

**Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés**

---

# **Kísérletes adatok a humán uveális melanoma kezeléséhez**

**Dr. Kemény-Beke Ádám**



**Debreceni Egyetem  
Orvos- és Egészségtudományi Centrum  
Általános Orvostudományi Kar  
Szemészeti Klinika  
2006.**

**Kísérletes adatok a humán uveális  
melanoma kezeléséhez**

**Dr. Kemény-Beke Ádám**

**Témavezetők:**

**Prof. Dr. Berta András**  
az orvostudomány doktora  
DE OEC Szemészeti Klinika

**és**

**Dr. Aradi János**  
a biológiai tudomány kandidátusa  
DE OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet

**Debreceni Egyetem**  
**Orvos- és Egészségtudományi Centrum**  
**Általános Orvostudományi Kar**  
**Szemészeti Klinika**  
**2006.**

# TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések.....	2
1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
1.1. Az intraocularis daganatok általános jellemzői.....	3
1.2. Diagnosztika.....	9
1.3. Sebészeti kezelés.....	13
1.4. Lézeres kezelés.....	14
1.5. Sugárterápia .....	16
1.6. Ruthenium applikátorkezelés.....	17
1.7. Külső besugárzás, citosztatikus és egyéb kezelés.....	18
1.8. Ellenőrző vizsgálatok.....	19
1.9. Az irradiáció utáni recidivák kezelése.....	20
1.10. Extrabulbáris terjedés.....	20
1.11. Proliferáció gátlás.....	20
2. CÉLKITŰZÉS.....	26
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	27
3.1. OCM-1 sejtkultúra.....	27
3.2. Benzofenantridin alkaloidok.....	28
3.3. Kísérletek 4-tio-uridin-5'-monofoszfáttal (s <sup>4</sup> UMP).....	31
3.4. Statisztikai elemzés.....	33
4. EREDMÉNYEK.....	34
4.1. Benzofenantridin alkaloidokkal való kezelés eredményei.....	34
4.2. Az s <sup>4</sup> UMP hatása OCM-1 sejtekre.....	46
5. MEGBESZÉLÉS.....	52
5.1. Benzofenantridin alkaloidok hatása.....	52
5.2. Az s <sup>4</sup> UMP kezelés hatása.....	53
5.3. Szabadalom.....	56
6. ÚJ EREDMÉNYEK.....	57
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	59
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	76
9. FÜGGELÉK.....	77

## RÖVIDÍTÉSEK

*/Megjegyzés: az írásmódban praktikusságra törekedtem akár az egyöntetűség rovására is, ezért a kifejezetten anatómiai, szövettani és patológiai kifejezéseket latin, a speciális vegyületneveket pedig magyar formájukban igyekeztem használni./*

<b>APAF:</b>	apoptosis activating factor
<b>ATP:</b>	adenozin-trifoszfát
<b>DMSO:</b>	dimetil-sulfoxid
<b>DNS:</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>FBS:</b>	fetal bovine serum
<b>FCS:</b>	fetal calf serum
<b>FITC:</b>	fluorescein isothiocyanate
<b>FLAG:</b>	fluoreszcein-angiográfia
<b>ICG:</b>	indocianin-zöld angiográfia
<b>MTT:</b>	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid
<b>NFκB:</b>	nukleáris faktor, mely a B sejtek enhancerén köti az immunoglobulinok κ láncát
<b>OCM:</b>	ocular choroideal melanoma
<b>PBS:</b>	phosphate-buffered saline
<b>PI:</b>	propidium-jodid
<b>RPMI:</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>TNM:</b>	T: primer tumor, N: regionális nyirokcsomó, M: metasztázis

# 1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 1.1. Az intraocularis daganatok általános jellemzői

Intraocularis daganatnak nevezzük azt a szemgolyó szöveteiből kiinduló szövetszaporulatot, amely infiltrálja és károsítja a környezetét. Kisebb-nagyobb kiterjedésben elfoglalja a normális szövetek helyét, valamint esetenként kitölti a bulbuszt részben vagy akár teljes egészében is. Organogenetikai szempontból megkülönböztethetünk benignus (jóindulatú) és malignus (rosszindulatú) szemészeti daganatokat.

A szemben előforduló malignus daganatok típusai előfordulási gyakoriságuk sorrendjében: melanoma malignum chorioideae, retinoblastoma, metasztatikus daganatok, lymphoma, medulloepithelioma.

A szem leggyakoribb primer malignus tumora felnőttkorban a melanoma malignum uveae. Az uveális melanoma egy ritka betegség, az összes melanoma 2.9%-át teszi ki (Singh és mtsai, 2001). Az összes regisztrált tumor kevesebb, mint 1%-át alkotja (Albert és mtsai, 1992; Zierhut és mtsai, 1999).

Magas malignitású intraocularis tumor, rossz prognózissal és jelenleg még ismeretlen aetiológiával (Lutz és mtsai, 2005). Lehet primer illetve szekunder előfordulású (Mejia-Novelo és mtsai, 2004). Általában egyoldali, de ismertek bilaterális megjelenései is (Hadden és mtsai, 2003; Bhourri és mtsai, 2003), akár metasztázis formájában is.

Viszonylag ritka daganat, de a második leggyakoribb primer melanoma emberben. Az uveális melanomának magas a halálozási rátája, mindez a haematogen szórásnak köszönhető. Mivel a szemgolyó belsejében nincsenek nyirokerek, ezért a metasztázis szinte kizárólag haematogen úton történik.

Az áttétek „célszerve” elsősorban a máj (Kodjikian és mtsai, 2005; Woll és mtsai, 1999).

Az intraocularis daganatok és ezen belül az uveális melanomák incidenciájáról – áttanulmányozva az utóbbi évek statisztikáit – nem áll rendelkezésre megbízható adat. Egyesek szerint az utóbbi időben nőtt (Teikari és mtsa, 1985; Tóth-Molnár és mtsa, 2005), mások szerint nem

változott (Singh és mtsa, 2003). A pontos statisztika elkészítését az is nehezíti, hogy BNO (Betegségek Nemzetközi Osztályozása) kód alapján sem tartják nyilván precízen és különítik el a szemészeti és intraocularis tumorokat, nem tesznek különbséget primer és metasztatikus daganatok között.

A benignus tumorok fajtái előfordulási gyakoriságuk szerint: naevus, haemangioma, osteoma, astrocytoma, hamartoma.

A malignus daganatoknak nagyobb a jelentőségük, mert azok nemcsak a látást, hanem az életet is veszélyeztetik (Nicolo és mtsai, 2005). Közülük is legnagyobb gyakorlati jelentősége az uveális melanomának van, mivel ez az egyetlen potenciálisan fatális szemészeti rosszindulatú daganat.

Az USA-ban végzett felmérések szerint az uveális melanoma 19.4-szer gyakoribb felnőtt fehér emberben, mint feketékben és valamennyi etnográfiai csoportban a férfiak aránya magasabb (Hu és mtsai, 2005). Bármely életkorban előfordulhat, az incidencia csúcsa azonban a 40-60. életévek közé esik (Augsburger, 1999).

Az irodalomban eddig négy kongenitális uveális melanomát is leírtak (Palazzi és mtsai, 2005). Gyermekkori előfordulása igen ritka, eddig 16 éven aluli gyerekeken mintegy 18 esetet írtak le. Magyarországon évente 25-30 friss esettel találkozunk, melyek döntő többségének ellátása a DE OEC Szemklinikán történik, mert klinikánk az országban az intraocularis daganatok onkológiai centrumának szerepét látja el.

Klinikai jelentőségét és felhasználását illetően fontos az a beosztás, amely a daganatok anatómiai elhelyezkedését veszi alapul.

A melanoma malignum uveae az uveális traktus bármely szövetét érintheti, bármely részéből kiindulhat: így előfordulhat az irisben, a corpus ciliaréban és a chorioideában is. Előfordulási gyakoriságuk: iris 6%; corpus ciliare 9%; chorioidea 85% (Süveges, 1998).

A tumor elhelyezkedése és a prognózis között figyelemfelkeltő összefüggést találtak. A legjobb prognózissal az iris melanomák rendelkeznek, a legrosszabbal pedig a corpus ciliare tumorai (Coleman és mtsai, 1993).

Az anatómiai lokalizáció miatt az iris melanomák felismerhetősége a legkönnyebb még kis méretűek esetén is. Ezért viszonylag könnyű a

diagnosztizálásuk. Mortalitásuk 3-5% /10 év. Öt éven belül 3%-ban, 10 éven belül 5%-ban és 20 éven belül 20%-ban találtak metasztázist. A corpus ciliare melanomák prognózisa rosszabb. Eucleatio után az 5 éves mortalitás 53%, míg a chorioidea melanoma enucleatioja után 14% volt a metasztázisok aránya. Radioterápia után pedig 22% /5 év (Singh és mtsai, 2001).

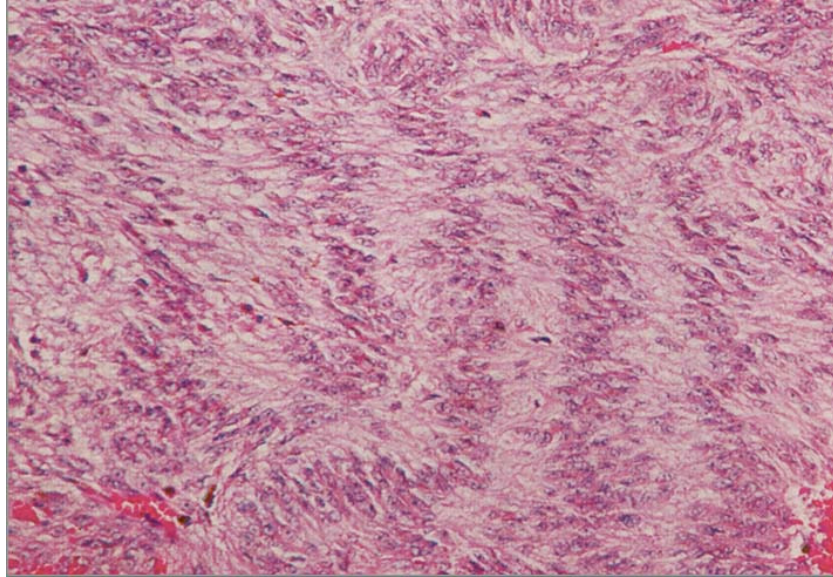
A metasztázis kifejlődésének átlagos ideje 68 hónap. Metasztázis kialakulása akkor feltételezhető, ha a tumor legnagyobb prominentiája nagyobb, mint 7 mm. Habár a sugártesti melanomák átlagos mérete már diagnosztizáláskor is nagyobb, mint a chorioideában lévőké, statisztikai vizsgálatok azt mutatták, hogy esetükben a prognózis független a tumor méretétől illetve a sejtípustól (Singh és mtsai, 2001).

A tumorok előfordulási gyakorisága és a melanoma malignitása is növekszik a hátsó pólus felé haladva: legritkább az irisben, leggyakoribb a chorioideában. Legrosszabb indulatúak a chorioidea macula lutea közeli területeinek daganatai.

A klinikailag hasonló megjelenésű melanomák igen eltérő szöveti típust mutathatnak (Stolnicu és mtsai, 1999). A melanoma malignum uveae esetében szövetszintűen ötféle sejtípusú tumort különböztetünk meg, amelyek elkülönítése prognosztikai szempontból is fontos.

1. *Orsósejtes A típus*: a tumorsejtek megnyúltak, a sejtmagjuk is ugyancsak elongált. Nucleolusuk nincs, a mitotikus osztódások száma igen kevés (1. ábra).

Azok a tumorok, amelyek csak ilyen sejtekből épülnek fel, benignusak, manapság inkább naevusoknak tekintjük őket.

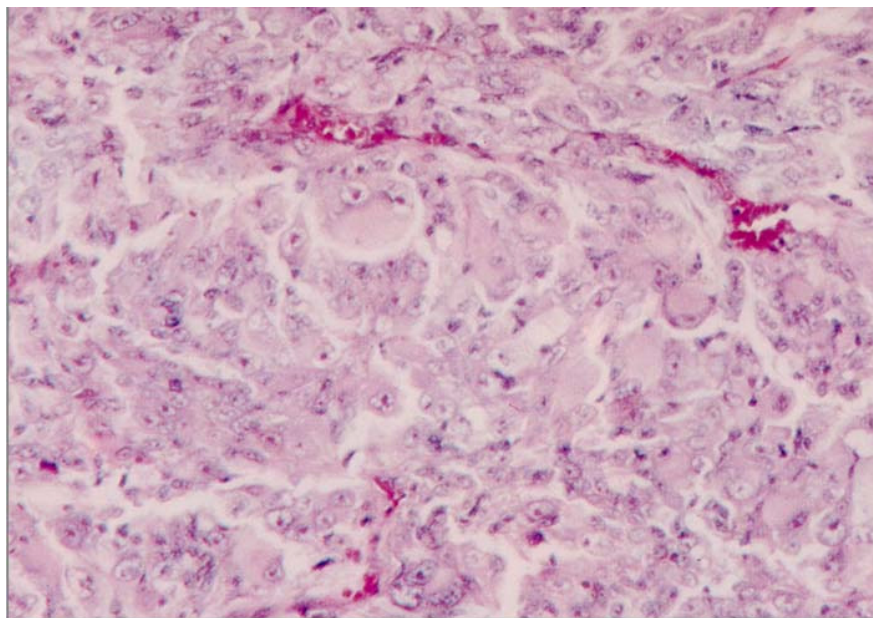


**1. ábra.**  
**Orsósejtes A típusú melanoma malignum chorioideae szövettani képe.**  
(HE festés, N: 40X)

2. *Orsósejtes B típus:* a sejtek kevésbé elongáltak, nagy ovális nucleolusokat tartalmaznak, amelyek jellemzőek ezekre a sejtekre. Citoplazmájuk syntitiumot alkot, ezért az orsó alakot a sejtek magja mutatja. Mitózis kisebb-nagyobb mértékben látható. A sejtek gyakran kötegekbe rendeződnek vagy körkörös sorokban helyezkednek el a tumor erei körül.

3. *Epithelioid sejtes típus:* nagy, gömb alakú sejtek alkotják, melyek kifejezett polimorfizmust mutatnak. Lehetnek többmagvúak, kifejezett nucleolussal. Nagyszámú mitotikus osztódás figyelhető meg (2. ábra). Az ilyen sejteket tartalmazó tumorok a legrosszabb indulatúak az összes sejtípusú uveális melanomák közül.

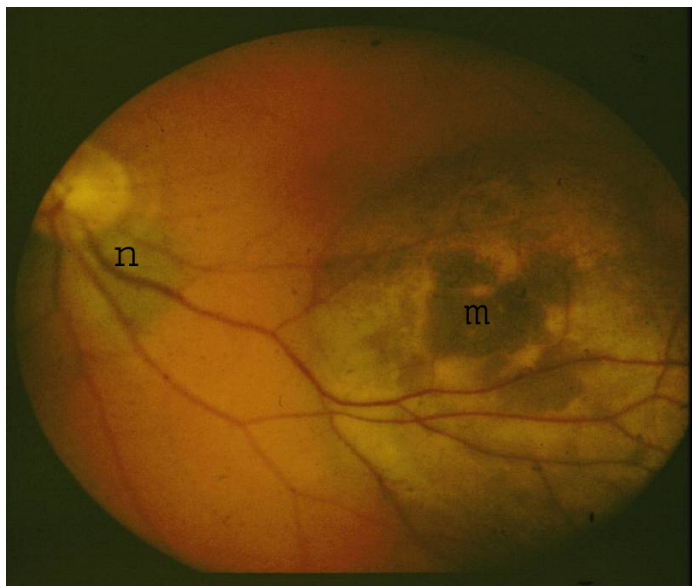
4. *Poligonális sejtípus:* kis poligonális sejtek alkotják, malignus melanocyták. Kerek magjuk és kifejezett nucleolusuk van.



**2. ábra.**  
**Epithelioid sejt melanoma malignum chorioideae szövettani képe.**  
(HE festés, N: 100X)

5. *Ballonsejtes típus:* nagy ballonsejtek alkotják, melyek kevés pigmentációval és habos citoplazmával rendelkeznek. Lehetséges, hogy egy átmeneti sejtípus a degeneratív tumorsejtek felé.

Előfordulhat egy szemben belül uveális melanoma és naevus egyidejűleg is (3., .4. ábra).



**3. ábra.**

**Melanoma malignum chorioideae és naevus a bal szemben.**

A melanoma malignum chorioideae (m) a temporális alsó érárkád mentén helyezkedik el. Az elváltozás jól láthatóan promineál, a felszínén durva pigmentkicsapódás. A papilla körüli elváltozás kevésbé pigmentált, lapos, naevusnak (n) imponál.



**4. ábra.**

**Az előző ábrán látható melanoma malignum chorioideae és naevus fluoereszcein angiográfiás képe.**

Az *iris melanomáit* gyakrabban diagnosztizálják malignusnak, holott azoknak többsége naevus. Az iris festékes daganatai szürkésbarna-barnás színűek. Jellemző klinikai tünetük a pupilla deformációja, mozgásában való korlátozottsága, amennyiben a tumorsejtek az iris izmait infiltrálják. A tumor károsítja az iris pigmentepitheliumát, ezért gyakori a pigmentkiszórás az elülső csarnokba, a cornea hátsó felszínére és/vagy a lencse elülső felszínére.

Az iris melanomái szövetileg általában orsósejtesek, előfordulnak azonban epithelioid sejtesek is. Ez utóbbi sejtek lazán tapadnak a tumor felszínéhez.

A tumorok általában bőven erezettek, a patológiás erek a fluoreszcein festéket átengedik, leakage-et mutatnak. A tumor infiltrálhatja a csarnokzugot. Ha ez nagy területen történik, a csarnokvíz elfolyása akadályozott, szekunder glaucoma alakul ki. Az irisből kiinduló tumor ráterjedhet a corpus ciliarára is.

Kis tumorok (melyek átmérője 7 mm-nél kisebb, prominenciája 2 mm-nél kisebb) 5 éves mortalitása kevesebb, mint 4%. Nagyobb tumorok 3 éven belül 50%-ban adnak metasztázist.

## **1.2. Diagnosztika**

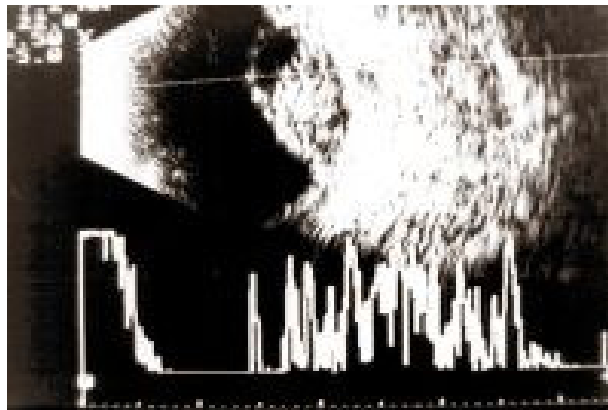
A *corpus ciliare melanomáit* kezdetben nehéz felismerni az anatómiai lokalizáció miatt. A rendelkezésünkre álló vizsgálómódszerek csak akkor eredményesek, ha a daganat egy bizonyos nagyságot elért. A klinikai diagnózis akkor lehetséges, ha a daganat az iris gyöke felé terjed és látható lesz az elülső csarnokban.

