

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**Hisztamin antagonisták hatása a humán melanoma
malignum progressziójára SCID egerekben**

Dr. Szincsák Nóra

Témavezető: Dr. Juhász István egyetemi docens



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS – ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSI KAR
BŐR– ÉS NEMIKÓRTANI KLINIKA**

Debrecen, 2007.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE:

DPPE = N, N-dietyl-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl

α -FMH = α -fluorometil-hisztidin

HDC = hisztidin dekarboxiláz

IFN- α = interferon-alfa

IFN- γ = interferon-gamma

iHR = intracelluláris hisztamin receptor

mean = átlag

NK = natural killer, természetes ölő sejtek

LAK = limfokin-aktivált ölő sejtek

SEM = standard error mean

SCID = severe combined immunodeficiency, súlyos kombinált immunhiányos állapot

VDJ = variable diversity joint (rekombinááz enzim)

I. BEVEZETÉS	1
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2
A melanoma malignum gyakoriságának növekedése	2
Súlyos kombinált immunhiányban (SCID) szenvedő egerek. Az in vivo egérmodell jelentősége	4
A hisztamin szerepe a sejtproliferációban	6
Az N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl (DPPE), egy tamoxifen származék szerepe a tumorproliferációban	8
A H2 hisztamin receptor antagonisták cimetidin, ranitidin szerepe a tumorproliferációban	9
III. CÉLKITŰZÉSEK	12
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	13
Gyógyszerek	13
Melanoma sejtvonalak	13
Melanoma sejtenyésztés	13
Protein kivonás és Western blot analízis	14
Antitestek	14
Natrium dodecil szulfát - poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) és immunoblot	15
MTT assay	15
A H2 hisztamin receptorok meghatározása HT168 melanoma sejteken	16
A H2 hisztamin receptor mRNS meghatározása reverz transzkripció polimeráz láncreakció révén	16
A kísérleti állatok	17
A tumornövekedés mérése	18
Hisztopatológiai feldolgozás	18
Statisztikai analízis	19
V. EREDMÉNYEK	20
In vitro kísérletek	20
Hisztamin antagonisták (cimetidin, ranitidin) és DPPE hatása humán melanoma sejtek (HT168 és M1) in vitro proliferációjára	20
A H2 receptor mRNS jelenlétének és aktivitásának vizsgálata melanoma sejtekben	22
In vivo kísérletek	24
HT168 és M1 melanoma sejtek in vivo növekedésének nyomonkövetése SCID egerekben	24
A különböző antihisztamin ágensek (cimetidin, ranitidin, DPPE) valamint ezek kombinációinak hatása SCID egerekbe oltott HT168 melanoma sejtek növekedésére	26
H2 receptor antagonisták (cimetidin, ranitidin) és DPPE hatása a tumor kialakulási potenciálra SCID egerekben	30
A cimetidinnel, ranitidinnel, DPPE-vel, valamint ezek kombinációival kezelt SCID egerek és a kontroll csoport túlélésének nyomonkövetése	33

A HT 168 melanoma sejtek in vitro és in vivo HDC expressziójának Western blot analízissel történő összehasonlítása	35
A kifejlődött tumorok szövettani szerkezetének, immunreaktivitásának, a tumort infiltráló sejteknek a vizsgálata	36
VI. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALVA	38
VII. MEGBESZÉLÉS	39
Autonóm hisztamin metabolizmus melanomában	39
A hisztaminnak hisztamin receptorokon keresztül megvalósuló direkt hatása melanomában	40
A DPPE, cimetidin, ranitidin szerepe a tumorproliferációban	41
Antihisztaminok hatása a melanoma sejtek in vitro és in vivo növekedésére	42
A hisztamin és a lokális immunválasz, a hisztamin indirekt hatása melanomában	42
A hisztamin kétarcú hatása melanomában, az antihisztaminok kettős támadáspontja	46
Munkánk gyakorlati jelentősége	48
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS	49
IX. SUMMARY	50
X. IRODALOMJEGYZÉK	51
XI. KÖZLEMÉNYEK	64
Az értekezésben felhasznált közlemények	64
Egyéb közlemények	64
Megjelent absztraktok	65
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	66
XIII. MELLÉKLET	67

I. BEVEZETÉS

A melanoma malignum igen nagy mortalitású tumor, gyakorisága a világon mindenhol folyamatosan emelkedik. A bőr daganatai között magas malignitása és elterjedtsége okán a legjelentősebb, de primeren egyéb szervekben, pl. a retina vagy a látgyagyhártya pigmentjéhez asszociáltan, a felső légutakban, illetve a gasztrointesztinális nyálkahártyán is keletkezhet. A melanoma malignum előfordulásának növekedése számos in vitro és in vivo kutatást ösztönöz egyrészt a tumor növekedésének modellezésére, másrészt a humán terápiában alkalmazható hatásos gyógyszerek kifejlesztésére.

A hisztamin számos élettani és patológias hatásért felelős a különböző sejtekben és szövetekben, az emberi szervezet egyik legáltalánosabb szerepű mediátora. Hisztamint többféle, a hisztamin szintézisért felelős hisztidin dekarboxiláz enzimmel rendelkező sejt termel. A hisztamin kimutatható szinte minden osztódó sejtben, lényeges szerepe lehet mind a benignus sejtosztódás, mind a malignus tumornövekedés folyamatában. A termelődő hisztamin az extracelluláris térbe kikerülve a célsejtek plazmamembránjában található hisztamin receptorokhoz kapcsolódik. Mivel a melanoma sejtek és szövetek viszonylag nagy mennyiségben tartalmaznak hisztamint, e mediátor funkcionális jelentősége specifikus antihisztaminokkal vizsgálható in vitro és in vivo, humán melanoma sejtekben és súlyos kombinált immundeficienciában (SCID) szenvedő egerekben.

Jelen tanulmányban humán HT168 melanoma sejtekkel xenotranszplantált súlyos kombinált immunhiányban (SCID) szenvedő egerekben vizsgáljuk az in vivo tumorproliferációt. Tanulmányozzuk, mind in vitro mind in vivo, a H2 hisztamin receptor antagonistá cimetidin és ranitidin, valamint egy tamoxifen származék, az N,N-dietyl-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl (DPPE), illetve ezek kombinációinak a melanoma növekedésére kifejtett hatását.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A melanoma malignum gyakoriságának növekedése

A melanoma malignum az egyik legrosszabb indulatú tumor. A bőrt és a nyálkahártyákat érintő, malignus melanocita eredetű megbetegedés. A malignus tumorok között a halálozások 1-2 %-áért felelős, de a betegség előfordulása drámaian növekszik. A bőrrákok okozta halálozások 70 %-a melanoma malignum miatt következik be (1). Jelenleg több új melanomás esetet regisztrálnak az Amerikai Egyesült Államokban mint AIDS-es esetet. A 25-30 éves nők között a daganatos halálozások között a melanoma áll az első helyen, 30-35 éves korban a második vezető halálzási ok, az emlőrák után (1). A melanoma malignumban szenvedő betegek száma, figyelembe véve az etnikai különbségeket is, a világon mindenhol emelkedik. Különösen az utóbbi két évtizedben nőtt a betegség előfordulása. A World Health Organization (WHO) 2005-ös adata alapján évente 132.000 melanomás esetet diagnosztizálnak világszerte (2). A melanoma malignum incidenciája, azaz a 100.000 lakosra jutó új megbetegedés, évente körülbelül 3 %-al növekszik világszerte, becslések szerint az incidencia 15 évenként megduplázódik (1). Az európai országokat érintő statisztikák szerint 100.000 lakosra 4-15 melanoma esik. A betegség incidenciája Magyarországon 2005-ös WHO adatok alapján 7/100.000, a betegség okozta halálozás 1.6/100.000 (3). Az amerikai National Cancer Institute adatai alapján 59.580 melanomát diagnosztizáltak 2005-ben az Amerikai Egyesült Államokban, és 7.770 ember halt meg e daganat miatt. A melanoma incidenciája az Amerikai Egyesült Államokban 24/100.000 a fehérbőrű lakosok között (1-2/100.000 a fekete bőrű lakosok esetében), a mortalitás 3/100.000. Ausztráliában és Dél-Amerikában a melanoma incidenciája sokkal magasabb, meghaladja a 40/100.000-t (4).

Jellemzően a középkorú felnőttek betegsége, de az utóbbi években egyre gyakoribb a melanoma előfordulása fiatalabb életkorban. A betegség prognózisa nagymértékben függ a tumor lokalizációjától. A bőrben észlelt tumorok esetén a végtagokra lokalizálódó forma kedvezőbb lefolyású, mint a törzsön vagy a fejen

elhelyezkedő tumor. Nőknél gyakrabban fordul elő és általában kedvezőbb lefolyású. Sokkal gyakoribb fehér bőrű egyéneknél, mint más rasszokban.

A melanoma malignum nagy mortalitású bőrtumor. Az általában gyors lefolyású kórkép korán halálozáshoz vezethet. Ezen a folyamat korai felismerése sokat segíthet. A melanomák mérete, alakja, színe, valamint inváziós és metasztázisok okozó hajlama eltérő. A melanoma olyan gyorsan terjedhet, hogy a felismerését követő hónapokban halálhoz vezet, míg a korán felfedezett, felszínes elváltozások 5 éves túlélési aránya magas. A betegség nagy malignitását alátámasztják a következő statisztikai adatok: míg in situ carcinománál (0 stádium) az ötéves túlélés közel 100 %-os, az I. és II. stádiumban, amikor nincsenek metasztázisok, az ötéves túlélés 75-80 %. Ha III. stádiumban ismerik fel és kezelik a betegséget, amikor nyirokcsomó metasztázisok vannak, de a primer tumor nem fekélyesedett ki (III.A), az ötéves túlélés 65 %-os, míg ugyanez kifekélyesedett III.B tumornál csak 25 %-os. A melanoma IV. stádiumában, amikor hematogén vagy távoli limfogén metasztázis mutatható ki az ötéves túlélés 7-9 % (1).

A túlélés növelésének, a prognózis javításának feltétele a korai pontos diagnózis mellett a minél korábbi és minél hatékonyabb kezelés. A sebészi terápia mellett az adjuváns kemo- és immunterápia is lényeges szerephez jut a melanomás betegek kezelésében. Az utóbbi években sok eljárás kipróbálásra került, de standard adjuváns terápia nem alakult ki. Szintén nincs olyan terápiás eljárás, amely profilaktikusan alkalmazva megnövelné a túlélést a közepes és magas rizikójú egyéneknél. A jelenleg leggyakrabban alkalmazott kemoterápiás szerek hatásossága korlátozott, ezért is foglalkoznak sokan a melanoma terápiájában a későbbiekben esetleg felhasználható anyagok, gyógyszerek kutatásával.

Nagy mortalitása miatt tehát a tumorkutatás kiemelt területét képezi a melanoma malignum. Számos kutatócsoport tanulmányozza a melanoma sejtek növekedését in vitro, valamint in vivo állatmodellekben, továbbá vizsgálják a terápiában alkalmazható különböző anyagoknak a tumorsejt proliferációra kifejtett hatását.

Súlyos kombinált immunhiányban (SCID) szenvedő egerek

Az in vivo egérmodell jelentősége

Ismert, hogy a legtöbb tumorsejt immunhiányos rágcsőló bőre alá oltva tumornövekedést eredményez. Széles körben elterjedt eljárás az emberi tumorok, így például a melanoma immundeficiens egerekbe történő xenotranszplantációja (5, 6). Kiderült, hogy a humán tumorok az egérben akkor növekszenek az eredeti tumorokhoz hasonlóan, ha azokat orthotopikusan ültetik át, azaz az állatnak abba a szervébe juttatják be, amely emberi szervből eredetileg származnak. Ilyen orthotopikus rágcsőló modelleket fejlesztettek ki gyomorrák, colon carcinoma (7), vesecarcinoma (8), tüdőrák, prostata carcinoma (9), pancreas carcinoma (10) kísérletes vizsgálatához. Ezen modellek bebizonyították, hogy a szervspecifikus mikrokörnyezet meghatározó szerepet játszik a tumorok növekedésében.

A melanoma vonatkozásában az orthotop viszonyokat a bőr felső rétegei, az epidermis és dermis jelenti. Az egér vékony hámja és irhája azonban nem alkalmas tumorok növekedésére. Ezért a humán állapot modellezésére subcutan vagy subdermalis, azaz egészen felszínes subcutan beültetés használható. Kerbel és munkacsoportja egy orthotopikus melanoma modellt hozott létre csupasz egerek subdermalis oltásával (5).

A súlyos kombinált immunhiányos szindrómában (severe combined immunodeficiency = SCID) szenvedő egereket 1983-ban Bosma és munkatársai felfedezték fel, akik a C.B-17 egértörzs szérum immunglobulinszint vizsgálatai során ellenanyaghiányos egerekre bukkantak (11). Ezek az egerek azonkívül, hogy hipogammaglobulinémiások és képtelenek specifikus antitesttermelésre, sejtes immunitásukat tekintve is deficiensek. A Glanzmann és munkatársai által az 1950-ben kisgyermeken leírt SCID szindrómához (12) való hasonlatosság miatt ezen egértörzset Bosma és munkatársai SCID egérnek nevezték el. A SCID egerek széles körben alkalmazhatók számos különféle sejt és szövet allo- és xenotranszplantációjára, mivel T és B sejtes immunitásuk egyaránt károsodott, egy autoszóm recesszív módon öröklődő genetikai mutáció révén (11, 13, 14). A SCID egerek homozigóták (scid/scid) a scid gén mutációt illetően. Az egerekben az immunglobulinok és T-sejt receptorok képzéséért felelős, úgynevezett variable diversity joint (VDJ) rekombináz enzim defektusa okozza az immunhiányt (15).

A SCID egérmodell jelentősége, hogy olyan in vivo kísérletek végzésére alkalmas, melyek embereken etikai megfontolásból nem végezhetők. A SCID egerek alkalmazásának kiemelt területe különböző tumorok transzplantációja, nyomonkövetése kísérleti körülmények között. Ezen egereket gyakran használják az emberi vérképzőrendszer tumorainak modellezésére (16, 17). Waller és munkatársai SCID egerekbe transzplantált T sejt non-Hodgkin limfóma növekedését vizsgálták (16), Jansen és munkatársai SCID egerekbe oltott humán leukémia sikeres kezeléséről számoltak be (17). Humán tüdőcarcinoma (18, 19), retinoblastoma, osteosarcoma sejtek (20) SCID egérbe történő sikeres átültetéséről jelentek meg közlemények. Mások humán hepatocelluláris carcinoma (21), valamint laphámrák (22) kísérletes tanulmányozására alkalmas SCID egér modellt dolgoztak ki az utóbbi években. A legújabb kutatások között szerepel a melanoma (23) tumor összejt vizsgálata ugyanúgy, mint más tumor, így a leukémia (24) összejt tanulmányozása is.

SCID egerek alkalmazásával lehetőség nyílt egy in vivo humán orthotopikus melanoma modell kidolgozására (25, 26). Hill és munkatársai betegek melanoma metasztázisaiból készített sejtuszpenziót oltottak sikerrel SCID egerek bőre alá (25). Arra a következtetésre jutottak, hogy a SCID egerek alkalmasabb recipiensek a tumorsejtek növelésére, mint a csupasz (nude) egerek. Nude egerekben a természetes ölő sejtek (NK sejtek) aktivitása számottevő, ezért transzplantáció esetén az immunszuppresszió fokozására az NK sejtek aktivitását csökkentő kezelésre van szükség. A SCID egerekben viszont az NK sejt aktivitás igen alacsony, így tumorkutatásra megfelelőbbek. Juhász és munkatársai által a SCID egerekben létrehozott humán orthotopikus melanoma modell alkalmas a tumorprogresszió in vivo tanulmányozására (26).

A DEOEC Bőr- és Nemikórtani klinikán 1994 óta működik SCID laboratórium. Az egér kolónia az Egyesült Államokból, a philadelphiai Wistar Intézetből származik. Az elmúlt évek során laboratóriumunkban a SCID egereket számos tumor modellezésére használtuk. Így humán melanoma szöveteken, melanoma sejteken kívül basaliomát, Kaposi sarcomát, epidermoid carcinoma sejteket, emlő tumorsejteket, cervix carcinoma sejteket, pajzsmirigy tumort, leukémiás sejteket ültettünk SCID egerekbe. Ezen kívül naevus, humán bőr, hajhagyma sikeres transzplantációját végeztük, továbbá tanulmányoztuk a humán transzplantált bőrben ejtett sebzések gyógyulását.

A SCID egerekkel való előzetes tapasztalatok lehetőséget adnak xenogén graftok hosszútávú in vivo vizsgálatára. Immundeficiens egerekbe melanoma sejteket oltva tanulmányozhatjuk a kifejlődött tumor növekedését, valamint a tumor fejlődésének befolyásolhatóságát különböző anyagok által.

A hisztamin szerepe a sejtproliferációban

A melanoma sejtek csakúgy, mint számos más sejt, jelentős mennyiségben termelnek hisztamint, és a hisztamin szintéziséért felelős hisztidin dekarboxiláz (HDC) enzimet (27, 28).

A hisztamin [2-(4-imidazolil)etilamin] élettani és patológias hatások széles köréért felelős a különböző sejtekben és szövetekben. A szervezet egyik legáltalánosabb szerepű mediátora (29). Elsősorban hízósejtekben, bazofil granulocitákban termelődik, valamint egyes hisztaminerg neuronokban mutatható ki. A hisztamin allergiás, gyulladásos reakciókban játszott szerepe már régóta ismert, emellett fontos neurotranszmitter, szerepe van a vér-agy gát fenntartásában, a gyomorsav termelésben. Az utóbbi időben a hisztaminnak az immunválaszban, a benignus és malignus sejtproliferációban betöltött funkciója került a kutatók érdeklődésének középpontjába. Falus és munkacsoportja számottevően hozzájárult a hisztamin szerepének megértéséhez humán melanomában (30).

A hisztamin a hisztidin dekarboxiláz enzim (HDC) jelenlétében, CO₂ felszabadulása mellett, az L-hisztidin dekarboxilálásával keletkezik (31). A HDC az egyetlen enzim, amely felelős a hisztamin szintéziséért. A hisztamin az extracelluláris térbe kerülve a célsejtek plazmamembránjában található H1, H2 és H3 hisztaminreceptorokhoz kapcsolódik, melyek G-proteinekkel kapcsolódva az extracelluláris jelet sejten belüli jelsorozattá változtatják (32). A hisztamin szinte minden eddig vizsgált osztódó sejtben kimutatható, az intracelluláris jelátvivő molekulák egyike, és szerepe van a sejtosztódás szabályozásában (29).

A hisztamin és a hisztamin szintéziséért kizárólagosan felelős enzim, a hisztidin dekarboxiláz (HDC) sejtes és szöveti előfordulása széleskörű. Nemcsak mastocitákban, bazofil sejtekben (33) és hisztaminerg neuronokban mutatható ki (34), hanem vérlemezkékben (35), limfocitákban, (36, 37) makrofágokban (38) és

dendritikus sejtekben is előfordul (39). Magas a HDC expresszió a regenerálódó májban, embrionális szövetekben és kísérletes tumorokban (27).

Erősen emelkedett a hisztamin bioszintézis és a hisztamin tartalom különböző humán és kísérletes tumorokban, így rágcsőknban növekvő emlőtumorban (40), egerekbe transzplantált melanómában (41), továbbá humán gasztrointestinális adenocarcinómában (42), krónikus myeloid leukémiában (43), humán emlőrákban (44). Valent és munkatársai kimutatták, hogy krónikus myeloid leukémia (CML) sejtekben egy CML specifikus onkoprotein elősegíti a HDC expressziót, ezáltal a hisztamin szintézist (43).

A malignus melanoma és a melanoma tumorból származó sejtvonalak a melanocitákkal ellentétben emelkedett mennyiségben tartalmazznak HDC-t. Ezt a megállapítást igazolta Falus és munkacsoportja in vitro tanulmányaikban. Western blot és immunhisztokémiai módszerek felhasználásával kimutatták a HDC gén expresszióját és a HDC protein jelenlétét humán melanoma sejtvonalakban (28). Bebizonyították, hogy a magas enzimszint következtében a melanomás szövetekben és sejtvonalakban igen magas a hisztamin koncentrációja. Megállapították, hogy a melanoma sejtek külső stimulus nélkül is detektálható mennyiségű hisztamint szabadítanak fel, ami felveti az autonóm hisztamin metabolizmus lehetőségét humán melanómában (45). Kimutatták, hogy nemcsak az exogén hisztamin, hanem a melanoma sejtek által termelődő és felszabaduló, autokrin és parakrin faktorként szereplő hisztamin is befolyásolja a sejtprolifерációt és szabályozza a szervezet in situ immunválaszt. Darvas és munkacsoportja melanoma sejtek proliferációjának csökkenését tapasztalta a HDC transzlációt gátló, HDC antiszenz oligonukleotidok alkalmazása mellett (46). Falus és munkatársai genetikailag módosított, különböző mennyiségű HDC-t termelő, C57BL/6 egérben növekvő B16-F10 egér melanoma sejtek növekedését vizsgálva megállapították, hogy a hisztamintermelés emelkedésével együtt kifejezetten nőtt a tumorok mérete, és nőtt a metasztatikus potenciál is (41). Kimutatták, hogy humán melanoma sejtekben az exogén hisztamin egy protoonkogén, az Ets-1 szintézisét stimulálja, és ez a hatás H2 receptorokon keresztül valósul meg (47).

Habár molekuláris és szöveti szinten még nem egészen világos a működés mechanizmusa, sok jel utal arra, hogy a hisztamin aktív szerepet tölt be a sejtprolifерációban (35, 44, 48), így kiemelt jelentősége lehet mind a benignus

sejtosztódás (pl. szövetregeneráció, hematopoézis, embrionális fejlődés), mind a malignus tumornövekedés folyamatában is.

A sejtekből a hisztamin nagyrésze endogén úton választódik ki, és ez autokrin vagy parakrin módon befolyásolja a környező sejteket (48). Ennek következményeit könnyen kimutathatjuk hisztamin antagonisták alkalmazásával, melyek a sejtplazma membránokon elhelyezkedő H₂ hisztamin receptorokhoz történő kötődés, valamint a G protein függő intracelluláris jelátadás blokkolása révén működnek (49, 50). Hasonló lokális blokkoló hatás érhető el, ha a hisztamin de novo bioszintézisét gátoljuk irreverzibilis HDC gátlóval, az α -fluorometil-hisztidinnel (α -FMH) (51). Feltételezhetően a helyileg termelődött hisztamin egy része a sejtben marad. Farmakológiai, biokémiai és hisztológiai adatok igazolták, hogy az intracelluláris hisztamin a mikroszómákban és a magi frakcióban található citokróm P450 sejtalkotóhoz kötődik (35, 52, 53). Ezt az intracelluláris hisztamin receptorhoz való kötődést hatékonyan gátolhatjuk egy anti-ösztrogén hatóanyaghoz, a tamoxifenhez hasonló, N,N-dietyl-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl-al (DPPE-vel) (53, 54, 55). A hisztamin funkcionális szerepére utal, hogy a HDC-t gátló α -FMH, valamint az intracelluláris kötőhelyet blokkoló DPPE jelentős sejtosztódás gátlást okoz in vitro melanoma sejtekben (27, 28).

Az N,N-dietyl-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl (DPPE), egy tamoxifen származék szerepe a tumorproliferációban

A tamoxifen származék, N,N-dietyl-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl (DPPE) erősen kapcsolódik az intracelluláris citokróm P450 sejtalkotóhoz, az intracelluláris hisztamin receptorhoz (iHR), ezáltal antagonizálja az intracelluláris hisztamin hatását, azaz nem H₁-, nem H₂-, nem H₃-receptor antagonista (53). A hisztamin intracelluláris szerepének jelentőségére utal, hogy az intracelluláris receptoron vetélkedő DPPE hatása a legtöbb esetben megegyezik a HDC-t, és ezáltal a hisztamin szintézisét gátló α -FMH hatásával (55).

Az intracelluláris hisztaminra vonatkozó kutatások kiemelt területe a tumorprogresszióval foglalkozik. A DPPE hatása sok esetben megegyezik az α -FMH hatásával, mindkettő gátolja a májtumorok és a colorectalis tumorok in vivo és in

vitro proliferációját (56 - 59). Más kutatások szerint azonban a DPPE önmagában serkenti az in vivo tumornövekedést DMBVA-indukált emlőtumoros Sprague-Dawley patkányokban, L5178Y leukémiás DBA/2 egerekben (53, 60). Berners és munkatársai kimutatták, hogy a DPPE csökkenti a B16 melanoma sejtek in vitro növekedését, valamint egerekbe oltott leukémia sejtek proliferációját (61).

Bencsáth és munkatársai kutatásai szerint a DPPE elnyomja a magas HDC szinttel rendelkező krónikus limfoid leukémiás betegekből származó limfociták in vitro proliferációs kapacitását (62). Valent és munkatársai megállapították, hogy a DPPE a krónikus myeloid leukémiás sejtek növekedését gátolja (43). A DPPE csökkenti a metasztázisok kialakulását colon tumoros nude egerekben (63), valamint húgyhólyag tumoros betegekből (64). Brandes és munkatársai szerint kemoterápiával kombinálva a DPPE megvédi a szervezetet a citotoxikus hatásoktól prostata- és emlőrákban (65, 66). A DPPE fokozhatja a metasztatikus emlőtumoros betegek kezelése során alkalmazott doxorubicin hatását (66).

