalint, aki témavezetőm mellett szakmailag és barátilag is mellettem állt, nélkülözhetetlen segítséget nyújtott metodikai ismereteim bővítésében, szakmai fejlődésemben. Szabó Vanesszának köszönöm, hogy bizalmat, barátságot adott nekem a szakmai- és magánéletben, nap mint nap étellel töltötte meg a labort, kitartóan vizsgálta velem az angiogenezis rejtelseit.

Köszönöm az állatház munkatársainak, Sztodola Andrásnak, Borza Alexandra Mónikának az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott pótolhatatlan segítségüket, odaadó munkájukat.

Köszönöm Csorba Gézáné Marica lelkiismeretes munkáját, hogy mindig segített rajtam, legyen szó sejtekről, vagy bármi másról.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkaközösségének, különösen a hematopatológiai labor, valamint a molekuláris diagnosztikai labor valamennyi munkatársának, végtelen segítőkészségükért, mellyel sokszor megkönnyítették feladataim elvégzését, elősegítették munkám eredményességét. Külön köszönet illeti Dr. Zalatnai Attilát, amiért készséggel elvállalta a házi opponensi feladatkört.

Köszönetemet fejezem ki munkacsoportunk nélkülözhetetlen tagjainak, Dr. Tóvári Józsefnek, és Dr. Döme Balázsnak, valamint munkatársaiknak, akik folyamatosan segítettek munkám előrehaladását.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinika, Sejtanalitika Laboratórium munkatársainak -különös tekintettel Kalmár Alexandrára- segítségét, akik nélkül nem tudtuk volna megvalósítani a lézer mikrodisszekciós vizsgálatokat.

Végezetül hálás köszönettel tartozom Családomnak, akik végtelen támogatással, odaadásukkal lehetővé tették, hogy az egyetem után is nyugodt körülmények között folytassam tanulmányaimat, és benyújthassam doktori értekezésemet.