Abban az esetben is diagnosztizálható, ha a lencse subluxatióját (igen ritka esetben luxatióját), vagy perifériás, lokalizált szürkehályogot okoz a tumor nyomásának megfelelő területen. Akkor is diagnosztizálható makroszkópiusan, illetve mikroszkópiusan, ha a daganat a chorioidea felé terjed, vagy ha a daganat áttöri a sclerát és megjelenik a bulbus felszínén.

Az uveális melanomák közül legnagyobb gyakorisággal a *chorioidea melanomái* fordulnak elő.

A diagnózis általában nem nehéz. Szubjektív tünetek (látóképesség csökkenés, látótérkiesés) és műszeres vizsgálatok alapján a barnásszürke-barnásfekete, üvegtest felé domborodó szövetmassza jól felismerhető (Berta és mtsa, 1998).

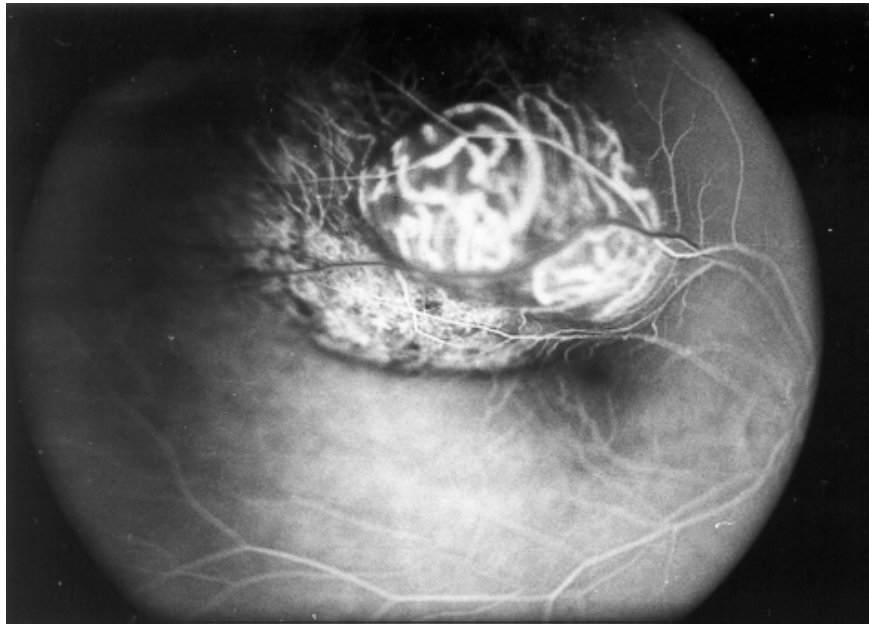
Direkt és indirekt binocularis ophthalmoscopya mellett a diagnosztizálás történhet ultrahanggal (UH) (5. ábra), fluoreszcein-angiográfiával (6. ábra), indocianin-zöld-angiográfiával, diascleralis illuminációval, computer tomográfiával (CT) (7. ábra), MRI-vel, <sup>32</sup>P-tesztel.



**5. ábra.**  
**Melanoma malignum chorioideae ultrahang A+B képe.**

Echográfiával a daganat akkor is felismerhető, ha a törőközegek nem tiszták, vagy a szemtükrözés más okból kivitelezhetetlen.

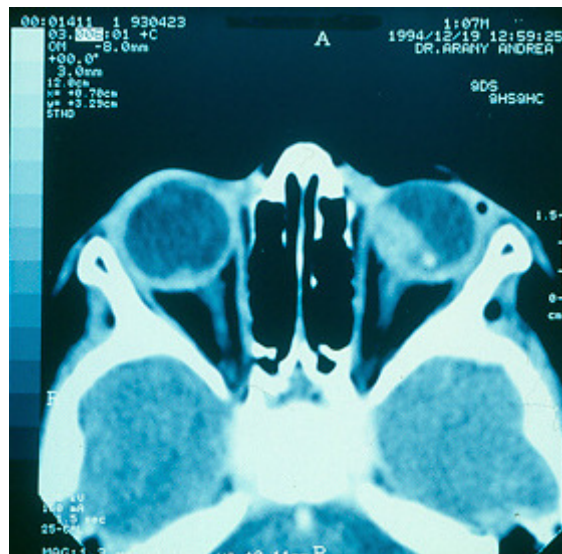
Különböző, nagy specifitású ultrahangtechnikák lehetőséget adnak arra is, hogy valószínűsítsük a daganat pigmenttartalmát, erezettségét, meghatározzuk a pontos kiterjedését, elhelyezkedését. Ez utóbbi két tulajdonság különösen fontos a terápia megválasztása szempontjából. Amennyiben a törőközegek tiszták, akkor fontos diagnosztikus lehetőség a fluoreszcein-angiográfia, amely megjeleníti a tumor tápláló ereit, és a tumor típusától függően foltos vagy intenzív generalizált hiperfluoreszcenciát látunk az arteriovenosus fázistól kezdődően.



**6. ábra.**

**Melanoma malignum chorioideae típusos FLAG képe.**

A tumor a jobb szemben, a hátsó póluson helyezkedik el, a centrumot is érinti. A felvétel a korai vénás fázisban készült, jól láthatók a diffúz hiperfluoreszcencia jelei. A tumor táplálói ere a felső temporális érárból ered.



**7. ábra.**

**A jobb szemben nagy, a bal szemben kis juxtapapillaris elhelyezkedésű intraocularis daganat CT képe.**

Előfordulhatnak azonban olyan esetek, amikor a végső diagnózist csak szövettani vizsgálat mondhatja ki. Az elváltozás körül gyakran találunk ideghártya-leválást (8. ábra), esetenként üvegtesti vérzést.



**8. ábra.**  
**Melanoma malignum chorioideae szövettani keresztmetszeti képe.**  
A daganat a sclerát nem törte át, körülötte elevált retina.  
(HE festés, N: 16X)

Az újabb alternatív módszerek közé tartozik az impressziós cytologia, illetve ide tartozhatnak a napjainkban és a jövőben nagy jelentőséggel bíró molekuláris genetikai vizsgálatok (Bene és mtsai, 2004; Kopper és mtsai, 2002; Woodward és mtsai, 2002), melyek alkalmazása nagyfokú előrehaladást jelentene a korai felismerés szempontjából, amelynek fontosságát nem lehet eléggé hangsúlyozni.

Napjainkra számos prognosztikai faktort is sikerült azonban azonosítani (Schaller és mtsai, 2000; Sheidow és mtsai, 2000; Udono és mtsai, 2000; Walker és mtsai, 2002). Ezek fontos szerepet játszanak a tumor osztályozásában, a kezelés formájának és időpontjának megválasztásában, a monitorizálásban (Djukanovic és mtsai, 2000; Egan és mtsai, 1998; Heine és mtsai, 2000; Ijland és mtsai, 1999; Lange, 1998; Metzelaar-Blok és mtsai, 2001).

### 1.3. Sebészeti kezelés

Az iris melanomáinak terápiája döntően sebészi: a kis, csarnokzugot nem infiltráló daganat eltávolítása iridectomiával történik.

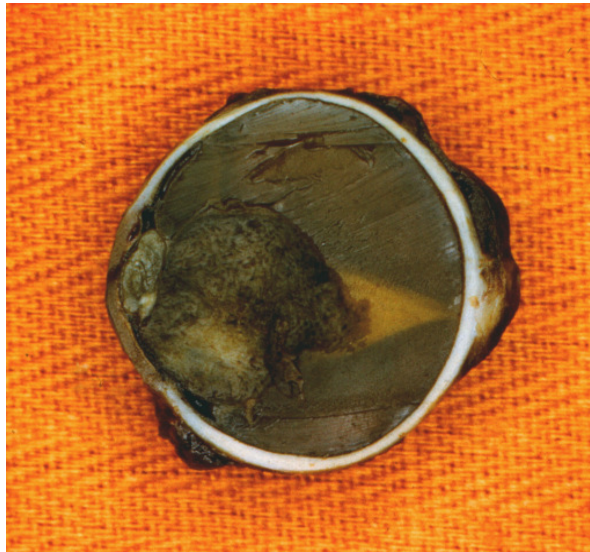
Az iris festékes daganatainak prognózisa kis tumorok esetében általában jó, azonban a daganat méretnövekedésével egyenes arányban romlik.

Ha az iris daganat a corpus ciliarét is érinti, iridocyclectomiát végzünk.

A kezelést több faktor befolyásolja. Ilyen a daganat nagysága, elhelyezkedése, a látásélesség, a másik szem látásélessége, a beteg életkora, általános egészségi állapota, és nem utolsósorban a beteg kívánsága a kezelést illetően (Berta és mtsai, 1997). A nagy daganatok esetében ma is az enucleatio a legáltalánosabb terápiás mód (9. ábra).

A betegek többsége első közléskor az enucleatiót elutasítja, de a felvilágosítás után elfogadja a félszeműség tényét.

Addig, ameddig a melanomasejtek nem metasztatizáltak távolabbi testrészekbe, az enucleatiót gyógyító beavatkozásnak tekintjük, jóllehet mikroszkópos metasztázis sohasem zárható ki (Alberth és mtsa, 1989). Máskor az áttét már az intraocularis daganat felfedezésekor létrejött. A betegek mintegy fele metasztatikus melanoma miatt hal meg az enucleatiót követő 3-6. évben.

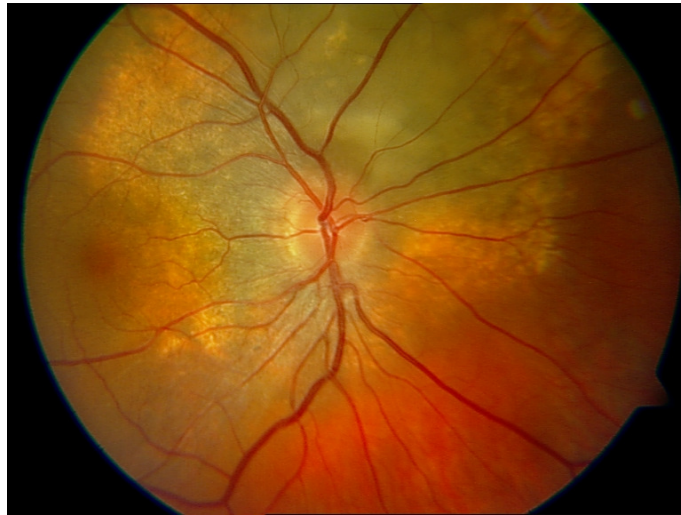


**9. ábra.**  
**Melanoma malignum chorioideae miatt eltávolított, félbe vágott bulbus.**

Az utóbbi időkben alkalmazzák a *mikrosebészeti beavatkozásokat*. Ezekkel a módszerekkel a daganatot a szem belsejéből vitrectomiával, vagy kívülről, a sclera felől távolítják el.

#### **1.4. Lézeres kezelés**

Alkalmazható még úgyszintén kisebb és különleges elhelyezkedésű (például papilla körüli) daganatok esetén (10. 11. ábra) fotokoaguláció és ún. nem koagulációs lézerterápia (dióda lézer transzpupilláris termoterápia, azaz TTT).



**10. ábra.**  
**Papilla körüli kiterjedt melanoma malignum fundusfotó képe.**



**11. ábra**  
**Az előző ábrán látható szemfenék fluoreszcein-angiográfias képe.**

A fotokoaguláció a 7 mm-nél nem nagyobb alapátmérőjű, 2 mm-nél nem nagyobb prominentiájú, extraocularis terjedést és távoli metasztázist nem mutató daganatok eseteiben jöhet szóba. A fenti adatokat a szerzők többsége azonban elméleti felső határként értékeli és a gyakorlatban ennél szigorúbb indikációs szempontokat használ. A szerzők többsége egyetért abban, hogy az ennél kisebb daganatok lézeres kezelése sikeres lehet. Vörösmarthy szerint a két papillaátmérőnél nem nagyobb alapú, 2 Dioptriánál nem nagyobb prominentiájú chorioidea melanomák fotokoagulációja minden esetben sikeresen elvégezhető (Vörösmarthy 1960; Vörösmarthy 1973). Ha a tumor alapja 2-5 papillaátmérőnek (25-30 fok látószögnek) felel meg, prominentiája legfeljebb 6 Dioptria és a daganat a bulbus hátsó részében helyezkedik el, akkor a kezelési ráta 70%-os. Az ennél nagyobb vagy perifériás elhelyezkedésű chorioidea melanomák fotokoagulációs kezelésre alkalmatlanok (Berta, 1989). Határesetekben helyesebb, ha a ruthenium applikátorokkal történő kontakt irradáció mellett döntünk.

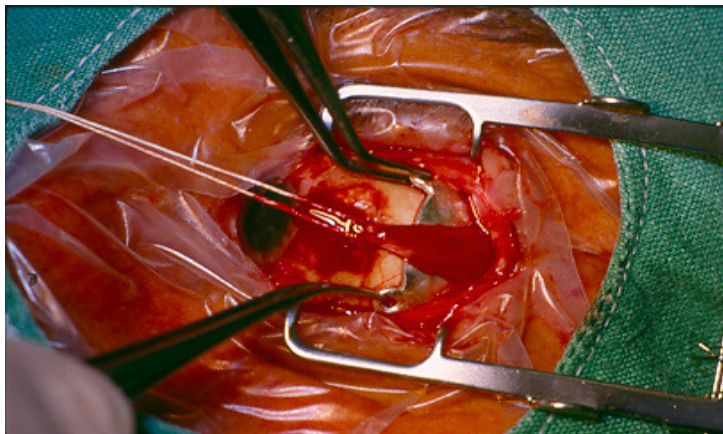
## 1.5. Sugárterápia

A kis és közepesen nagy chorioidea melanomák kezelése világszerte a szem eltávolítása helyett egyre inkább kontakt béta-sugárzó applikátorokkal történik.

Az *irradiációs kezelés* a tumor elpusztítását, a bulbus megtartását célozza.

A sugárkezelés után különböző látásélesség maradhat vissza, a kezelés azonban csak szűk határok között képes figyelembe venni a látásélesség megtartását (Damjanovich és mtsai, 1997). Az ún. *plaque radioterápián* radioizotóp sugárzását értjük a tumor feletti sclerán keresztül a tumorra (Berta, 2005). A radioizotóp egy lemezen helyezkedik el, amelyet a sclera felszínére varrunk a tumor felett. A lemezben Ruthenium-106 (12. ábra) vagy jód-125 izotóp van.

Az applikátor elhelyezkedését intraoperatív szemészeti ultrahanggal ellenőrizzük.



**12. ábra.**

### **Hátsó pólusi applikátor felhelyezése.**

A conjunctiva felpreparálása után a musculus rectus lateralis-t leválasztva a nagy hátsó pólusi applikátort hátracsúsztatjuk a nervus opticus közelébe, majd scleravarratokkal rögzítjük. A conjunctivát általában csomós öltésekkel zárjuk. Az applikátor kivételekor varrjuk vissza a leválasztott izmot.

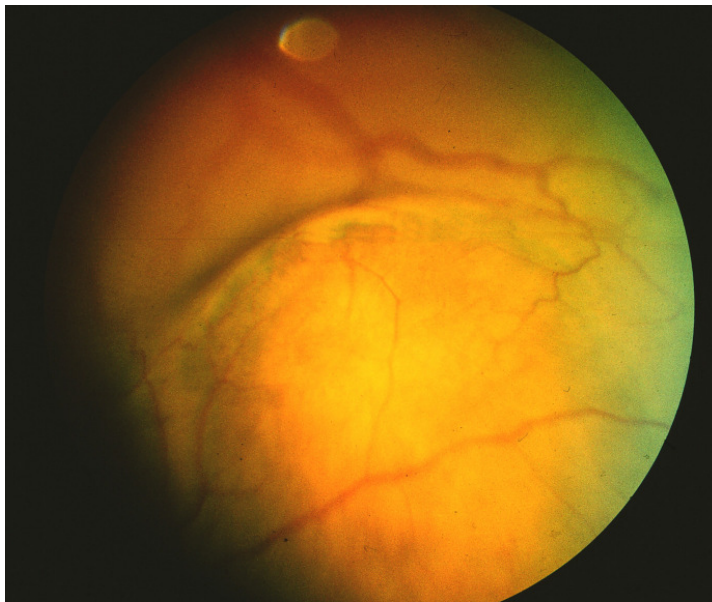
A sugárkezelés másik módja a *protonbesugárzás*, amely kevésbé elterjedt és Európában is kevés helyen alkalmazott. Mindkét sugárkezelés protokollja meghatározott, csak kisebb daganatok kezelhetők ezen a módon.

## 1.6. Ruthenium applikátorkezelés

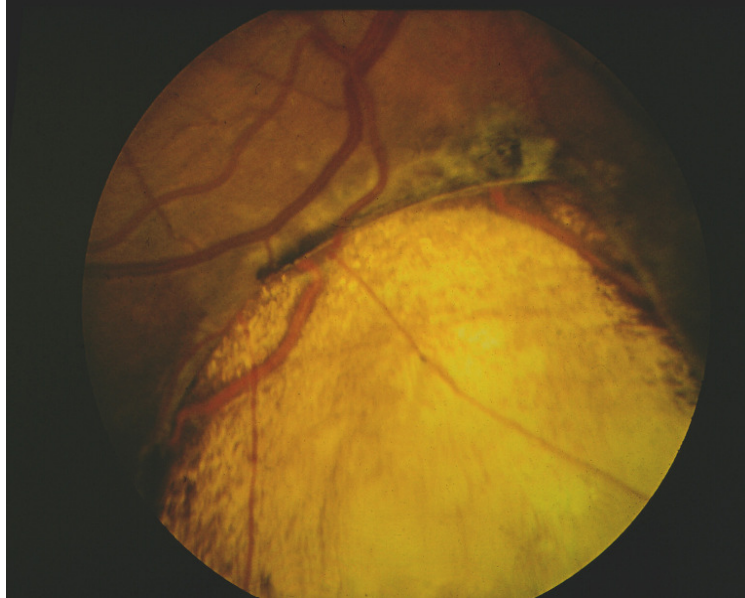
A chorioidea melanoma a ruthenium applikátorokkal történő kontakt béta-sugárkezelésre alkalmas, ha megfelel az alábbi feltételeknek:

1. A prominentia nem nagyobb, mint 5 mm.
2. Alapjának átmérője nem haladja meg a 15 mm-t.
3. Nem áll összefüggésben a corpus ciliaréval.
4. Hátsó széle legalább 1 papillaátmérő (1.5 mm) távolságra van a papillától.
5. Nem törte át a bulbus falát.