Falus és munkacsoportjának in vitro kutatásai szerint a hisztamin termelődést gátló α -FMH, valamint a kötőhely antagonistá DPPE jelentős sejtosztódás gátlást okoz primer és metasztatikus eredetű melanoma sejtvonalakban, az α -FMH 25-30 %-os, a DPPE 45-65 %-os osztódásgátlást eredményez (27). Mások megállapításai szerint mind a tamoxifen, mind a DPPE gátolja a humán T-289 melanoma sejtek in vitro növekedését (67). Klinikai vizsgálatok során megállapították, hogy a DPPE megnövelheti a melanoma kemoterápiájában használt gyógyszerek terápiás hatékonyságát olyan betegekből is, akik korábban nem reagáltak a citosztatikumokra (68).

A H2 hisztamin receptor antagonistá cimetidin, ranitidin szerepe a tumorproliferációban

Számos kutatócsoport vizsgálta a H2 receptor antagonistá cimetidin és ranitidin tumornövekedésre kifejtett hatását. A H2 hisztamin receptor antagonisták a hisztamin sejtplazma membránokon elhelyezkedő H2 receptorokhoz történő kötődését gátolják, valamint a G protein függő intracelluláris jelátadást blokkolják. Kimutatták, hogy a cimetidin számos különböző típusú tumor növekedését gátolja

mind in vitro, mind in vivo állatmodellekben (69, 70). Hahm és munkatársai szerint szignifikánsan csökkentette a humán gyomorrák tumorsejtek in vitro növekedését (70). Adams és munkatársai vizsgálata szerint a cimetidin Balb/c és nude egerekbe transzplantált humán colon carcinoma proliferációját gátolta, (58), Watson és munkatársai pedig megállapították, hogy a cimetidin akadályozta a nude egerekbe oltott emberi gyomorrák sejtek és colorectalis tumorsejtek in vivo növekedését (42). Más szerzők szerint fokozta a gasztrointesztinális tumorokban szenvedő betegek túlélését (71, 72).

Osband és munkatársai kimutatták, hogy a cimetidin tüdőcarcinomás C57BL/6 egerekben csökkentette a metasztázisok kifejlődését, valamint megnyújtotta az állatok túlélését (73). A cimetidin Sheehan és munkatársai szerint megnövelte az immunszupprimált egerekbe ültetett humán bronchus carcinomák térfogat kettőződési idejét (74), Finn és munkatársai szerint pedig gátolta a neoplasztikus glia tumor in vitro növekedését (75).

Igazolódott, hogy a nude egerekben kifejlődött humán ovarium carcinoma növekedése kedvezően befolyásolható cimetidinnel (76). Klinikai vizsgálatok során a cimetidin ovarium tumoros betegek túlélését segítette elő (77).

A cimetidin hatékonyságát az adoptív kemoterápiában állatmodellek is igazolták. Fokozta a ciklofoszfamid terápia hatását, szignifikánsan megnövelte a leukémiás egerek túlélését, míg a ranitidin nem befolyásolta ezt (78). Hatékonyan alkalmazták a cimetidint vesetumoros betegek IFN- α -val végzett kombinált kezelése során (79). Marshall és munkatársai metasztatikus vesetumoros és melanomás betegeknek a cimetidint kumarinnal kombináltan adták, több vizsgálat alkalmával, mely során objektív tumorregressziót találtak (80).

Lawson és munkatársainak vizsgálatai szerint a cimetidinnel ellentétben a ranitidin, egy másik hatásos H₂ hisztaminreceptor antagonistá nem gátolta sem a humán colon tumorsejtek proliferációját, sem ezen sejtek in vivo növekedését (81). Hahm és munkatársai kimutatták, hogy a ranitidin a cimetidinhez hasonlóan in vitro csökkentette ugyan a humán gyomorrák sejtek növekedését, de a ranitidin hatása nem volt szignifikáns (70). H₂ agonisták alkalmazása mellett, in vivo Sprague-Dawley patkányokban kifejlődött emlőcarcinomában Gricco és munkatársai szignifikáns tumorsejtproliferáció növekedést mutattak ki, amelyet a H₂ antagonistá ranitidin

csökkentett (40). Jurkat T limfocita sejtek növekedését nem befolyásolta a ranitidin (37).

Számos szerző igazolta, hogy a hisztamin stimulált melanoma sejt növekedés gátolható mind cimetidinnel, mind ranitidinnel in vitro (82, 83, 84), ugyanúgy, mint ahogyan Hellstrand és munkatársai szerint in vivo, Swiss albino, C57BL/6 és BALB/c egerekben növekvő melanomában (85). A cimetidin szignifikánsan csökkentette B16BL6 melanomával transzplantált egerekben a tumornövekedést (50). A cimetidint kipróbálták multiplex melanomában szenvedő lovak kezelésében is, a terápia alatt a melanomák mérete és száma csökkent, és a kezelés felfüggesztése után sem tapasztaltak méret vagy számbeli növekedést (86). Klinikai II. fázisú vizsgálatokból származó biztató adatok szintén alátámasztották a cimetidin terápia létjogosultságát humán metasztatikus melanoma kezelésében (87, 88). Melanomás betegek tünetmentes túlélésének jelentős növekedéséről számoltak be, amikor a cimetidint komplex terápiában alkalmazták specifikus allogén melanoma ellenes vakcinával (89). A cimetidinhez hasonlóan a ranitidin egyaránt aktív immunterápiás ágens lehet a humán melanomás betegek kezelésében Smith és munkatársai szerint (90). Mertens és munkatársai II. fázisú vizsgálatokban bizonyították, hogy a ranitidin az indometacinnal kombináltan, IL-2 alkalmazása nélkül is, antitumor aktivitást mutatott előrehaladott melanomában (91). Quan és munkatársai is bizonyították a cimetidin, ranitidin és IL-2 együttes alkalmazásának hatásosságát melanomás betegek terápiájában (92).

III. CÉLKITŰZÉSEK

Abból a célból, hogy minél jobban megértsük a hisztamin antagonisták melanoma malignumra kifejtett hatását, munkánk során az alábbiakat kívántuk vizsgálni.

In vitro kísérletek:

1. Tanulmányozni akartuk a melanoma sejtek in vitro proliferációját különböző hisztamin antagonisták alkalmazása mellett. A HT168 és M1 humán melanoma sejtek in vitro növekedését kívántuk vizsgálni. Hisztamin antagonistaként cimetidint, ranitidint, továbbá a tamoxifen származék, N,N-dietyl-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl-t (DPPE-t) akartunk használni. A sejtproliferációt MTT assay segítségével kívántuk mérni.

2. A H2 receptor mRNS jelenlétét akartuk igazolni melanoma sejtekben (HT168) reverz transzkripció polimeráz láncreakció révén. Vizsgálni kívántuk továbbá a melanoma sejteken levő H2 receptorok aktivitását. A H2 receptorkötő kapacitást [³H]tiotidin jelenlétében akartuk mérni.

In vivo kísérletek:

3. Melanoma sejtek (HT168 és M1) növekedését szándékoztunk nyomonkövetni in vivo, súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egerekben.

4. Különböző antihisztamin ágensek hatását akartuk vizsgálni humán melanoma sejtekben (HT168) in vivo. Hisztamin antagonistaként cimetidint, ranitidint, és DPPE-t, valamint ezek kombinációit kívántuk alkalmazni. Tanulmányozni akartuk, hogy hogyan befolyásolják a hisztamin antagonisták a melanoma sejtek növekedését in vivo, immundeficiens SCID egerekbe oltva. A különböző kezelések során kapott átlagos tumortérfogatokat kívántuk összehasonlítani.

5. Vizsgálni kívántuk továbbá azt, hogy antihisztamin ágensek hatására hogyan változik meg a tumorsejtekből kialakuló tumorok kifejlődésének potenciálja.

6. A cimetidinnel, ranitidinnel, DPPE-vel, valamint ezek kombinációival kezelt SCID egerek és a kontroll csoport túlélését szándékoztuk nyomonkövetni.

7. A melanoma sejtek (HT168) HDC expresszióját kívántuk összehasonlítani in vitro és in vivo, Western blot analízis révén.

8. A kifejlődött tumorok szövettani szerkezetét, immunreaktivitását, a tumort infiltráló sejteket akartuk vizsgálni.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Gyógyszerek

A cimetidint és a ranitidint a Tocris Cookson Ltd (London, UK)-től szereztük be. A DPPE-t Dr. Hudecz Ferenc (Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Szerves Kémia Intézet, Budapest) szintetizálta számunkra.

Melanoma sejtvonalak

A kísérletek során primer melanoma eredetű HT168 jelű, a májtraktusba alacsony frekvenciával metasztatizáló humán melanoma sejtvonalat használtunk. Előkísérleteink során használtuk még az előző sejtvonal májmetasztázisaiból izolált HT168-M1 jelű, magas metasztázis potenciájú sejtvonalat. A HT168 tumorvonal korábban az A2058 sejt IS CBA/Ca egérre történő subcutan in vivo passzázsával került előállításra. A subcutan növekvő HT168 tumorból készített sejtszuspenziót IS egerek lépébe injektálták, majd az így keletkezett májmetasztázisokból származó sejteket HT168-M1 (M1) jelöléssel látták el, és in vitro tenyésztették (93).

In vitro kísérletek

Melanoma sejtenyésztés

A humán melanoma sejtvonalat 5% CO₂ jelenlétében RPMI 1640 médiumban (GIBCO, Ausztrália) tenyésztettük, amelyet 10%-os magzati borjú szérummal (FCS, GIBCO) valamint 0.16 g/l gentamycinnel (Chinoin Rt., Magyarország) egészítettünk ki. A kultúrát 37°C-on vízzel telített 5% CO₂ / 95% levegő jelenlétében inkubáltuk. A sejteket a szokásos módon három naponta passzáztuk. Kezelés előtt, az utolsó

passzázs után 24 órán keresztül a sejteket inkubáltuk 37°C-on 10% FCS tartalmú RPMI 1640-es közegben, 5%-os CO₂-ot tartalmazó, nagy nedvességtartalmú inkubátorban, 4.5x10⁴ sejt/ml sűrűséget megtartva. A médiumot ezután cseréltük és a HT168 sejteket kezeltük DPPE-vel (10⁻⁵ –10⁻⁶ M), ranitidinnel (10⁻⁵ M), cimetidinnel (10⁻⁵ M), valamint ezek kombinációival. A kultúrákat 37°C-on, 5% CO₂ jelenlétében 48 órán át inkubáltuk. Az optimális koncentrációt, valamint az inkubációs időt korábbi kísérletek alapján határoztuk meg (ebben a tanulmányban ezeket az adatokat nem szerepeltetjük). Inkubáció után a sejteket foszfáttal pufferolt só (PBS) oldatban mostuk, majd további vizsgálatok céljából lizátumot készítettünk.

Protein kivonás és Western blot analízis

A molekulárbiológiai vizsgálatok Dr. Falus András akadémikus egyetemi tanár laboratóriumában a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében, a DEOEC Bőr-és Nemikórtani Klinika és a SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézete között megvalósult kollaboráció keretében jöttek létre.

A kitenyésztett sejteket vagy a folyékony nitrogénben gyorsfagyasztott szövetmintákat a protein kivonás céljából lízis pufferban mostuk, amely a következő összetételű volt: 10mM 1M Tris-HCl (tris-hidroxiaminometán-HCl), pH 8.0, 10 µg/ml leupeptin, 0.5 mM etilén-glikol-bisz(2-aminoetiléter) 0.5M tetrasavas sav (EGTA), 2% NaF, 1% Triton-X 100, 25mM fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF), valamint 2% Na-orthovanadat. A magfrakciót centrifugálással (10.000 g, 5 perc) különítettük el, és a szupernatánst használtuk a HDC expressziójának meghatározásához Western immunoblot módszerrel.

Antitestek

Számítógépes modellezések alapján a primer poliklonális antitestet csirkében állították elő a humán HDC protein egy kiválasztott peptidje ellen (Promega, Madison, Wisconsin, USA), kutató csoportunkkal együttműködve. Az antitest a HDC

318-325 (VKDKYKLQ) aminosav szekvenciáját tartalmazó epitópja ellen készült (28).

Natrium dodecil szulfát - poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) és immunoblot

A művelethez 15µg fehérjét tettünk mintánként a denaturáló poliakrilamid géltre. Egy előzőleg festett fehérje keveréket (SIGMA Co., UK) alkalmaztunk a molekuláris tömeg markereként, és 10% folyós gél és 5% szilárd gél használtunk 110V és 20mA mellett két órán át. A blothoz Hoeffler műszert alkalmaztunk Amersham nitrocellulóz Hybond-C Extra membránon, Tris-HCl, glicin és metanol tartalmú transzfer pufferban, 100V feszültségen, 200mA áramerősségen 80 percig. A membránt szobahőmérsékleten, egy órán keresztül enyhén ráztuk gátló oldatban (PBS, amely 1% zsírmentes tejsót és 0.1% Tween 20-at tartalmazott). 40ng/ml koncentrációban 60 percen át használtuk a primer antitestet (affinitás purifikált antihumán HDC₃₁₈₋₃₂₅ IgY (csirke); Promega, USA). A másodlagos antitestet pedig (torma peroxidáz konjugált anti-csirke IgY (nyúl); Promega, USA) 0.5 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk 30 percen át. Immunreaktív csíkokat jelenítettünk meg ECL (Amersham, Anglia) Western blot protokoll alkalmazásával.

MTT assay

A sejtprolifерáció tanulmányozására kolorimetriás MTT módszert használtunk, amelyben a vízzoldékony tetrazólium só (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazólium bromid; MTT) oldhatatlan lila formazánná alakítottuk át dehidrogenáz enzimek által (94). Korábbi kísérletekben igazoltuk, hogy az MTT assay eredményei összhangban vannak a [³H]timidin inkorporációval. A tenyésztési periódusok végén 20 µl MTT-t (5mg/ml, Sigma, USA) adtunk a kultúrákhoz. További 3 órás inkubáció után a szupernatánsokat kiszelektáltuk és a kicsapódott részt 100 µl dimetil szulfoxid-ban (DMSO) oldottuk. Az abszorpciót 540 és 620 nm-en olvastuk le.

A H₂ hisztamin receptorok meghatározása HT168 melanoma sejteken

A H₂ receptorkötő kapacitást 3nM-os [³H]tiotidin (DuPont, 81.1Ci/mmol) jelenlétében mértük 500 µl assay volumenben, amint azt másutt közölték (51). A nem specifikus kötődést 5mM hisztamin HCl-al (Sigma) határoztuk meg. A sejteket hideg sóoldatban mostuk, majd 60 percig 25 °C-on inkubáltuk. A reakciót vákum alatti, Whatman GF/B üvegszál filtereken át történt gyors filtrációval állítottuk le, melyeket 0.3%-os polietilénaminban előáztattunk, majd 10 ml jéghideg médiummal öblítettünk. A filtereken visszamaradt radioaktivitást folyadék szcintilláció számlálóval mértük 3 ml OptiPhase HiSafe koktéltban (Wallac). A Scatchard analízisből nyert adatok átlag értékeinek grafikai megjelenítése LIGAND szoftver programmal történt.

A H₂ hisztamin receptor mRNS meghatározása reverz transzkripció polimeráz láncreakció révén

A reverz transzkripció kivitelezésére a Pharmacia Ataq Gene Controller féle Perkin Elmer reverz transzkriptázt használtuk. A reakciós elegy (20 µl) a következőket tartalmazta: 4 µl 25 mM Mg²⁺, 2 µl 10x-es puffer, 2 µl 10 mM deoxinukleotid (dNTP), 0.25 µl RNáz inhibitor (5 U), 1 µl oligo-deoximidin primer, 0.5 µl rágcsló leukémia vírus (Mu-LV) reverz transzkriptáz (25 U) és 0.25 µl dietil pirokarbonat (DEPC)-desztillált víz, mely 10 µl-enként összesen 1.5 µg RNS-t tartalmazott. Az RNS mintákkal (1.5 µg) reverz transzkripciót végeztünk 42 °C -on 30 percig, majd 99 °C-on 5 percig.

A polimeráz láncreakció (PCR) felerősítésére a reakciós elegy a következőkből állt: 1x-es puffer, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP, 2.25 U Taq polimeráz, 25 pmol szenz és antiszenz primerek, templátok (10 µl) és végső volumenében 50 µl-re kiegészített desztillált víz. A primereket a GIBCO szintetizálta. A PCR reakciók megvalósítása során a H₂ receptorok felerősítésére a következő eljárásokat használtuk: 94 °C-os hőmérséklet 2 percig, 94 °C 30 másodpercig 30 cikluson át, 58 °C 1 percig és 72 °C 1 percig, majd 72 °C 7 percig. A H₂ receptorokra vonatkozó

oligonukleotid primerek (53) a következők voltak: a szenz primer: 5'-TCG TGT CCT TGG CTA TCA C, az antiszenz primer: 5'-CCT TGC TGG TCT CGT TCC T.

A kapott PCR termékeket szeparáltuk 2%-os, 0.01% etidium bromidot tartalmazó agaróz gélen. A mintákat 100 V-on 45 percig futtattuk. A PCR termék mérete 330 bp volt, összhangban a H2 receptor mRNS-el.

In vivo kísérletek

A kísérleti állatok

Az immundeficiens C.B-17 scid/scid egér populáció a Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA laboratóriumából származik. Az állatkísérleteket a hazai és nemzetközi etikai szabályozásoknak megfelelően végeztük. A tipikus SCID tulajdonságokat a szérum IgM mérésével ellenőriztük (az adatokat nem közöljük). 6-8 hetes egereket használtunk. Előkísérleteink során az állatokat (összesen 24 egeret) 5×10^6 M1 illetve HT168 melanoma sejttel oltottuk 200 μ l PBS volumenben, subdermalisan a hasfal bőrébe. A sejtek injekciózása technikailag nem különbözött a rutinszerűen alkalmazott intracutan injekciós technikától. További kísérleteink során HT168 melanoma sejteket használtunk. Összesen 81 egérrel végeztük a kísérleteket (összesen 36 kontroll, összesen 45 kezelt egér). Az egereket 7-12 fős csoportokba osztottuk, mely csoportok az oltást követő naptól a következő anyagokat kapták az ivóvizükben, a dózist állandó szinten tartva: (i) DPPE (4mg/kg/nap/egér), (ii) DPPE (4mg/kg/nap/egér) cimetidinnel (50mg/kg/nap/egér) kombinálva, (iii) DPPE (4mg/kg/nap/egér) ranitidinnel (50mg/kg/nap/egér) kombinálva, (iv) cimetidin (50mg/kg/nap/egér), (v) ranitidin (50mg/kg/nap/egér). Az egyes kezelt csoportoknak saját kontroll csoportjuk volt, melyek az oltást követően tiszta vizet kaptak. A ranitidin, cimetidin, DPPE dózist előkísérletek során határoztuk meg, a korábbi irodalmi adatokat figyelembe véve (56, 58, 59, 81). A kezeléseket folyamatosan alkalmaztuk az egész kísérlet alatt. Öt naponta cseréltük az ivóvizet, az egyes állatketrecekben levő kezelt csoportok vizének összeállításánál figyelembe vettük korábbi megfigyeléseinket, mely alapján

átlagosan 5ml vizet fogyaszt egy egér naponta, valamint a ketrecben levő egerek számát, testsúlyát. Monitoroztuk az egerek étel- és vízfelvételét, testsúlyát, így állandó körülményeket biztosítottunk a kísérletek során.

A tumornövekedés mérése

Az egyes subdermalisan növekvő tumorok méretét caliper (tolómérce) segítségével mértük hetente az oltást követően 6-9 héten keresztül. A tumorvolument a következő képlet segítségével határoztuk meg: $\text{tumortérfogat} = \text{hossz} \times \text{szélesség} \times \text{magasság}$ (81, 93). Ezt követően kiszámoltuk az egyes csoportokhoz tartozó átlagos tumortérfogatot.

Hisztopatológiai feldolgozás

A melanoma sejtek beadását követő 6 - 9. héten, amikor a tumorok elérték a 2 cm³ méretet, a kontroll és minden egyes kezelt csoportból néhány egeret szövettani feldolgozás céljából cervicalis dislocatiót alkalmazva elpusztítottunk, és a tumorokat a környező egérbőr vékony sávjával együtt kimetszettük. A szövettani mintákat paraffinba ágyasztuk és 5 µm-es metszeteket készítettünk, majd megfestettük hematoxilin-eozinnal. Ezzel egyidőben fagyasztott metszeteket is készítettünk. A tumorokat vizsgáltuk a differenciáltsági fok, a mag és citoplazma aránya, a sejtmag pleiomorfizmusa, a tumor széli növekedésének infiltratív volta, valamint a melanin pigment jelenléte szerint. Továbbá a deparaffinált szöveti metszeteket inkubáltuk 1%-os marha szérumban (BS) és 1%-os saponin/PBS-ben, festettük fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) jelölt patkány anti-egér interferon- γ (IFN- γ) IgG1 antitestekkel (1:1000, Pharmingen) vagy phycoeritrinnel (PE)-jelölt patkány anti-egér CD11b IgG2b antitestekkel, melyek detektálják az infiltráló rágcső makrofágokat (1:500, Pharmingen). Következő lépésként mostuk, valamint konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (Bio-Rad, MRC 1024, krypton-argon lézerrel felszerelve). Kontrollként hasonlóan jelölt izotipusos antitesteket használtunk.

Statisztikai analízis

Student féle t-tesztet, ANOVA variancia analízist, Holm-Sidak, Fisher és Logrank tesztet használtunk a különböző kezelések során kialakult eltérések mérésére. Az eredményeket mean (átlag) $\pm$ SEM (standard error mean = hiba) -ként adtuk meg. Az eredmények közti különbségeket szignifikánsnak tartottuk ha $P < 0.05$ volt.

V. EREDMÉNYEK

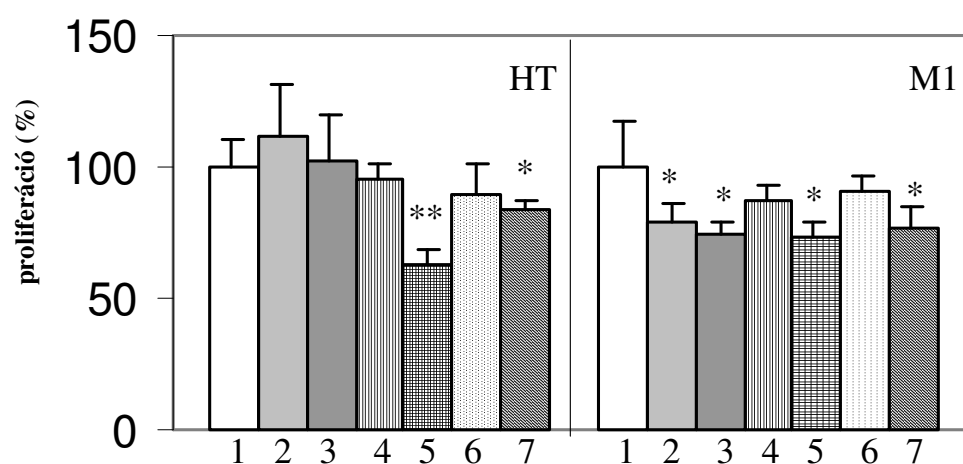
In vitro kísérletek

Hisztamin antagonisták (cimetidin, ranitidin) és DPPE hatása humán melanoma sejtek (HT168 és M1) in vitro proliferációjára

A hisztamin antagonistáknak a HT168 és M1 humán melanoma sejtvonal in vitro proliferációjára kifejtett hatását az 1. ábra mutatja. A proliferációt az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerinti MTT assay segítségével mértük.

HT168 sejtek esetén a cimetidin DPPE-vel kombinálva (5. oszlop) szignifikánsan csökkentette (37% gátlás) a sejtek proliferációját ($P < 0.01$), a ranitidin DPPE-vel kombinálva (7. oszlop) mérsékeltebb (16%), de szignifikáns csökkenést eredményezett ($P < 0.05$). A ranitidin önmagában adva (6. oszlop) illetve a cimetidin önmagában alkalmazva (4. oszlop) nem szignifikánsan kismértékben csökkentette a melanoma sejtek proliferációját. A DPPE önmagában (2., 3. oszlop) nem gátolta a sejtproliferációt.

M1 sejtek esetén a H2 hisztamin receptor antagonisták DPPE jelenlétében szignifikánsan csökkentették a proliferációt ($P < 0.05$): a cimetidin DPPE-vel kombinálva (5. oszlop) 27%, a ranitidin DPPE-vel kombinálva (7. oszlop) 23% gátlást okozott. Az M1 sejteknél a DPPE önmagában adva (2., 3. oszlop) szignifikáns mértékű proliferáció gátlást okozott (1 μM koncentrációban 21%, 10 μM koncentrációban 26% gátlást). HT168 sejtek esetében ilyen hatást nem észleltünk. A cimetidin (4. oszlop), valamint a ranitidin (6. oszlop) önmagában nem szignifikánsan csökkentette az M1 sejtek proliferációját.

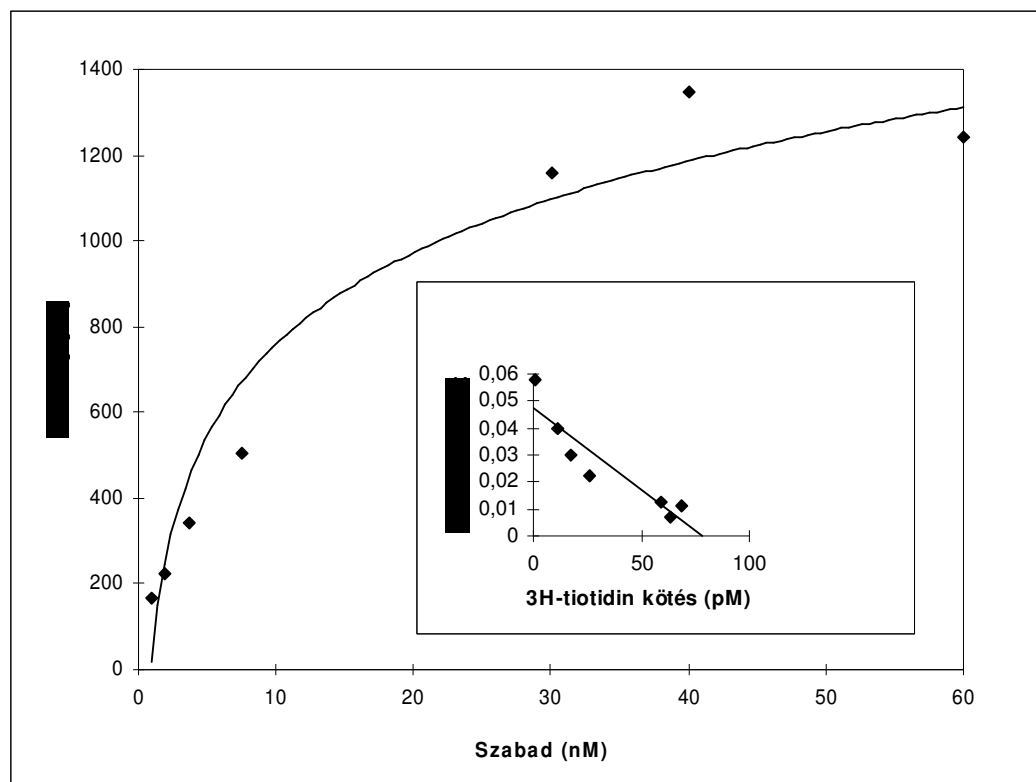


1. ábra In vitro funkcionális vizsgálatok humán M1 és HT168 melanoma sejtekben.

A H2 hisztamin receptor antagonisták és a DPPE hatása human melanoma sejtvonalak in vitro proliferációjára. 1. oszlop, kontroll; 2. oszlop, DPPE 10^{-6} M; 3. oszlop, DPPE 10^{-5} M; 4. oszlop, cimetidin 10^{-5} M; 5. oszlop, cimetidin 10^{-5} M + DPPE 10^{-6} M; 6. oszlop, ranitidin 10^{-5} M; 7. oszlop, ranitidin 10^{-5} M + DPPE 10^{-6} M. A proliferációt az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerinti MTT assay segítségével mértük. A feltüntetett eredmények megadása a következők szerint történt: mean $\pm$ SEM; n=csoportonként 3, **P<0.01, *P<0.05.

A H₂ receptor mRNS jelenlétének és aktivitásának vizsgálata melanoma sejtekben

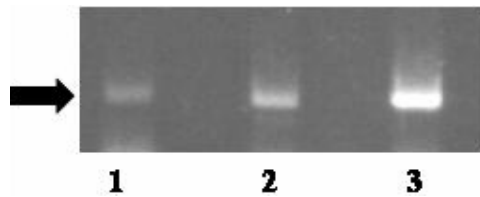
A H₂ receptor mRNS jelenlétét és aktivitását HT168 melanoma sejtekben vizsgáltuk. A H₂ receptorkötő kapacitást [³H]tiotidin jelenlétében mértük, a nem specifikus kötődést a hisztamin felesleggel határoztuk meg. A maximális specifikus kötődés ($B_{\max}$) és az equilibrium disszociációs állandó (K_d) értékek ($0.98 \pm 0.2 \times 10^6$ hely/sejt és 18.08 ± 6.77 nM), melyek Scatchard plot analízisből származnak tisztán mutatják a HT168 sejteken levő aktív H₂ receptorok jelenlétét (2. ábra). Hasonló eredményeket kaptunk M1 sejtek vonatkozásában is (az adatokat nem tüntettük fel).



2. ábra In vitro H₂ receptorkötődési vizsgálatok humán HT168 melanoma sejtekben.

A Scatchard plot analízissel történő H₂ receptorkötés jellemzése humán melanoma HT168 sejtvonalban. A H₂ receptorkötési kapacitást [³H]tiotidin jelenlétében mértük; a nem specifikus kötődést a hisztamin felesleggel határoztuk meg. A $B_{\max}$ ($0.98 \pm 0.2 \times 10^6$ hely/sejt) valamint a K_d (18.08 ± 6.77 nM) értékeket megadtuk.

Igazoltuk a H₂ hisztamin receptor mRNS jelenlétét HT168 melanoma sejtekben az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerinti reverz transzkripció polimeráz láncreakció (PCR) révén (3. ábra). A PCR termék mérete 330 bp volt, összhangban a H₂ receptor mRNS-el.

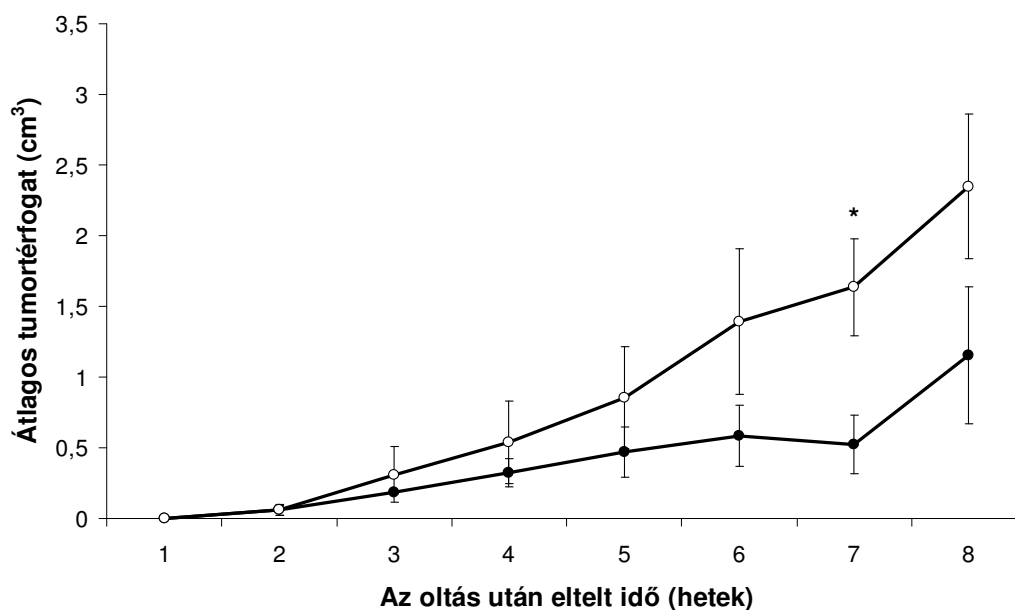


3. ábra: H₂ hisztamin receptor mRNS jelenlétének igazolása HT168 sejtekben. A nyíl a 330 bp-t mutatja, ami megfelel a felerősített H₂ receptor cDNS fragmentum méretének. 1.sáv M1; 2.sáv HT168; 3.sáv H₂ receptor cDNS klón.

In vivo kísérletek

HT168 és M1 melanoma sejtek in vivo növekedésének nyomonkövetése SCID egerekben

A HT168 és M1 sejtek okozta in vivo tumornövekedést SCID egerekben a 4. ábra mutatja. A HT168 sejtekkel oltott egerek 75%-ában, az M1 sejtekkel oltott egerek 91%-ában fejlődött ki tumor. Az átlagos tumortérfogat és az in vivo tumornövekedési potenciál nagyobb volt az M1 sejtekkel oltott egerek esetén, mint a HT168 sejtekkel oltott egereknél. A 7. hetet kivéve ($P = 0.015$) a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns ($P > 0.05$) (t teszt). További vizsgálataink során az alacsonyabb tumornövekedési potenciált mutató HT168 melanoma sejtvonalat használtuk.



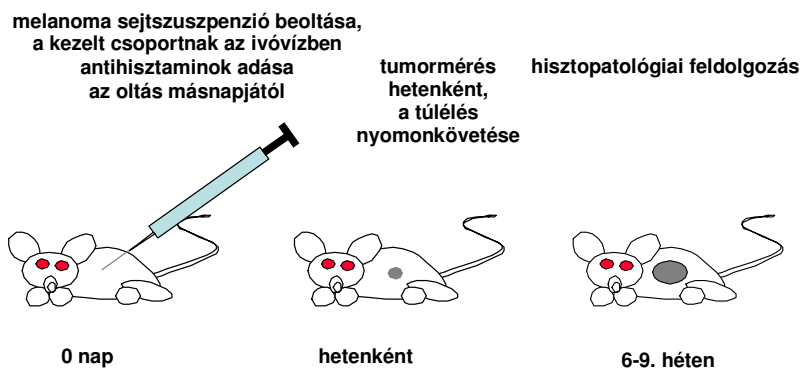
4. ábra A HT168 és az M1 humán melanoma sejtek növekedése SCID egérben.

HT168 sejtekkel oltott SCID egerekben (●; $n=12$), illetve M1 sejtekkel oltott SCID egerekben (○; $n=12$) mért növekedési jellemzők (tumortérfogat). Az eredményeket átlag tumortérfogatban (mean $\pm$ SEM) adjuk meg az 5×10^6 tumorsejt oltás utáni különböző időpontokban. * $P < 0.05$.

SCID egérben növekvő HT168 melanomáról készült felvétel látható az 5. ábrán. A SCID egerekbe oltott humán HT168 melanoma sejtek növekedését az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint követtük nyomon (6. ábra).



5. ábra SCID egérben növekvő HT 168 melanoma



6. ábra SCID egérbe oltott humán melanoma sejtek növekedésének nyomonkövetése

A különböző antihisztamin ágensek (cimetidin, ranitidin, DPPE) valamint ezek kombinációinak hatása SCID egerekbe oltott HT168 melanoma sejtek növekedésére

A cimetidin és DPPE együttes alkalmazása in vivo nagymértékben csökkenti a melanoma növekedését SCID egerekben

A ranitidinnel, cimetidinnel és DPPE-vel önmagában vagy ezek különböző kombinációival kezelt egerek tumornövekedését összehasonlítottuk a kontroll egerek tumornövekedésével.

Míg a cimetidin, önmagában adva a 3. héttől növelte a tumorvolument, addig DPPE-vel kombinálva a tumortömeg fejlődése nagymértékben csökkent a kontroll csoporthoz képest (1. táblázat).

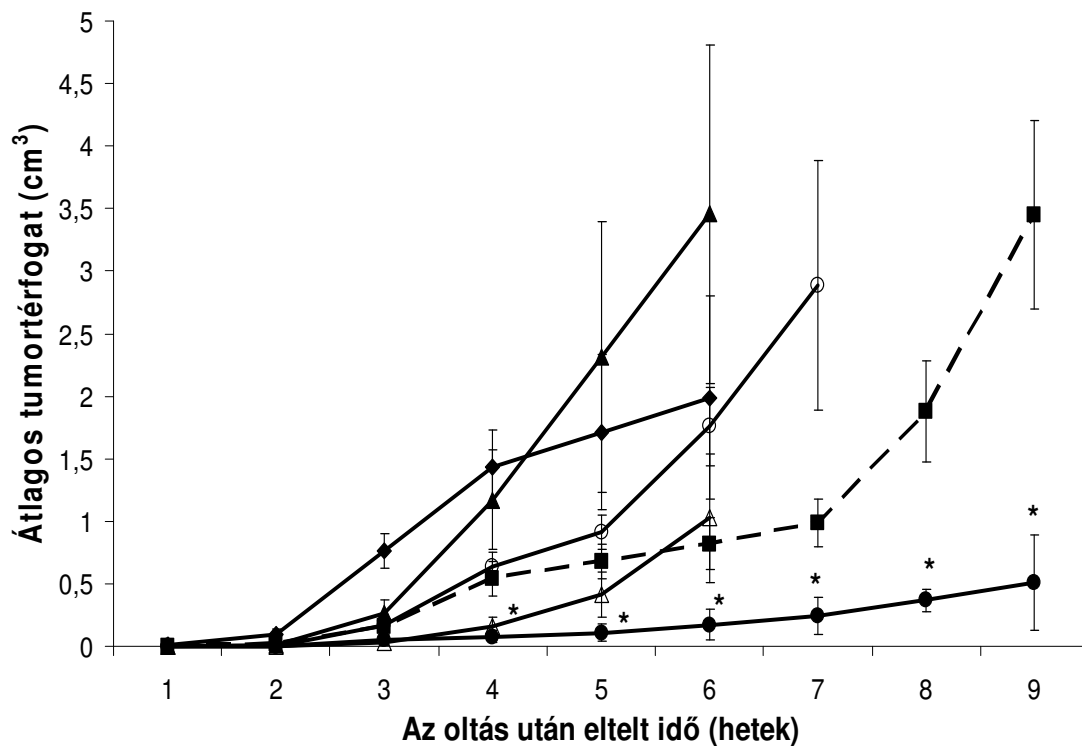
A cimetidinnel, DPPE-vel kombináltan illetve önállóan kezelt egerek, továbbá a nem kezelt, kontroll egerek átlag tumortérfogat adatait ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) mutatja az 1. táblázat. A HT168 melanoma sejtekkel oltott SCID egerekkel végzett különböző kezelések során kapott átlagos tumortérfogatot az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint kaptuk meg. Az eredmények igazolják a cimetidin és DPPE kombinált kezelés hatásosságát. A tumorsejtek oltását követő 3. héttől a cimetidin-DPPE kombinációt kapott csoportban a tumorok növekedése kisebb mértékű volt a kontroll csoporthoz viszonyítva, a 4. héttől ezen egerekben szignifikánsan csökkent a tumornövekedés a kontroll csoporthoz képest (t-teszt, $P < 0.05$). Ezen csoportban a tumortérfogatok szignifikánsan kisebbnek bizonyultak a kontroll csoporthoz képest a teljes vizsgálati időtartamot figyelembe véve, ANOVA, illetve Holm-Sidak tesztet használva.

HETEK	KONTROLL	CIMETIDIN	DPPE	DPPE+CIMETIDIN
1	0.004 ± 0.001	0 ± 0	0.014 ± 0.004	0 ± 0
2	0.016 ± 0.007	0.006 ± 0.002	0.092 ± 0.042	0 ± 0
3	0.154 ± 0.041	0.270 ± 0.102	0.763 ± 0.138	0.057 ± 0.041
4	0.543 ± 0.139	1.173 ± 0.398	1.429 ± 0.302	0.078 ± 0.051 *
5	0.679 ± 0.136	2.311 ± 1.082	1.714 ± 0.620	0.110 ± 0.068 *
6	0.820 ± 0.205	3.458 ± 1.353	1.988 ± 0.812	0.175 ± 0.124 *
7	0.986 ± 0.188	+	+	0.244 ± 0.152 *
8	1.978 ± 0.382	+	+	0.367 ± 0.092 *
9	3.454 ± 0.755	+	+	0.511 ± 0.386 *

1. táblázat A cimetidin és DPPE (N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl) kezelés hatása a HT168 melanoma sejttel oltott SCID egerek tumornövekedésére. Az eredményeket átlag tumortérfogatban (mean ± SEM) (cm³) tüntetjük fel.

A hetek a tumor injektálás utáni időtartományt jelölik. *P < 0.05 (**félkövér betűvel**)=szignifikáns érték a megfelelő kontroll csoporthoz viszonyítva. ANOVA vagy Student t-tesztet használtunk. n=8-36 csoportonként, az eredmények (mean ± SEM) megfelelnek az átlag tumortérfogatnak (cm³) az 5x10⁶ tumorsejt oltást követő növekedés különböző periódusaiban. + nincs élő állat az adott csoportban.

A HT168 melanoma sejtekkel oltott SCID egerekkel végzett különböző kezelések hatását a melanoma növekedésére, a mért átlagos tumortérfogatokat a 7. ábra mutatja.



7. ábra A HT168 melanoma sejtvonal növekedése SCID egérben. Különböző antihisztamin ágensekkel végzett kezelések hatása a tumornövekedésre a HT168 melanoma sejttel oltott SCID egerekben, összehasonlítva a kontroll csoporttal. Az eredményeket átlag tumortérfogatban (mean $\pm$ SEM) mutatjuk a tumoroltást követő különböző időpontokban. A szaggatott vonal a kontroll csoport eredményeit jelöli. *P < 0.05. ■, kontroll (n=36); ◆, DPPE (4mg/kg/nap) (n=8); ●, cimetidin (50mg/kg/nap) DPPE-vel kombinálva (4mg/kg/nap) (n=12) - 4 hét után P < 0.05; ○, ranitidin (50mg/kg/nap) DPPE mellett (4mg/kg/nap) (n=7); ▲, cimetidin (50mg/kg/nap) (n=9); △, ranitidin (50mg/kg/nap) (n=9).

A ranitidin és DPPE együtt adva, valamint a DPPE önmagában alkalmazva nem mutatott gátló hatást a HT168 sejtek növekedésére SCID egerekben (t teszt).

A 4. héttől a cimetidin és DPPE kombinációt kapott csoportban a tumortérfogat szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz viszonyítva ($P < 0.05$) (7.ábra) (t teszt).

A ranitidin önmagában adva a 2. táblázat szerint a 3. és 4. héten szignifikánsan csökkentette az egerekben a melanoma növekedését a kontroll csoporthoz képest (t teszt). A cimetidin és DPPE kombinációhoz viszonyítva a ranitidin gyengébb és kevésbé tartós gátlást eredményezett a tumornövekedésben. A 6. héten pedig a kontroll csoporthoz képest nagyobb tumornövekedést okozott a ranitidin.

A csak cimetidint, csak DPPE-t, illetve a ranitidin-DPPE kombinációt kapott csoportban a tumortérfogatok nagyobbak voltak a kontroll csoporthoz képest, a különbség csak a cimetidint kapott csoportban volt szignifikáns (ANOVA, Holm-Sidak teszt).

HETEK	KONTROLL	RANITIDIN	DPPE	DPPE+RANITIDIN
1	0.004 ± 0.001	0 ± 0	0.014 ± 0.004	0 ± 0
2	0.016 ± 0.007	0.004 ± 0.002	0.092 ± 0.042	0 ± 0
3	0.154 ± 0.041	0.032 ± 0.017 *	0.763 ± 0.138	0.173 ± 0.049
4	0.543 ± 0.139	0.163 ± 0.071 *	1.429 ± 0.302	0.635 ± 0.123
5	0.679 ± 0.136	0.416 ± 0.181	1.714 ± 0.620	0.912 ± 0.135
6	0.820 ± 0.205	1.025 ± 0.511	1.988 ± 0.812	1.758 ± 0.312
7	0.986 ± 0.188	+	+	2.889 ± 0.999
8	1.978 ± 0.382	+	+	+
9	3.454 ± 0.755	+	+	+

2. táblázat A ranitidin és DPPE (N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl) kezelés hatása a HT168 melanoma sejttel oltott SCID egerek tumornövekedésére. Az eredményeket átlag tumortérfogatban (mean $\pm$ SEM) (cm³) tüntetjük fel.

A hetek a tumor injektálás utáni időtartományt jelölik. * $P < 0.05$ (**félkövér betűvel**)=szignifikáns érték a megfelelő kontroll csoporthoz viszonyítva. ANOVA vagy Student t-tesztet használtunk. $n=7-36$ csoportonként, az eredmények (mean $\pm$ SEM) megfelelnek az átlag tumortérfogatnak (cm³) az 5×10^6 tumorsejt oltást követő növekedés különböző periódusaiban. + nincs élő állat az adott csoportban.

H2 receptor antagonisták (cimetidin, ranitidin) és DPPE hatása a tumor kialakulási potenciálra SCID egerekben

A kísérlet során a kontroll csoportba tartozó egerek 83%-ában fejlődött ki tumor, a DPPE és cimetidinnel kombináltan kezelt csoportban viszont csak az egerek 33%-ában találtunk tumort. Ez a különbség szignifikánsnak bizonyult Fisher tesztet használva. A ranitidinnel önmagában kezelt egerek 55%-ában nőtt tumor. A DPPE-t, illetve cimetidint önmagában kapott egerek, valamint a DPPE és ranitidin kombinációval együttesen kezelt egerek 100%-ában tapasztaltunk tumornövekedést.

Megvizsgáltuk, hogy hogyan változik meg antihisztamin ágensek hatására a melanoma tumorsejtekből a tumorok kifejlődésének potenciálja az idő függvényében (8. ábra). Eredményeinket úgy kaptuk, hogy meghatároztuk az adott csoportba tartozó (azaz az adott ágenssel kezelt, vagy kontroll csoportba tartozó) tumorral rendelkező egerek arányát az azonos csoportban, ugyanazon időpontban élő összes egér számához viszonyítva.

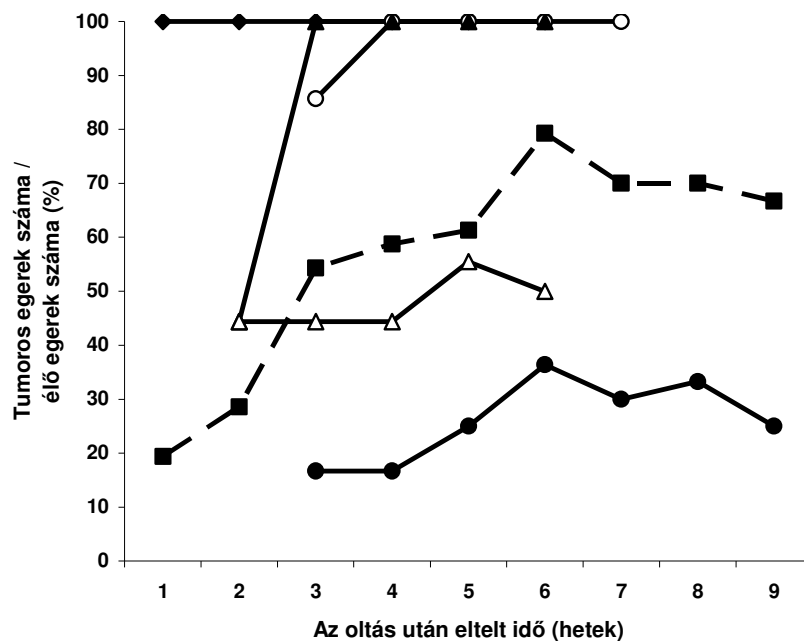
A kontroll csoportban már az első héten nőtték tumorok. A cimetidinnel és DPPE-vel kombináltan kezelt csoportban a kontrollhoz képest később, a 3. héttől indult meg a tumornövekedés. A cimetidin és DPPE-vel együttesen kezelt egerekben alacsonyabb volt a tumor kifejlődési potenciál a kontroll csoporthoz képest.

A DPPE-t önmagában kapott egerek mindegyikében már az 1. héten tumornövekedést tapasztaltunk, és a 6. hétig (amíg élő egér volt ebben a csoportban) 100 %-os maradt a tumoros egerek aránya.

A cimetidinnel önmagában kezelt csoportban a 2. héten jelentkeztek tumorok, és a 3. héttől az összes egérben növekedett tumor.

A ranitidint önmagában alkalmazva, a 2. héttől tapasztaltunk tumornövekedést. A 3. héttől ez a csoport alacsonyabb mértékű tumor kialakulási potenciált mutatott, mint a kontroll csoport; viszont a cimetidin és DPPE-t kombináltan kapott csoporthoz képest ez a tumornövekedési potenciál magasabb volt.

A DPPE és ranitidin kombinációval kezelt csoportban a tumorok kifejlődése a 3. héttől kezdődött ugyan, de gyors mértékű volt, a 4. héttől az összes ebbe a csoportba tartozó élő egér tumorral rendelkezett.



8. ábra Hisztamin antagonisták hatása a SCID egerekben növekvő HT 168 melanoma tumor kialakulási potenciáljára.

A hetek a tumor injektálás utáni időtartományt jelölik. Az eredmények az adott csoportba tartozó, tumorral rendelkező állatok számának és az azonos csoportba tartozó élő állatok számának arányai, ugyanazon időpontban vizsgálva. ■, kontroll (n=36); ◆, DPPE (4mg/kg/nap) (n=8); ●, cimetidin (50mg/kg/nap) DPPE-vel kombinálva (4mg/kg/nap) (n=12); ○, ranitidin (50mg/kg/nap) DPPE mellett (4mg/kg/nap) (n=7); ▲, cimetidin (50mg/kg/nap) (n=9); △, ranitidin (50mg/kg/nap) (n=9).