A melanoma malignum képe besugárzás előtt a 13. ábrán, a besugárzás utáni állapot 14. ábrán látható.



**13. ábra.**  
**Melanoma malignum képe besugárzás előtt.**



**14. ábra.**  
**Ugyanaz a daganat egy évvel a besugárzás után.**  
**Az eredetileg félgömb alakú, elődomborodó daganat helyén**  
**a besugárzás után lapos heg alakult ki.**

Ahhoz, hogy a chorioidea melanoma sugárkezelése sikeres legyen az applikátort addig hagyjuk a sclerára felvarrva, amíg a tumor belső felszínén az összdózis eléri a 100 Gy-t (10000 rad-ot). A szükséges besugárzási időt az applikátor gyártási idejének, a béta sugarak szöveti elnyelődésének és az izotóp felezési idejének figyelembe vételével határozzuk meg (Berta és mtsai, 1991).

Bár a tumor elpusztítása szempontjából az összdózis a legfontosabb, az sem közömbös, hogy az adott sugármennyiség mennyi idő alatt éri el a daganatot (Alberth és mtsai, 1992).

Az egységnyi idő alatt leadott optimális sugármennyiség, az optimális dózisiráta 0.6-1 Gy/h (60-100 rad/h). Az aktuális dózisiráta régebbi applikátorokkal történő besugárzás esetén sem süllyedhet a kritikus 0.01 Gy/min (1 rad/min) alá.

### **1.7. Külső besugárzás, citosztatikus és egyéb kezelések**

A külső sugárforrással történő teljes szembesugárzás elvileg történhet röntgen sugarakkal (orthovoltos berendezés), gamma-sugarakkal

(kobaltágyú), nagyenergiájú fotonokkal (lineáris gyorsító), proton vagy héliumionokból álló sugarakkal (ciklotron). A régebben használt röntgen és kobalt besugárzás erre a célra a súlyos mellékhatások miatt nem, a lineáris gyorsító pedig csak korlátozottan alkalmas. A chorioidea melanomák külső besugárzására, teleterápiájára a töltéssel rendelkező részecskesugárzásokat (proton, hélium), valamint a fókuszált gamma-sugárnyalábót (gamma-kés) használnak. Ezekkel lehet a szem sugárérzékeny többi része és (szemlencse, látóideg, cornea) és a környező szövetek viszonylagos megkímélésével a szemben levő daganatra koncentrált tumorölő dózist leadni.

A *kemoterápia* nem alkalmas az intraocularis melanomák kezelésére (Baggetto és mtsai, 2005), metasztázis eseteiben viszont a bőrmelanomához alkalmazott különböző protokollok szerinti kemoterápiához folyamodhatunk preventív, adjuváns kezelésként (Bajcsay és mtsai, 2001; Szántó, 2005).

## **1.8. Ellenőrző vizsgálatok**

A beteget az irradáció után rendszeresen ellenőrizni kell (Berta, 1999). Az ellenőrzések a besugárzás után az első negyedévben havonta, az első év végéig 3 havonta, a második évben 6 havonta, azután évente történnek. A kontroll vizsgálatok során a visus, látótérvizsgálat, szemnyomásmérés, fundusfotó, fluoreszcein-angiográfiás vizsgálat mellett a prominentia, a legnagyobb alapátmérő és a reflektivitás meghatározását kell elvégezni. Az ellenőrzéseket addig folytatjuk, amíg a daganat helyén a tumor teljes pusztulását mutató, a scleráig terjedő heg ki nem alakul (Berta és mtsai, 1998). A metasztázis irányában történő kivizsgálás (Harbour és mtsai, 1997) mellkas röntgen és hasi ultrahang vizsgálatból, laboratóriumi vizsgálatokból (májfunkció, vesefunkció, vérsejtsüllyedés, vizelet melanin meghatározás) és évente egy alkalommal orbita és koponya CT, valamint csontszcintigráfiás vizsgálatból áll.

A kisebb daganatok általában nem kerülnek azonnal műtetre, a nemzetközi protokolloknak megfelelően 3–6 hónaponként kontrolláljuk azokat. Amennyiben a daganat méretében növekedést tapasztalunk, vagy fluoreszcein-angiográfiával (FLAG), illetve indocianin-zöld angiográfiával

(ICG) kimutathatóan a vér-csarnokvíz-gát károsodott, vagy ha a szemnyomás emelkedett, akkor az a műtéti indikáció mellett szól. A szemnyomásemelkedés főleg akkor értékelhető kórosnak, ha az ép és a beteg szem között jelentős szemnyomáskülönbség van.

### **1.9. Az irradiáció utáni recidívák kezelése**

Recidíva a megfelelően végrehatott irradiáció után ritka. Amennyiben mégis kialakul, annak általában az az oka, hogy az applikátor nem fedte be teljesen a tumor alapját. A recidívák előfordulásával azért kell számolni, mert a daganatot igyekszünk minél kisebb applikátorral befedni a sugárkárosodott terület csökkentése és különösen a hátsó pólus daganatai esetén a macula és a nervus opticusra érő sugárkárosodás minimalizálása érdekében. A recidívák kezelési elvei az első daganat terápiai elveivel azonosak. Lapos (1.5 mm-nél nem nagyobb prominentiájú) recidívákat, ha barna vagy feketés színűek, akkor kripton vagy dióda lézerrel kezeljük (Damjanovich és mtsa, 1995). Ha a vastagságuk 1.5 és 5.0 mm közé esik, akkor reapplikáció szükséges (Berta és mtsa, 2000).

### **1.10. Extrabulbáris terjedés**

Ritkán a chorioidea melanoma diffúzan növekszik, alakja szabálytalan és hamar áttöri infiltrálja a sclerát. Extraocularis, orbitalis terjedéssel elsősorban a diffúzan növekvő formánál vagy az igen nagyra nőtt noduláris jellegű daganatoknál lehet számítani. A sclera infiltrációját, az áttörést és az orbitalis terjedést ultrahang, CT valamint MRI vizsgálattal ki lehet mutatni. Eucleatio során minden esetben megvizsgáljuk a bulbus külső felszínét és gyanús esetben az orbitális szövetekből mintát veszünk.

### **1.11. Proliferáció gátlás**

Mivel az uveális melanoma nagyon rezisztens a jelenleg használatos kemoterápiás szerekre, ezért napjainkban nem áll rendelkezésre hatékony kemoterápiás gyógyszer, amellyel az uveális melanomát gyógyítani lehetne.

A sikeres *immunoterápia* kifejlesztését jelentősen hátráltatja az a tény, hogy a szem – bizonyos mértékig – immunológiailag privilégizált helyzetben van, mivel mind a szerzett, mind az öröklött immunválaszok elnyomottak (Streilein és mtsai, 1997). Ráadásul az uveális melanoma sejtek lymphocyták működését gátló reakcióit nagyban befolyásolják a szemészeti mikrokörnyezet hatásai (Repp és mtsai, 2001; Verbik és mtsai, 1997).

Következésképpen *sürgető feladat az uveális melanomák kezelésében új utakat találni.*

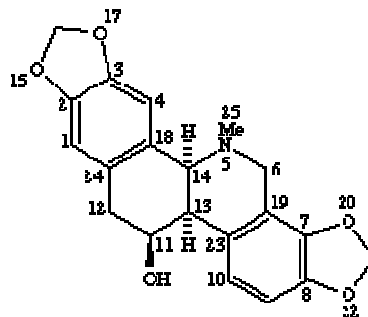
Az uveális melanomákhoz kötődő antigének felfedezése mind az *in vivo* daganatos sejtekben, mind az *in vitro* melanoma sejtvonalakon utal arra a tényre, hogy bizonyos körülmények között ezek a daganatok immunológiai támadáspontúak is lehetnek (Luyten és mtsai, 1998; de Vries, 1998), és ez a tény dendritikus-sejt alapú immunoterápiák hatásos célpontjává teheti ezeket a daganatokat.

Nemrégben kimutatták, hogy amennyiben dendritikus típusú sejtekhez apoptotikus melanoma sejteket adtak, akkor képesek voltak proliferatív és citolítikus T-sejt választ produkálni (Shaif-Muthana, 2000). Ez azt sugallja, hogy az ilyen módon előállított dendritikus sejtek képesek voltak mind *in vivo* növelni az apoptózis indukáló tumorelles szerekek hatékonyságát, mind *in vitro* képessé teszi effektor T-sejteket létrehozni adaptációs transzfer terápiára (Andrawiss és mtsai, 2001; Shaif-Muthana, 2000).

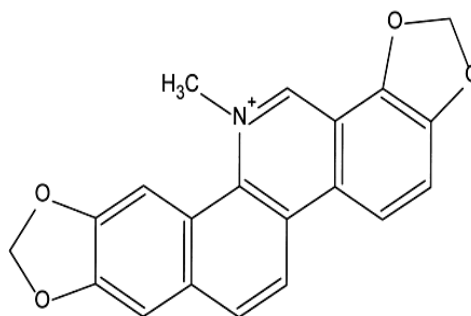
Ezért kulcsfontosságú lehet olyan új vegyületeket vizsgálni, amelyek a melanoma sejtekre antiproliferatív hatást gyakorolnak. A jövőben ezek gyógyszerre fejlesztve kiegészíthetik a dendritikus sejt alapú terápiás protokollokat vagy a már régóta alkalmazott, jól bevált brachyterápiás kezelést.

Az utóbbi néhány évben a klinikai kutatásokban a növényi eredetű szerekek vizsgálata előtérbe került a tumorok keletkezésének megelőzésére illetve a már kialakult tumorok kezelésére. Az ilyen eredetű vegyületek egyre elterjedtebbek lettek napjainkra a tumorok terápiájában (Hanuske, 1996; Mukherjee és mtsai, 2001).

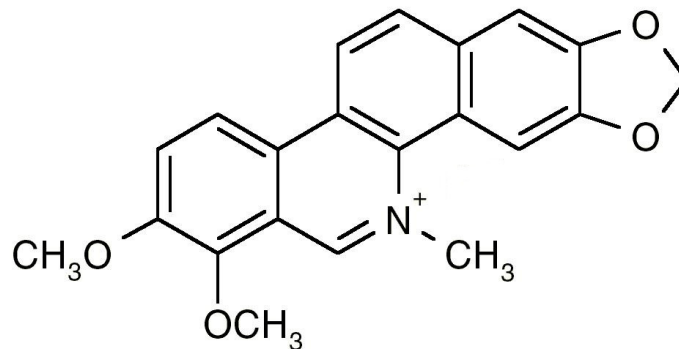
A *Chelidonium majus*-ból és más *Papaveraceae* növényi családból izolált alkaloidokról már korábban bizonyítást nyert, hogy széles körű biológiai aktivitással rendelkeznek az antimikróbás hatástól kezdve a gyulladáscsökkentő hatásig (Colombo és mtsai, 1996; Jagiello-Wojtowicz és mtsai, 1989; Lenfeld és mtsai, 1981; Vavreckova és mtsai, 1996). A *Chelidonium majus* alkaloidjait kémiai szerkezetük alapján csoportosíthatjuk: protopin típusú (pl. a- és b-allokraptopin, protopin), protoberberin típusú (pl. berberin) és benzofenantridin típusú (pl. chelidonin, sanguinarin, chelerytrin, chelilutin, chelirubin, macarpin) alkaloidokat különböztethetünk meg. Az utóbbiak gyulladásgátló és tumorellenes hatását már igazolták (Southard és mtsai, 1984). Közülük is behatóbban az eddigi vizsgálatokban a chelidonint (15. ábra), a sanguinarint (más néven pseudochelerytrin) (16. ábra) és a chelerytrint (17. ábra) tanulmányozták.



**15. ábra.**  
A chelidonin szerkezeti képlete.



**16. ábra.**  
A sanguinarin szerkezeti képlete.



**17. ábra.**  
**A chelerytrin szerkezeti képlete.**

Az említett három vegyületről elsősorban az igazolódott, hogy számos tumorféleségben főleg a sejtnövekedés gátlását érik el apoptózis indukálásán keresztül (Adhami és mtsai, 2003; Adhami és mtsai, 2004; Ahmad és mtsai, 2000; Chmura és mtsai, 1996; Chmura és mtsai, 2000). Ezzel azt sugallva, hogy potenciálisan használhatók proapoptotikus szerekként a tumorterápiában (Vogt és mtsai, 2005). Ráadásul ezek a vegyületek hatásosnak bizonyultak olyan tumorokkal szemben is, amelyek a korábban ismert standard terápiákkal szemben rezisztensek voltak (Ding és mtsai, 2002; Ma és mtsai, 1995).

Habár napjainkban csak kevés megbízható adat áll rendelkezésünkre a *Chelidonium majus* fő komponensének számító chelidonin hatásáról, de a jelenlegi adatok azt jelzik, hogy ez a típusú benzofenantridin alkaloid is indukálhat apoptózis típusú sejthalált megváltozott belső szignálú és malignus sejtekben is (Panzer, 2001).

A chelidonin (15. ábra) gátolja a mikrotubulus polimerizációt ( $IC_{50} = 24 \mu M$ ), ezáltal szétszakítja a sejtek mikrotubuláris rendszerét.

A sanguinarin (16. ábra) – számos hatásán túl – gátolja a  $Na^+/K^+$  ATP-ázt, a protein kináz A-t valamint a NF $\kappa$ B aktiválódását (Plo és mtsai, 2000).

A chelerytrin (17. ábra) pedig gátolja a protein kináz-c-t és fokozza a citokróm-c felszabadulást, amely folyamat az apoptózis indukciójában, illetve a folyamat továbbvitelében játszik fontos szerepet.

Korábban ezeket a típusú vegyületeket nem próbálták ki uveális melanoma sejtvonal ellen, ezért fordult érdeklődésünk ezek alkalmazása felé.

Vizsgálatainkban OCM-1 (ocular choroideal melanoma) sejteket, egy különösen agresszív proliferációjú sejtvonalat használtunk fel.

Arra szerettünk volna választ kapni, hogy a fent említett benzofenantridin alkaloidok megváltoztatják-e az uveális melanomasejtek életképességét, és amennyiben igen, akkor ezt milyen mechanizmus alkalmazásával érik el. Döntően apoptózis típusú vagy nekrozissal kombinált bifázisos típusú sejthalált okoznak.

Az uveális melanoma kezelését illetően új utakat kell keresnünk a már korábban alkalmazott módokon kívül. Egy jövőbeni lehetséges út a DE OEC Szemészeti Klinikán már eddig is sok esetben használt brachyterápia kiegészítése lehet megfelelő antitumor ágensekkel. Ezek az ágensek szenzibilizálhatják a tumor sejteket a radioterápia iránt és így növelhetik a brachyterápia hatékonyságát.

Számos vegyületet próbáltak már ki uveális melanoma sejteken, amelyeknek antitumor aktivitását feltételezték (Klisovic és mtsai, 2005; Labialle és mtsai, 2005;). A tio-dezoxiuridilát-tartalmú oligonukleotidok biológiai aktivitásának vizsgálata során kiderült (Aradi és mtsai, 1985; Horváth és mtsai, 2005; Horváth és mtsai, 2005), hogy bár a rövid oligomerek inaktívak, a monomer – mely a természetben is előforduló anyag – tumor sejtekben apoptózist indukál.

Munkacsoportunk korábban már beszámolt arról, hogy a 35-tagú oligo-4-tio-2'-dezoxi-uridin-5'-monofoszfát (dUMP) jelentős antiretrovirális hatása mellett kifejezetten hatékonynak bizonyult a sejtproliferáció gátlásában is. A tio-dezoxiuridilát-tartalmú oligonukleotidok részletesebb biológiai aktivitásának vizsgálata során váratlanul hatásosnak bizonyult a 4-tio-dUMP ( $s^4$ dUMP) és a 4-tio-UMP ( $s^4$ UMP) mellett maga a 4-tio-uridin nukleozid is. Ez utóbbi vegyület régóta ismert, mint a tRNS része

(Lipsett, 1965). Megvizsgáltuk ugyanakkor *in vivo* toxicitásukat is. Az  $s^4$ UMP-t intravénásan beadva egerekbe akár még 1 g/tskg dózisban sem találtunk semmiféle morfológiai elváltozást még 30 nap után sem.

Bár az utóbbi években, évtizedekben sokat fejlődött a tumorkutatás és a terápiás beavatkozások köre is bővült, mégis a melanoma malignum chorioideae kezeléséhez nem áll még rendelkezésünkre olyan lehetőség, amely segítségével *in vivo* sejtszinten tudnánk beavatkozni a tumor növekedési folyamatába.

Ezért munkánk középpontjában az antiproliferatív kezelés lehetőségeinek vizsgálata állt. Amennyiben a laboratóriumi munka során eredményeket sikerül megvalósítani, ezeket megfelelően alkalmazva az élő szervezetre a klinikumban is használható sikereket lehetne elérni a melanomás betegek hatékonyabb kezelésében.

Bár az utóbbi években, évtizedekben sokat fejlődött a tumorkutatás és a terápiás beavatkozások köre is bővült, mégis a melanoma malignum chorioideae kezeléséhez nem áll még rendelkezésünkre olyan lehetőség, amely segítségével *in vivo* sejtszinten tudnánk beavatkozni a tumor növekedési folyamatába.

Ezért munkánk fő célkitűzésének középpontjában az antiproliferatív kezelés lehetőségeinek vizsgálata állt. Amennyiben a laboratóriumi munka során eredményeket sikerül megvalósítani, ezeket megfelelően alkalmazva az élő szervezetre a klinikumban is használható sikereket lehetne elérni a melanomás betegek hatékonyabb kezelésében.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Célkitűzésünk volt, hogy adatokat szolgáltatassunk a melanoma malignum uveae antiproliferatív kezelési lehetőségeire vonatkozóan, amelyek a jövőben lehetővé tehetik azt, hogy sejt szinten lehessen beavatkozni a tumor növekedési folyamatába.

2. Célunk volt olyan sejtvonal kiválasztása, amely elég agresszív proliferációt mutat, nagy mennyiségben hozzáférhető és jól jellemzi az uveális melanomák intraocularis élettani viselkedését. A sejtvonal életciklusának több támadásponton, több anyaggal való befolyásolását szerettük volna elérni.

3. Vizsgálni kívántuk a benzofenantridin alkaloidok humán uveális melanoma sejtekre gyakorolt hatását. Amennyiben a benzofenantridin alkaloidok sikeresen képesek gátolni a sejtproliferációt, akkor tisztázni kívántuk, hogy a sejtek apoptózissal vagy nekrozissal pusztultak-e el. Így a benzofenantridin alkaloidok csoportjába tartozó vegyületek közül a chelerytrin, a chelidonin és a sanguinarin hatását kívántuk tanulmányozni.