A cimetidin és DPPE kombinációval kezelt csoportban, a 3. héttől a tumort hordozó egerek aránya jelentősen alacsonyabb a kontroll csoporthoz képest.

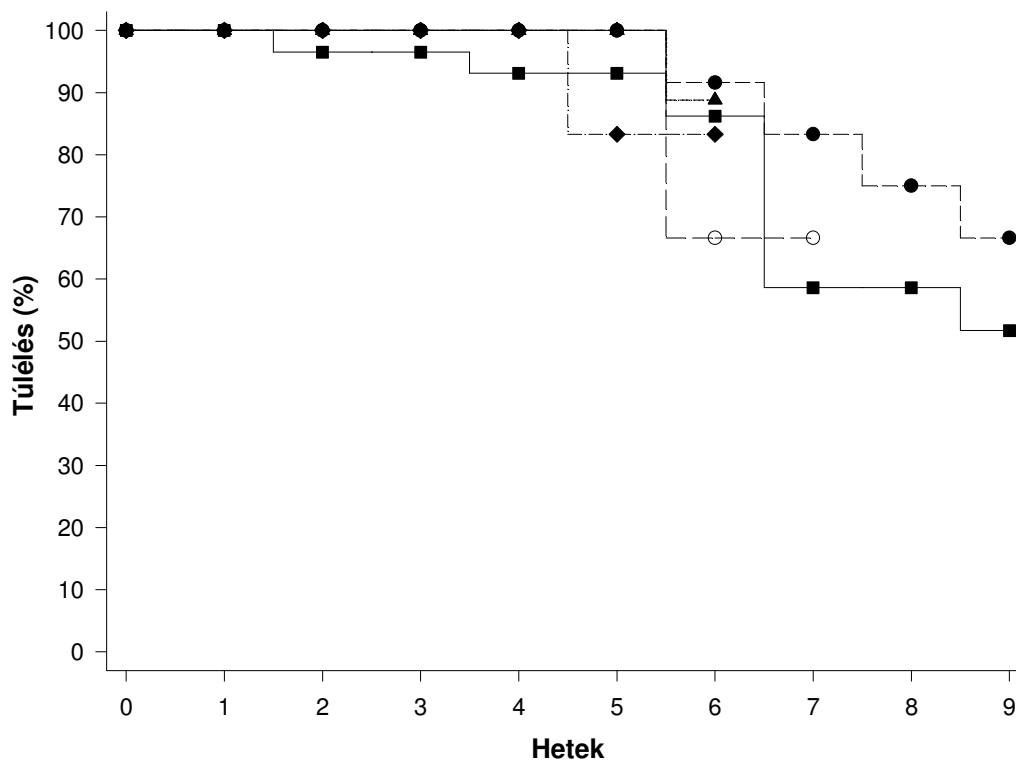
A 3. héten a kontroll csoportba tartozó egerek 54.3%-ában fejlődött ki tumor, a cimetidin és DPPE kombinációt kapott csoportban viszont csak az egerek 16.7%-ában nőtt tumor. A ranitidinnel önmagában kezelt egerek, ugyanezen a héten, a kontroll csoporthoz képest kisebb arányban (44.4%) hordoztak tumort. Ez a különbség azonban a cimetidin és DPPE kombinációt kapott csoporthoz képest nem volt jelentős. A cimetidinnel, illetve DPPE-vel önmagában kezelt csoportokban mindegyik egér tumoros volt a 3. héten, a DPPE és ranitidinnel kombináltan kezelt egerek 85.7%-a hordozott tumort.

A 6. héten a kontroll csoportba tartozó egerek 79.3%-ában fejlődött ki tumor, a DPPE-t cimetidinnel kombinálva kezelt csoportban viszont az egerek 36.4%-ában találtunk tumort. A ranitidinnel önmagában kezelt egerek 50%-ában nőtt tumor. A DPPE illetve cimetidinnel önmagában kezelt, valamint a DPPE és ranitidin kombinációt kapott egerek mindegyikében tumornövekedést találtunk ugyanekkor.

Az átlagos tumortérfogat mellett tehát a tumornövekedési potenciál is alacsonyabb volt a DPPE-t és cimetidint együttesen kapott egerek esetében a kontroll és más kezelt csoportokhoz képest.

A cimetidinnel, ranitidinnel, DPPE-vel, valamint ezek kombinációival kezelt SCID egerek és a kontroll csoport túlélésének nyomonkövetése

A különböző antihisztamin ágensekkel kezelt SCID egerek túlélését nyomonkövetve, az előzőekkel összhangban levő eredményt kaptunk, azaz a cimetidin és DPPE-vel kombináltan kezelt egerek túlélése meghaladta a kontroll és más kezelt csoportok túlélését (9. ábra). A különbség statisztikailag nem volt szignifikáns a kontroll csoporthoz képest Logrank tesztet alkalmazva. Statisztikailag várható szignifikáns különbség kimutatásához jóval nagyobb egérszám lenne szükséges, ami technikailag nem volt megoldható. Eredményeinket úgy kaptuk, hogy meghatároztuk az adott csoportba tartozó élő egerek (azaz az adott ágenssel kezelt, vagy kontroll csoportba tartozó egerek) arányát az azonos csoportbeli kiindulási egérszámhoz viszonyítva.



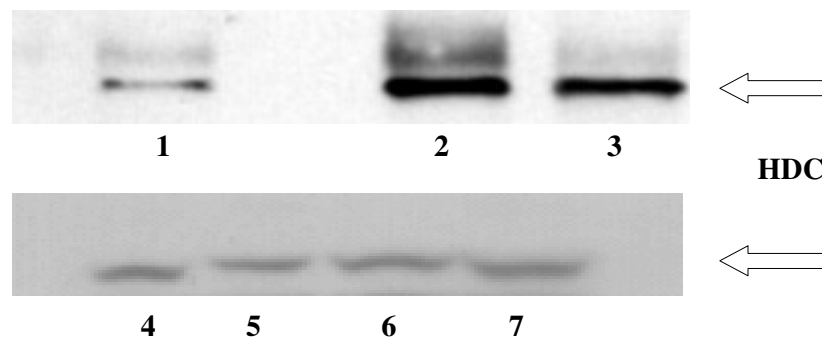
9. ábra HT168 humán melanoma sejttel oltott SCID egerek túlélési mutatói különböző kezelések után. ■, kontroll (n=36); ◆, DPPE (4mg/kg/nap) (n=8); ●, cimetidin (50mg/kg/nap) DPPE-vel kombinálva (4mg/kg/nap) (n=12); ○, ranitidin (50mg/kg/nap) DPPE mellett (4mg/kg/nap) (n=7); ▲, cimetidin (50mg/kg/nap) (n=9); △, ranitidin (50mg/kg/nap) (n=9). A ranitidinnel és a cimetidinnel kezelt csoport túlélését jelölő vonalak egybeesnek.

A 6. héten a cimetidin és DPPE kombinációt kapott egerek 91.6%-a élt, ami felülmúlta a többi csoport túlélését. A kontroll csoportba tartozó egerek túlélése ugyanis 86.2% volt. A cimetidint, ranitidint önmagában kapott egerek 88.8%-a élt, DPPE-t önmagában kapott egerek 83.3%-a. A DPPE és ranitidin kombinációval kezelt csoport túlélése 66.6% volt.

A 9. héten a cimetidin és DPPE-vel kombináltan kezelt csoport túlélése 66.6% volt. Ezen a héten a kontroll csoport 51.7%-a élt. A DPPE-vel, ranitidinnel illetve cimetidinnel önmagában kezelt egerek túlélését a 6. hétig, a DPPE és ranitidinnel kombináltan kezelt egerek túlélését pedig a 7. hétig követhettük nyomon, mivel egy részük spontán elhalálozott, másik részüknél pedig a tumortérfogat ekkorra elérte a 2 cm³-t, ezért szövettani feldolgozásra kerültek.

A HT 168 melanoma sejtek in vitro és in vivo HDC expressziójának Western blot analízissel történő összehasonlítása

A HT 168 melanoma sejtek in vitro és in vivo HDC expresszióját Western blot analízissel hasonlítottuk össze (10. ábra). Az antihisztaminok jelenlétét vagy hiányát figyelmen kívül hagyva, a HT168 sejtek HDC expressziója nagyobb mértékű volt in vivo körülmények között, mint in vitro tenyésztett sejtek esetében (10. ábra, felső rész). A különböző in vivo kezelések nem befolyásolták a HDC fehérje mennyiségét a szöveti kivonatokban (10. ábra, alsó rész). A ranitidinnel kezelt egerek esetében enyhe eltolódást találtunk a HDC sáv helyzetében (4. és 7. vonal), melynek oka nem ismert.

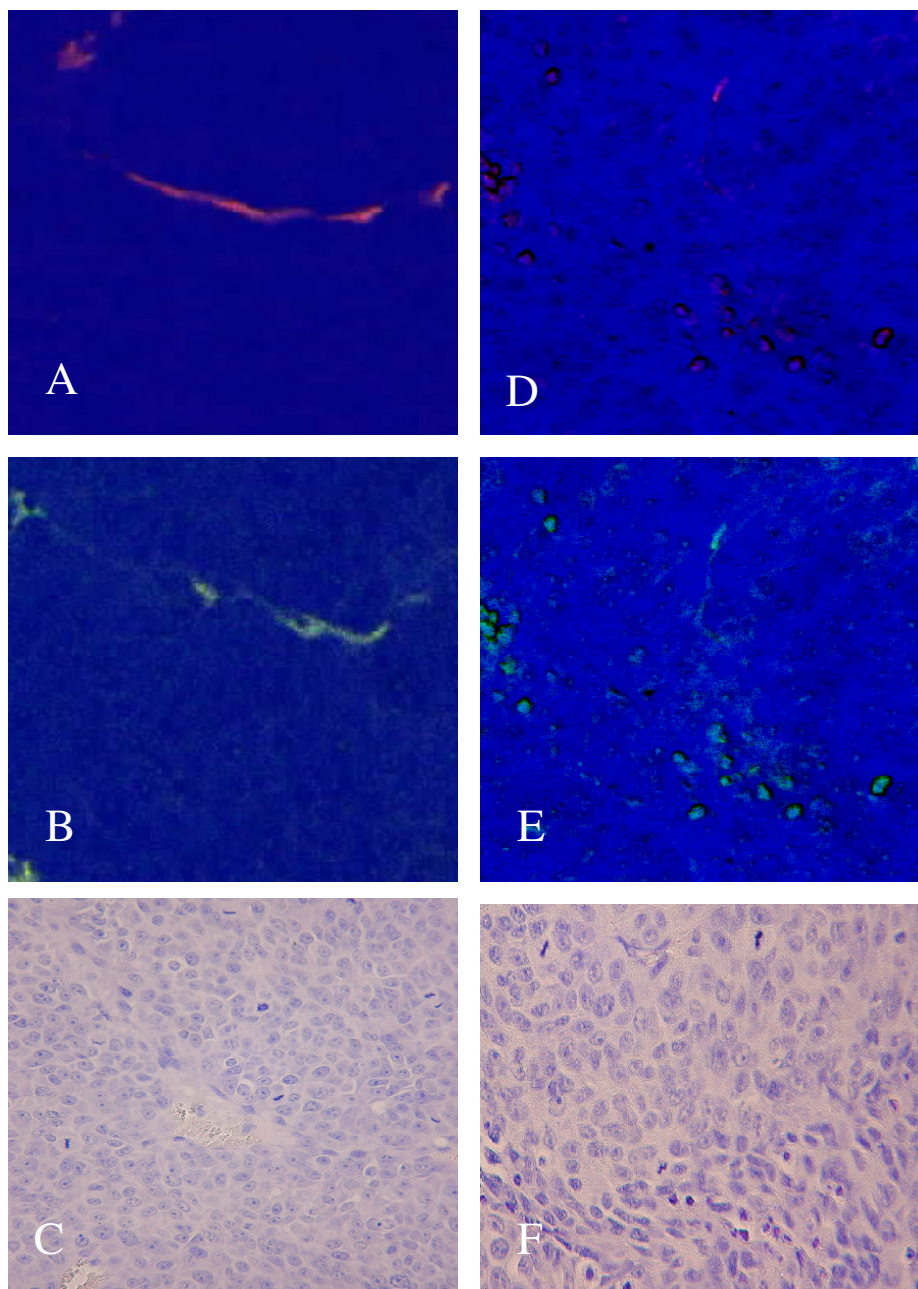


10. ábra A HT 168 melanoma sejtekben mért HDC expresszió

A HT168 sejtekben in vitro mért HDC expresszió Western blot analízise (1. sáv) valamint az in vivo értékek (2., 3. sáv) (**felső rész**), majd az in vivo értékek kezelés után (4. sáv, DPPE + ranitidin; 5. sáv, DPPE + cimetidin; 6.sáv, cimetidin; 7. sáv, ranitidin) (**alsó rész**). A nyílak a HDC sáv 55 kDa-ját jelölik.

A kifejlődött tumorok szövettani szerkezetének, immunreaktivitásának, a tumort infiltráló sejteknek a vizsgálata

Szövettani analízis igazolta a humán melanoma kifejlődését SCID egerekben, valamint a metasztázisok hiányát. A HT168-al oltott, majd cimetidin és DPPE-vel együttesen kezelt egerek szöveti mintáinak (11. ábra D, E, F) hisztológiai feldolgoása és immunreaktivitás vizsgálata azt mutatta, hogy ez a kombinált kezelés megnöveli az IFN- γ -t termelő egér makrofágok infiltrációját, a csak HT168-al oltott kontroll állatokban (tumoros kontroll egerek 11. ábra A, B, C) kifejlődött tumorokhoz képest. Hasonló tendenciát láttunk, de kevesebb sejt infiltrálta a tumort, amikor a természetes ölő sejteket (NK) vizsgáltuk (az adatokat nem mutatjuk).



11. ábra HT168 humán melanoma sejttel oltott SCID egerekben kifejlődött tumorok hisztológiája és immunreaktivitás vizsgálata.

A HT168-al oltott egerek szövettani képe kezelés nélkül (**A - C**), valamint a cimetidinnel és DPPE-vel kezelt egerekben (**D - F**): normál szövettan (haematoxinilin eozin; **C** és **F**), makrofágok kimutatása (CD11b; **A** és **D**), valamint INF- γ kimutatása (**B** és **E**). A nagyítás 1:40.

VI. EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALVA

Eredményeinket összefoglalva az alábbiakat kaptuk :

1. Mind HT168, mind M1 melanoma sejtek esetén, in vitro, a cimetidin a tamoxifen származék N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl-al (DPPE-vel) kombinálva szignifikánsan csökkentette a tumorsejtek proliferációját. A ranitidin pedig önmagában mérsékeltebb csökkenést eredményezett.
2. HT168 sejtekben igazoltuk a H2 receptor mRNS jelenlétét, kimutattuk az ezen sejteken levő H2 receptorok aktivitását.
3. In vivo kísérleteink során az átlagos tumortérfogat nagyobb, az in vivo tumornövekedés gyorsabb volt az M1 sejtekkel oltott egerek esetén, mint a HT168 sejtekkel oltott egereknél.
4. Vizsgálataink szerint a H2 receptor antagonistá cimetidin a DPPE-vel kombináltan alkalmazva, in vivo nagymértékben csökkenti a HT168 melanoma növekedését SCID egerekben.
5. Az antihisztamin ágenseknek a melanoma tumorok kialakulására kifejtett hatását vizsgálva azt találtuk, hogy a tumornövekedési potenciál is alacsonyabb volt a DPPE-t és cimetidint együttesen kapott egerek esetében a kontrollhoz és a többi kezelt csoporthoz képest.
6. A cimetidinnel és DPPE-vel kombináltan kezelt egerek túlélése szignifikánsan meghaladta a kontroll és a többi kezelt csoport túlélését.
7. Western blot analízis alapján a HT168 sejtek HDC expressziója nagyobb mértékű volt in vivo körülmények között, mint in vitro tenyésztett sejtek esetében, a különböző in vivo kezelések azonban nem befolyásolták a HDC fehérje mennyiségét a szöveti kivonatokban.
8. A cimetidin és DPPE-vel együttesen kezelt egerekben kifejlődött tumorok szövettani feldolgozása és az immunreaktivitás vizsgálata igazolta, hogy ez a kezelés megnöveli az IFN- γ -t termelő egér makrofágok infiltrációját, és kisebb mértékben a természetes öló sejtek (NK sejtek) felhalmozódását a kezelt állatokban növekvő tumorokban, szemben a kontroll csoporttal.

VII. MEGBESZÉLÉS

Autonóm hisztamin metabolizmus melanomában

A hisztamin szinte minden eddig vizsgált osztódó sejtben kimutatható, szerepe van a sejtosztódás szabályozásában (29), így a tumornövekedés folyamatában is. A hisztidin dekarboxiláz (HDC) a hisztamin termeléséért egyedül felelős enzim, specifikus markerként szolgál a hisztamin bioszintézisében. A HDC proteint, és enzimatis aktivitását, azaz a hisztamin produkciót kódoló mRNS szintje megnövekszik különböző humán, valamint más emlősök tumoraiban, például colorectalis, glia, prostata, ovarium tumorokban (95).

A malignus melanoma sejtek és melanomás szövetek (úgy a primer, mint a metasztatikus) a melanocitákkal ellentétben emelkedett mennyiségben tartalmaznak HDC-t (28). A magas enzimszint következtében a melanomás szövetekben és sejtvonalakban igen magas a hisztamin koncentrációja. Ez is alátámasztja a hisztamin kiemelt szerepét a melanoma sejtek proliferációjában (45). A HDC transzlációt gátló, HDC specifikus antiszenz oligonukleotidok alkalmazása mellett Falus és munkacsoportja melanoma sejtek proliferációjának csökkenését tapasztalta (46). Genetikailag módosított, különböző mennyiségű HDC-t termelő egér melanoma sejtek in vivo növekedését vizsgálva Hegyesi és munkatársai megállapították, hogy a hisztamintermelés emelkedésével együtt kifejezetten nőtt a tumorok mérete, és nőtt a metasztatikus potenciál is (41). Kimutatták, hogy humán melanoma sejtekben az exogén adott hisztamin egy protoonkogén szintézisét stimulálja, és ez a hatás H2 receptorokon keresztül valósul meg (47).

A melanoma sejtek egyaránt képesek a hisztamin felszabadítására, valamint környezetükből történő felvételére. Mivel a melanoma sejtek enzimatisan aktív HDC proteint expresszálnak, képesek endogén módon hisztamin szintetizálására. Az endogén termelődött hisztamin autokrin növekedési faktorként szabályozza a proliferációt korai stádiumú melanomában, míg a hízósejtek vagy más környező sejtek által termelt hisztamin a betegség előrehaladott, metasztatikus fázisában a növekedés parakrin szabályozásában játszik szerepet (96). A termelődött hisztamin az

extracelluláris térbe kerülve a célsejtek plazmamembránjában található H1, H2 és H3 hisztamin receptorokhoz kapcsolódik (32).

A hisztaminnak hisztamin receptorokon keresztül megvalósuló direkt hatása melanomában

A H1 és H2 hisztamin receptorok nemcsak az exogén, más sejtek által termelt, hanem a melanoma sejtek által szintetizált és felszabadított hisztamint is képesek megkötni. A melanoma sejtek közötti különbség, amely a hisztamin termelő és lebontó kapacitásukban jelentkezik, magyarázza az egyes melanoma sejt típusok különböző érzékenységet az exogén hisztaminra (45).

Az endogén módon termelődött hisztamin hatása a melanoma sejt növekedés szabályozására attól függ, hogy H1 vagy H2 receptorok vannak-e túlsúlyban a célsejtek felszínén. Az aktuális receptor aránytól függően, a hisztamin a melanoma sejtekben a H1 hisztamin receptorokon át csökkenti a sejtproliferációt, míg a H2 receptorokon át elősegíti a növekedést (45, 95). H2 receptor antagonistá jelenlétében a hisztamin elnyomja a melanoma sejtek növekedését, egyrészt H1 receptorokon át, másrészt azért, hogy a H2 receptorokhoz nem marad szabad hozzáférés.

Falus és munkacsoportja HDC deficiens egerekkel folytatott vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy a hisztamin tartós hiánya ezen egerek számos szövetében a H2 receptorok szövetspecifikus down regulációját okozza. Exogén adott hisztamin megszünteti ezt a változást a H2 receptor expresszióban. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a H2 receptor expresszió a hisztamin kontrollja alatt áll egerekben (97).

A hisztamin H2 receptorokhoz való kapcsolódását gátolhatjuk a hisztamin antagonistá cimetidin vagy ranitidin által. A termelődött hisztamin egy része a sejtben marad, és az intracelluláris citokróm P450 sejtalkotóhoz kötődik (iHR), mely a mikroszómákban és a magrészben található (35, 52, 53). Ezt a kötődést hatékonyan gátolhatjuk a tamoxifen származék DPPE-vel (53, 54, 55).

A DPPE, cimetidin, ranitidin szerepe a tumorproliferációban

A tamoxifen származék DPPE korábban leírt antihisztamin hatása azon alapszik, hogy a DPPE befolyásolja a hisztamin citokróm P450 molekulákhoz való kötődését (53). A DPPE hatása a legtöbb esetben összhangban van a HDC gátló α -FMH hatásával, amely a hisztamin de novo termelődésének blokkolásával gátolja a májtumorok és a colorectalis carcinomák mind in vivo mind in vitro proliferációját (58, 59). Ugyanakkor más források szerint a DPPE önmagában stimulálja az in vivo tumornövekedést emlőtumoros patkányokban és leukémiás egerekben (53, 60). Úgy találták, hogy a DPPE gátolja a limfoid leukémiás betegek magas HDC tartalmú limfocitáinak in vitro növekedését (62). Megállapították, hogy a DPPE a krónikus myeloid leukémiás sejtek növekedését gátolja (43). Emlőrákban és prosztatarákban a DPPE kemoterápiával alkalmazva megvédi a szervezetet a citotoxikus hatásoktól (65, 66). Falus és munkacsoportja szerint a DPPE jelentős sejtosztódás gátlást okoz melanoma sejtekben (27). Kombináltan alkalmazva a DPPE a cimetidin hatásosságát fokozza. Ennek a hatásnak a mechanizmusa még nem ismert.

A cimetidin számos tumor növekedését gátolja, mind in vitro mind in vivo (69, 70). Gátolja a neoplasztikus glia tumor in vitro növekedését (75). Csökkenti immunszupprimált egerekbe ültetett humán bronchus carcinoma (74), nude egerekbe oltott humán ovarium carcinoma (76) növekedését. A cimetidin szignifikánsan csökkentette melanomával transzplantált egerekben a tumornövekedést (50). Klinikai II. fázisú vizsgálatok igazolták a cimetidin terápia létjogosultságát melanomás betegek esetében (87, 92).

A cimetidinnel ellentétben a ranitidin, egy másik hatásos hisztamin H₂ antagonistája nem gátolja sem a humán colon tumorsejtek proliferációját, sem ezen sejtek in vivo növekedését (81).

Bár mind a ranitidin, mind a cimetidin H₂ receptor antagonisták, eltérő szerkezettel bírnak, és a receptorokhoz különböző kötődési affinitással rendelkeznek (98). Ez is szerepet játszhat a munkánk során tapasztalt hatásbeli különbségükben.

Antihisztaminok hatása a melanoma sejtek in vitro és in vivo növekedésére

In vitro kísérletek során igazoltuk, hogy a melanoma sejtek H2 receptorokat expresszálnak, ezt korábbi eredmények is alátámasztják (27, 28). Megállapítottuk, hogy a hisztamin receptorok blokkolása cimetidinnel és DPPE-vel kombináltan végzett kezelés során gátolja a melanoma in vitro növekedését, mind HT168, mind M1 sejtek esetében. Ezzel összhangban vannak in vivo eredményeink, melyek azt mutatják, hogy a H2 hisztamin receptor blokkoló cimetidin kombináltan alkalmazva az intracelluláris P450 sejtalkotórész egyik ligandjával, a DPPE-vel, hatékonyan csökkenti a SCID egérbe transzplantált HT168 humán melanoma in vivo növekedését. Az átlagos tumortérfogat mellett, a melanoma tumorsejtekből a tumorok kifejlődésének potenciálja is alacsonyabb volt a DPPE-t és cimetidint együttesen kapott egerek esetében. A DPPE és cimetidin kombinált kezelés növeli továbbá az immundeficiens egerek túlélését, habár nincsen nyilvánvaló korreláció a tumor növekedés/méret és az állatok túlélése között.

A ranitidin önmagában adva, a cimetidin és DPPE kombinációhoz képest kevésbé csökkenti a SCID egerekbe oltott HT168 melanoma sejtek növekedését.

In vivo kísérleteink során megállapítottuk, hogy a HT 168 melanoma sejtek alacsonyabb tumornövekedési potenciált mutatnak, mint az M1 sejtek, amint ezt korábbi adatok is alátámasztják (93). A HT 168 sejtekkel oltott egerek hosszabb túlélése miatt használtuk ezen sejtvonalat további kísérleteink során.

A hisztamin és a lokális immunválasz, a hisztamin indirekt hatása melanomában

Immunhisztokémiai vizsgálataink szerint a cimetidin és DPPE-vel végzett kombinált kezelés során tapasztalt sejtproliferáció csökkenés összefügg az INF- γ -t termelő egér makrofágok masszív tumor infiltrációjával és kisebb mértékben az NK sejtek felhalmozódásával a tumoros szövetekben. Az IFN- γ megemelkedett koncentrációja pedig a sejtproliferáció gátlásával jár, a természetes ölü sejtek direkt stimulációja révén (99, 100).

A hisztológiai vizsgálat eredménye azt jelzi, hogy a hisztamin melanoma növekedésre kifejtett direkt hatása mellett, amely a hisztamin receptorok típusától és egyensúlyától függ, a hisztamin lokálisan befolyásolja a környező immunsejteket.

Az IFN- γ megemelkedett mennyisége a sejtproliferáció gátlását eredményezi melanomában

Eredményeink szerint mind a ranitidin önmagában adva, mind a cimetidin DPPE-vel kombináltan alkalmazva csökkenti a tumornövekedést egerekben in vivo, bár különböző intenzitással. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a ranitidin kevésbé csökkenti a SCID egérbe oltott melanoma növekedését. Ezt az adatot magyarázhatják Falus munkacsoportjának azok az eredményei is, miszerint a ranitidinnel ellentétben a cimetidin jelentősen megnöveli a humán limfociták IFN- γ produkcióját (99) egy lehetséges hisztamin-független útvonalon, valószínűleg citokróm P450 sejtalkotórész által. Ugyanakkor az IFN- γ megemelkedett koncentrációja a sejtproliferáció gátlását eredményezi a természetes ölü sejtek direkt stimulációja által. Az NK sejtek és az IFN- γ megnövelik az immunválaszt, amely csökkenti a tumornövekedést (100). Mindez indokolhatja azt is, miért volt a cimetidin hatékony, a ranitidin viszont kevésbé a HT168 humán melanoma sejtekkel végzett kísérleteink során. Hermodsson és munkacsoportja szerint a megemelkedett hisztamin szint amellett, hogy elősegíti a tumorsejtek proliferációját, immunszuppresszív hatással is rendelkezik, amely elősegíti a tumorsejtek növekedését, azáltal, hogy kikapcsolja a természetes ölü sejtek aktivitását (85). A cimetidin csökkentheti a sejtproliferációt az NK sejtekre kifejtett hisztamin mediált gátló hatás felfüggesztése révén (92). A DPPE kombináltan adva a cimetidinnel, annak hatásosságát növeli, ennek a hatásnak a mechanizmusa azonban még nem ismert.

A humán rekombináns IFN- γ és IFN- α hatékonyan használt anyag a malignus betegségek immunterápiájában, beleértve a magas rizikójú melanomát is. Ezen citokinek hasznát több in vitro és in vivo kísérleti és klinikai terápiás adat alátámasztja, bár antitumor aktivitásuk pontos mechanizmusa még nem ismert (101, 102). Az interferonok mint növekedés gátló faktorok játszanak szerepet, és a proliferációs génekre hatva számos sejt terminális differenciálódását indukálják

(101). Ezen citokinek potenciális immunszabályozó hatásához tartozik az a képességük, hogy növelik a tumor antigén prezentációt az MHC I és II molekulák felszíni expressziójának fokozása által. Az interferonok továbbá hatékony aktivátorai az NK sejtek antitumor tevékenységének (102).

Az IFN- γ és az NK sejtek tumorproliferációban betöltött jelentőségét, valamint expressziójuk cimetidin általi fokozódását támasztják alá az alábbi irodalmi adatok:

Az antitumor hatású IFN- γ alacsony expresszióját a cimetidin megnövelte Balb/c egerekbe oltott colon carcinoma sejtek esetében (103).

A cimetidin megnövelte az NK és LAK sejtek (limfokin-aktivált ölü sejtek) aktivitását in vivo BALB/c egerekbe oltott colon adenocarcinomában (104), továbbá fokozta az NK sejtek aktivitását ovarium tumoros (77), prostata tumoros (105) és melanomás (106) betegekben. A ranitidin nem befolyásolta az NK sejtfunkciót Swiss albino egerekbe oltott limfomás és melanomás sejtekben (107).

Flodgren és munkatársa szerint a cimetidin melanomás betegekben gátolhatja a sejtproliferációt NK sejtek stimulálása révén (106). Továbbá a cimetidin és a ranitidin is jelentősen csökkenti egerekbe oltott melanoma növekedését NK sejtek aktivitásának fokozása által Hellstrand és munkatársai megfigyelése szerint (85).

Más szerzők egyéb mechanizmust tartottak fontosnak a hisztamin antagonisták hatásmechanizmusában:

Egyesek szerint a cimetidin (108), és a ranitidin is (109) gátolja a szuppresszor T limfociták aktivitását. Flodgren és munkatársai szerint a cimetidin fokozza az IFN- α tumorelles hatását metasztatikus melanomás betegekben, a szuppresszor T sejtek gátlása által (110). Mások azt állítják, hogy a cimetidin és a ranitidin fokozhatja a helper T sejtek IL-2 termelését (111).

Dinarello és munkatársai szerint a TNF- α gén expresszióját és szintézisét a hisztamin csökkenti H₂ receptorok által; a H₂ receptor antagonisták pedig a hisztamin által csökkentett TNF- α szintézist növelik meg (112).

Duda Ernő és munkacsoportjával korábban folytatott munkánk során megállapítottuk, hogy membránkötött TNF- α prekursor formáját termelő humán

cervix carcinoma (HeLa) sejtekkel transzplantált SCID egerekben a tumornövekedés szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest (113). A TNF- α transzformált sejtekkel tenyésztett makrofágok megnövekedett fagocitózist és citokin termelést mutattak; jelezve, hogy az aktivált makrofágok a tumorellenes válasz mediátorai lehetnek.

Falus és munkatársai az utóbbi időben kifejlesztett HDC deficiens egerekben igazolták, hogy ezen állatok magas TNF- α szinttel rendelkeznek. A HDC deficiens egerekben a hisztamin a H2 receptorokon keresztül gátolja a tumorellenes hatású citokinek, így az IFN- γ vagy a TNF- α produkcióját a tumoros szövetekben (114). Ez is mutatja az antihisztaminok IFN- γ , TNF- α mennyiséget fokozó hatásának jelentőségét a tumoros sejtprolifерáció csökkentésében. Továbbá felveti a hisztamin antagonisták TNF rendszeren keresztüli hatásmechanizmusát.

A hisztamin és az IFN- γ között kölcsönös gátló hatás tapasztalható

Mivel a SCID egerek sérült T sejt rendszerrel bírnak, az antihisztaminoknak a melanoma sejtekre kifejtett direkt gátló hatása mellett, mely H2 receptorokon keresztül valósul meg, az egyik lehetséges magyarázat az eredményeinkre, hogy a cimetidin és a DPPE helyileg aktiválhatja az IFN- γ -t termelő egér makrofágokat (és az NK sejteket), és ezen sejtek megváltoztatják a HT168 sejtek általi tumorképződést. Ezt az összetett kölcsönhatást tovább bonyolítja, hogy Hegyesi és munkatársainak megállapítása szerint az IFN- γ elnyomja a HDC mRNS és protein expressziót humán HT168 melanoma sejtekben in vitro (115), habár munkánk során a HDC in vitro és in vivo expresszióját összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a hisztamin antagonisták nem befolyásolták jelentősen a HDC expressziót, amely alacsonyabb volt in vitro, mint in vivo körülmények között.

Korábban bebizonyították a hisztamin gátló hatását az IFN- γ gén expressziójára, ugyanakkor kölcsönös gátló hatás tapasztalható a hisztamin és az IFN- γ között. Falus és munkatársai kimutatták, hogy mind az IFN- α , mind az IFN- γ csökkentette a HDC mRNS és protein expressziót, különböző kinetikával. Az IFN- γ erős proliferáció gátlást okozott humán HT168 melanoma sejteken, míg az IFN- α mérsékeltebb hatást mutatott (115).

Újabb irodalmi adatok szerint a hisztamin T helper 2 (Th2) típusú eltolódást okoz: amellet, hogy csökkenti az IFN- γ termelődését, gátolja az IL-12 expresszióját, ugyanakkor növeli az IL-10, az IL-6 produkcióját (95, 116). Az interferonok pedig a HDC expressziót elnyomva és csökkentve a lokális hisztamin koncentrációt, gátolják a lokális hisztamin hatást, ezáltal indirekt módon megnövelik a T helper 1 (Th1) citokinek szintézisét (115).

Falus és munkacsoportjának megállapítása szerint valószínű, hogy létezik egy egymást gátló kölcsönhatás melanomában az endogén hisztamin és a lokális immunrendszer sejtei között (117). Az IFN- γ -tól eltérően, legalábbis az előrehaladott stádiumú melanomában, stimuláló kölcsönhatás mutatkozik az interleukin-6 (IL-6) és a hisztamin között. A primer melanoma sejtekben az IL-6 gátolja a sejtnövekedést, míg metasztatizáló melanomában elősegíti a proliferációt. A hisztamin által indukálható (118) interleukin-6 úgy tűnik, hogy szerepet játszik a késői stádiumú melanomában mint egy autokrin támogató faktor (119), és ez arra utal, hogy egy igen összetett rendszer működik közre a melanoma növekedés in situ szabályozásában (120).

A hisztamin kétarcú hatása melanomában, az antihisztaminok kettős támadáspontja

A hisztamin autokrin (endogén) és parakrin (exogén) módon befolyásolja a melanoma sejtek proliferációját. Ebben a korábban vázolt bonyolult szabályozásban **a hisztamin egyik célpontja** a melanoma sejtek felszínén levő H1 és H2 hisztamin receptorok. Mivel a HDC erősen expresszálódik melanoma sejtekben és szövetekben, a melanoma növekedésének H2 hisztamin receptorok általi autokrin fokozódása feltételezhető (45). Eredményeink azt mutatják, hogy a HT168 melanoma sejtvonal H2 receptorokat expresszál, és ezek blokkolása cimetidin-DPPE kombinációval, gátolja a melanoma növekedését.

A H1 és H2 receptorok száma és elérhetősége, valamint lokális egyensúlyuk fontos tényezők, melyek meghatározzák, hogy a hisztamin elősegíti vagy elnyomja a melanoma növekedését. A hisztamin a receptor típusától függően kétféleképpen

hathat, vagy növeli, vagy csökkenti a melanoma növekedését (45, 95). A különböző antihisztaminok eltolhatják ezt a helyi egyensúlyt, és ezzel befolyásolják a hisztamin hatékonyságát a melanoma növekedésére. Ez a tény a melanoma kezelésében a hisztamin receptor antagonistáknak egy lehetséges új szerepet adhat.

A hisztamin másik célpontja a lokális bevándorló immunsejtek, melyekre hatva befolyásolja az immunválaszt, többek között azáltal, hogy Th2 eltolódást okoz, amely elősegíti a tumor túlélését (95). Újabban leírták, hogy a Th1 válaszok elsősorban a H1 receptorokon, míg a Th2 válaszok a H2 receptorokon dominálnak (121).

Eredményeink arra utalnak tehát, hogy a melanoma növekedés szabályozásában egyidejűleg két különböző mechanizmus játszhat szerepet:

Az egyik mechanizmus a hisztamin receptorokon keresztül valósul meg. A H2 receptor antagonisták (cimetidin, ranitidin) egyrészt közvetlenül gátolják a melanoma sejtek proliferációját, azáltal, hogy a hisztamin számára nem marad szabad hozzáférés a H2 receptorokhoz, ezzel kikapcsolják a hisztamin H2 receptorokon át megvalósuló tumorproliferációt fokozó hatását; másrészt az emiatt túlsúlyba kerülő H1 receptorokon át a hisztamin csökkenti a tumornövekedést (45, 95). Az endogén úton termelődött hisztaminnak a sejten belül maradó része a mikroszómákban és a magrészen található intracelluláris citokróm P450 sejtalkotóhoz (iHR) kötődik, ezt a kötődést gátolja a DPPE (53).

A másik mechanizmusban a H2 receptor antagonisták által aktivizálódik a lokális immunválasz, amelyet az interferon-gamma produkció jellemez.

A hisztamin jelentős mennyiségű előfordulása melanoma sejtekben és szövetekben további vizsgálatokra ösztönöz a már meglevő és speciálisan megtervezett új antihisztaminok terápiás hatékonyságát illetően. A kutatások új irányvonalát mutatja az utóbbi időben hozzáférhető HDC deficiens rágcselelő modell (114), amely további lehetőséget teremt, hogy tanulmányozzuk a humán medicinában használt antihisztaminok hisztamin receptor függő és független hatását.

Munkánk gyakorlati jelentősége

A melanomás betegek számának az utóbbi években tapasztalt jelentős növekedése sok kutatócsoportot arra késztet, hogy a melanoma sejtek proliferációját in vitro és in vivo módszerekkel tanulmányozzák, a tumorsejtek növekedését csökkentő anyagokat, gyógyszereket találjanak. Mindez alátámasztja munkánk jelentőségét.

Kísérleteink során a SCID egerek a melanoma sejtek beoltását követően másnapról kapták az antihisztamin anyagokat. A cimetidin és DPPE kombinált kezelés hatékonyan csökkentette az egerekbe transzplantált humán melanoma sejtekből kifejlődő tumorok méretét, a tumorok kifejlődésének potenciálját, továbbá megnövelte ezen egerek túlélését. Ezek az eredmények felvetik annak lehetőségét, hogy a cimetidin és DPPE kombináció már a tumor megjelenése előtt rendszeresen alkalmazva profilaktikus lehet a tumor kifejlődésére.

A SCID állatmodell alkalmazása azért hasznos, mivel lehetőséget teremt embereken etikai megfontolásból nem végezhető kísérletek kivitelezésére. A SCID egerekben létrehozott humán orthotopikus melanoma modell alkalmas a tumor progressziójának in vivo tanulmányozására. Segítségével számos, a melanoma malignummal kapcsolatos kérdés reprodukálható módon vizsgálható in vivo körülmények között. A SCID egérmodell segítségével lehetőség nyílik a melanoma terápiájában a későbbiekben felhasználásra kerülhető anyagok tanulmányozására.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A melanoma malignum gyakorisága a világon mindenhol folyamatosan emelkedik, ezért fontos a tumor növekedésének modellezése állatkísérletek segítségével, és a terápiában alkalmazható hatásos gyógyszerek kifejlesztése.

Mivel a melanoma sejtek és szövetek viszonylag nagy mennyiségben tartalmaznak hisztamint és a hisztamin szintéziséért felelős hisztidin dekarboxiláz enzimet, valamint hisztamin receptorokat expresszálnak, specifikus antihisztamin hatású anyagokkal vizsgálható a hisztamin szerepe melanoma sejtekben *in vitro*, és súlyos kombinált immunhiányban szenvedő (SCID) egerekben *in vivo*. Így tanulmányozhatjuk az antihisztaminoknak a melanoma proliferációjára kifejtett hatását.

Korábbi *in vitro* eredményeink azt sugallják, hogy a hisztamin H₂ és iHR receptorokon keresztül elősegíti a melanoma sejtek növekedését. Munkánk során tanulmányoztuk, hogy különböző antihisztamin ágensek, így a cimetidin, a ranitidin, az N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl (DPPE) valamint ezek kombinációi hogyan befolyásolják a humán melanoma HT168 vonal növekedését *in vitro*, illetve immundeficiens SCID egerekbe oltva *in vivo*.

Vizsgálataink szerint, az *in vitro* eredményeinkkel összhangban, humán melanoma sejtekkel xenotranszplantált immunodeficiens egerekben az *in vivo* tumorproliferáció csökkent a H₂ receptor antagonistá cimetidin által, ha kombinációban alkalmaztuk a DPPE-vel. Feltételezhetjük, hogy vannak olyan tényezők, melyek befolyásolják az immundeficiens egerekbe transzplantált HT168 sejtek növekedését, és hogy a cimetidin és DPPE együttesen adva jelentősen hatnak ezen tényezőkre. Az antihisztaminok ezen kombinációja megnöveli a humán melanomával oltott egerek túlélését is. A cimetidin és DPPE kombinációhoz viszonyítva a ranitidin gyengébb és kevésbé tartós, nem szignifikáns gátlást eredményezett a tumornövekedésben.

Ezeket a folyamatokat a tumort infiltráló interferon-gammát termelő egér makrofágok megnövekedett mennyisége kíséri. Két különböző mechanizmus játszhat szerepet egyidejűleg a tumornövekedés csökkentésében: a H₂ receptor antagonisták közvetlenül gátolják a tumorsejt proliferációt, illetve aktivizálódik a lokális immunválasz, amelyet az interferon- γ produkció jellemez. Eredményeink segíthetnek meghatározni az antihisztaminok szerepét a melanoma terápiájában.

IX. SUMMARY

Malignant melanoma is a skin tumour with a very high mortality rate, and the incidence of this tumour is increasing rapidly throughout the world. Consequently it stimulates a plethora of in vitro and in vivo research, modelling melanoma growth on one hand and searching for effective drugs for possible human therapy on the other.

Melanoma cells and tissue but not melanocytes contain significant amounts of histamine and histidine decarboxylase (HDC), the enzyme responsible for the synthesis of histamine, and express histamine receptors. The functional significance of histamine was examined using specific antihistamines in vitro and in vivo in the human melanoma cell line HT168 and severe combined immunodeficiency (SCID) mice.

It was shown that the H₂ receptor antagonist cimetidine when combined with N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]-ethanamine-HCl (DPPE), a tamoxifen derivate, inhibits the proliferation of HT168 cells. Furthermore, it is suggested that there are factors that interfere with the growth of HT168 cells xenografted to immunodeficient mice, and cimetidine and DPPE together may significantly influence these factors. This combination of antihistamines also increases the survival of human melanoma-grafted mice. Ranitidine alone evokes a weaker and more transient inhibition in tumour growth.

These changes are accompanied by enhanced infiltration of interferon- γ -producing mouse macrophages into the tumour tissue. These findings suggest that two different mechanisms are probably acting concordantly: direct inhibition of tumour cell proliferation by the H₂ receptor antagonists, and activation of the local immune response characterized by interferon- γ production. These findings may help to elucidate the possibility of a rationally designed antihistamine strategy in melanoma therapy.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Melanoma Fact Sheet. The Melanoma Research Foundation, 2005
(http://www.melanoma.org/mrf_facts.pdf)
2. The World Health Report 2005. World Health Organization (WHO), 2005
(<http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2005/np07/en/>)
3. The European Health Report 2005. World Health Organization (WHO), 2005 (http://www.euro.who.int/document/ehr05/e87325pt2_overview.pdf)
4. A Snapshot of Melanoma. National Cancer Institute, 2005
(<http://planning.cancer.gov/disease/Melanoma-Snapshot.pdf>)
5. Cornil I, Man S, Fernandez B, Kerbel RS. Enhanced tumorigenicity, melanogenesis, and metastases of a human malignant melanoma after subdermal implantation in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 1989; 81:938-944.
6. Fodstad O, Aamdal S, McMenamin M, Nesland JM, Pihl A. A new experimental metastasis model in athymic nude mice, the human malignant melanoma LOX. *Int. J. Cancer* 1988; 41:442-449.
7. Morikawa K, Walker SM, Nakajima M, Pathak S, Jessup JM, Fidler IJ. Influence of organ environment on the growth, selection and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res.* 1988; 48:6863-6871.
8. Naito S, Eschenbach AC, Fidler IJ. Different growth pattern and biologic behavior of human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 1987; 78:377-385.
9. Kozlowski JM, Fidler IJ, Campbell D, Xu Z, Kaighn ME, Hart IR. Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. *Cancer Res.* 1984; 44:3522-3529.
10. Vezeridis MP, Doremus CM, Tibbets LM, Tzanakakis G, Jackson BT. Invasion and metastasis following orthotopic transplantation of human pancreatic cancer in the nude mice. *J. Surg. Oncol.* 1989; 40:261-265.

11. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983; 301:527-530.
12. Glanzmann E, Riniker P. Essentielle lymphocytophthise. Ein neues krankheitsbild aus der säuglings pathologie. *Ann. Paediat.* 1950; 175:1-32.
13. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu. Rev. Immunol.* 1991; 9:323-350.
14. Custer RP, Bosma GC, Bosma MJ. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. Pathology, reconstitution, neoplasms. *Am. J. Pathol.* 1985; 120:464-477.
15. Schuler W, Bosma MJ. Nature of the scid defect: A defective VDJ recombinase system. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1989; 152:55-62.
16. Waller EK, Kamel OW, Cleary ML, Majumdar AS, Schick MR, Lieberman M, Weissman IL. Growth of primary T-cell non-Hodgkin's lymphomata in SCID-hu mice: requirement for a human lymphoid microenvironment. *Blood* 1991; 78:2650-2665.
17. Jansen B, Uckun FM, Jaszcz WB, Kersey JH. Establishment of a human t(4;11) leukemia in severe combined immunodeficient mice and successful treatment using anti-CD19 (B43)-pokeweed antiviral protein immunotoxin. *Cancer Res.* 1992; 52:406-412.
18. Bankert RB, Umemoto T, Sugiyama Y, Chen FA, Repasky E, Yokota S. Human lung tumors, patients' peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes propagated in SCID mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1989; 152:201-210.
19. Cuenca RE, Takita H, Bankert R. Orthotopic engraftment of human lung tumours in SCID mice for the study of metastasis. *Surg. Oncol.* 1996; 5:85-91.
20. Phillips RA, Jewett MA, Gallie BL. Growth of human tumors in immune-deficient scid mice and nude mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1989; 152:259-263.

21. Huynh H, Soo KC, Chow PK, Panasci L, Tran E. Xenografts of human hepatocellular carcinoma: a useful model for testing drugs. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12:4306-4314.
22. Lin W, Zhang X, Chen Z, Borson N, Voss S, Sanderson S, Murphy L, Wettstein P, Strome SE. Development and immunophenotyping of squamous cell carcinoma xenografts: tools for translational immunology. *Laryngoscope* 2005; 115:1154-1162.
23. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005; 65:9328-9337.
24. Luo L, Han ZC. Leukemia stem cells. *Int. J. Hematol.* 2006; 84:123-127.
25. Hill LL, Korngold R, Jaworsky C, Murphy G, McCue P, Berd D. Growth and metastasis of fresh human melanoma tissue in mice with severe combined immunodeficiency. *Cancer Res.* 1991; 51:4937-4941.
26. Juhász I, Albelda SM, Elder DE, Murphy GF, Adachi K, Herlyn D, Vályi-Nagy IT, Herlyn M. Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am. J. Pathol.* 1993; 143:528-537.
27. Falus A, László V, Radvány Z, Hegyesi H, Kiss B, Bencsáth M, Darvas Z. Histidine decarboxylase and intracellular histamine in melanoma cells and in a T cell line. *Inflamm. Res.* 1997; 46:Suppl 1:S51-52.
28. Haak-Frendscho M, Darvas Z, Hegyesi H, Kárpáti S, Hoffmann RL, László V, Bencsáth M, Szalai C, Fűrész J, Timár J, Bata-Csörgő Z, Szabad G, Pivarcsi A, Pállinger É, Kemény L, Horváth A, Dobozy A, Falus A. Histidine decarboxylase expression in human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 115:345-352.
29. Rangachari PK. Histamine: mercurial messenger in the gut. *Am. J. Physiol.* 1992; 262:G1-13.
30. Falus A. Histamine, part of the metabolome. *Acta Biol. Hung.* 2003; 54:27-34.

31. Hayashi H, Watanabe T. Histamine and its related enzymes. In: Parvez SH, Naoi M, Nagatsu T, Parvez S et al. Methods in neurotransmitter and neuropeptide research. *Elsevier* 1993, chapter 5.
32. Kahlson G, Rosengren E. New approaches to the physiology of histamine. *Physiol. Rev.* 1968; 48:155-196.
33. Geha RS. Atopic allergy and other hypersensitivities. *Curr. Opin. Immunol.* 1993; 5:935-936.
34. Prast H, Heistracher M. Influence of catecholamines on the in vivo release of histamine in the hypothalamus. *Agents Actions* 1991; 33:129-130.
35. Saxena SP, Brandes LJ, Becker AB, Simons KJ, LaBella FS, Gerrard JM. Histamine is an intracellular messenger mediating platelet aggregation. *Science* 1989; 243:1596-1599.
36. Aoi R, Nakashima I, Kitamura Y, Asai H, Nakano K. Histamine synthesis by mouse T lymphocytes through induced histidine decarboxylase. *Immunology* 1989; 66:219-223.
37. Radvány Z, Darvas Z, Kerekes K, Prechl J, Szalai C, Pállinger É, László V, Varga VL, Sándor M, Erdei A, Falus A. H1 histamine receptor antagonist inhibits constitutive growth of Jurkat T cells and antigen specific proliferation of ovalbumin specific murine T cells. *Semin. Cancer Biol.* 2000; 10:41-45.
38. László V, Stohr J, Hegyesi H, Rothe G, Orsó E, Falus A, Schmitz G. Increase of histidine decarboxylase in human monocytes during macrophage colony stimulating factor induced in vitro phagocytic differentiation. *Inflam. Res.* 1999; 48:85-86.
39. Szeberényi JB, Pállinger É, Zsinkó M, Pócs M, Rothe G, Orsó E, Szeberényi S, Schmitz G, Falus A, László V. Inhibition of effects of endogenously synthesised histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunol. Lett.* 2001; 76:175-182.
40. Gricco GP, Davio CA, Martin G, Engel N, Fitzsimons CP, Bergoc RM, Rivera ES. Histamine as an autocrine growth factor in experimental mammary carcinomas. *Agents Actions* 1994; 43:17-20.