4. Az OCM-1 uveális melanoma sejtek gátlására egy a természetben is előforduló nukleotidot, a 4-tio-uridilátot is szerettünk volna felhasználni. Azt szerettük volna vizsgálni, hogy ez a nukleotid okoz-e a sejtproliferációban szignifikáns változást. Amennyiben igen, akkor tisztázni kívántuk, hogy ezt milyen mechanizmussal éri el.

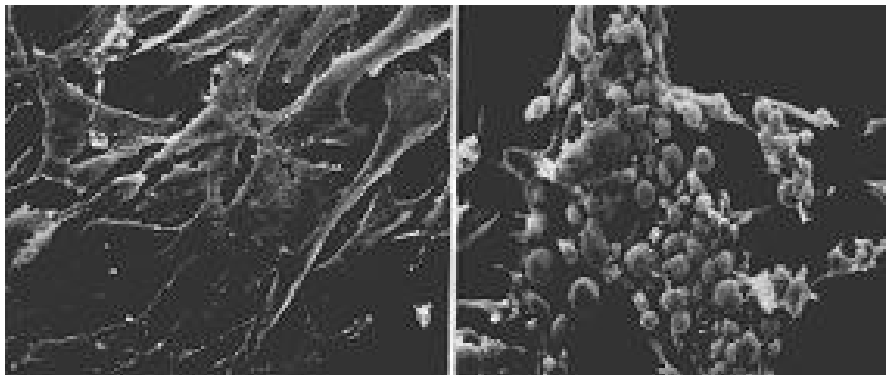
## 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 3.1. OCM-1 sejt kultúra

Vizsgálatainkhoz olyan sejt vonalat szeretnénk volna választani, amely elég agresszív proliferációt mutat, nagy mennyiségben hozzáférhető és jól jellemzi az uveális melanómák intraocularis élettani viselkedését. Ezért esett választásunk az OCM-1 (ocular choroideal melanoma) sejtekre, mert még a többi uveális melanómához képest is kitűnik nagy proliferációs képességével.

Az OCM-1 sejt vonalat a hollandiai Leidenből, a Leiden-i Egyetem Orvosi Centrumának Szemészeti Klinikájáról, Dr. Monique Hurks bocsátotta rendelkezésünkre, amiért külön köszönet illeti. Eredetileg ő a sejteket Dr. J. Kan-Mitchell szíves hozzájárulásával kapta az Amerikai Egyesült Államok-beli California-i, Los Angeles-i Norris Cancer Hospital and Research Institute Mikrobiológiai Intézetéből (Kan-Mitchell J és mtsai, 1989).

Az OCM-1 sejt kultúrát (18. ábra) többféle módon lehet tárolni. Benzofenantridin alkaloidokkal történő kísérleteinkhez a sejteket RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 tápfolyadékba helyeztük el, amely 10%-os FCS-t (Fetal Calf Serum), 0.3 g/ml L-glutamint és antibiotikumként gentamycint tartalmazott, és 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó párasított közegben 37 °C-on inkubáltuk. A sejteket hetente kétszer-háromszor passzáltuk a standard tripszines módszert alkalmazva.



**18. ábra.**  
**Humán uveális melanoma sejt kultúra tenyészet képe.**

## 3.2. Benzofenantridin alkaloidok

A benzofenantridin alkaloidokat a Sigma Aldrich Co. (St. Louis, OR, USA) cégtől szereztük be. A chelidonin dimetil-szulfoxidban (DMSO), míg a chelerytrin klorid és a sanguinarin klorid DMSO/víz (1:2) közegben volt oldva. A laboratóriumi munka során használt további vegyületeket az Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ, USA) cégtől szereztük be.

### 3.2.1. Kezelés benzofenantridin alkaloidokkal

A sejteket 24 lyukú plate-be helyeztük. Egy lyukba kb.  $1 \times 10^5$  sejtet mértünk 500  $\mu$ l oldatban szuszpendálva. A sejteket – amelyek 80-90%-ban összecsapzódtak a plate falára – különböző koncentrációjú alkaloidokkal kezeltük: 0.5, 1, 4 és 8  $\mu$ g/ml dózisban.

A kezelést 4, 24 és 48 óráig folytattuk. A vizsgált alkaloidok nagyjából azonos moláris tömegét figyelembe véve kiszámítható, hogy az alkalmazott dózisok megközelítőleg azonos moláris koncentrációkat jelentettek.

Az oldatokat minden esetben hígítottuk a megfelelő oldószerrel azért, hogy minden mintában azonos legyen a végleges DMSO (dimetil-szulfoxid) koncentráció.

A kontroll sejteket ugyanolyan mennyiségű DMSO-val kezeltük és ugyanolyan kísérletes körülmények között tartottuk. A fent jelzett időpontokban a sejteket tripszinnel emésztettük, PBS-sel (phosphate-buffered saline) mostuk és előkészítettük DNS fragmentációs assay-re vagy annexin V/PI assay-re. Az alkaloid kezelés hatására a sejtörmelékek leváltak a plate faláról és az oldatban úsztak.

### **3.2.1.2. DNS fragmentációs assay**

A benzofenantridin alkaloidokkal kapcsolatos vizsgálatok során a sejtek DNS tartalmát áramlási citometriával határoztuk meg (Zhu és mtsa, 1997). A sejteket 200 g-n centrifugáltuk, majd az áramlási citometria előtt 0.5 ml hypotoniás fluorochrom oldatban (50 µg/ml PI [propidium-jodid] 0.1% Triton X-100-ban) 4 °C-on tartottuk egy éjszakán át. A mintákat FACScan áramlási citométerrel (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) vagy FLEX-el dolgoztuk fel.

Az apoptotikus sejteket onnan lehetett felismerni, hogy kisebb volt a DNS koncentrációjuk, pl. a karakterisztikus sub-G<sub>1</sub> csúcs a DNS-tartalom (PI-intenzitás) frekvencia hisztogrammon.

Az s<sup>4</sup>UMP-val kapcsolatos vizsgálatok során átlagosan 2x10<sup>6</sup> sejtet kezeltünk s<sup>4</sup>UMP-vel 24, illetve 48 órán át, majd centrifugálással (1000 rpm, Jouan C/CR4-12, Horizontal Rotor, 10 percig, 10 °C-on) gyűjtöttük be a sejteket. Ezt követően kétszer mostuk PBS-sel, majd izoláltuk a DNS-t és agaróz-gélre vittük. Az agaróz géleket Alphamager™ 2200 szoftverrel értékeltük ki és archiváltuk.

### **3.2.1.3. A sejtek V-FITC/PI festése benzofenantridin alkaloidokkal való kísérletek során**

Az élő és a nekrotikus sejtekből az apoptotikus sejtek elkülönítése az annexin V-FITC (fluorescein isothiocyanate) és PI (propidium-jodid) használatával történt Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma Aldrich Co., St. Louis, OR, USA) alkalmazásával. A lecentrifugált sejteket a kötő pufferrel (10 mM HEPES/NaOH, 0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH=7.5) hígítottuk 1x10<sup>6</sup> sejt/ml koncentrációra. A mintákat 0.5 µl/ml annexin V-FITC és 2 µg/ml PI-ben inkubáltuk 10 percen keresztül szobahőmérsékleten és aztán mértük FACScan áramlási citométerrel.

Az annexin V-FITC és PI fluoreszcenciát az FL-1 (zöld) és az FL-2 (vörös) csatornán mértük, illetve a két csatorna közötti spektrum

átfedések korrekciója után értékeltük az eredményeket, melyeket WinMDI 2.8 vagy FLEX szoftver segítségével elemeztünk (Szentesi és mtsai, 2004). Az apoptotikus és a nekrotikus sejtek megkülönböztetése az annexin V-FITC aktivitáson és a PI kizáráson alapultak. Az apoptotikus sejtek intenzív zöld (FITC) és alacsony vagy közepes vörös (PI) fluoreszcenciát mutattak (a korai vagy késői apoptotikus fázisnak megfelelően). Az élő sejtek egyáltalán nem festődtek. A késői apoptotikus fázisban levő sejtek permeabilitása a plazma membránjuk megváltozott integritásának a következménye.

A nekrotikus sejtek mindkét reagens szempontjából festhetőnek bizonyultak és ezért erős zöld és vörös fluoreszcenciát mutattak.

#### **3.2.1.4. A sejt morfológia elemzése**

A sejteket tárgylemezre helyezve vizsgáltuk az alkaloidok sejt morfológiára gyakorolt hatását. A sejtek egy része a tárgylemezen összecsapódott. Azokat a sejteket kezeltük alkaloidokkal, amelyek 80-90%-os összecsapódást mutattak, ezeket 4 órán keresztül inkubáltuk, majd Zeiss LSM 510 scanning lézer-mikroszkóppal vizsgáltuk. Ennek során kerestük az apoptózisra és/vagy nekrozisra jellemző fénymikroszkópos elváltozásokat.

#### **3.2.1.5. MTT-assay**

Az MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) assay kivitelezése az American Type Culture Collection (ATCC) használati utasítása szerint történt (Gerlier és mtsa, 1986). A sejteket 48 lyukú plate-be tettük ki, mintegy  $0.6 \times 10^5$  sejt volt lyukanként 200  $\mu$ l tápoldatban 15 órán keresztül és ezután kezeltük a jelzett dózisu alkaloidokkal vagy azok nélkül csak az oldószerral. 24 órás inkubációs idő után a sejt kultúrát 20  $\mu$ l MTT-oldattal kevertük össze és további 3 órán át inkubáltuk, majd 200  $\mu$ l

savas izo-propanol oldattal felfoszpendáltuk és ezen homogén elegy 200 µl-ét vittünk 96 lyukú plate-re. Ezt követően ELISA olvasóval olvastuk le.

### **3.3. Kísérletek 4-tio-uridin-5'-monofoszfáttal (s<sup>4</sup>UMP)**

#### **3.3.1. A 4-tio-uridin-5'-monofoszfát (s<sup>4</sup>UMP) előállítása**

A 4-tio-uridin-5'-monofoszfát (s<sup>4</sup>UMP) tiolált mononukleotidot a citidin-5'-monofoszfát H<sub>2</sub>S kezelésével állítottuk elő és ioncserélő kromatográfiával tisztítottuk, ahogy ez munkacsoportunk korábbi publikációiban már szerepel (Horváth és mtsa, 2005; Horváth és mtsai, 2005). 10 mg/ml törzsoldatot készítettünk és szövetkultúrában hígítottuk közvetlenül minden használat előtt.

#### **3.3.2. Kezelés s<sup>4</sup>UMP-vel**

Az OCM-1 sejteket az s<sup>4</sup>UMP-vel való kezeléshez RPMI 1640 tápfolyadékba helyeztük, mely 10%-os hő által inaktivált FBS-t (phosphate-buffered saline) és antibiotikumként penicillint tartalmazott 100 nemzetközi egység/ml, valamint streptomycint 100 µg/ml dózisban. A sejteket 37 °C-on, 5%-os CO<sub>2</sub>-os párasított közegben tároltuk.

Majd az inkubálás után 2.5 µg/ml koncentrációjú PBS/tripszint tartalmazó eleggyel szűrtük le.

##### **3.3.2.1. MTT-assay**

A sejtek életképességének vizsgálatához a sejteket 24 lyukú lemezekre oltottuk.

A sejteket a fent ismertetett módon 6 órán keresztül tenyésztettük 1 ml tápközegben, majd különböző koncentrációkban kezeltük azokat az

s<sup>4</sup>UMP-vel. Az MTT-assay kivitelezése az ATCC által kiadott kézikönyv szerint történt.

### **3.3.2.2. A sejt morfológia elemzése**

A különböző s<sup>4</sup>UMP koncentrációk és kezelési időtartamok hatására a kezelések után bekövetkezett karakterisztikus sejt morfológiai és sejtszám változásokat vizsgáltuk a kontroll OCM-1 sejtekhez képest.

### **3.3.2.3. DNS-fragmentáció teszt**

A fent említett módon 24 valamint 48 órán keresztül 30 µM (10 µg/ml) s<sup>4</sup>UMP-vel kezeltünk 2x10<sup>6</sup> sejtet, azokat centrifugálással összegyűjtöttük, kétszer mostuk PBS-sel, majd DNS-t izoláltunk a mintákból és agaróz gélelektroforézisnek vetettük alá. Az agaróz géleket Alphamager™ 2200 szoftverrel értékeltük és archiváltuk.

### **3.3.2.4. Kaszpáz-9 aktivitás mérése**

Az s<sup>4</sup>UMP hatásmechanizmusának tisztázásához elvégeztük a kaszpáz-9 aktivitás mérését is azért, mert az apoptotikus eseménysor elindításában és végrehajtásában kulcsszerep hárul a kaszpázokra.

Az s<sup>4</sup>UMP-vel kezelt OCM-1 sejteket 1000 rpm-en 10 percen keresztül centrifugáltuk és kétszer mostuk PBS-sel. Az aktivitást Caspase-9/Mch6 Colorimetric Assay Kit felhasználásával vizsgáltuk a használati utasításban leírt módon (Medical and Biological Laboratories Co. Ltd, Nagoya, Japan).

Az értékelés során három egymástól független mérés eredményeinek átlagértékét vettük figyelembe.

### **3.3.2.4. Áramlási citometria s<sup>4</sup>UMP-vel való kezelés során**

Mind az s<sup>4</sup>UMP-vel kezelt, mind a kezeletlen OCM-1 sejteket ( $5 \times 10^5$  sejt/lyuk) 72 órán keresztül inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk (1000 rpm, Jouan C/CR4-12, Horizontal Rotor) 10 percen keresztül, 10 °C-on. A sejteket ezután újraszuszpendáltuk 0.5 ml kötő pufferben (25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) és megjelöltük 5 µl annexin FITC-el és 5 µl propidium-jodiddal a felhasználási utasításnak megfelelően (Medical and Biological Laboratories Co. Ltd, Nagoya, Japan). Az áramlási citometriás méréseket úszkáló, nem fixált sejteken FacsCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson, Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük el, excitációra 488 nm-es argon-lézert használva. Az eredményeket CellQuest szoftverrel értékeltük ki. Minden esetben a fluoreszcens adatok 20 000 eseményt gyűjtöttek egybe.

### **3.4. Statisztikai elemzés**

A statisztikai adatok, az átlagok és a szórás értékek kiszámítását WinMDI 2.8 (Copyright© 1993-1998, Joseph Trotter), FLEX, CellQuest valamint GraphPad PRISM<sup>®</sup> 4 szoftverekkel végeztük el.

## 4. EREDMÉNYEK

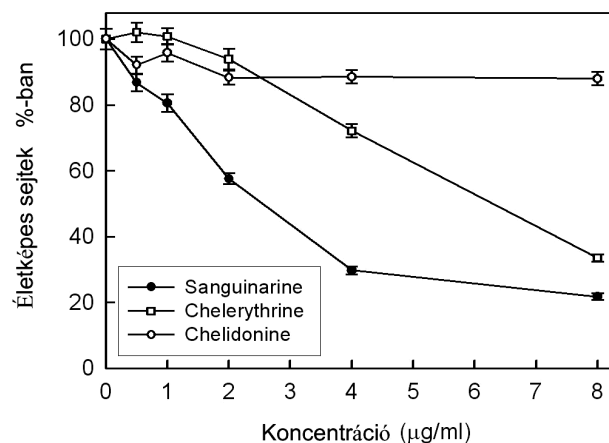
### 4.1. Benzofenantridin alkaloidokkal való kezelés eredményei

#### 4.1.1. A chelidonin sanguinarintól és chelerytrintől eltérő hatásai

A benzofenantridin alkaloidokról korábban bebizonyították már, hogy különböző típusú daganatokban a tumor sejtek növekedését gátolják.

Ahhoz, hogy megnézzük, hogy hasonló antiproliferatív hatást kifejtenek-e az OCM-1 uveális melanoma sejteken is, elvégeztük a kolorimetriás MTT-assay-t (Gerlier és mtsa, 1986).

A 19. ábrán látható, hogy az OCM-1 sejtek életképessége 24 órás sanguinarin és chelerytrin kezelés után erős és dóziszfüggő csökkenést mutatott.



19. ábra.

**A chelidonin, sanguinarin és a chelerytrin hatása az OCM-1 uveális melanoma sejtek növekedésére/túlélésére.**

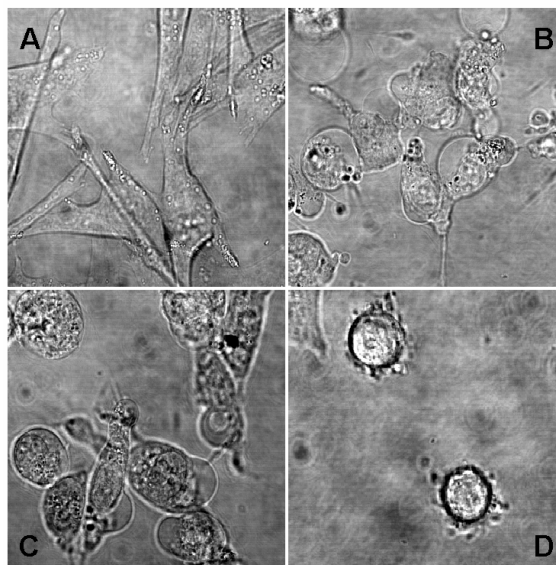
Az ábrán a 24 órás inkubációs idő utáni eredményeket tüntettük fel.

Ugyanakkor a chelidonin okozta proliferáció-csökkenés csak alig volt számottevő és a jelzett koncentrációtartományban a hatása nem mutatott szignifikáns dózis-függő hatást. Az itt megfigyelhető eltérő antiproliferatív effektust – amely jelentősen csökkent mértékű volt a chelidonin esetében, szemben a sanguinarinnal és a chelerytrinnel – korábban is leírták már különböző sejtípusok esetében (Vavreckova és mtsai, 1996).

#### **4.1.2. Morfológiai eltérések az OCM-1 sejteken a benzofenantridin alkaloidok hatására**

Habár a chelidonin esetében csak a sejtnövekedés enyhe gátlása igazolódott (19. ábra), fénymikroszkópos vizsgálattal sejt morfológiai változásokat tapasztaltunk: akár már négy óra múlva is apoptózist indukált az OCM-1 sejtekben.

Azokban a mintákban, amelyekben csak vivőanyag volt (20. ábra A), a sejtek kitapadtak a plate falára, míg a chelidoninnal kezelt sejtek leváltak a plate-ek faláról és közülük sokan plazma membrán blebbing jelenséget, az apoptózisra jellemző egyik markáns elváltozást mutattak (20. ábra B). Ilyenkor a sejtek plazmamembránján kitüremkedések (bleb) jelennek meg. Némely kitüremkedés idővel visszahúzódik, majd újra megjelenik.



**20. ábra.**

**Benzofenantridin alkaloidok hatása az OCM-1 uveális melanoma sejtek morfológiájára fénymikroszkóppal vizsgálva.**

A sejteket vivőanyaggal (A), 8 µg/ml chelidoninnal (B), sanguinarinnal (C) és chelerytrinnel (D) kezeltük 4 órán át és Zeiss LSM 510 konfokális scanning lézer mikroszkóppal vizsgáltuk (méret: 70x70 µm).