41. Pos Z, Safrany G, Muller K, Toth S, Falus A, Hegyesi H. Phenotypic profiling of engineered mouse melanomas with manipulated histamine production identifies histamine H2 receptor and rho-C as histamine-regulated melanoma progression markers. *Cancer Res.* 2005; 65:4458-4466.
42. Watson SA, Wilkinson LJ, Robertson JF, Hardcastle JD. Effect of histamine on the growth of human gastrointestinal tumours: reversal by cimetidine. *Gut.* 1993; 34:1091-1096.
43. Aichberger KJ, Mayerhofer M, Vales A, Krauth MT, Gleixner KV, Bilban M, Esterbauer H, Sonneck K, Florian S, Derdak S, Pickl WF, Agis H, Falus A, Sillaber C, Valent P. The CML-related oncoprotein BCR/ABL induces expression of histidine decarboxylase (HDC) and the synthesis of histamine in leukemic cells. *Blood* 2006; 108:3538-3547.
44. Bolton E, King J, Morris D. H2 antagonists in the treatment of colon and breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2000; 10:3-10.
45. Darvas Z, Sakurai E, Schwelberger HG, Hegyesi H, Rivera E, Ohtsu H, Watanabe T, Pallinger E, Falus A. Autonomous histamine metabolism in human melanoma cells. *Melanoma Res.* 2003; 13:239-246.
46. Hegyesi H, Somlai B, Varga VL, Tóth G, Kovács P, Molnár EL, László V, Kárpáti S, Rivera E, Falus A, Darvas Z. Suppression of melanoma cell proliferation by histidine decarboxylase specific antisense oligonucleotides. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 117:151-153.
47. Hegyesi H, Horvath B, Pallinger E, Pos Z, Molnar V, Falus A. Histamine elevates the expression of Ets-1, a protooncogen in human melanoma cell lines through H2 receptor. *FEBS Lett.* 2005; 579:2475-2479.
48. Rivera ES, Cricci GP, Engel NI, Fitzsimons CP, Martin GA, Bergoc RM. Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. *Semin. Cancer Biol.* 2000; 10:15-24.
49. Mitsuhashi M, Mitsuhashi T, Payan DG. Multiple signaling pathways of histamine H2 receptors. *J. Biol. Chem.* 1989; 31:18356-18362.

50. Tomita K, Nakamura E, Okabe S. Histamine regulates growth of malignant melanoma implants via H₂ receptors in mice. *Inflammopharmacol.* 2005; 13:281-289.
51. Kollonitsch J, Ptchett AA, Marburg S, Perkins LM, Doldouras GA, Duggan DE, Aster SD. Selective inhibitors of biosynthesis of aminergic neurotransmitters. *Nature* 1978; 274:906–908.
52. Hill SJ. Multiple histamine receptors: properties and functional characteristics. *Biochem. Soc. Trans.* 1992; 20:122-125.
53. Brandes LJ, Beecroft WA, Hogg GR. Stimulation of in vivo tumor growth and phorbol ester-induced inflammation by N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine HCl, a potent ligand for intracellular histamine receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 179:1297-1304.
54. Glavin GB, Gerrard JM. Characterization of the gastroprotective effects of N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]-ethanamine hydrochloride, a non-H₁ / non-H₂ histamine antagonist. *Digestion* 1990; 47:143-148.
55. Brandes LJ, Hogg GR. Study of the in vivo antioestrogenic action of N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]-ethanamine HCl (DPPE), a novel intracellular histamine antagonist and antioestrogen binding site ligand. *J. Reprod. Fert.* 1990; 89:59-67.
56. Brandes LJ, LaBella FS, Warrington RC. Increased therapeutic index of antineoplastic drugs in combination with intracellular histamine antagonists. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991; 83:1329-1336
57. Bartholeyns J, Bouclier M. Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Res.* 1984; 44:639-645.
58. Adams WJ, Lawson JA, Morris DL. Cimetidine inhibits in vivo growth of human colon cancer and reverses histamine stimulated in vitro and in vivo growth. *Gut.* 1994; 35:1632-1636.

59. Suonio E, Tuomisto L, Alhava E. Effects of histamine, H1, H2 and H3 receptor antagonists and alpha-fluoromethylhistidine on the growth of human colorectal cancer in the subrenal capsule assay. *Agents Actions* 1994; 41:C118-C120.
60. Brandes LJ, Arron RJ, Bogdanovic RP, Tong J, Zaborniak CLF, Hogg GR, Warrington RC, Fang W, LaBella FS. Stimulation of malignant growth in rodents by antidepressant drugs at clinically relevant doses. *Cancer Res.* 1992, 52:3796-3800.
61. Berners PSJ, Johnson RK, Giovenella AJ, Faucette LF, Mirabelli CK, Sadler PJ. Antimicrobial and anticancer activity of tetrahedral, chelated, diphosphine silver (I) complexes: comparison with copper and gold. *J. Inorg. Biochem.* 1988, 33:285-295.
62. Bencsáth M, Pálóczi K, Szalai C, Szenthe A, Szeberényi J, Falus A. Histidine decarboxylase in peripheral lymphocytes of healthy individuals and chronic lymphoid leukemia patients. *Pathol. Oncol. Res.* 1998; 4:121-124.
63. Rho YS, Lee KT, Jung JC, Yoon C, An Z, Hoffman RM, Chang SG. Efficacy of new platinum analog DPPE in an orthotopic nude mouse model of human colon cancer. *Anticancer Res.* 1999; 19:157-161.
64. Chang SG, Kim JI, Jung JC, Rho YS, Lee KT, An Z, Wang X, Hoffman RM. Antimetastatic activity of the new platinum analog [Pt(cis-dach)(DPPE).2NO₃] in a metastatic model of human bladder cancer. *Anticancer Res.* 1997; 17:3239-3242.
65. Brandes LJ, Bracken SP, Ramsey EW. N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine in combination with cyclophosphamide: an active, low-toxicity regimen for metastatic hormonally unresponsive prostate cancer. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13:1398-1403.
66. Brandes LJ, Bracken SP. The intracellular histamine antagonist, N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine-HCl, may potentiate doxorubicin in the treatment of metastatic breast cancer: Results of a pilot study. *Breast Cancer Res. Treat.* 1998; 49:61-68.

67. Jones JA, Albright KD, Christen RD, Howell SB, McClay EF. Synergy between tamoxifen and cisplatin in human melanoma cells is dependent on the presence of antiestrogen-binding sites. *Cancer. Res.* 1997; 57:2657-2660.
68. Brandes LJ, Simons KJ, Bracken SP, Warrington RC. Results of a clinical trial in humans with refractory cancer of the intracellular histamine antagonist, N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine-HCl, in combination with various single antineoplastic agents. *J. Clin. Oncol.* 1994, 12:1281-1290.
69. Gifford M, Ferguson R, Voss B. Cimetidine reduction of tumor formation in mice. *Lancet* 1981; i:638-639.
70. Hahm KB, Park IS, Kim HC, Lee KJ, Kim JH, Cho SW, Lee SI. Comparison of antiproliferative effects of 1-histamine-2 receptor antagonists, cimetidine, ranitidine, and famotidine, in gastric cancer cells. *Int. J. Immunopharmacol.* 1996; 18:393-399.
71. Tonnesen H, Knigge U, Bulow S, Damm P, Fischerman K, Hesselfeldt P, Hjortrup A, Pedersen IK, Pedersen VM, Siemssen OJ et al. Effect of cimetidin on survival after gastric cancer. *Lancet* 1988; 2:990-992.
72. Kelly MD, King J, Cherian M, Dwerryhouse SJ, Finlay IG, Adams WJ, King DW, Lubowski DZ, Morris DL. Randomized trial of preoperative cimetidine in patients with colorectal carcinoma with quantitative assessment of tumor-associated lymphocytes. *Cancer* 1999, 85:1658-1663.
73. Osband ME, Hamilton D, Shen YJ, Cohen E, Shlesinger M, Lavin P, Brown A, McCaffrey R. Successful tumour immunotherapy with cimetidine in mice. *Lancet* 1981; i:636-638.
74. Sheehan PF, Baker T, Tutton PJ, Barkla DH. Effects of histamine and 5-hydroxytryptamine on the growth rate of xenografted human bronchogenic carcinomas. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1996; 23:465-471.
75. Finn PE, Purnell P, Pilkington GJ. Effect of histamine and the H2 antagonist cimetidine on the growth and migration of human neoplastic glia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1996; 22:317-324.

76. Kikuchi Y, Oomori K, Kizawa I, Kato K. Effects of cimetidine on tumor growth and immune function in nude mice bearing human ovarian carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 1985; 74:495-498.
77. Kikuchi Y, Oomori K, Kizawa I, Kato K. Augmented natural killer activity in ovarian cancer patients treated with cimetidine. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 1986; 22:1037-1043.
78. Dorr RT, Soble MJ, Alberts DS. Interaction of cimetidine but not ranitidine with cyclophosphamide in mice. *Cancer Res.* 1986; 46:1795-1799.
79. Kinouchi T, Saiki S, Maeda O, Kuroda M, Usami M, Kotake T. Treatment of advanced renal cell carcinoma with a combination of human lymphoblastoid interferon-alpha and cimetidine. *J. Urol.* 1997; 157:1604-1607.
80. Marshall ME, Riley LK, Rhoades J, Eichhorn T, Jennings CD, Cibull M, Thompson J. Effects of coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine on peripheral blood lymphocytes, natural killer cells, and monocytes in patients with advanced malignancies. *J. Biol. Response Mod.* 1989; 8:62-69.
81. Lawson JA, Adams WJ, Morris DL. Ranitidine and cimetidine differ in their in vitro and in vivo effects on human colonic cancer growth. *Br. J. Cancer* 1996; 73:872-876.
82. Reynolds JL, Akhter J, Morris DL. In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res.* 1996; 6:95-99.
83. Whitehead RJ, Taylor DJ, Evanson JM, Hart IR, Woolley DE. Demonstration of histamine H2 receptors on human melanoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 151:518-523.
84. Ucar K. The effects of histamine H2 receptor antagonists on melanogenesis and cellular proliferation in melanoma cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 177:545-550.
85. Hellstrand K, Asea A, Hermodsson S. Role of histamine in natural killer cell-mediated resistance against tumor cells. *J. Immunol.* 1990; 145:4365-4370.

86. Goetz TE, Ogilvie GK, Keegan KG, Johnson PJ. Cimetidine for treatment of melanomas in three horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1990; 196:449-452.
87. Mandanas R, Schultz S, Scullin D, Einhorn LH. Phase II trial of cimetidine in metastatic melanoma. A Hoosier Oncology Group trial. *Am. J. Clin. Oncol.* 1991; 14:397-399.
88. Creagan ET, Ahmann DL, Green SJ, Long HJ, Frytak S, Itri LM. Phase II study of recombinant leukocyte A interferon (IFN-rA) plus cimetidine in disseminated malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1985; 3:977-981.
89. Piura B, Meirovitz M, Kedar I. Long-term disease-free survival following surgery and active specific immunotherapy with allogeneic vaccine in a patient with high-risk malignant melanoma of the vulva. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1998; 81:83-85.
90. Smith T, Clark JW, Popp MB. Regression of melanoma nodules in a patient treated with ranitidine. *Arch. Intern. Med.* 1987; 147:1815-1816.
91. Mertens WC, Bramwell VH, Banerjee D, Gwadry SF, Lala PK. Sustained indomethacin and ranitidine with intermittent continuous infusion interleukin-2 in advanced malignant melanoma: a phase II study. *Clin. Oncol. R. Coll. Radiol.* 1993; 5:107-113.
92. Evangelista-Dean M, Khan N, Quan W. Continuous infusion interleukin-2 and antihistamines in melanoma: a retrospective review showing activity of this combination. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2004; 19:754-757.
93. Ladányi A, Tímár J, Paku S, Molnár G, Lapis K. Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity. *Int. J. Cancer* 1990; 46:456-461.
94. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 1986; 89:271-277.
95. Falus A, Hegyesi H, Lázár E, Pócs Z, László V, Darvas Z. Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. *Trends Immunol.* 2001; 22:648-652

96. Lázár-Molnár E, Gricco G, Martin G, Darvas Z, Hegyesi H, Fitzsimons C, Bergoc R, Falus A, Rivera E. Histamine as a potential autocrine regulator of melanoma. *Inflamm. Res.* 2001; 50 S102-103
97. Fitzsimons CP, Lazar-Molnar E, Tomoskozi Z, Buzas E, Rivera ES, Falus A. Histamine deficiency induces tissue-specific down-regulation of histamine H2 receptor expression in histidine decarboxylase knockout mice. *FEBS Lett.* 2001, 508:245-248.
98. Lin JH. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of histamine H2 receptor antagonists. Relationship between intrinsic potency and effective plasma concentrations. *Clin. Pharmacokinet.* 1991; 20:218-236.
99. Horváth BV, Szalai C, Mándi Y, László V, Radvány Z, Darvas Z, Falus A. Histamine and histamine-receptor antagonists modify gene expression and biosynthesis of interferon γ in peripheral human blood mononuclear cells and in CD19-depleted cell subsets. *Immunol.Lett.* 1999; 70:95-99.
100. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Yamaguchi N, Yagita H, Okumura K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell. Immunol.* 2001; 214:194-200.
101. Andalib AR, Lawry J, Ali SA, Murray AK, Sisley K, Silcocks P., Herlyn M, Rees RC. Cytokine modulation of antigen expression in human melanoma cell lines derived from primary and metastatic tumour tissues. *Melanoma Res.* 1997; 7:32-42.
102. Kirkwood JM, Bryant J, Schiller JH, Oken MM, Borden EC, Whiteside TL. Immunomodulatory function of interferon-gamma in patients with metastatic melanoma: results of a phase II-B trial in subjects with metastatic melanoma, ECOG study E 4987. Eastern Cooperative Oncology Group. *J. Immunother.* 1997; 20:146-157.
103. Takahashi K, Tanaka S, Ichikawa A. Effect of cimetidine on intratumoral cytokine expression in a experimental tumor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 281:1113-1119

104. Nakajima I, Chu TM. Synergistic antitumor activity of interleukin-2 and cimetidine against syngeneic murine tumor. *Cancer Immunol. Immunother.* 1991; 33:9-14.
105. Lahat N, Alexander B, Levin DR, Moskovitz B. The relationship between clinical stage, natural killer activity and related immunological parameters in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Immunol. Immunother.* 1989; 28:208-212.
106. Flodgren P, Sjogren HO. Influence in vitro on NK and K cell activities by cimetidine and indomethacin with and without simultaneous exposure to interferon. *Cancer Immunol. Immunother.* 1985; 19:28-34.
107. Asea A, Hermodsson S, Hellstrand K. Histaminergic regulation of natural killer cell-mediated clearance of tumour cells in mice. *Scand. J. Immunol.* 1996; 43:9-15.
108. Maglivit GM. Immunologic effects of cimetidine: potential uses. *Pharmacotherapy* 1987; 7:120S-124S.
109. Griswold DE, Alessi S, Badger AM, Poste G, Hanna N. Inhibition of T suppressor cell expression by histamine type 2 (H2) receptor antagonists. *J. Immunol.* 1984; 132:3054-3057.
110. Flodgren P, Borgstrom S, Jonsson PE, Lindstrom C, Sjogren HO. Metastatic malignant melanoma: regression induced by combined treatment with interferon [HuIFN-alpha(Le)] and cimetidine. *Int. J. Cancer.* 1983; 32:657-665.
111. Gifford RR, Tilberg AF. Histamine type-2 receptor antagonist immune modulation. II. Cimetidine and ranitidine increase interleukin-2 production. *Surgery* 1987; 102:242-247.
112. Vannier E, Miller LC, Dinarello CA. Histamine suppresses gene expression and synthesis of tumor necrosis factor alpha via histamine H2 receptors. *J. Exp. Med.* 1991; 174:281-284.
113. Nagy T, Glavinas H, Szincsák N, Hunyadi J, Jánossy T, Duda E, Vizler C, Juhász I. Tumor cells expressing membrane-bound tumor necrosis factor

activate macrophages and have a compromised growth in immunosuppressed and immunodeficient mice. *Cancer Lett.* 2003; 196(1):49-56.

114. Ohtsu H, Tanaka S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G, Tchougounova E, Hellman L, Gertsenstein M, Hirasawa N, Sakurai E, Buzás E, Kovács P, Csaba Gy, Kittel A, Okada M, Hara M, Mar L, Numayama-Tsuruta K, Ishigaki-Suzuki S, Ohuchi K, Ichikawa A, Falus A, Watanabe T, Nagy A. Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Letters* 2001; 502:53-57.
115. Heninger E, Falus A, Darvas Z, Szalai C, Zsinko M, Pos Z, Hegyesi H. Both interferon (IFN) α and IFN γ inhibit histidine decarboxylase expression in the HT168 human melanoma cell line. *Inflamm. Res.* 2000; 49:393-397.
116. Elenkov IJ, Webster E, Papanicolaou DA, Fleisher TA, Chrousos GP, Wilder RL. Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *J. Immunol.* 1998; 61:2586-2593.
117. Horváth B, Heninger E, Hegyesi H, Lázár E, Radvány Z, Szalai C, Darvas Z, Falus A. Reciprocal inhibitory interactions between interferon γ and histamine in melanoma. *Inflamm. Res.* 2000; 49:27-28.
118. Falus A. Interleukin-6 biosynthesis is increased by histamine in human B-cell and glioblastoma cell lines. *Immunology* 1993; 78:193-196.
119. Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Darvas Z, László V, Szalai C, Falus A. Biosynthesis of interleukin-6, an autocrine growth factor for melanoma, is regulated by melanoma derived histamine. *Semin. Cancer Biol.* 2000; 10:25-28.
120. Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Pállinger E, Kovács P, Tóth S, Fitzsimons C, Cricco G, Martin G, Bergoc R, Darvas Z, Rivera ES, Falus A. Inhibition of human primary melanoma cell proliferation by histamine is enhanced by interleukin-6. *Eur. J. Clin. Invest.* 2002; 32:743-749.
121. Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 2001; 413:420-425.

XI. KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált közlemények:

1. **Szincsák N**, Hegyesi H, Hunyadi J, Martin G, Lázár-Molnár E, Kovács P, Rivera E, Falus A, Juhász I. Cimetidine and a tamoxifen derivate reduce tumour formation in SCID mice xenotransplanted with a human melanoma cell line. *Melanoma Res.* 2002 Jun; 12(3):231-240.

IF: 1,773

2. **Szincsák N**, Hegyesi H, Hunyadi J, Falus A, Juhász I. Different H2 receptor antihistamines dissimilarly retard the growth of xenografted human melanoma cells in immunodeficient mice. *Cell Biol. Int.* 2002; 26(9):833-836.

IF: 1,017

Egyéb közlemények:

1. Nagy T, Glavinas H, **Szincsák N**, Hunyadi J, Jánossy T, Duda E, Vizler C, Juhász I. Tumor cells expressing membrane-bound tumor necrosis factor activate macrophages and have a compromised growth in immunosuppressed and immunodeficient mice. *Cancer Lett.* 2003; 196(1):49-56.

IF: 2,614

2. Márián T, Szabó G, Goda K, Nagy H, **Szincsák N**, Juhász I, Galuska L, Balkay L, Mikecz P, Trón L, Krasznai Z. In vivo and in vitro multitracer analyses of P-glycoprotein expression-related multidrug resistance. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2003 Aug; 30(8):1147-1154.

IF: 3,324

Megjelent absztraktok:

1. Juhász I, Veres I, **Szincsák N**, Simics E, Hunyadi J. Introduction of a novel transplantation model for experimental studies of the human pilosebaceous unit. *J. Invest. Dermatol.* 1997; 109(3):457
2. Győry I, Nagy T, **Szincsák N**, Kusz E, Falus A, Juhász I, Hunyadi J, Duda E. Cytokine gene therapy of tumors in animal model systems. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 110(4):523.
3. Juhász I, **Szincsák N**, Nagy T, Kusz E, Jánossy T, Glavinas H, Hunyadi J, Duda E. Investigation of tumor necrosis faktor- α induced tumor rejection in mice with severe combined immunodeficiency. *J. Invest. Dermatol.* 1999; 113(3):496.
4. Krasznai Z, **Szincsák N**, Rubovszky B, Goda K, Szabó G, Juhász I, Galuska L, Bálint K, Dezső B, Trón L, Márián T. In vivo visualization of multidrug resistance by parallel administration of ^{18}F FDG and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI. *Eur. J. Nucl. Med.* 2000; 27(8):1181.
5. Hegyesi H, **Szincsák N**, Martin G, Lázár-Molnár E, Kovács P, Rivera E, Hunyadi J, Falus A, Juhász I. Reduction of tumor formation in SCID mice xenotransplanted with human melanoma cell line by cimetidine and a tamoxifene derivate. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 117(3):782.
6. **Szincsák N**, Márián T, Nagy H, Galuska L, Trón L, Balkay L, Krasznai Z, Hunyadi J, Juhász I. Visualization of multidrug resistance with radiotracers in scid mice. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 2004; 18(1):99.

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki Dr. Hunyadi János egyetemi tanárnak, a DEOEC Bőr- és Nemikórtani Klinika igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy a SCID egér laboratóriumban dolgozzak, munkám során sok hasznos tanáccsal segített, a melanoma in vivo növekedésének tanulmányozására ösztönzött.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Juhász Istvánnak, a Bőrklinika egyetemi docensének, hogy felkeltette érdeklődésemet a tudományos kutatás, az állatkísérletek iránt. A SCID egér laboratórium létrehozásával, a philadelphiai kísérleti rendszer megvalósításával színvonalas kutató tevékenységet alakított ki. Bevezetett az egerekkel való kísérletezés rejtjelmeibe. Megtanította a SCID laboratóriumban elengedhetetlen steril körülmények között végzett munka megvalósítását, megtanított az egérkísérletek során használt gyakorlati módszerekre, technikákra. Munkámat magas szakmai színvonalon irányította.

Köszönöm Dr. Falus András akadémikus egyetemi tanárnak, a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet vezetőjének a munkám során számos alkalommal nyújtott segítségét, támogatását, a publikálás során adott számtalan értékes tanácsát. Nagy köszönet illeti Dr. Hegyesi Hargitát és Dr. Falus András Professzor Úr munkacsoportjában dolgozó valamennyi, a hivatkozott közleményekben szereplő és ezekben nem említett munkatársát, akiknek hathatós segítsége, türelme és támogatása nélkül a kísérletek nem jöhettek volna létre. Nagy öröm volt számomra, hogy Falus Professzor Úr munkacsoportjával történő kollaboráció során számos kísérleti módszert és úttörő metodikákat ismerhettem meg.

Köszönettel tartozom a Bőr- és Nemikórtani Klinikán dolgozó minden kollegámnak a baráti légkörért, támogatásért.

Munkánkat a következő grantek támogatták:

OTKA 031887

MKM-FKFP 1075/97

ETT 05560, 300/2000

DEOEC Mec 421-2/99 OTE

XIII. MELLÉKLET

Melanoma Research 2002, 12, pp. 231–240

Cimetidine and a tamoxifen derivate reduce tumour formation in SCID mice xenotransplanted with a human melanoma cell line

N. Szincsaák, H. Hegyesi, J. Hunyadi, G. Martin, E. Lázár-Molnár, P. Kovács, E. Rivera, A. Falus* and I. Juhász

Department of Dermatology, Debrecen University, Debrecen, Hungary (N. Szincsaák, J. Hunyadi, I. Juhász). Department of Genetics, Cell and Immunobiology, Semmelweis University, Nagyvárad tér 4, 1089, Budapest, Hungary. Tel: +36 1 210 2929; Fax: +36 1 303 6968; Email: faland@dgci.sote.hu (H. Hegyesi, E. Lázár-Molnár, P. Kovács, A. Falus). Laboratory of Radioisotopes, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Argentina (G. Martin, E. Rivera). Molecular Immunology Research Group, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary (A. Falus).

Histamine is produced by many cells expressing histidine decarboxylase (HDC), the enzyme responsible for the synthesis of histamine. Since melanoma cells and tissue contain relatively large amounts of histamine, the functional significance of histamine was examined using specific antihistamines *in vitro* and *in vivo* in the human melanoma cell line HT168 and severe combined immunodeficiency (SCID) mice. It was shown that the H2 receptor antagonist cimetidine when combined with *N*, *N*-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]-ethanamine-HCl (DPPE), a tamoxifen derivate, inhibits the proliferation of HT168 cells. Furthermore, it is suggested that there is a factor(s) that interferes with the exponential growth of HT168 cells xenografted to immunodeficient mice, and cimetidine and DPPE together significantly influence this factor(s). This combination of antihistamines also increases the survival of human melanoma-grafted mice. These changes are accompanied by enhanced infiltration of interferon- γ -producing mouse macrophages into the tumour tissue. These findings suggest that two different mechanisms are probably acting concordantly: direct inhibition of tumour cell proliferation by the H2 receptor antagonists, and activation of the local immune response characterized by interferon- γ production. These findings may help to elucidate the possibility of a rationally designed antihistamine strategy in melanoma therapy. © 2002 Lippincott Williams & Wilkins

Keywords: melanoma, histamine, SCID mice, histamine receptor antagonist, cimetidine, DPPE

Introduction

Malignant melanoma is a skin tumour with a very high mortality rate, and the incidence of this tumour, though reflecting some ethnic differences, is increasing rapidly throughout the world. Consequently it stimulates a plethora of *in vitro* and *in vivo* research, modelling melanoma growth on the one hand and searching for effective drugs for possible human therapy on the other.

The technique of xenotransplantation of human tumours, among them melanoma, into immunodeficient mice is widely used¹. Human tumours, however, only show growth similar to their original growth if they are orthotopically implanted, that is if tumour tissue samples are inoculated into the same organs that they had originally been obtained from. In case of melanoma the organ involved is the epidermis and dermis of the skin. Due to the extremely thin epidermis and dermis in mice, however, the closest way to mimic the human situation is to use subcutaneous/subdermal implantation.

Mice suffering from severe combined immunodeficiency (SCID) are widely used for allo- and xenotransplantation of a variety of cells and tissues, since both T and B cell-mediated immunity have been damaged due to a congenital autosomal recessive mutation². These mice have frequently been used to model tumours of the human haematopoietic system³, human lung cancer, retinoblastoma, osteosarcoma and melanoma^{4–6}.

*To whom correspondence should be addressed

N. Szincsik et al.

Histamine and L-histidine decarboxylase (HDC), the only enzyme responsible for the biosynthesis of histamine, have been detected not only in mastocytes, basophilic cells and histaminergic neurons^{7,8}, but also in platelets, lymphocytes, macrophages and dendritic cells⁹⁻¹¹. HDC expression is also high in regenerating liver, in embryonic tissues and in experimental tumours. Melanoma cell lines and melanoma tissue but not melanocytes contain significant amounts of HDC¹².

Even though the molecular details and tissue specificity are not as yet clear, an active role for histamine in cellular proliferation is strongly supposed¹³⁻¹⁵. A major proportion of endogenously produced histamine is secreted out of the cells and influences the neighbouring cells in a paracrine (or autocrine) manner. The consequences of these effects can be easily detected by applying histamine antagonists, which act by blocking binding to histamine receptors that are connected with inducible G protein-dependent intracellular signalling pathways¹⁶ and are located on cellular plasma membranes. Similar local blocking effects can be produced by inhibiting the *de novo* biosynthesis of histamine using an irreversible blocker of HDC, α -fluoromethyl histamine (α FMH)¹⁷. In addition, it has been suggested that a small amount of locally produced histamine remains within the cell and binds to intracellular cytochrome P450 moieties found in the microsome and the nuclear fraction^{13,18}. This binding could be effectively blocked by the tamoxifen derivate *N,N*-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]-ethanamine-HCl (DPPE).

The aim of the present study was to examine the effect of various antihistamine agents (cimetidine, ranitidine, DPPE) and their combinations on melanoma growth *in vitro* and *in vivo* after inoculation of the human melanoma cell line HT168 into immunodeficient (SCID) mice. Our findings suggest that, consistent with the *in vitro* findings, the combined application of cimetidine and DPPE *in vivo* largely reduces tumour growth in mice and increases the survival of the animals.

Materials and methods

Drugs

Cimetidine and ranitidine were purchased from Tocris Cookson Ltd (London, UK). DPPE was synthesized by Dr Ferenc Hudecz (Department of Organic Chemistry, Eotvos University, Budapest).

Melanoma cell lines

We used a primary melanoma HT168 cell line with a low liver metastatic capacity. Initially we also used the M1 cell line with a high liver metastatic capacity, isolated from the liver metastases of the HT168 cell line. The HT168 tumour line had been generated previously by subcutaneous *in vivo* passaging of A2058 cells in IS CBA/Ca mice. Cell suspensions from the subcutaneously growing HT168 tumour were injected into the spleens of IS mice, and then cells from the liver metastases were cultured as HT168-M1 (M1) cells¹⁹.

Melanoma cell culture

Human melanoma cell lines were cultivated in a 5% CO₂ atmosphere in RPMI 1640 medium (GIBCO, Australia) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, GIBCO) and 0.16 g/l gentamicin (Chinoin Co., Hungary). Cultures were incubated at 37°C in a water-saturated atmosphere of 5% CO₂/95% air. Cells were routinely passaged every 3 days. Before treatment, cells were incubated for 24 h after the last passaging at 37°C in RPMI 1640 medium containing 10% FCS in a 5% CO₂ humidified incubator, at a density of 4.5×10^4 cells/ml medium. The medium was then replaced and the HT168 cells were treated with DPPE (10^{-5} to 10^{-6} M), ranitidine (10^{-5} M), cimetidine (10^{-5} M) or combinations of these, as indicated in the Results section. Cultures were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 48 h. The optimal concentrations and incubation period were determined in earlier experiments (data not shown). After incubation the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) and then lysed for further analysis.

Protein extraction and Western blot analysis

Cultivated cells or snap frozen (liquid nitrogen) tissue specimens were lysed in lysis buffer for protein extraction containing 10 mM 1 M Tris-HCl (tris-hydroxyaminomethane-HCl), pH 8.0, 10 µg/ml leupeptin, 0.5 mM ethylene glycol bis(2-aminoethyl-ether) 0.5 M tetra-acetic acid (EGTA), 2% NaF, 1% Triton-X 100, 25 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 2% Na orthovanadate. The nuclear fraction was separated by centrifugation (10,000 g, 5 min) and the supernatant was used to determine the expression of HDC by Western immunoblotting.

*Histamine-dependent melanoma growth in SCID mice***Antibodies**

Based on computer predictions, the primary polyclonal antibody was produced in chicken to a selected peptide of human HDC protein (Promega, Madison, Wisconsin, USA) in collaboration with our group. The antibody was prepared against the epitopes containing the 318–325 (VKDKYKLQ) amino acid sequence of HDC¹².

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblotting

For this 15 µg protein per sample was loaded onto the denaturing polyacrylamide gel. A prestained protein mixture (Sigma Co., UK) was used as a marker of molecular mass, and 10% running gel and 5% stacking gel were used at 110 V and 20 mA for 2 h. The blotting was done using a Hoeffer instrument on Amersham nitrocellulose Hybond-C Extra membrane in transfer buffer (containing Tris-HCl, glycine and methanol) at 100 V and 200 mA for 80 min. The membrane was mildly shaken in a blocking solution (PBS containing 1% fat-free milk powder and 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. The primary antibody (affinity-purified anti-human HDC_{318–325} IgY (chicken); Promega, USA) was used at a concentration of 40 ng/ml for 60 min. The secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated anti-chicken IgY (rabbit); Promega, USA) was used at a concentration of 0.5 µg/ml for 30 min. Immunoreactive bands were visualized using the ECL (Amersham, England) Western blotting protocol.

MTT assay

For studying cell proliferation, the colorimetric MTT method was used, in which a water-soluble tetrazolium salt (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTT) is converted into an insoluble purple formazan by dehydrogenase enzymes²⁰. In previous experiments we have confirmed that results with the MTT assay correspond to those of [³H]thymidine incorporation. At the end of the culture periods 20 µl MTT (5 mg/ml, Sigma, USA) was added to the cultures. After incubation for a further 3 h, the supernatants were discarded and the precipitates were dissolved in 100 µl dimethyl sulphoxide (DMSO). Absorption was read at 540 and 620 nm.

Detection of H2 histamine receptors on HT168 melanoma cells

H2 receptor binding capacity was measured in the

presence of 3 nM of [³H]tiotidine (DuPont, 81.1 Ci/mmol) in an assay volume of 500 µl as described elsewhere¹⁷. Non-specific binding was defined with 5 mM histamine HCl (Sigma). The cells were washed with cool saline, then incubated for 60 min at 25°C. The reaction was stopped by rapid filtration under vacuum over Whatman GF/B glass fibre filters presoaked in 0.3% polyethyleneimine, which were then rinsed with 10 ml of ice-cold medium. Radioactivity retained on the filters was measured by liquid scintillation counting in 3 ml of OptiPhase HiSafe cocktail (Wallac). Graphical representation of the mean values of the data from Scatchard analysis was produced by the software program LIGAND.

Detection of H2 histamine receptor mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction

Reverse transcription (RT) was carried out using Perkin Elmer reverse transcriptase on a Pharmacia Ataq Gene Controller. The reaction mixture (20 µl) consisted of 4 µl 25 mM Mg²⁺, 2 µl 10× buffer, 2 µl 10 mM deoxynucleotides (dNTPs), 0.25 µl RNase inhibitor (5 units), 1 µl oligo-deoxythymidine primer, 0.5 µl murine leukaemia virus (Mu-LV) reverse transcriptase (25 units) and 0.25 µl diethyl pyrocarbonate (DEPC)-distilled water, containing 1.5 µg of total RNA in 10 µl DEPC-distilled water. RNA samples (1.5 µg) were reverse transcribed at 42°C for 30 min, then at 99°C for 5 min.

For polymerase chain reaction (PCR) amplification, the reaction mixture consisted of 1× buffer, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs, 2.25 U Taq polymerase, 25 pmol sense and antisense primers, templates (10 µl) and distilled water in a final volume of 50 µl. The primers were synthesized by GIBCO. The PCR reactions were carried out using the following procedures for amplification of the H2 receptor: 94°C for 2 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 1 min and 72°C for 1 min, then 72°C for 7 min. The oligonucleotide primers¹⁸ used for the H2 receptor were 5'-TCG TGT CCT TGG CTA TCA C for the sense primer, and 5'-CCT TGC TGG TCT CGT TCC T for the antisense primer.

The resulting PCR products were separated on 2% agarose gels containing 0.01% ethidium bromide. Samples were run under 100 V for 45 min. The size of the PCR product corresponding to H2 receptor mRNA was 330 bp.

N. Szincsa et al.

In vivo studies

Animals

The immunodeficient CB-17 scid/scid mouse population originated from the laboratory of the Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA. Typical SCID features were proven by measuring serum IgM in the mice (data not shown). In the initial experiments animals were injected with 5×10^6 M1 or HT168 melanoma cells in 200 μ l PBS, subdermally into the abdominal skin. In further experiments we injected the mice with HT168 melanoma cells and divided them into groups (7–12 mice), which were given the following agents in their drinking water, keeping the doses constant, from the day after the injection of cells: (i) DPPE alone (4 mg/kg per day per mouse); (ii) DPPE (4 mg/kg per day per mouse) in combination with cimetidine (50 mg/kg per day per mouse); (iii) DPPE (4 mg/kg per day per mouse) in combination with ranitidine (50 mg/kg per day per mouse); (iv) cimetidine alone (50 mg/kg per day per mouse); (v) ranitidine alone (50 mg/kg per day per mouse). The individual test groups had their own control groups who were given only plain drinking water from the day after the injection of cells.

Measurement of tumour growth

The size of individual subdermal growing tumours was measured weekly by calliper for 6–9 weeks after injection of the cells, and tumour volume was calculated using the formula tumour volume = length $\times$ width $\times$ height. The mean tumour volume was then calculated for each group.

Histopathological assessment

The mice were killed 6–9 weeks after the injection of cells and the tumours together with a thin stripe of the mouse skin were resected. Tissue samples were embedded in paraffin and 5 μ m sections were stained with haematoxylin and eosin. At the same time frozen sections were also prepared. Tumours were examined with respect to grade of differentiation, proportion of nucleus and cytoplasm, pleiomorphism of cell nucleus, and presence of melanin. In addition, deparaffinated tissue sections were incubated in 1% bovine serum (BS) and 1% saponin/PBS, stained with either fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled rat anti-mouse interferon- γ (IFN γ) IgG1 antibodies (1:1000, Pharmingen) or phycoerythrin (PE)-labelled rat anti-mouse CD11b IgG2b antibodies, which detect infiltrating murine macrophages (1:500, Pharmingen), washed and then examined using a confocal microscope (Bio-Rad, MRC 1024, equipped with a

krypton-argon laser). Similarly labelled isotypic antibodies were applied as controls.

Statistical analysis

The Student's t-test and one-way analysis of variance (ANOVA) were used to measure differences resulting from the different treatment regimens in all experiments. Results were expressed as the mean $\pm$ SEM. Differences between results were considered to be significant if $P < 0.05$.

Results

The effect of histamine antagonists on the in vitro proliferation of human melanoma cell lines HT168 and M1 is shown in Fig. 1A. In HT168 cells, a combination of cimetidine and DPPE (column 5) significantly reduced (37% inhibition) the proliferation of the cells, and ranitidine and DPPE (column 7) produced a moderate (16%) but significant reduction. In M1 cells, H2 histamine receptor antagonists in the presence of DPPE decreased proliferation (cimetidine + DPPE, 27%; ranitidine + DPPE, 23%). Interestingly, in M1 but not in HT168 the inhibition produced by DPPE alone was significant (21% and 26% at concentrations of 1 and 10 μ M, respectively).

The presence of H2 receptor mRNA and activity in HT168 cells is demonstrated in Fig. 1B. The maximum specific binding (B_{max}) and equilibrium dissociation constant (K_d) values ($0.98 \pm 0.2 \times 10^6$ sites/cell and 18.08 ± 6.77 nM, respectively) from the Scatchard plot analysis clearly indicate the presence of active H2 receptors on HT168 cells. Similar results were obtained with M1 cells (data not shown).

In vivo tumour growth of HT168 and M1 cells is presented in Fig. 2A. Tumours appeared in 75% of the mice injected with the HT168 cell line and in 91% of the mice injected with the M1 cell line. The mean tumour volume and in vivo tumour growth in mice injected with the M1 line was higher than that in mice injected with the HT168 line. Except at week 7 ($P = 0.015$), the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). For all further experiments the HT168 melanoma line, which showed lower tumour growth potential, was used. The mean tumour volumes in SCID mice after various treatments are given in Fig. 2B. Growth after treatment with ranitidine, cimetidine and DPPE, alone and in various combinations, was compared with tumour growth in controls. While cimetidine alone en-

Histamine-dependent melanoma growth in SCID mice

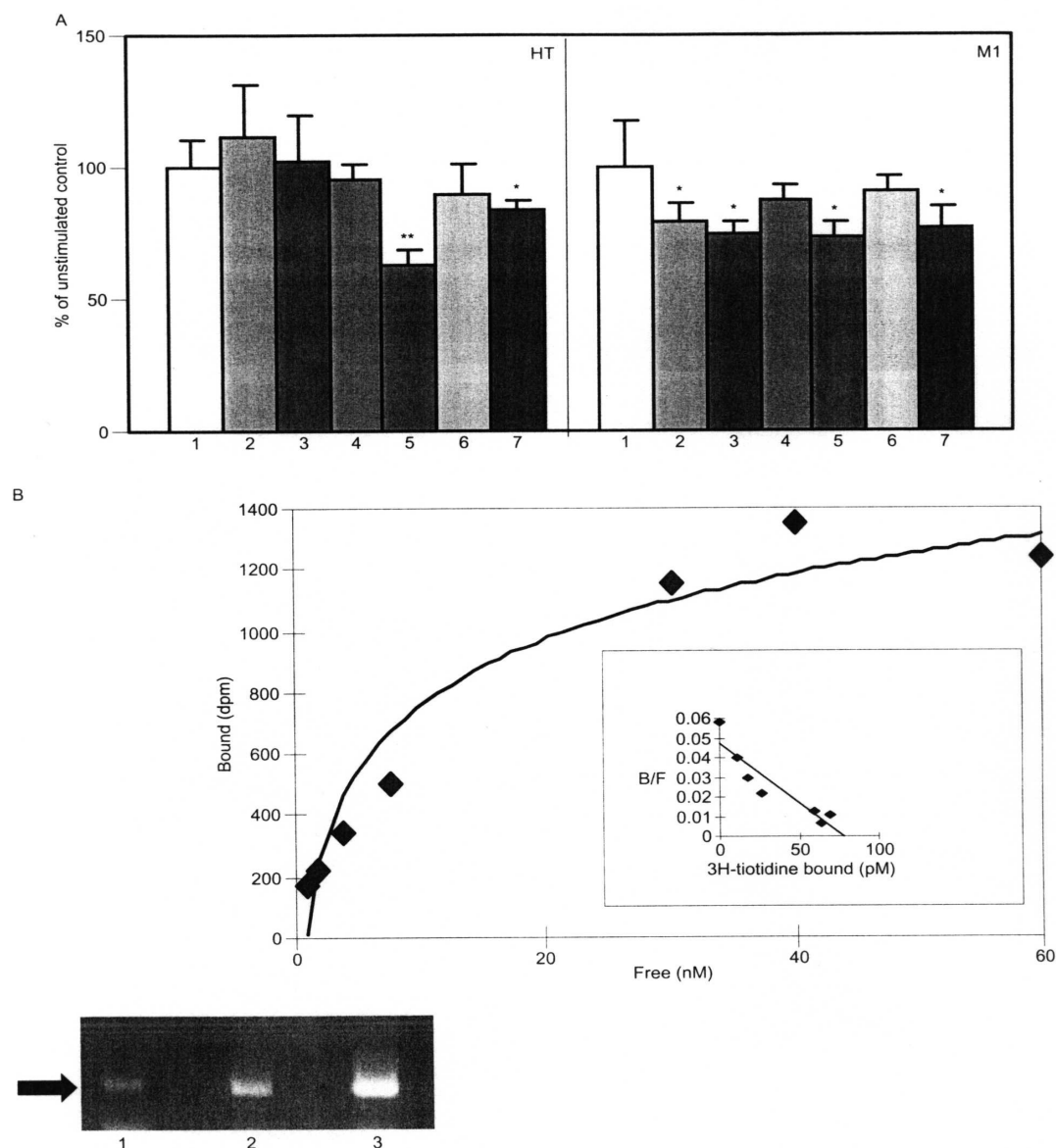


Figure 1. *In vitro* functional and receptor binding studies on human melanoma cell lines. **A** Effect of H2 histamine receptor antagonists and DPPE on the proliferation of human melanoma cell lines *in vitro*. Column 1, control; column 2, DPPE 10^{-6} M; column 3, DPPE 10^{-5} M; column 4, cimetidine 10^{-5} M; column 5, cimetidine 10^{-5} M + DPPE 10^{-6} M; column 6, ranitidine 10^{-5} M; column 7, ranitidine 10^{-5} M + DPPE 10^{-6} M. Proliferation was measured using the MTT assay as described in Materials and methods. Results shown are mean $\pm$ SEM; $n = 3$ for each group. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$. **B** Characterization of H2 receptor binding by Scatchard plot analysis in human melanoma cell line HT168. H2 receptor binding capacity was measured in the presence of [3 H]tiotidine; non-specific binding was defined with excess of histamine. $B_{\max}$ ($0.98 \pm 0.2 \times 10^6$ sites/cell) and K_d (18.08 ± 6.77 nM) values were determined. *Insert:* Demonstration of the presence of H2 histamine receptor mRNA in HT168 cells. The arrow indicates 330 bp, the size of the amplified fragment of H2 receptor cDNA. Lane 1, M1; lane 2, HT168; lane 3, H2 receptor cDNA clone.

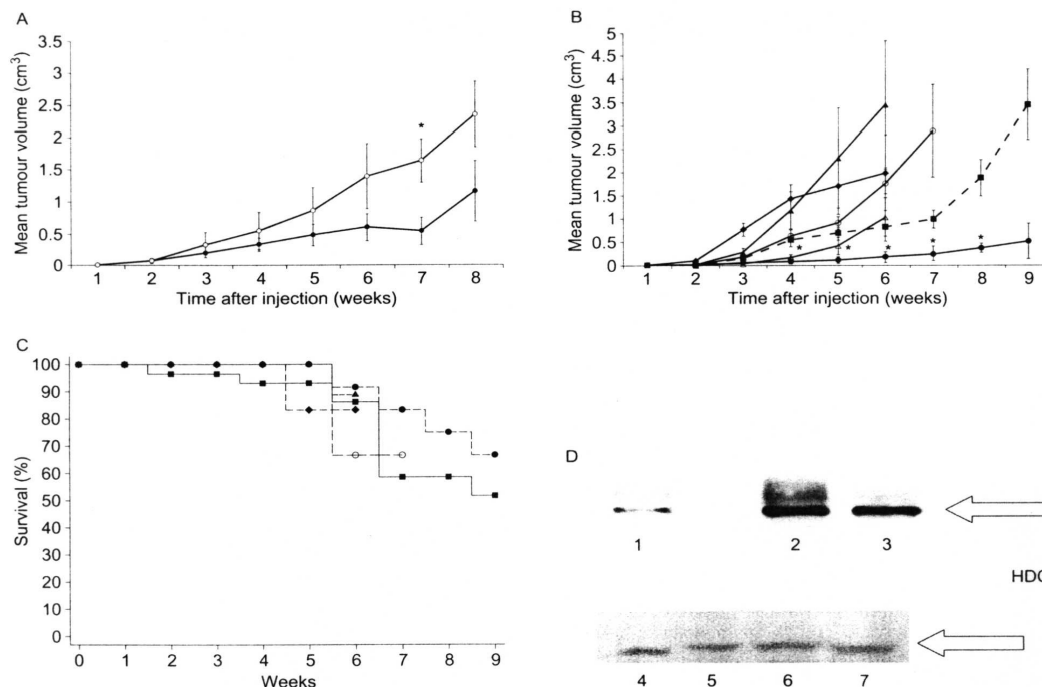


Figure 2. The growth of HT168 and M1 melanoma cell lines in SCID mice. **A** Growth characteristics (tumour volume) in SCID mice inoculated with human HT168 (●; $n = 12$) or M1 (○; $n = 12$) melanoma cells. Results were expressed as the mean tumour volume ($\pm$ SEM) at various periods after inoculation of 5×10^6 tumour cells. * $P < 0.05$. **B** Effects of several treatments on tumour growth in SCID mice injected with HT168 melanoma cells compared with control group. Results were expressed as the mean tumour volume ($\pm$ SEM) at various times after tumour injection. The broken line denotes the results from the control group. * $P < 0.05$. ■, control ($n = 12$); ◆, DPPE (4 mg/kg per day) ($n = 8$); ●, cimetidine (50 mg/kg per day) in combination with DPPE (4 mg/kg per day) ($n = 12$) – after 4 weeks $P < 0.05$; ○, ranitidine (50 mg/kg per day) in combination with DPPE (4 mg/kg per day) ($n = 7$); ▲, cimetidine (50 mg/kg per day) ($n = 9$); △, ranitidine (50 mg/kg per day) ($n = 9$). **C** Survival characteristics of SCID mice with HT168 human melanoma cell line after various treatments. For symbols see **B**. **D** Western blot analysis of HDC expression in HT168 cells *in vitro* (lane 1) and *in vivo* (lanes 2, 3) (upper panel) and after various *in vivo* treatments (lane 4, DPPE + ranitidine; lane 5, DPPE + cimetidine; lane 6, cimetidine; lane 7, ranitidine) (lower panel). Arrows indicate the 55 kDa band of HDC.

hanced the tumour volume after 4 weeks ($P > 0.05$), when combined with DPPE a very large reduction in tumour mass was found. After 6 weeks 83% of the mice developed tumours in the control group, but only 33% in the group of mice receiving DPPE in combination with cimetidine. In addition, both the mean tumour volume and the tumour growth potential in mice receiving DPPE and cimetidine together were lower than in control mice, the differences being statistically significant ($P < 0.05$). Ranitidine and DPPE, alone or in combination, did not affect the growth of HT168 in SCID mice ($P > 0.05$).

Very similar conclusions can be drawn if survival of mice is examined (Fig. 2C). The survival of mice treated with cimetidine and DPPE significantly exceeds that of controls and other treatment groups.

The HDC expression of melanoma cells *in vitro* and *in vivo* was compared (Fig. 2D) by Western blot analysis. Regardless of the presence or absence of antihistamines, HDC expression in HT168 cells increases under *in vivo* conditions compared with that of *in vitro* cultivated cells (Fig. 2D, upper panel); however, the various *in vivo* treatments did not influence the amount of HDC protein in the tissue extracts (Fig. 2D, lower panel). There is a tiny shift in the position of the HDC band in ranitidine-treated mice (lanes 4 and 7), but the reason for this is not known.