A fénymikroszkópos vizsgálat a sanguinarin és a chelerytrin eseteiben is dóziszfüggő elváltozásokat mutatott. Nagy dózisu (8 µg/ml) sanguinarinnal és chelerytrinnel kezelve a sejteket kifejezettebben mutatták a sejtduzzadás jelenségét, amely elváltozás a nekrosis korai fázisában figyelhető meg (20. ábra C és D).

Ha csökkentettük a hatóanyag koncentrációját, akkor a nekrotikus sejtek száma is csökkent, és ugyanakkor megjelentek apoptózisra jellemző sejt morfológiai elváltozások is.

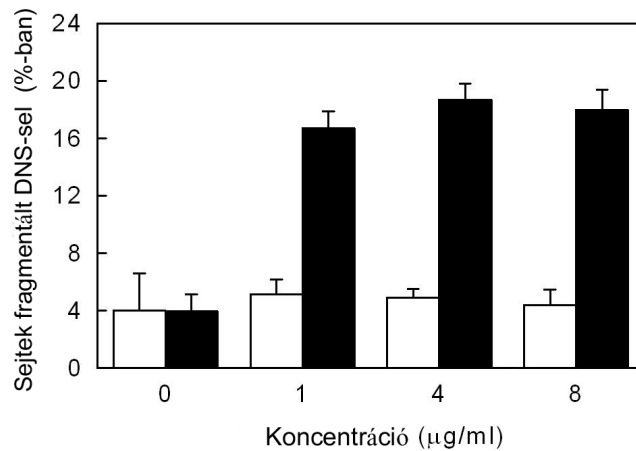
A legalacsonyabb koncentrációban (0.5 µg/ml) a legtöbb sejtnak normális volt az alakja, hasonlóan a kontroll sejtek morfológiájához. A fenti eredményekből azt a következtetést lehetett levonni, hogy a sanguinarin és a chelerytrin két együttesen meglévő mechanizmussal (apoptózis és nekrosis) pusztítják az uveális melanoma sejteket.

### **4.1.3. A benzofenantridin alkaloidok által okozott apoptózis kvantitatív analízise**

Fénymikroszkópos vizsgálattal kimutattuk, hogy a benzofenantridin alkaloidok apoptózist indukálhatnak az OCM-1 uveális melanoma sejtekben. Azért, hogy kvantitatíve megmérjük ezen alkaloidok apoptózis indukáló képességét, két vizsgálómódszert alkalmaztunk, amellyel az apoptótikus sejtekre jellemző változásokat tudjuk detektálni.

#### **4.1.3.1. A DNS fragmentáció értékelése**

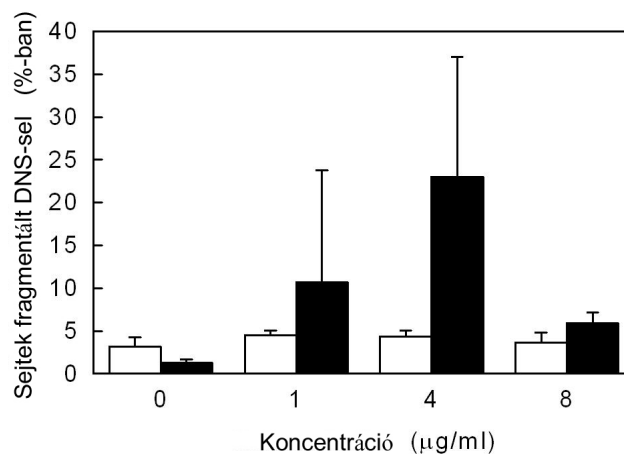
Az apoptózis jelenségének egyik karakterisztikus jellemzője a fragmentált, kis molekulásúlyú DNS-ek megjelenése. Ezeket áramlási citometriával lehet kimutatni (Bacso és mtsai, 2000). Ezért az alkaloidok apoptózis indukáló hatását először a DNS fragmentációs képességükkel értékeltük. Négy órás kezelés után sem a chelidonin, sem a sanguinarin nem okozott szignifikáns DNS degradációt, viszont 24 órás inkubáció után a fragmentált DNS-ekkel rendelkező sejtek aránya jelentősen megnőtt (21., 22. ábra). Ezzel szemben a chelerytrin képes volt szignifikáns DNS fragmentációt okozni már akár 4 órás inkubációs idő után is (23. ábra) és az apoptótikus sejtek száma a hosszabb inkubációs idővel egyenes arányban növekedett.



**21. ábra.**

**Chelidonin okozta DNS fragmentáció OCM-1 uveális melanomasejtekben áramlási citometriával vizsgálva.**

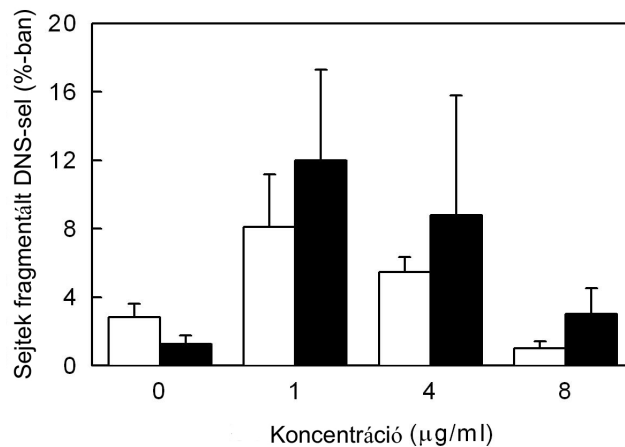
A sejteket csak vivőanyaggal vagy specifikus dózisban chelidoninnal kezeltük és 4 valamint 24 órán keresztül inkubáltuk (fehér és fekete oszlopok). Az eredmények legalább három egymástól független kísérlet eredményeit mutatják. Az értékeket a sub-G<sub>1</sub> sejtek százalékában fejeztük ki és az átlagot tüntettük fel (S.D.).



**22. ábra.**

**Sanguinarin okozta DNS fragmentáció OCM-1 uveális melanoma sejtekben áramlási citometriával vizsgálva.**

A sejteket csak vivőanyaggal vagy specifikus dózisban chelidoninnal kezeltük és 4 valamint 24 órán keresztül inkubáltuk (fehér és fekete oszlopok). Az eredmények legalább három egymástól független kísérlet eredményeit mutatják. Az értékeket a sub-G<sub>1</sub> sejtek százalékában fejeztük ki és az átlagot tüntettük fel (S.D.).



**23. ábra.**

**Chelerytrin okozta DNS fragmentáció OCM-1 uveális melanoma sejtekben áramlási citometriával vizsgálva.**

A sejteket vivőanyaggal vagy specifikus dózisban chelidoninnal kezeltük és 4 valamint 24 órán keresztül inkubáltuk (fehér és fekete oszlopok). Az eredmények legalább három egymástól független kísérlet eredményeit mutatják. Az értékeket a sub-G<sub>1</sub> sejtek százalékában fejeztük ki és az átlagot tüntettük fel (S.D.).

A chelidonin esetében a kiváltott válasz nem volt dózisfüggő a vizsgált koncentrációtartományon belül (21. ábra). Ugyanakkor a sanguinarin és a chelerytrin hatására bekövetkező elváltozások bifázisos jellegűt mutattak (22., 23. ábra).

**4.1.3.2. Annexin V-FITC/PI festés elemzése**

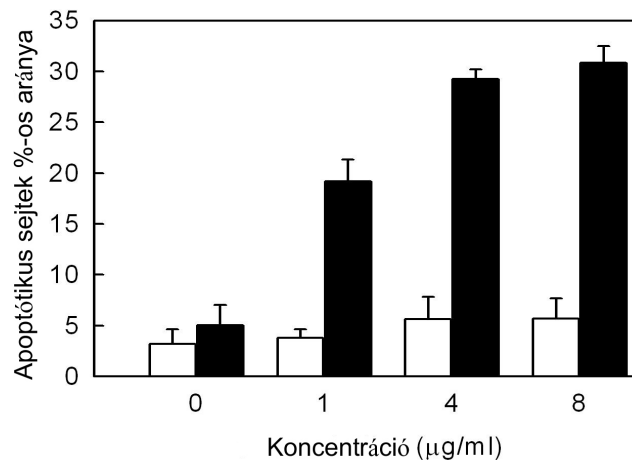
A DNS fragmentációs assay-jel szimultán módon készítettünk mintákat, amelyeket annexin V-FITC-el és propidium-jodiddal festettünk meg és áramlási citometriával értékeltünk ki. Egy sejtnek az a képessége, hogy köti az annexin V-t – a plazma membrán külső felszínén levő foszfatidil-szerinhez kapcsolódóan –, az apoptózis egy újabb specifikus jele (Bacsó és mtsa, 2001). Ráadásul a DNS degradációs teszttel ellentétben, amennyiben a sejteknél kettős festődést alkalmazunk – fluoroforral kapcsolt annexin V-t és

egy plazma membrán integritást vizsgáló markert (azaz propidium-jodidot) használva –, akkor nemcsak az apoptotikus sejteket tudjuk láthatóvá tenni, hanem ezen módszer alkalmazásával a nekrotikus és az élő sejteket is el lehet egymástól különíteni.

Meg kell jegyezni, hogy az apoptotikus sejtek abszolút száma az előbb említett két assay esetében nem szükségszerűen volt azonos.

Ez az eltérés adódhatott abból, hogy a két eltérő módszer alkalmazásakor különböző celluláris válaszokat kaptunk, de származhatott abból is, hogy különböző módon történt a minták előkészítése, mérése és elemzése.

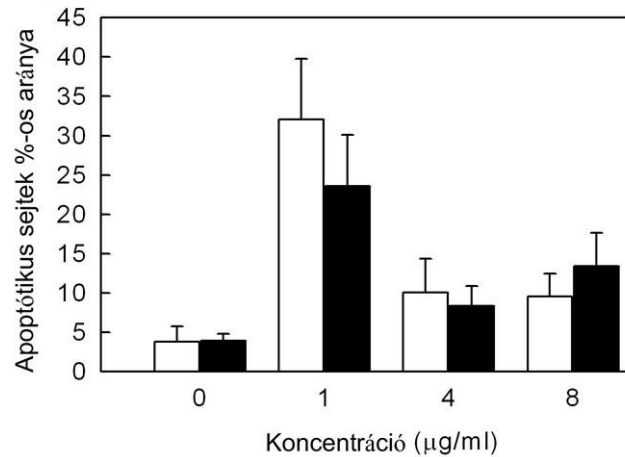
A 24., 25., 26. ábrák mutatják az apoptotikus sejtek arányát 4 és 24 órás benzofenantridin alkaloidokkal való inkubálás után.



**24. ábra.**

**Chelidonin okozta apoptózis indukció PI kirekesztés/annexin V-FITC kötéssel vizsgálva.**

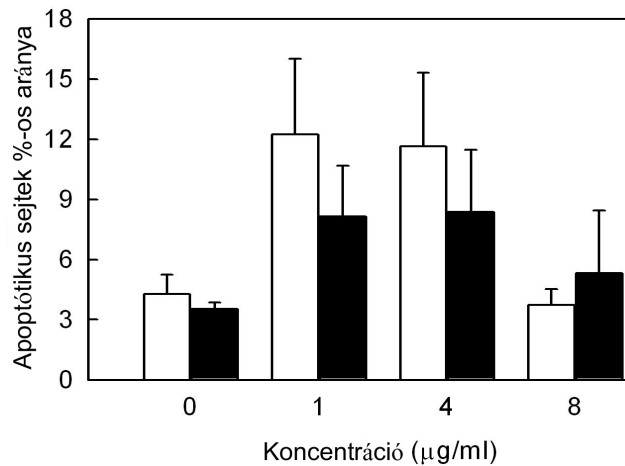
A sejteket 4 és 24 óráig inkubáltuk (fehér és fekete oszlopok) a jelzett koncentrációkkal. Az ábra legalább három egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát tünteti fel (S.D.).



**25. ábra.**

**Sanguinarin okozta apoptózis indukció PI kirekesztés/annexin V-FITC kötő assay-jel vizsgálva.**

A sejteket 4 és 24 óráig inkubáltuk (fehér és fekete oszlopok) a jelzett koncentrációkkal. Az ábra legalább három egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát tünteti fel (S.D.).



**26. ábra.**

**Chelerytrin okozta apoptózis indukció PI kirekesztés/annexin V-FITC kötő assay-jel vizsgálva.**

A sejteket 4 és 24 óráig inkubáltuk (fehér és fekete oszlopok) a jelzett koncentrációkkal. Az ábra legalább három egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát tünteti fel (S.D.).

A DNS degradáció eredményeihez hasonlóan chelidonin esetében az annexin V-FITC/PI festéssel sem találtunk szignifikáns apoptózis indukáló hatást (24. ábra). Ha megnöveltük az inkubációs időt, akkor az apoptotikus sejtek száma jelentősen megnőtt, ami szintén a dóziszfüggőségre utal. Ezt a dóziszfüggőséget azonban a DNS fragmentációs assay-jel kimutatni nem lehetett.

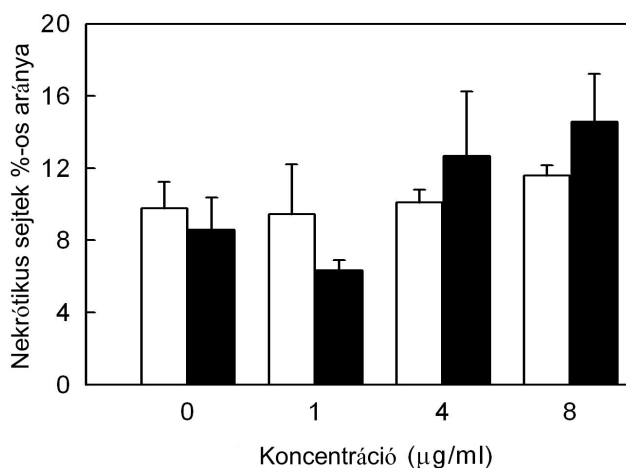
Míg az előbb említett másik módszerrel alig lehetett igazolni (21. ábra), addig az OCM-1 sejtek annexin V-FITC/PI festése jól látható bizonyítékát adta annak, hogy a vizsgált koncentrációtartományban a sanguinarin értékelhető apoptózist okozott már 4 órás kezelés után is (24. ábra). Ez az eredmény megegyezik azzal a jelenleg ismert ténnyel, hogy a sanguinarin gyors, már órákon belül jelentkező apoptotikus választ indukál a sejtek korai és nagymértékű glutation depléciója miatt, majd a későbbi fázisokban az apoptózis jellegű változások kevésbé dominálnak (Debiton és mtsai, 2003; Nicoletti és mtsai, 1991).

Kísérleteinkben mi is a sanguinarin indukálta apoptotikus válasz bifázisos mintázatát tapasztaltuk (25. ábra). Míg sanguinarin esetében az apoptotikus sejtek száma a két kvantitatív módszerrel vizsgálva időben fordított arányt mutatott, chelerytrin vonatkozásában a két különböző kísérlet hasonló eredményt produkált (23., 26. ábra).

A vizsgált különbségek ellenére a két assay egyértelműen demonstrálta a benzofenantridin alkaloidok OCM-1 uveális melanoma sejtekre gyakorolt apoptózis indukáló hatását.

#### 4.1.4. Nekrotikus sejthalál indukció OCM-1 sejtekben benzofenantridin alkaloidok hatására

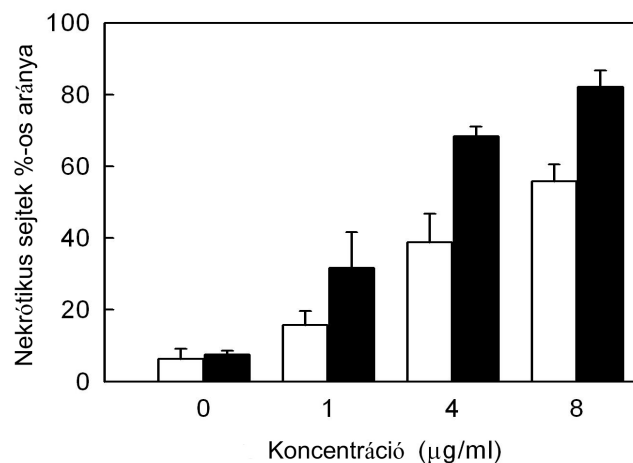
Az annexin V-FITC/PI festés bebizonyította, hogy a benzofenantridin alkaloidok nemcsak apoptózist, hanem alkalmazott dózisuktól függően nekrozist is okoztak az OCM-1 sejtekben (27., 28. 29. ábra). Ez a hatás legkevésbé kifejezett mértékben a chelidoninra volt jellemző (27. ábra), míg a sanguinarin és a chelerytrin eseteiben a hatás kifejezettebb volt (28., 29. ábra). Sanguinarint és chelerytrint alkalmazva már a 4 órás kezelés is számottevő nekrozist okozott, míg a chelidonin a nekrotikus sejtek arányát alig fokozta.



**27. ábra.**

**Chelidonin okozta nekrozis indukció PI kirekesztés/annexin V-FITC kötő assay-jel vizsgálva.**

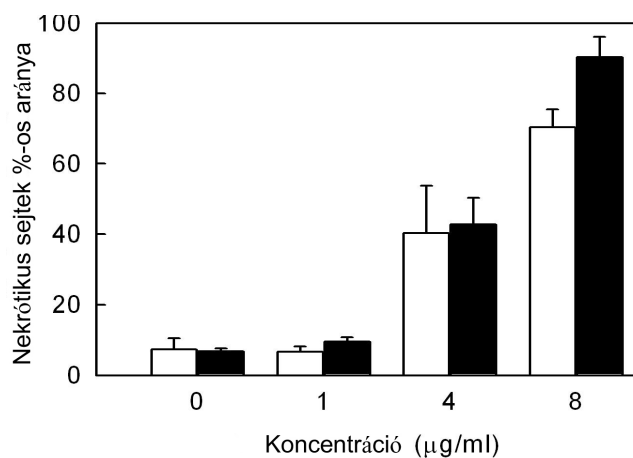
A sejteket 4 és 24 óráig inkubáltuk (fehér és fekete oszlopok) a jelzett koncentrációkkal. Az ábra legalább három egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát tünteti fel (S.D.).



**28. ábra.**

**Sanguinarin okozta nekrozis indukció PI kirekesztés/annexin V-FITC kötő assay-jel vizsgálva.**

A sejteket 4 és 24 óráig inkubáltuk (fehér és fekete oszlopok) a jelzett koncentrációkkal. Az ábra legalább három egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát tünteti fel (S.D.).



**29. ábra.**

**Chelerytrin okozta nekrozis indukció PI kirekesztés/annexin V-FITC kötő assay-jel vizsgálva.**

A sejteket 4 és 24 óráig inkubáltuk (fehér és fekete oszlopok) a jelzett koncentrációkkal. Az ábra legalább három egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát tünteti fel (S.D.).

Mintegy 10% volt már kiinduláskor is a nekrotikus sejtek aránya, a chelidonin hatására ez az arány még 48 óra alatt is csak 20-25%-kal emelkedett meg.

Úgy tűnik, hogy a chelidonin hatására valamint a sanguinarin és a chelerytrin jelenlétében a nekrozis indukálásában kialakuló jelentős különbségek a különböző alkaloidok eltérő antiproliferatív hatásával magyarázhatók (19. ábra). Érdekes konklúziót lehet levonni abból, ha összehasonlítjuk a nekrotikus és az apoptotikus sejtek arányát egy-egy alkaloidnál (24., 25., 26., valamint 27., 28., 29. ábrák).

A chelidonin esetében az apoptotikus sejtek száma szignifikánsan fölülmúlja a nekrotikus sejteket utalva arra, hogy az alkalmazott kísérletes körülmények között a chelidonin predominánsan apoptotikus típusú sejthalált okozott. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a sanguinarin és a chelerytrin esetében a két sejthalál típus versenyez egymással és az eredő hatás (az apoptotikus és nekrotikus sejtek aktuális aránya) a koncentrációtól, az inkubálási időtől és az egyéb körülményektől (pl. a sejtek összecsapódásától) függ.

Általános szabályként megállapítható, hogy nagyobb koncentrációnál a nekrozis a domináns sejthalálforma, míg kisebb dózis esetén az apoptózis hatékonysága fölülmúlhatja a nekrozisét. Ezek az eredmények jó összhangban állnak a fénymikroszkópos morfológiai eltérésekkel (20. ábra) és magyarázzák a sanguinarin és a chelerytrin bifázisos mintáját (25., 26., valamint 28., 29. ábrák). Ezeket az eredményeket újra csak megerősítik a sejtek áramlási citometriás fényszóródásos tulajdonságai (azaz a méret és a morfológia).

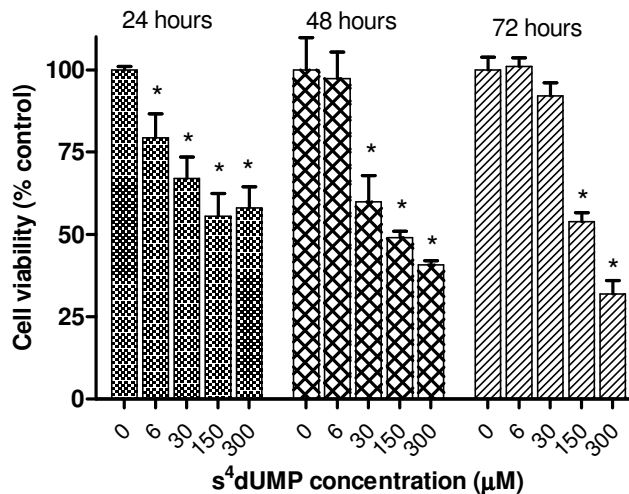
Az időben előrehaladó változások és a sejtek fényszóródásos tulajdonságai alátámasztják azt a nézetet, hogy azok a sejtek, amelyeket chelidoninnal kezeltünk főleg apoptózist mutattak, míg a sanguinarin és a chelerytrin bimodális sejthalált okoztak. A sanguinarin által okozott bimodális sejthalált korábban már számos sejttypusnál leírták (Ding és mtsai, 2002; Weerasinghe és mtsai, 2001) azt sugallva, hogy ez egy általános jelenség. A sanguinarin és a chelerytrin által okozott sejtszintű válasz közötti

hasonlóságok feltételezhetően a két alkaloid közötti szerkezeti hasonlóságokból adódnak (Chaturvedi és mtsai, 1997).

## 4.2. Az s<sup>4</sup>UMP hatása OCM-1 sejtekre

### 4.2.1. MTT-assay

Először az MTT-assay-t végeztük el azért, hogy vizsgáljuk a különböző dózisokat és a különböző időtartamú kezeléseket a sejtproliferációra (30. ábra).



30. ábra.

### Különböző koncentrációjú s<sup>4</sup>UMP hatása az OCM-1 sejtek életképességére MTT-assay-jel vizsgálva.

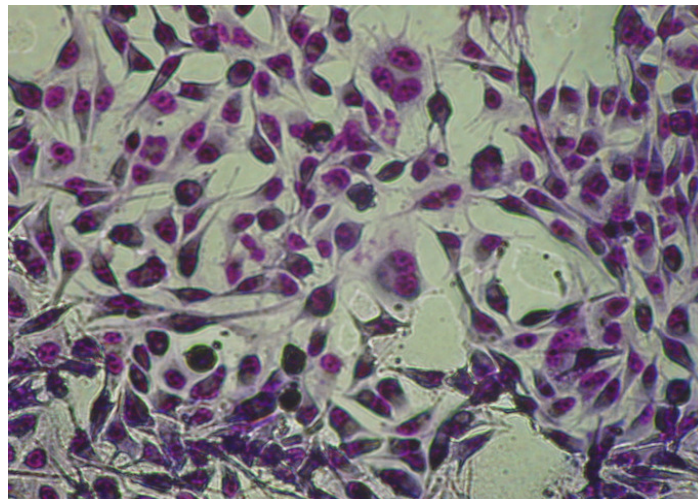
Az ábra legalább három egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát tünteti fel (SEM). A \* a kontrollhoz viszonyított szignifikáns eltéréseket jelöli.

Ezekben a kísérletekben az anyagokat csak egyszer adtuk az OCM-1 sejtekhez T=0 időpontban. 24 órás kezelés után a sejtek életképessége mind a négy vizsgált koncentrációban (6, 30, 150 és 300 µM, amelyek 1, 10, 50 és 100 µg/ml-rel ekvivalensek) csökkent. Számos lehetséges magyarázat van a

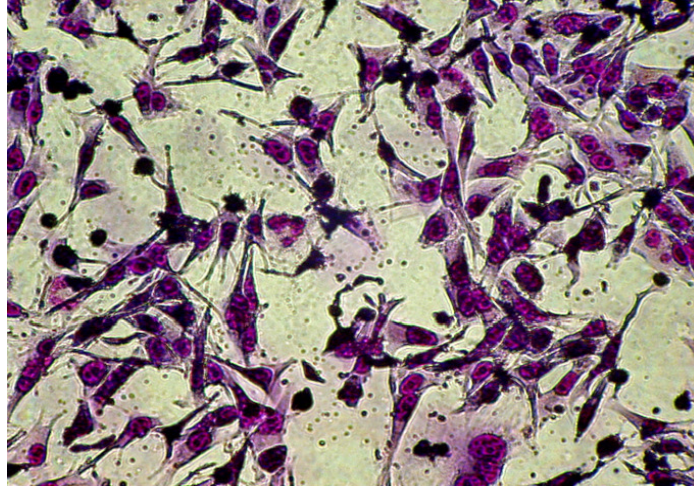
sejtek életképességének csökkenésére, köztük az apoptózis is. Azért, hogy információt nyerjünk az  $s^4$ UMP hatásmechanizmusáról először a nukleotid OCM-1 sejt morfológiára gyakorolt hatását vizsgáltuk. Számos kísérletet végeztünk – ugyanazon protokollokat használva a kezelésre –, amelyeket a 30. ábra mutat.

#### 4.2.2. Morfológiai elváltozások

Itt a morfológiában bekövetkező változásokat mutatjuk be  $150 \mu\text{M}$   $s^4$ UMP hatására 48 és 72 órás kezelések után. A módosított nukleotid hatására a morfológiában karakterisztikus apoptotikus változásokat és csökkent sejtszámot láthatunk a kontroll OCM-1 sejtekhez képest az  $s^4$ UMP kezelés után (31., 32., 33. ábrák).

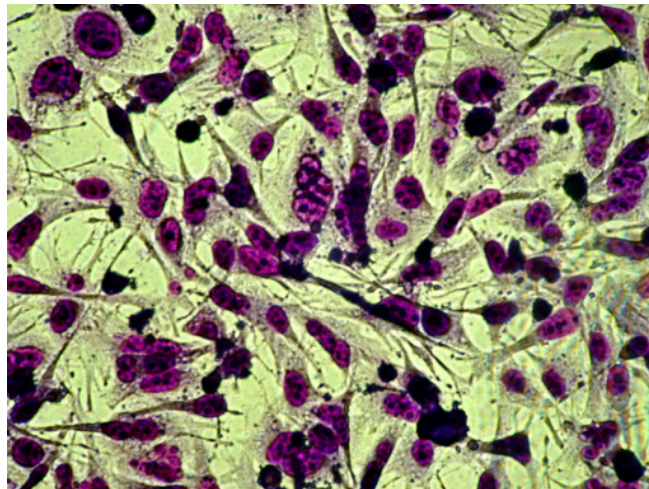


**31. ábra.**  
**Kontroll OCM-1 sejtek morfológiája 48 órás szaporítás után.**  
A sejteket May-Grünwald-Giemsa festékekkel festettük és Zeiss Axivert 135 mikroszkóppal fényképeztük (N: 200X).



**32. ábra.**

**Az  $s^4$ UMP hatása az OCM-1 sejtek morfológiájára  
150  $\mu$ M (50  $\mu$ g/ml)  $s^4$ UMP 48 órás kezelése után.  
A sejteket May-Grünwald-Giemsa festéssel festettük és  
Zeiss Axivert 135 mikroszkóppal fényképeztük (N: 200X).**



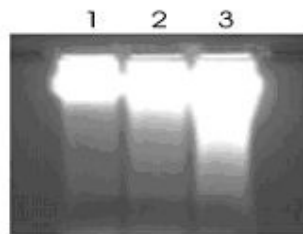
**33. ábra.**

**Az  $s^4$ UMP hatása az OCM-1 sejtek morfológiájára  
150  $\mu$ M (50  $\mu$ g/ml)  $s^4$ UMP 72 órás kezelése után.  
A sejteket May-Grünwald-Giemsa festéssel festettük és  
Zeiss Axivert 135 mikroszkóppal fényképeztük (N: 200X).**

### 4.2.3. A DNS fragmentáció értékelése

Az apoptózis egyik markáns jele a DNS degradáció megjelenése és a karakterisztikus DNS-létra jelenléte mintegy 180 nukleotidnyi fragmentekkel. Az OCM-1 sejteket  $30\ \mu\text{M}$  ( $10\ \mu\text{g/ml}$ )  $s^4\text{UMP}$ -vel kezeltük 24 és 48 órán át, aztán a DNS-t izoláltuk és elemeztük agaróz gél elektroforézissel.

A DNS-degradáció időfüggő volt, bizonyítva ezzel az apoptotikus degradáció karakterisztikus jeleit (34. ábra).

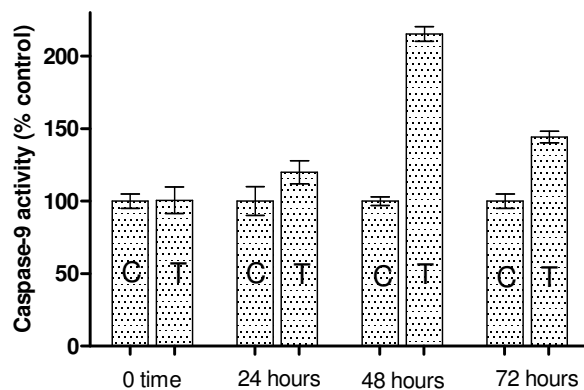


**34. ábra**  
**OCM-1 sejtek DNS fragmentációja  $30\ \mu\text{M}$  ( $10\ \mu\text{g/ml}$ )  $s^4\text{UMP}$  hatására.**  
1: kontroll, 2: 24 órás kezelés után, 3: 48 órás kezelés után

### 4.2.4. A kaszpáz-9 aktivitás mérése

Az  $s^4\text{UMP}$  további hatásmechanizmusának vizsgálatára meghatároztuk a kaszpáz-9 aktivitást a kezelés előtt és után (35. ábra).

A kaszpáz-9 aktivitás  $90\ \mu\text{M}$  ( $30\ \mu\text{g/ml}$ )  $s^4\text{UMP}$ -vel való kezelés hatására 48 óra múlva volt a legmagasabb.



**35. ábra**

**Kaspáz-9 aktiválódás 90  $\mu\text{M}$  (30  $\mu\text{g/ml}$ )  $\text{s}^4\text{UMP}$  kezelés hatására.**

C: kontroll, T: kezelt sejtek.

Az ábra legalább három egymástól független kísérlet eredményeinek átlagát és szórását tünteti fel.

A DNS-degradáció mintázata és a megemelkedett kaspáz-9 aktivitás nyomatékosan azt sugallta, hogy az  $\text{s}^4\text{UMP}$  apoptózist okozott.

#### 4.2.5. Áramlási citometria $\text{s}^4\text{UMP}$ -vel való kezelés után

Ezt követően meghatároztuk az annexin-pozitív és annexin és propidium-jodid-pozitív sejtek arányát FACS analízissel úgyszintén a kezelés előtt és után. Az eredmény (I. Táblázat) azt jelezte, hogy az  $\text{s}^4\text{UMP}$  hatásának fő módja apoptózis indukció és csak másodlagosan jelentkezhet nekrozis.

Kezelés időtartama	KONTROLL		KEZELT	
	Annexin pozitív	Annexin-PI*- pozitív	Annexin pozitív	Annexin-PI*- pozitív
0	33%	6%	33%	7%
24	21%	8%	41%	8%
48	15%	6%	46%	15%

\*Propidium-jodid

**I. Táblázat**  
**Annexin-pozitív és annexin-PI\*-pozitív sejtek arányának változása**  
**s<sup>4</sup>UMP kezelés hatására.**

## 5. MEGBESZÉLÉS

### 5.1. Benzofenantridin alkaloidok hatása

A benzofenantridin alkaloidokról korábban bebizonyították már, hogy különböző típusú daganatokban a tumor sejtek növekedését gátolják (Vavreckova és mtsai, 1996; Chmura és mtsai, 2000; Ahmad és mtsai, 2000; Adhami és mtsai, 2003; Adhami és mtsai, 2004; Panzer és mtsai, 2001).

Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy hasonló antiproliferatív hatást kifejtenek-e az OCM-1 uveális melanoma sejteken is.

Ha a benzofenantridin alkaloidokkal kapcsolatos eredményeket összesítjük, láthatjuk, hogy bár különböző mértékben, de a vizsgált alkaloidok az OCM-1 uveális melanoma sejtekben apoptózist is, valamint nekrozist is okoztak. Míg a chelidonin predominantán apoptózis típusú sejtpusztulást indukált, addig a chelerytrin és a kémiai szerkezetét tekintve pseudochelerytrinnek is nevezett sanguinarin inkább bimodális sejthalált okozott, vagyis egyidejűleg volt jelen apoptózis is és nekrozis is.

A vizsgálatainkban megfigyelhető eltérő antiproliferatív effektust – amely jelentősen csökkent mértékű volt a chelidonin esetében, szemben a sanguinarinnal és a chelerytrinnel – korábban is leírták már különböző sejttípusok esetében (Faddeeva és mtsai, 1997; Vavreckova és mtsai, 1996).

Ezek az eredmények arra fordították figyelmünket, hogy az ilyen típusú benzofenantridin alkaloidok valószínűleg felhasználhatók lehetnek az uveális melanoma kezelésében. Mivel közülük mindegyik rendelkezik apoptotikus potenciállal (Habermehl és mtsai, 2006), ezért vélhetőleg nemcsak jó kemoterápiás vegyületek válhatnak belőlük, hanem hozzájárulhatnak az uveális melanomák sikeres immunoterápiájának fejlesztéséhez is.

Amellett, hogy a dendrit-sejt alapú immunoterápiákban az uveális melanoma sejtek esetében biztató eredményeket lehet elérni apoptózis indukcióban (Shaif-Muthana és mtsai, 2000), kombinációban a kostimuláns

molekulák termékeivel ezen tumorok adjuváns kezelésének újszerű lehetőségei is nyílhatnak (Carling és mtsai, 2003).

Ismereteink szerint ez az első tanulmány, amely a benzofenantridin alkaloidok tumor ellenes lehetőségét vizsgálja.

Mindamellet még további vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy a pontos mechanizmust és a lehetséges szövődményeket tisztázzuk.

## 5.2. Az s<sup>4</sup>UMP kezelés hatása

Munkacsoportunk korábban már beszámolt egy kizárólag 4-tio-dezoxiuridilátból álló 35-tagú oligonukleotid molekula *in vitro* anti-HIV-vírus hatásáról. A molekula részletes hatásmechanizmusának vizsgálata vezetett arra az eredményre, hogy a 4-tio-dUMP monomer számos sejtvonal – köztük az OCM-1 uveális melanoma sejtek – életképességét csökkenti. Ez az eredmény azért volt váratlan, mert a kizárólag 4-tio-dezoxiuridilátból álló oligonukleotidok rövidebb lánchosszúságoknál elvesztették biológiai aktivitásukat.

Mivel mind a ribo-, mind a dezoxiribonukleotid (s<sup>4</sup>UMP és az s<sup>4</sup>dUMP) hatása a sejtek életképességének csökkenésére azonos volt, ezért az összes vizsgálatban a ribo-származékot használtuk.

Mivel kémiai szerkezetét tekintve az s<sup>4</sup>UMP egy nukleotid, ezért nem valószínű, hogy bejut a sejtbe, ezért az apoptózis indukáló aktivitása a módosult nukleotid és a sejt felszíni proteinek közötti interakciónak a következménye (Bretner és mtsai, 1993). Mindez kémiailag alátámasztható, mivel a 4-tiono csoport hajlamos tautomer átalakuláson átmenni és így reaktív –SH-csoportokat képezni a 4-es pozícióban (Simuth és mtsai, 1970). Ezek kölcsönhatásba kerülhetnek a sejt felszíni fehérjék –SH-csoportjaival és így diszulfid hidakat alkothatnak. A sejt felszín redukív funkciója a sejt felszíni szulfhidril-csoportok – mint például a protein diszulfid izomeráz – közvetítésével már ismert tény (Mandel és mtsai, 1993; Terada és mtsai,

1995). Elképzelhető, hogy az  $s^4$ UMP targetjei ezek az –SH-tartalmú proteinek.

A fent említett hatásmechanizmussal összhangban azt találták, hogy a 4-tiouridilát egy dezoxi oligomerje, az ( $s^4dU$ )<sub>35</sub> reakcióba léphet a sejtfelszíni tioredoxinnal (Horváth és mtsai, 2005). További vizsgálatok szükségesek, hogy meg lehessen magyarázni az  $s^4$ UMP pontos hatásmechanizmusát és hogy azonosíthassuk azokat a lehetséges proteineket, amelyek interakcióba lépnek a tiolált nukleotiddal.

Az  $s^4$ UMP effektusát MTT-assay-jel vizsgálva bebizonyosodott, hogy a hatás dóziszfüggő, de a vegyület telítettségét csak magas koncentrációnál érjük el.

Amikor az inhibitor koncentrációja 6  $\mu$ M (2  $\mu$ g/ml  $s^4$ UMP) volt, akkor a sejtek életképességének csökkenése 24 óra alatt 20%-os volt és a 300  $\mu$ M-os nukleotid koncentráció sem volt hatásosabb, mint a 150  $\mu$ M-os. Az a megfigyelés, hogy a gátló hatás telítődhet, egyezik azzal a feltételezett hatásmechanizmussal, hogy a nukleotid interakcióba lép a sejtfelszíni proteinekkel.

A 30  $\mu$ M-os (10  $\mu$ g/ml)  $s^4$ UMP hatásait vizsgálva megállapítható, hogy a sejtek életképességének csökkenése 24, 48 és 72 óra múlva 32%, 40% és 9% volt. A 72 órás inkubáció utáni mindössze 9%-os életképességcsökkenés jelzi, hogy ekkorra a sejtek kiheverték a 48 órás kezelésnél mért életképességcsökkenést (40%), valószínűleg metabolizálva a nukleotid analógot. Ez a megfigyelés magyarázatul szolgálhat a vegyület nem toxikus természetére.

Ugyanis az  $s^4$ UMP-vel kapcsolatos egy korábbi *in vivo* kísérletben bizonyítást nyert, hogy ez a vegyület egérbe 1g/tskg dózisban beadva sem toxikus. Azt a két látszólag egymásnak ellentmondó ténytet – az apoptózis indukáló hatást és a vegyület non-toxikus természetét – úgy tudjuk magyarázni, ha feltételezzük, hogy a vegyület metabolizálódhat a sejtben és a sejtek ezért heverték ki a kezelést relatíve hosszú inkubációs idő után is.

A vegyület hatásmechanizmusának tisztázásához elvégeztük a DNS degradációs tesztet és a kaszpáz-9 aktivitás mérését is. Az utóbbit azért,

mert az apoptotikus eseménysor elindításában és végrehajtásában kulcsszerep hárul a kaszpázokra.

A kaszpázok tulajdonképpen cisztein-proteázok, melyek szubsztrátjaikat az aszparaginsav után hasítják. A kaszpázoknak, mint enzimsaládnak számos tagját és szerepét azonosították mára és funkciójuk szerint több csoportba sorolták őket. Vannak közülük olyanok, amelyek az apoptotikus folyamatban először aktiválódnak: ezek az iniciátorkaspázok. Ezek a kaszpáz-2, -8, -9, -10.

A citokróm-c a citoplazmában egy másik kulcsfaktorral, az APAF-1-gyel (apoptosis activating factor), valamint a dATP-vel vagy ATP-vel együtt alkotja az apoptozómát (Kroemer és mtsai, 2000). Ennek a nagy, többtagú komplexnek a tagja a kaszpáz-9 is. A komplex feladata a kaszpáz-9 aktiválása és ezzel a kaszpázkaskád elindítása (Bernardi és mtsai, 1999; Budihardjo és mtsai, 1999; Chao és mtsai, 1998; Crompton, 1999).

A citokróm-c-kibocsátás és a kibocsátás módjától függő mitokondriummembrán-depolarizáció előbb következik be, mint a kaszpázok – főként pedig az effektorkaspázok – aktivációja (Daugas és mtsai, 2000).

A FACS analízis és az előbbi vizsgálatok eredményei is megegyeznek az apoptotikus folyamat eredményeivel, de a pontos mechanizmus még nem ismert.

Kísérleteinkben először tanulmányoztuk az  $s^4$ UMP apoptózis indukáló hatását. Vizsgálatainkhoz egy különösen agresszív és rezisztens sejtvonalat, az OCM-1 uveális melanoma sejtvonalat használtunk.

Az uveális melanomák proliferációjának gátlására alkalmazott benzofenantridin alkaloidokat és az  $s^4$ UMP-t összehasonlítva megállapítható, hogy mindkét vegyületnek van előnyös és kevésbé előnyös tulajdonsága. Az alkaloidok lényegesen agresszívebb antitumor ágensek, de sokkal toxikusabbak is. Az  $s^4$ UMP nem annyira toxikus, viszont kevésbé erős antiproliferatív hatással rendelkezik.

### 5.3. Szabadalom

A kísérleteinkben használt  $s^4$ UMP-vel kapcsolatban a Debreceni Egyetem, illetve a DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., mint meghatalmazott szabadalmat nyújtott be a Magyar Szabadalmi Hivatalba 2006. januárban.

A szabadalmat „Mononukleotidok és nukleozidok új gyógyászati alkalmazása” címmel P 0600042 számmal jegyezték be.

A szabadalom feltalálói: Dr. Aradi János, Dr. Fésüs László és Dr. Beck Zoltán.

## 6. ÚJ EREDMÉNYEK

Az utóbbi évtizedekben sokat fejlődött a tumorkutatás, sokat sikerült előrelépni a szemészeti tumorok diagnosztizálásában és terápiájában is. Azonban a kezelésben továbbra sincs még a lehetőségeink között az antiproliferatív terápia. Munkánk során az uveális melanoma antiproliferatív kezelésének lehetőségeit vizsgáltuk kísérletes körülmények között.

1. Sikerült vizsgálatainkhoz olyan agresszív tumorfajtát szerezni, amely a többi uveális melanomához képest is kitűnik nagy proliferációs képességével. Az OCM-1 sejtvonal ilyennek bizonyult. Elsőként próbáltuk ki és bizonyítottuk laboratóriumi körülmények között a benzofenantridin alkaloidok humán uveális melanoma sejtekre gyakorolt antiproliferatív hatását.

2. A proliferáció gátlásában elsőként választott benzofenantridin alkaloidok alkalmazásával sikerült szignifikáns sejtpusztulást elérni. Ez fénymikroszkóposan is jól detektálható volt és biokémiai módszerekkel is lehetett a sejtek életképességének csökkenését igazolni. Mindhárom általunk kipróbált benzofenantridin alkaloid okozott apoptózist és nekrozist is, de eltérő mértékben. A kontrollhoz viszonyítva a változás mindig szignifikáns eltérést igazolt. A chelidonin elsősorban apoptózist, míg a sanguinarin és a chelerythrin az apoptózis mellett jelentősebb mértékű nekrozist is okozott, így az utóbbi két vegyület által okozott hatást elsősorban bifázisos eltérésként jellemezhetjük. A kiváltott hatások dózisfüggőek voltak.

3. Az OCM-1 humán uveális sejtek gátlásában további biztató eredményt értünk el egy nukleotid, az  $s^4$ UMP alkalmazásával. Kísérleteinkben először tanulmányoztuk az  $s^4$ UMP apoptózis indukáló hatását és először vizsgáltuk OCM-1 uveális sejtekre kifejtett hatását. Vizsgálatainkban igazolni tudtuk, hogy ez a természetben is előforduló nukleotid az OCM-1 sejtekben apoptózist indukált.

További kísérletekre van szükség a pontos és részletes hatásmechanizmus tisztázására, de a későbbiekben a fent említett vegyületekkel vagy módosított változataikkal sikerülhet az uveális melanoma kezelésében megteremteni az antiproliferatív lehetőséget.

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

### 7.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

1. Adhami V.M., Aziz M.H., Mukhtar H., Ahmad N.: Activation of prodeath Bcl-2 family proteins and mitochondrial apoptosis pathway by sanguinarine in immortalized human HaCaT keratinocytes. *Clin. Cancer Res.* 9, 3176-3182 (2003).
2. Adhami V.M., Aziz M.H., Reagan-Shaw S.R., Nihal M., Mukhtar H., Ahmad N.: Sanguinarine causes cell cycle blockade and apoptosis of human prostate carcinoma cells via modulation of cyclin kinase inhibitor-cyclin-cyclin-dependent kinase machinery. *Mol. Cancer Ther.* 3, 933-940 (2004).
3. Ahmad N., Gupta S., Husain M.M., Heiskanen K.M., Mukhtar H.: Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clin. Cancer Res.* 6, 1524-1528 (2000).
4. Albert D.M., Niffenegger A.S., Willson J.K.: Treatment of metastatic uveal melanoma: review and recommendations. *Surv. Ophthalmol.* 36, 429-438 (1992).
5. Alberth B., Berta A.: Szemléletváltások az intraocularis melanomák kezelésében. *Szemészet* 126, 67-70 (1989).
6. Alberth B., Berta A., Marek P.: Chorioidea melanomák contact béta-sugárkezelése Ruthenium applicatorokkal. *Szemészet* 129, 56-57 (1992).
7. Andrawiss M., Maron A., Beltran W., Opolon P., Connault E., Griscelli F., Yeh P., Perricaudet M., Devauchelle P.: Adenovirus-mediated gene transfer in canine eyes: a preclinical study for gene therapy of human uveal melanoma. *J. Gene Med.* 3, 228-239 (2001).

8. Aradi J., Ho Y.K.: Antitemplate effect of polynucleotides and their hybrid complexes. *Cancer Biochem. Biophys.* 7, 349-359. (1985)
9. Ardjomand N., Schaffer G., Radner H., El-Shabrawi Y.: Expression of somatostatin receptor in uveal melanomas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 980-987 (2003).
10. Augsburger J.J., Schneider S., Freire J., Brady L.W.: Survival following enucleation versus plaque radiotherapy in statistically matched subgroups of patients with choroidal melanomas: results in patients treated between 1980 and 1987. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 7, 558-567 (1999).
11. Bacsó Z., Eliason J.F.: Measurement of DNA damage associated with apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 45, 180-186 (2001).
12. Bacsó Z., Everson R.B., Eliason J.F.: The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res.* 60, 4623-4628 (2000).
13. Baggetto L.G., Gambrelle J., Dayan G., Labialle S., Barakat S., Michaud M., Grange J.D., Gayet L.: Major cytogenetic aberrations and typical multidrug resistance phenotype of uveal melanoma: current views and new therapeutic prospects. *Cancer Treat. Rev.* 31, 361-379 (2005).
14. Bajcsay A., Bánfalvi T., Berta A., Hajda M., Németh Gy., Récsán Zs., Salacz Gy., Süveges I., Tóth J.: A szem és adnexumainak rosszindulatú daganatai. in: Kásler Miklós /Szerk./: *Az onkoterápia irányelvei.* 661-702 B + V Lap- és Könyvkiadó Kft, Budapest, 2001.
15. Bene L., Bodnár A., Damjanovich S., Vámosi G., Bacsó Z., Aradi J., Berta A., Damjanovich J.: Membrane topography of HLA I, HLA II, and ICAM-1 is affected by IFN-gamma in lipid rafts of uveal melanomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 678-683 (2004).
16. Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V., Di Lisa F.: Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.* 264, 687-701 (1999).

17. Berta A: Szemfenéki daganatok laser-therapiája. Újabb Eredmények a Szemészetben. Az Országos Szemészeti Intézet kiadványai. 1989/1: 55-82 (1989).
18. Berta A., Kolozsvári L., Rigó Gy., Damjanovich J., Alberth B.: Intraocularis tumorok Ruthenium irradiációjával szerzett tapasztalataink. Az első négy év eredményei. Szemészet 128, 16-17 (1991).
19. Berta A., Damjanovich J., Vezendi L.: Az intraocularis daganatok diagnosztikája és terápiája I. Chorioidea melanoma. Újabb eredmények a szemészetben. Az Országos Szemészeti Intézet Kiadványai. Budapest, 1997/1, 5-16 (1997).
20. Berta A., Damjanovich J.: Az intraocularis daganatok korai felismerésének és eredményes kezelésének lehetőségei. Házi orvos Továbbképző Szemle 3, 28-30 (1998).
21. Berta A., Damjanovich J., Vezendi L.: Az intraocularis daganatok korszerű ellátása. Kórház 5, 19-21 (1998).
22. Berta A.: A szemben lévő festékes daganatok sugárkezelése ruténium applikátorokkal. Szemsugár 6, 4-5 (1999).
23. Berta A., Damjanovich J.: Kontakt-Strahlenbehandlung von Chorioidea-Melanomen und Retinoblastomen mit Ruthenium-106-Augenapplikator an der Universitäts-Augenklinik von Debrecen (abstract). Ophthalmologie 97, S152 (P 688) (2000).
24. Berta A.: Radiotherapy of intraocular tumors with Ruthenium-106-containing, beta-emitting ophthalmic applicators. Experiences with treatments performed between 1986 and 1999 in Hungary. Magy. Onkol. 49, 53-57 (2005).
25. Bhourri L., Lumbroso L., Levy C., Dendale R., Asselain B., Plancher C., Sastre X., Desjardins L.: Bilateral uveal melanomas. Five case reports. J. Fr. Ophtalmol. 26, 149-153 (2003).

26. Bretner M., Kulikowski T., Dzik J.M., Balinska., Rode W., Shugar D.: 2-Thio derivatives of dUrd and 5-fluoro-dUrd and their 5'-monophosphates: synthesis, interaction with tumor thymidylate synthase, and in vitro antitumor activity. *J. Med. Chem.* **36**, 3611-3617 (1993).
27. Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X., Wang X.: Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 269-290 (1999).
28. Carling J., Shaif-Muthana M., Sisley K., Rennie G., Murray A.K.: Apoptotic cell death in conjunction with CD80 costimulation confers uveal melanoma cells with the ability to induce immune responses. *Immunology* **109**, 41-48 (2003).
29. Chao D.T., Korsmeyer S.J.: BCL-2 family: regulators of cell death. *Ann. Rev. Immunol.* **16**, 395-419 (1998).
30. Chaturvedi M.M., Kumar A., Darnay B.G., Chainy G.B., Agarwal S., Aggarwal B.B.: Sanguinarine (pseudochelerythrine) is a potent inhibitor of NF-kappaB activation, IkappaBalpha phosphorylation, and degradation. *J. Biol. Chem.* **272**, 30129-30134 (1997).
31. Chmura S.J., Nodzenski E., Weichselbaum R.R., Quintans J.: Protein kinase C inhibition induces apoptosis and ceramide production through activation of a neutral sphingomyelinase. *Cancer Res.* **56**, 2711-2714 (1996).
32. Chmura S.J., Dolan M.E., Cha A., Mauceri H.J., Kufe D.W., Weichselbaum R.R.: In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay in vivo. *Clin. Cancer Res.* **6**, 737-742 (2000).
33. Coleman K., Baak J.P.A., Diest P.V., Mullaney J., Farrel M., Fentom M.: Prognostic factors following enucleation of 111 uveal melanomas. *Br. J. Ophthalmol.* **77**, 688-692 (1993).
34. Colombo M.L., Bosisio E.: Pharmacological activities of *Chelidonium majus* L. (Papaveraceae). *Pharmacol. Res.* **33**, 127-134 (1996).

35. Cree I.A.: Chemosensitivity testing as an aid to anti-cancer drug and regimen development. *Recent Results Cancer Res.* 161, 119-125 (2003).
36. Crompton M.: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341, 233-249 (1999).
37. Damjanovich J., Berta A.: Ruthenium 106 izotóppal irradiált intraocularis daganatok kiegészítő lézerkezelésével nyert tapasztalataink. *Szemészet* 132, 7-10 (1995).
38. Damjanovich J., Berta A., Vezendi L.: Results of contact beta-irradiation of choroidal melanomas. *Acta Chir. Hung.* 36, 67-68 (1997).
39. Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N., Kroemer G.: Apoptosis-inducing factor (AIF): an ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett.* 476, 118-123 (2000).
40. de Lange T.: Telomeres and senescence: ending the Debate. *Science* 279, 334-335 (1998).
41. de Vries T.J., Trancikova D., Ruiter D.J., van Muijen G.N.: High expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, tyrosinase and TRP-1 in uveal melanoma. *Br. J. Cancer* 78, 1156-1161 (1998).
42. Debiton E., Madelmont J.C., Legault J., Barthomeuf C.: Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 51, 474-482 (2003).
43. Ding Z., Tang S.C., Weerasinghe P., Yang X., Pater A., Liepins A.: The alkaloid sanguinarine is effective against multidrug resistance in human cervical cells via bimodal cell death. *Biochem. Pharmacol.* 63, 1415-1421 (2002).
44. Djukanovic D., Hofman U., Sucker A., Rittgen W., Schadendorf D.: Comparison of S100 protein and MIA protein as serum marker for malignant melanoma. *Anticancer Research* 20, 2203-2208 (2000).

45. Egan C.A., Savre-Train I., Shay J.W., Wilson S.E., Bourne W.M.: Analysis of telomere lengths in human corneal endothelial cells from donors of different ages. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 648-653 (1998).
46. Faddeeva M.D., Beliaeva T.N.: Sanguinarine and ellipticine cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants. Intracellular targets of their action. *Tsitologiya.* 39, 181-208 (1997). (in russian)
47. Gerlier D., Thomasset N.: Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods* 94, 57-63 (1986).
48. Habermehl D., Kammerer B., Handrick R., Eldh T., Gruber C., Cordes N., Daniel P.T., Plasswilm L., Bamberg M., Belka C., Jendrossek V.: Proapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway. *BMC. Cancer.* 17, 6-14 (2006).
49. Hadden P.W., Damato B.E., McKay I.C.: Bilateral uveal melanoma: a series of four cases. *Eye* 17, 613-616 (2003).
50. Hanauske A.R.: The development of new chemotherapeutic agents. *Anticancer Drugs* 7 Suppl 2, 29-32 (1996).
51. Harbour J.W., Char D.H., Kroll S., Quivey J.M., Castro J.: Metastatic risk for distinct patterns of postirradiation local recurrence of posterior uveal melanoma. *Ophthalmology* 104, 1785-792 (1997).
52. Heine B., Coupland S.E., Kneiff S., Demel G, Bornfeld N, Hummel M, Stein H.: Telomerase expression in uveal melanoma. *Br. J. Ophthalmol.* 84, 217-223 (2000).
53. Horváth A., Aradi J.: Advantages of sodium perchlorate solution as mobile phase for purification of synthetic oligonucleotides by anion exchange chromatography. *Anal. Biochem.* 338, 341-343 (2005).
54. Horváth A., Tőkés S., Hartman T., Watson K., Turpin J.A., Buckheit R.W. Jr, Sebestyén Z., Szöllösi J., Benkő I., Bárdos T.J., Dunn J.A., Fésüs L., Tóth F.D., Aradi J.: Potent inhibition of HIV-1 entry by (s4dU)<sub>35</sub>. *Virology* 334, 214-223 (2005).

55. Hu D.N., Yu G.P., McCormick S.A., Schneider S., Finger P.T.: Population-based incidence of uveal melanoma in various races and ethnic groups. *Am. J. Ophthalmol.* *140*, 612-617 (2005).
56. Hurks H.M., Metzelaar-Block J.A., Mulder A., Claas F.H., Jager M.J.: High frequency of allele-specific down-regulation of HLA class I expression in uveal melanoma cell lines. *Int. J. Cancer* *85*, 697-702 (2000).
57. Hurks H.M., Metzelaar-Blok J.A., Barthen E.R., Zwindermann A.H., De Wolf-Rouendaal D., Keunen J.E., Jager M.J.: Expression of epidermal growth factor receptor: Risk factor in uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 2023-2027 (2000).
58. Ijland S.A., Jager M.J., Heijdra B.M., Westphal J.R., Peek R.: Expression of angiogenic and immunosuppressive factors by uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res.* *9*, 445-450 (1999).
59. Jagiello-Wojtowicz E., Jusiak L., Szponar J., Kleinrok Z.: Preliminary pharmacological evaluation of chelidonine in rodents. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* *41*, 125-131 (1989).
60. Kan-Mitchell J., Mitchell M.S., Rao N., Liggett P.E.: Characterization of uveal melanoma cell lines that grow as xenografts in rabbit eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *30*, 829-834 (1989).
61. Klisovic D.D., Klisovic M.I., Efron D., Liu S., Marcucci G., Katz S.E.: Depsipeptide inhibits migration of primary and metastatic uveal melanoma cell lines *in vitro*: a potential strategy for uveal melanoma. *Melanoma Res.* *15*, 147-153 (2005).
62. Kodjikian L., Grange J.D., Baldo S., Baillif S., Garweg J.G., Rivoire M.: Prognostic factors of liver metastases from uveal melanoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *243*, 985-993 (2005).
63. Kopper L., Jeney A.: *Onkológia a génektől a betegségig.* Medicina Könyvkiadó RT. Budapest, 2002.
64. Kroemer G., Reed J.C.: Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* *6*, 513-519 (2000).

65. Labialle S., Dayan G., Gambrelle J., Gayet L., Barakat S., Devouassoux-Shisheboran M., Bernaud J., Rigal D., Grange J.D., Baggetto L.G.: Characterization of the typical multidrug resistance profile in human uveal melanoma cell lines and in mouse liver metastasis derivatives. *Melanoma Res.* 15, 257-266 (2005).
66. Lenfeld J., Kroutil M., Marsalek E., Slavik J., Preininger V., Simanek V.: Antiinflammatory activity of quaternary benzophenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus*. *Planta Med.* 43, 161-165 (1981).
67. Lipsett M.N.: The isolation of 4-thiouridylic acid from the soluble ribonucleic acid of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 10, 3975-3978 (1965).
68. Lutz J.M., Cree I., Sabroe S., Kvist T.K., Clausen L.B., Afonso N., Ahrens W., Ballard T.J., Bell J., Cyr D., Eriksson M., Fevotte J., Guenel P., Hardell L., Jockel K.H., Miranda A., Merletti F., Morales-Suarez-Varela M.M., Stengrevics A., Lynge E.: Occupational risks for uveal melanoma results from a case-control study in nine European countries. *Cancer Causes Control* 16, 437-447 (2005).
69. Luyten G.P., van der Spek C.W., Brand I., Sintnicolaas K., Waard-Siebinga I., Jager M.J., de Jong P.T., Schrier P.I., Luider T.M.: Expression of MAGE, gp100 and tyrosinase genes in uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 8, 11-16 (1998).
70. Ma L., Krishnamachary N., Center M.S.: Phosphorylation of the multidrug resistance associated protein gene encoded protein P190. *Biochemistry* 34, 3338-3343 (1995).
71. Mandel R., Ryser H.J., Ghani F., Wu M., Peak D.: Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 4112-4116 (1993).

72. Mejia-Novelo A., Alvarado-Miranda A., Morales-Vazquez F., Gamboa-Vignole C., Nunez-Gomez R., Castaneda-Soto N., Duenas-Gonzalez A., Candelaria-Hernandez M., Lara-Medina F.: Ocular metastases from breast carcinoma. *Med. Oncol.* *21*, 217-221 (2004).
73. Metzelaar-Blok J.A., ter Huurne J.A., Hurks H.M., Keunen J.E., Jager M.J., Gruis N.A.: Characterization of melanocortin-1 receptor gene variants in uveal melanoma patients. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, *42*, 1951-1954 (2001).
74. Mukherjee A.K., Basu S., Sarkar N., Ghosh A.C.: Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr. Med. Chem.* *8*, 1467-1486 (2001).
75. Nagy P.V., Fehér T., Morga S., Matkó J.: Apoptosis of murine thymocytes induced by extracellular ATP is dose- and cytosolic pH-dependent. *Immunol. Lett.* *72*, 23-30 (2000).
76. Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., Riccardi C.: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* *139*, 271-279 (1991).
77. Nicolo M., Piccolino F.C., Ghiglione D., Nicolo G., Calabria G.: Multiple bilateral choroidal metastatic tumors from a small-cell neuroendocrine carcinoma of unknown primary site. *Eur. J. Ophthalmol.* *15*, 148-152 (2005).
78. Palazzi M.A., Ober M.D., Abreu H.F., Cardinalli I.A., Isaac C.R., Odashiro A.N., Burnier Jr M.N.: Congenital uveal malignant melanoma: a case report. *Can. J. Ophthalmol.* *40*, 611-615 (2005).
79. Panzer A., Joubert A.M., Bianchi P.C., Hamel E., Seegers J.C.: The effects of chelidonine on tubulin polymerisation, cell cycle progression and selected signal transmission pathways. *Eur. J. Cell. Biol.* *80*, 111-118 (2001).

80. Plo I., Lautier D., Levade T., Sekouri H., Jaffr  zou J.P., Laurent G., Bettaieb A.: Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and phospholipase D are respectively implicated in mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kB activation in tumour-necrosis-factor-a-treated immature acute-myeloid-leukaemia cells. *Biochem. J.* *351*, 459–467 (2000).
81. Repp A.C., Mayhew E.S., Howard K., Alizadeh K., Niederkorn J.Y.: Role of fas ligand in uveal melanoma-induced liver damage. *Graefe’s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *239*, 752-758 (2001).
82. Schaller U.C., Mueller A.J., Bosserhoff A.K., Haraida S., L  hrs U., Buettner R., Kampik A.: Melanoma inhibitory activity (MIA). *Ophthalmol.* *97*, 429-432 (2000).
83. Shaif-Muthana M., McIntyre C., Sisley K., Rennie I., Murray A.: Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res.* *60*, 6441-6447 (2000).
84. Sheidow T.G., Hooper P.L., Crukley C., Young J., Heathcote J.G.: Expression of vascular endothelial growth factor in uveal melanoma and its correlation with metastasis. *Br. J. Ophthalmol.* *84*, 750-756 (2000).
85. Simuth J., Scheit K.H., Gottschalk E.M.: The enzymatic synthesis of poly 4-thiouridylic acid by polynucleotide phosphorylase from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* *204*, 371-380 (1970).
86. Singh A.D., Shields C.L., Shields J.A.: Prognostic factors in uveal melanoma *Melanoma Research* *11*, 255-263 (2001).
87. Singh A.D., Topham A.: Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmol.* *110*, 956-961 (2003).
88. Southard G.L., Boulware R.T., Walborn D.R., Groznik W.J., Thorne E.E., Yankell SL.: Sanguinarine, a new antiplaque agent: retention and plaque specificity. *J. Am. Dent. Assoc.* *108*, 338-341 (1984).

89. Streilein J.W., Ksander B.R., Taylor A.W.: Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J. Immunol.* 158, 3557-3560 (1997).
90. Stolnicu S., Jung J., Módis L., Berta A., Fodor F.: Morphological study of cell type and tumor vascularisation in malignant melanomas (MM) of the choroid and ciliary body. *Romanian J. Path.* 3, 294-301 (1999).
91. Süveges I.: Szemészet. Medicina könyvkiadó RT. Budapest. 205-209. (1998).
92. Szántó János: Klinikai onkológia a gyakorlatban. Medicina, Budapest, 334-338 (2005).
93. Szentesi G., Horváth G., Bori I., Vámosi G., Szöllősi J., Gáspár R., Damjanovich S., Jenei A., Mátyus L.: Computer program for determining fluorescence resonance energy transfer efficiency from flow cytometric data on a cell-by-cell basis. *Comput. Methods Programs Biomed.* 75, 201-211 (2004).
94. Teikari J.M., Raivio I.: Incidence of choroidal malignant melanoma in Finland in the years 1973-1980. *Acta Ophthalmol. (Copenh).* 63, 661-665 (1985).
95. Terada K., Manchikalapudi P., Noiva R., Jauregui H.O., Stockert R.J., Schilsky M.L.: Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 20410-20416 (1995).
96. Tóth-Molnár E., Hammer H.: Második primer malignus daganat előfordulása ocularis melanomás betegek között. *Magy. Onkol.* 49, 27-30 (2005).
97. Udono T., Totsune K., Takahashi K., Abe T., Sato M., Shibahara S., Tamai M.: Increased expression of adrenomodulin mRNA in the tissues of intraocular and orbital tumors. *Am. J. Ophthalmol.* 129, 555-556 (2000).
98. Vavreckova C., Gawlik I., Muller K.: Benzophenanthridine alkaloids of *Chelidonium majus*; II. Potent inhibitory action against the growth of human keratinocytes. *Planta Med.* 62, 491-494 (1996).

99. Verbik D.J., Murray T.G., Tran J.M., Ksander B.R.: Melanomas that develop within the eye inhibit lymphocyte proliferation. *Int. J. Cancer* 73, 470-478 (1997).
100. Vogt A., Tamewitz A., Skoko J., Sikorski R.P., Giuliano K.A., Lazo J.S.: The Benzo[c]phenanthridine alkaloid, sanguinarine, is a selective, cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* 280, 19078-19086 (2005).
101. Vörösmarthy D.: Szemfenéki melanoma kiirtása solaris cauterisatióval. *Szemészet* 97, 87-89 (1960).
102. Vörösmarthy D.: Photocoagulatio. *Orvostudomány Akt. Probl.* 15, 91-115 (1973).
103. Walker T.M., Van Ginkel P.R., Gee R.L., Ahmadi H., Subramanian L., Ksander B.R., Meisner L.F., Albert D.M., Polans A.S.: Expression of angiogenic factors Cyr61 and tissue factor in uveal melanoma. *Arch. Ophthalmol.* 120, 1719-1725 (2002).
104. Weerasinghe P., Hallock S., Tang S.C., Liepins A.: Sanguinarine induces bimodal cell death in K562 but not in high Bcl-2-expressing JM1 cells. *Pathol. Res. Pract.* 197, 717-726 (2001).
105. Woll E., Bedikian A., Legha S.S.: Uveal melanoma: natural history and treatment options for metastatic disease. *Melanoma Res.* 9, 575-581 (1999).
106. Woodward J.K., Elshaw S.R., Murray A.K., Nichols C.E., Cross N., Laws D., Rennie I.G., Sisley K.: Stimulation and inhibition of uveal melanoma invasion by HGF, GRO, IL-1 $\alpha$  and TGF-beta. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3144-3152 (2002).
107. Zhu N., Wang Z.: An assay for DNA fragmentation in apoptosis without phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. *Anal. Biochem.* 246, 155-158 (1997).
108. Zierhut M., Streilein J.W., Schreiber H., Jager M.J., Ruiter D., Ksander B.R.: Immunology of ocular tumours. *Immunol. Today* 20, 482-485 (1999).

## 7.2. A disszertáció alapjául szolgáló in extenso közlemények

**Kemény-Beke Á.**, Aradi J., Damjanovich J., Beck Z., Facskó A., Berta A., Bodnár A.: Apoptotic response of uveal melanoma cells upon treatment with chelidonine, sanguinarine and chelerythrine.

Cancer Letters 237, 67-75 (2006).

**I.F.: 2.938**

**Kemény-Beke Á.**, Berényi E., Facskó A., Damjanovich J., Horváth A., Bodnár A., Berta A., Aradi J.: Antiproliferative effect of 4-thiouridylate on OCM-1 uveal melanoma cells.

European Journal of Ophthalmology (Közlésre elfogadva és nyomdába továbbítva) (2006).

**I.F.: 0.534**

## 7.3. Más témában megjelent és közlésre benyújtott közlemények

Módis L., Kettesy B., **Kemény-Beke Á.**, Berta A.: A corneális endothélium diabetes mellitusban. Szemészet 137, 157-161 (2000).

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Szatmári I., Aradi J., Berta A.: Szemészeti tumorok telomeráz aktivitása I. Szemészet 139, 55-59 (2002).

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Aradi J., Damjanovich J., Berta A.: Telomerase activity in ocular tumors. Experimental Eye Research (közlésre beküldve) (2006).

## 7.4. Idézhető absztraktok

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Szatmári I., Dósa A., Berta A., Aradi J.: Kezdeti eredmények a telomeráz enzim vizsgálatával szemészeti tumorokban.

Szemészet 137, S38 (2000).

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Szatmári I., Aradi J., Berta A.: Kezdeti eredmények telomeráz aktivitás in vitro mérésére humán uveális melanoma sejtvonalakból.

Szemészet 139, S108 (2002).

**Kemény-Beke, Á.**, Facskó A., Szatmári I., Aradi J., Berta A.: Telomerase activity by a new tp-trap assay: Detection of telomerase re-expression in intraocular tumors (abstract).

Clinical & Experimental Ophthalmology 30, P1215, A454 (2002).

**I.F.:0.709**

**Kemény-Beke Á.**, Bodnár A., Aradi J., Facskó A., Damjanovich J., Berta A.: A sanguinarin, chelerythrin és chelidonin hatására bekövetkező apoptózis OCM-1 uveális melanoma sejtekben.

Szemészet 142, S32 (2005).

## 7.5. A disszertáció témakörében elhangzott külföldi előadások és poszterek

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Szatmári I., Dósa A., Berta A., Aradi J.: Telomerase activity in ocular tumors; testing with modified telomeric repeat amplification protocol.

XIII<sup>th</sup> Congress of the European Society of Ophthalmology, 2001. június 03-07. Istanbul, Turkey

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Szatmári I., Dósa A., Berta A., Aradi J.:  
Telomerase activity in ocular tumors; testing with modified telomeric repeat  
amplification protocol. XXIX<sup>th</sup> International Congress of Ophthalmology,  
2002. április 21-25. Sydney, Australia

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Aradi J., Berta A.: Effect of inhibition of BCL-2  
expression in uveal melanoma cells.  
XIV<sup>th</sup> Congress of the European Society of Ophthalmology,  
2003. június 07-12. Madrid, Spain

**Kemény-Beke Á.**, Bodnár A., Aradi J., Facskó A., Damjanovich J., Berta A.:  
Sanguinarine, chelerythrine and chelidonine induce apoptosis and necrosis in  
OCM-1 uveal melanoma cells.  
XV<sup>th</sup> Congress of the European Society of Ophthalmology,  
2005. szeptember 24-29. Berlin, Germany

## **7.6. A disszertáció témakörében elhangzott magyar nyelvű előadások**

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Szatmári I., Dósa A., Berta A., Aradi J.:  
Kezdeti eredmények a telomeráz enzim vizsgálatával szemészeti  
tumorokban.  
Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, 2000. augusztus 28-30.  
Székesfehérvár

**Kemény-Beke Á.**: Telomeráz aktivitás mérésének jelentősége intraocularis  
tumorokból.  
Továbbképző Tanfolyam, DE OEC Szemklinika, 2001. március 18-19.  
Debrecen

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Szatmári I., Aradi J., Berta A.: Telomeráz aktivitás mérésének jelentősége intraocularis tumorokból: jelen és jövő.  
Magyar Szemorvostársaság Retina Szekció Ülése, 2001. október 25-27.  
Pécs

**Kemény-Beke Á.**, Facskó A., Szatmári I., Aradi J., Berta A.: Kezdeti eredmények telomeráz aktivitás in vitro mérésére humán uveális melanoma sejtvonalakból.  
Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, 2002. augusztus 29-31. Miskolc

**Kemény-Beke Á.:** Protonbesugárzás intraocularis daganatok esetén.  
Továbbképző Tanfolyam, DE OEC Szemklinika, 2003. március 11-12.  
Debrecen

**Kemény-Beke Á.:** Bcl-2 antiszensz oligonucleotid és benzofenantridin alkaloidok együttes hatása OCM1 uveális melanoma sejtekre.  
Magyar Szemorvostársaság Fiatal Kutatók Fóruma, 2003. november 28.  
Budapest

**Kemény-Beke Á.:** Bcl-2 antiszensz oligonucleotid és benzofenantridin alkaloidok hatása OCM1 uveális melanoma sejtekre.  
Tudományos Ülés, DE OEC Szemklinika, 2004. március 29. DAB Székház,  
Debrecen

**Kemény-Beke Á.:** Bcl-2 antiszensz oligonucleotid és benzofenantridin alkaloidok együttes hatása OCM1 uveális melanoma sejtekre.  
Ph.D. és TDK hallgatók Tudományos Diáktalálkozója, 2004. április 10-15.  
Debrecen

**Kemény-Beke Á.:** Újdonságok a humán uveális melanoma kísérletes gátlásában.

Semmelweis Egyetem I. sz. Szemészeti Klinika Továbbképzés,  
Szemhétvége, 2004. december 10-12. Tapolca

**Kemény-Beke Á.,** Bodnár A., Aradi J., Facskó A., Damjanovich J., Berta A.:  
A sanguinarin, chelerythin és chelidonin hatására bekövetkező apoptózis  
OCM-1 uveális melanoma sejtekben.

Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, 2005. június 09-11.  
Szeged

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet és nagyrabecsülésemet fejezem ki témavezetőimnek, Prof. Dr. Berta András egyetemi tanár úrnak és Dr. Aradi János egyetemi docens úrnak, akiktől a kísérletes és elméleti kutatómunka alapjait megtanultam, ami a jelen disszertáció megszületéséhez vezetett. Köszönöm, hogy felkeltették az érdeklődésemet az uveális melanómák iránt és köszönöm türelmüket és hitüket abban, hogy az első kísérletes eredményekből tudományos eredmények születhetnek.

Köszönöm Prof. Dr. Damjanovich Sándor akadémikus úrnak, amiért a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetben lehetőséget teremtett molekuláris biológiai módszerek elvégzésére, melyek Dr. Bodnár Andrea segítségével történtek meg.

Köszönet illeti Dr. Facskó Andrea egyetemi docens nőt, amiért értékes tanácsaival és pályázati anyagi erőforrásaival segítette tevékenységem.

Külön köszönöm Berényi Erikának és a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet számos munkatársának, hogy a laboratóriumi munkában mindig segítségemre voltak és ötleteikkel valamint lelkiismeretes munkájukkal az adódó nehézségeken mindig átsegítettek.

Köszönöm Dr. Damjanovich Judit egyetemi adjunktus nőnek és a Szemklinika minden munkatársának, hogy lehetővé tették, hogy a kutatásokra megfelelő mennyiségű időt szakíthassak.

A kísérletes munka anyagi fedezetét az OTKA F046497, OTKA T038163, OTKA T038348, ETT 603/2003, Mec-5/2002 és a Bolyai János Kutatói Ösztöndíj témátámogatásai szolgáltatták.

## 9. FÜGGELÉK