The histology and immunoreactivity of skin specimens (Fig. 3) taken from SCID mice injected with HT168 (tumour-bearing control mice, Fig. 3A, B, C) and those injected with HT168 and treated with cimetidine plus DPPE (Fig. 3D, E, F) show that this combination enhances the infiltration of IFN γ -produ-

Histamine-dependent melanoma growth in SCID mice

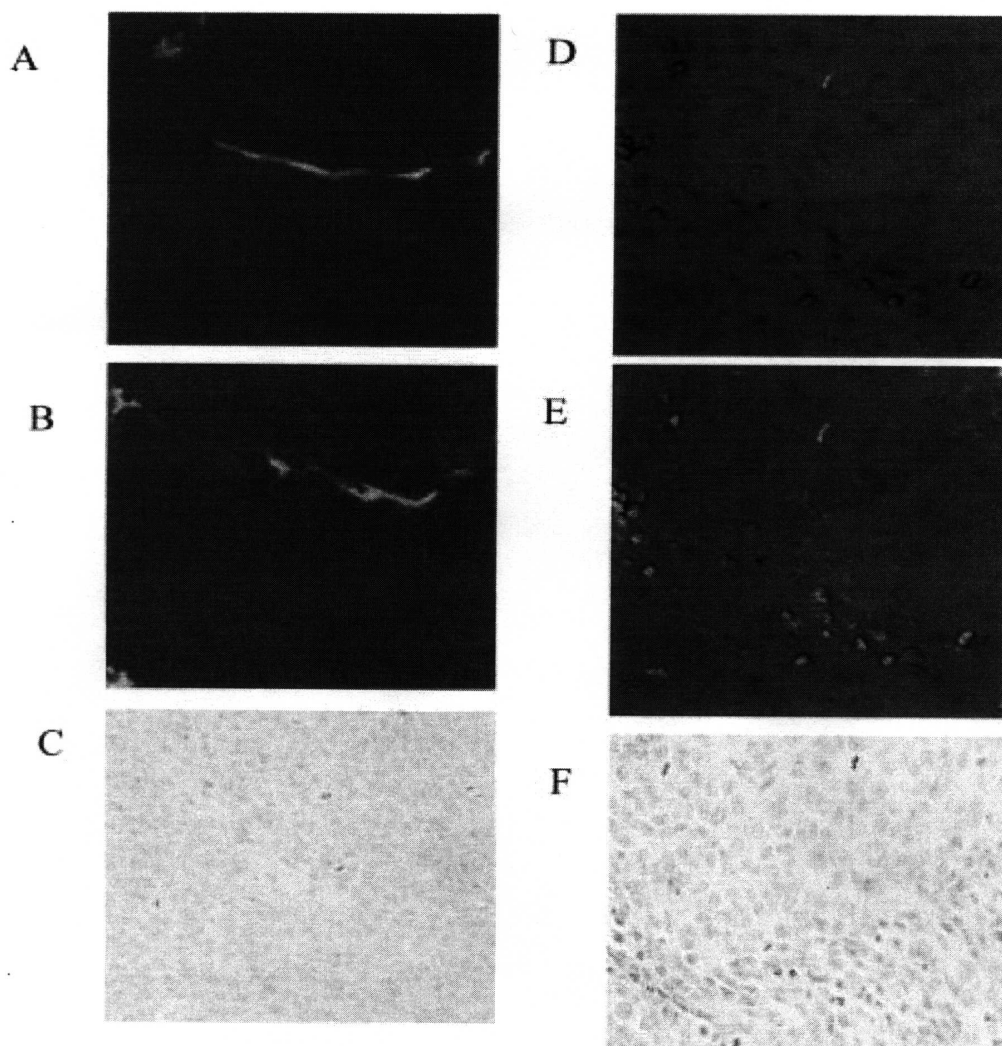


Figure 3. Histological sections of HT168 xenograft in mice without subsequent treatment (A–C) and in mice treated with cimetidine and DPPE (D–F): normal histology (haematoxylin and eosin; C and F), detection of macrophages (CD11b; A and D) and detection of $INF\gamma$ (B and E). Magnification 1:40.

cing macrophages and that their distribution within the tumour is different in treated and control animals. A similar tendency, but with much fewer cells, was found when natural killer (NK) cells were examined (data not shown).

Discussion

Our data suggest that treatment with the H2 histamine receptor blocker cimetidine in combination with DPPE, a ligand of intracellular P450

moieties, effectively reduces the *in vivo* growth of xenografted human melanoma and elevates survival in immunodeficient mice, although there is no obvious correlation between tumour growth/size and survival of animals. The changes are associated with infiltration of INF γ -producing macrophages and (to a much smaller extent) NK cells into tumour tissue. The previously described effects of DPPE¹⁸ with low anti-oestrogen capacity is based on the interference of DPPE with the binding of histamine to P450 molecules. The effect of DPPE corresponds in most cases to that of the HDC inhibitor α FMH, which, by blocking *de novo* histamine production, inhibits both *in vivo* and *in vitro* proliferation of hepatomas and colorectal carcinomas²¹⁻²⁵. Interestingly, DPPE alone stimulates *in vivo* tumour growth (DMBVA-induced breast tumours in Sprague-Dawley rats, L5178Y leukaemia in DBA/2 mice)^{18,26}. It was found that DPPE suppressed the *in vitro* proliferation capacity of lymphocytes from chronic lymphoid leukaemia patients with high HDC levels²⁷. In combination with chemotherapy, DPPE protected the body from cytotoxic effects in breast and prostate cancer²⁸.

Cimetidine has been shown to inhibit the growth of several types of tumours, both *in vitro* and *in vivo* in animal models^{29,30}. Furthermore, cimetidine increased the volume doubling time of human bronchogenic carcinomas xenografted in immunosuppressed mice³¹ and inhibited the growth of lung cancer as well as human neoplastic glia *in vitro*^{32,33}. Human ovarian carcinoma in nude mice has been shown to be favourably affected by cimetidine³⁴. Promising data from a phase II trial also prove the strength of cimetidine therapy³⁵. In contrast, ranitidine, another potent histamine H2 antagonist, did not inhibit the proliferation or *in vivo* tumour growth of a human colon cancer cell line³⁶. These data can be explained by results showing that cimetidine (but not ranitidine) dramatically elevates the INF γ production by human lymphocytes³⁷ via a possibly histamine-independent pathway, likely through cytochrome P450 moieties. This would also explain why cimetidine but not ranitidine was effective in our experimental system using HT168 human melanoma cells. Others claim that cimetidine may inhibit cell proliferation by stimulating NK cells³⁸.

Since SCID mice possess a defective T cell system, in addition to a direct inhibitory effect on melanoma cells (suggested by the *in vitro* findings), one possible explanation of our findings could be that cimetidine and DPPE locally activate mouse macrophages (and NK cells), and these cells reverse tumour formation by HT168 cells. This complex

interaction is further complicated by the fact that both IFN α and IFN γ suppress HDC expression in melanoma cells *in vitro*³⁹; however, in the present system antagonists did not greatly influence the expression of HDC, which was lower than that in *in vivo* conditions. It is possible that there is a mutually inhibiting interaction between endogenous histamine in melanoma and the cells of the local immune system⁴⁰. In contrast to IFN γ , at least in the advanced stages, histamine-inducible⁴¹ interleukin-6 has been shown to act as an autocrine supporting factor in melanoma⁴², suggesting that a highly complex network is involved in the *in situ* regulation of melanoma growth.

Our data suggest that the melanoma cell line HT168 expresses H2 receptors and that blocking by cimetidine combined with DPPE inhibits the growth of melanoma. Since HDC is strongly expressed in melanoma cells and tissue, autocrine enhancement of melanoma growth through H2 histamine receptor is suggested.

Acknowledgements

This work was supported by the following grants: OTKA 031887, MKM-FKFP1075/97, ETT 05560, 300/2000 and DEOEC Mec 421-2/99 OTE.

References

1. Cornil I, Man S, Fernandez B, Kerbel RS. Enhanced tumorigenicity, melanogenesis, and metastases of a human malignant melanoma after subdermal implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1989; **81**: 938-944.
2. Bosma MJ, Carroll AM. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 1991; **9**: 323-350.
3. Waller EK, Kamel OW, Cleary ML, Majumdar AS, Schick MR, Lieberman M, Weissman IL. Growth of primary T-cell non-Hodgkin's lymphomata in SCID-hu mice: requirement for a human lymphoid microenvironment. *Blood* 1991; **78**: 2650-2665.
4. Bankert RB, Umemoto T, Sugiyama Y, Chen FA, Repasky E, Yokota S. Human lung tumors, patient's peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes propagated in SCID mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989; **152**: 201-210.
5. Hill LL, Korngold R, Jaworsky C, Murphy G, McCue P, Berd D. Growth and metastasis of fresh human melanoma tissue in mice with severe combined immunodeficiency. *Cancer Res* 1991; **51**: 4937-4941.
6. Juhász I, Albelda SM, Elder DE, Murphy GF, Adachi K, Herlyn D, et al. Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am J Pathol* 1993; **143**: 528-537.

Histamine-dependent melanoma growth in SCID mice

7. Geha RS. Atopic allergy and other hypersensitivities. *Curr Opin Immunol* 1993; **5**: 935–936.
8. Prast H, Heistracher M. Influence of catecholamines on the *in vivo* release of histamine in the hypothalamus. *Agents Actions* 1991; **33**: 129–130.
9. Radvány Z, Darvas Z, Kerekes K, Prechl J, Szalai C, Pállinger É, *et al.* H1 histamine receptor antagonist inhibits constitutive growth of Jurkat T cells and antigen specific proliferation of ovalbumin specific murine T cells. *Semin Cancer Biol* 2000; **10**: 41–45.
10. László V, Stohr J, Hegyesi H, Rothe G, Orsó E, Falus A, Schmitz G. Increase of histidine decarboxylase in human monocytes during macrophage colony stimulating factor induced *in vitro* phagocytic differentiation. *Inflam Res* 1999; **48**: 85–86.
11. Szeberényi JB, Pállinger É, Zsínkó M, Pós M, Rothe G, Orsó E, *et al.* Inhibition of autocrine effects of endogenously synthesised histamine disturbs *in vitro* human dendritic cell differentiation. *Immunol Lett* 2001; **76**: 175–182.
12. Haak-Frendscho M, Darvas Z, Hegyesi H, Kárpáti S, Hoffmann RL, László V, *et al.* Histidine decarboxylase expression in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; **115**: 345–352.
13. Saxena SP, Brandes LJ, Becker AB, Simons KJ, LaBella FS, Gerrard JM. Histamine is an intracellular messenger mediating platelet aggregation. *Science* 1989; **243**: 1596–1599.
14. Bolton E, King J, Morris D. H2 antagonists in the treatment of colon and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2000; **10**: 3–10.
15. Rivera ES, Cricci GP, Engel NI, Fitzsimons CP, Martin GA, Bergoc RM. Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. *Semin Cancer Biol* 2000; **10**: 15–24.
16. Mitsuhashi M, Mitsuhashi T, Payan DG. Multiple signaling pathways of histamine H2 receptors. *J Biol Chem* 1989; **31**: 18356–18362.
17. Kollonitsch J, Ptchett AA, Marburg S, Perkins LM, Doldouras GA, Duggan DE, Aster SD. Selective inhibitors of biosynthesis of aminergic neurotransmitters. *Nature* 1978; **274**: 906–908.
18. Brandes LJ, Beecroft WA, Hogg GR. Stimulation of *in vivo* tumor growth and phorbol ester-induced inflammation by *N,N*-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy] ethanamine HCl, a potent ligand for intracellular histamine receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **179**: 1297–1304.
19. Ladányi A, Tímár J, Paku S, Molnár G, Lapis K. Selection and characterization of human melanoma lines with different liver-colonizing capacity. *Int J Cancer* 1990; **46**: 456–461.
20. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; **89**: 271–277.
21. Gajtkowski GA, Norris DB, Rising TJ, Wood TP. Specific binding of ³H-tiotidine to histamine H2 receptors in guinea pig cerebral cortex. *Nature* 1983; **304**: 65–67.
22. Jansen-Olesen I, Ottosson A, Cantera L, Strunk S, Lassen LH, Olesen J, *et al.* Role of endothelium and nitric oxide in histamine-induced responses in human cranial arteries and detection of mRNA encoding H1- and H2-receptors by RT-PCR. *Br J Pharmacol* 1997; **121**: 41–48.
23. Brandes LJ, LaBella FS, Warrington RC. Increased therapeutic index of antineoplastic drugs in combination with intracellular histamine antagonists. *J Natl Cancer Inst* 1991; **83**: 1329–1336.
24. Adams WJ, Lawson JA, Morris DL. Cimetidine inhibits *in vivo* growth of human colon cancer and reverses histamine stimulated *in vitro* and *in vivo* growth. *Gut* 1994; **35**: 1632–1636.
25. Suonio E, Tuomisto L, Alhava E. Effects of histamine, H1, H2 and Hic receptor antagonists and alpha-fluoromethylhistidine on the growth of human colorectal cancer in the subrenal capsule assay. *Agents Actions* 1994; **41**: C118–C120.
26. Brandes LJ, Arron RJ, Bogdanovic RP, Tong J, Zaborniak CLF, Hogg GR, *et al.* Stimulation of malignant growth in rodents by antidepressant drugs at clinically relevant doses. *Cancer Res* 1992; **52**: 3796–3800.
27. Bencsáth M, Pálóczi K, Szalai C, Szenthe A, Szeberényi J, Falus A. Histidine decarboxylase in peripheral lymphocytes of healthy individuals and chronic lymphoid leukemia patients. *Pathol Oncol Res* 1998; **4**: 121–124.
28. Brandes LJ, Bracken SP, Ramsey EW. *N,N*-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine in combination with cyclophosphamide: an active, low-toxicity regimen for metastatic hormonally unresponsive prostate cancer. *J Clin Oncol* 1995; **13**: 1398–1403.
29. Gifford M, Ferguson R, Voss B. Cimetidine reduction of tumor formation in mice. *Lancet* 1981; **i**: 638–639.
30. Hahm KB, Park IS, Kim HC, Lee KJ, Kim JH, Cho SW, Lee SI. Comparison of antiproliferative effects of 1-histamine-2 receptor antagonists, cimetidine, ranitidine, and famotidine, in gastric cancer cells. *Int J Immunopharmacol* 1996; **18**: 393–399.
31. Sheehan PF, Baker T, Tutton PJ, Barkla DH. Effects of histamine and 5-hydroxytryptamine on the growth rate of xenografted human bronchogenic carcinomas. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996; **23**: 465–471.
32. Xue LF, Cheng J, Wang JW, Song Y, Gu SX. Histamine and lung cancer. II. Human lung cancer cell line and histamine. *Chung Hua Chung Liu Tsa Chih* 1988; **10**: 19–22.
33. Finn PE, Purnell P, Pilkington GJ. Effect of histamine and the H2 antagonist cimetidine on the growth and migration of human neoplastic glia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; **22**: 317–324.
34. Kikuchi Y, Oomori K, Kizawa I, Kato K. Effects of cimetidine on tumor growth and immune function in nude mice bearing human ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1985; **74**: 495–498.
35. Mandanas R, Schultz S, Scullin D, Einhorn LH. Phase II trial of cimetidine in metastatic melanoma. A Hoosier Oncology Group trial. *Am J Clin Oncol* 1991; **14**: 397–399.
36. Lawson JA, Adams WJ, Morris DL. Ranitidine and cimetidine differ in their *in vitro* and *in vivo* effects on human colonic cancer growth. *Br J Cancer* 1996; **73**: 872–876.
37. Horváth BV, Szalai C, Mándi Y, László V, Radvány Z, Darvas Z, Falus A. Histamine and histamine-receptor antagonists modify gene expression and biosynthesis of interferon γ in peripheral human blood mono-

N. Szincsik et al.

- nuclear cells and in CD19-depleted cell subsets. *Immunol Lett* 1999; **70**: 95–99.
38. Hellstrand K, Asea A, Hermansson S. Role of histamine in natural killer cell-mediated resistance against tumor cells. *J Immunol* 1990; **145**: 4365–4370.
 39. Heninger E, Falus A, Darvas Z, Szalai C, Zsanko M, Radvány Z, Hegyesi H. Both interferon (IFN) α and IFN γ inhibit histidine-decarboxylase expression and cell proliferation of the HT168 human melanoma cell line. *Inflam Res* 2000; **49**: 393–397.
 40. Horváth B, Heninger E, Hegyesi H, Lázár E, Radvány Z, Szalai C, *et al.* Reciprocal inhibitory interactions between interferon γ and histamine in melanoma. *Inflam Res* 2000; **49**: 27–28.
 41. Falus A. Interleukin-6 biosynthesis is increased by histamine in human B-cell and glioblastoma cell lines. *Immunology* 1993; **78**: 193–196.
 42. Lázár E, Hegyesi H, Tóth S, Darvas Z, László V, Szalai C, Falus A. Biosynthesis of interleukin-6, an autocrine growth factor for melanoma, is regulated by melanoma derived histamine. *Semin Cancer Biol* 2000; **10**: 25–28.

(Received 22 June 2001; accepted in revised form 6 October 2001)



SHORT COMMUNICATION

DIFFERENT H2 RECEPTOR ANTIHISTAMINES DISSIMILARLY RETARD THE GROWTH OF XENOGRAFTED HUMAN MELANOMA CELLS IN IMMUNODEFICIENT MICE

NORA SZINCÁS¹, HARGITA HEGYESI², JÁNOS HUNYADI¹, ANDRAS FALUS^{2,3*} and ISTVAN JUHÁSZ¹

¹Department of Dermatology, Debrecen University, Debrecen; ²Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University, Nagyvárad tér 4, 1089, Budapest; ³Molecular Immunology Research Group, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

Received 20 December 2001; accepted 4 June 2002

Melanoma cells and tissues contain considerable amounts of histamine and express histamine receptors, suggesting the existence of autocrine and paracrine regulation by histamine. Our previous *in vitro* results suggested that histamine elevates melanoma cell growth through the H2 receptor. In this work we show that *in vivo* tumour proliferation in immunodeficient mice xenotransplanted with a human melanoma cell line is diminished by cimetidine, an H2 receptor antagonist, if combined with a tamoxifen derivate acting on cytochrome p450 molecules (DPPE). Ranitidine, another H2 receptor antagonist, has a weaker inhibitory effect, the kinetics and mechanism of which is probably dissimilar to that of the cimetidine/DPPE mixture.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS: histamine; melanoma; tumour growth; histamine antagonists.

INTRODUCTION

Xenotransplantation of human tumours into immunodeficient mice is widely performed (Cornil *et al.*, 1989). Mice suffering from severe combined immunodeficiency (SCID) can be used for allo- and xenotransplantation of a variety of cells and tissues, because both their T and B cell-mediated immunity have been damaged due to a congenital autosomal recessive mutation (Bosma *et al.*, 1991). The successful implantation of melanoma cells (Juhász *et al.*, 1993) and other tumours into SCID mice has been reported in recent years.

Histamine and L-histidine decarboxylase (HDC) expression are high in melanoma cell lines and melanoma biopsies, but not in normal melanocytes (Haak-Frendscho *et al.*, 2000), thus an active role

for histamine of autocrine or paracrine origin in malignant cellular proliferation is strongly suggested (Bolton *et al.*, 2000). Presumably, a small amount of locally produced histamine remains within the cell and binds to intracellular cytochrome p450 moieties found in the microsome and nuclear fraction (Brandes *et al.*, 1991). This binding can be effectively blocked by a tamoxifen derivate, DPPE (N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]-ethanamine-HCl).

The aim of the present study was to examine the effect of antihistamine agents (cimetidine, ranitidine, DPPE and combinations of them) on melanoma growth *in vivo* after inoculation of the human melanoma cell line HT168 into immunodeficient (SCID) mice. Our findings suggest that ranitidine alone or a combined application of cimetidine and DPPE both reduce tumour growth in mice *in vivo*, although with different kinetics.

*To whom correspondence should be addressed: Tel.: (36)-1-210-2929; Fax: (36)-1-303-6968; E-mail: faland@dgci.sote.hu

Table 1.
Effect of cimetidine and DPPE (N,N-diethyl-2-[4-phenylmethyl]phenoxy}-ethanamine-HCl)
treatment on tumour growth in SCID mice injected with HT168 melanoma cells. Results
(mean $\pm$ SEM) are expressed as mean tumour volume (cm³).

Weeks	Control	Cimetidine	DPPE	DPPE + Cimetidine
1	0.004 $\pm$ 0.001	0 $\pm$ 0	0.014 $\pm$ 0.004	0 $\pm$ 0
2	0.016 $\pm$ 0.007	0.006 $\pm$ 0.002	0.092 $\pm$ 0.042	0 $\pm$ 0
3	0.154 $\pm$ 0.041	0.270 $\pm$ 0.102	0.763 $\pm$ 0.138	0.057 $\pm$ 0.041
4	0.543 $\pm$ 0.139	1.173 $\pm$ 0.398	1.429 $\pm$ 0.302	0.078 $\pm$ 0.051*
5	0.679 $\pm$ 0.136	2.311 $\pm$ 1.082	1.714 $\pm$ 0.620	0.110 $\pm$ 0.068*
6	0.820 $\pm$ 0.205	3.458 $\pm$ 1.353	1.988 $\pm$ 0.812	0.175 $\pm$ 0.124*

Weeks indicate the time scale after tumour injection. * $P < 0.05$ (**bold face**) = significant inhibition compared to corresponding control group. Either ANOVA or Student's *t*-test were used. $n = 12$ –14 per group, results (mean $\pm$ SEM) correspond to the mean tumour volume (cm³) at various periods after 5×10^6 tumour cell inoculation.

MATERIALS AND METHODS

Cimetidine and ranitidine were purchased from Tocris Cookson Ltd (London, U.K.). DPPE was synthesized by Dr Ferenc Hudecz (Department of Organic Chemistry, Eotvos University, Budapest). Animal studies were carried out according to local and national ethical regulations.

Grafting immunodeficient mice with human melanoma cell line

Primary melanoma HT168 cells (5×10^6) with low liver metastatic capacity (Wistar Institute, Philadelphia, PA, U.S.A.) were injected intradermally into the abdominal skin of immunodeficient C.B-17 scid/scid (SCID) mice (Fox Chase Cancer Centre, Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A.). The animals were treated with various antihistamines in their drinking water. Treatments were ranitidine, cimetidine (50 mg/kg/day/mouse) or DPPE alone (4 mg/kg/day/mouse), or a combination of DPPE and ranitidine or cimetidine. The dosage was selected by preliminary dose-ranging experiments. The treatments lasted throughout the whole experiment. The food and water uptake of the mice was monitored and did not change during the experiment.

Measurement of the developing tumour

The size of individual subdermal growing tumours was measured weekly by calliper and tumour volume was calculated using the formula: tumour volume (cm³) = length $\times$ width $\times$ height. Six to nine weeks after the initial injection the mice were killed

and the tumours, together with a thin strip of skin, were dissected. Tissue samples were embedded in paraffin, serial sections were cut (5 μ m) and stained with haematoxylin-eosin.

Statistical analysis

Student's *t*-test and one-way ANOVA analysis was used to measure the significant differences as a result of the different treatment regimens in all experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Mean tumour volume of SCID mice after treatment with cimetidine and DPPE (alone and together) is shown in Table 1. While cimetidine alone enhances tumour volume after 4 weeks, in combination with DPPE a large reduction in tumour mass is found. Moreover, after 6 weeks 83% of mice developed tumours in the control group, while this figure is only 33% in the DPPE plus cimetidine group.

Ranitidine alone evokes a weaker and more transient inhibition in tumour growth (weeks 3–4), while the simultaneous application of DPPE with ranitidine has no inhibitory effect on the growth of HT168 in SCID mice (Table 2). Very similar results are found if survival rate of mice is tested (not shown). This suggests that the effect of cimetidine (in combination with DPPE) cannot be restricted to merely an H2 receptor blocker. Histological analysis proves the growth of human tumours in SCID mice and the lack of any metastases.

Table 2.
Effect of ranitidine and DPPE (N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]-ethanamine-HCl)
treatment on tumour growth in SCID mice injected with HT168 melanoma cells. Results
(mean $\pm$ SEM) are expressed as mean tumour volume (cm³).

Weeks	Control	Ranitidine	DPPE + Ranitidine
1	0.004 $\pm$ 0.001	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
2	0.016 $\pm$ 0.007	0.004 $\pm$ 0.002	0 $\pm$ 0
3	0.154 $\pm$ 0.041	0.032 $\pm$ 0.017*	0.173 $\pm$ 0.049
4	0.543 $\pm$ 0.139	0.163 $\pm$ 0.071*	0.635 $\pm$ 0.123
5	0.679 $\pm$ 0.136	0.416 $\pm$ 0.181	0.912 $\pm$ 0.135
6	0.820 $\pm$ 0.205	1.025 $\pm$ 0.511	1.758 $\pm$ 0.312

Weeks indicate the time scale after tumour injection. * $P < 0.05$ (**bold face**)=significant inhibition compared to corresponding control group. $n = 12-14$ per group, results (mean $\pm$ SEM) correspond to the mean tumour volume (cm³) at various periods after 5×10^6 tumour cell inoculation.

Cimetidine has been shown to inhibit the growth of several types of tumours both *in vitro* and *in vivo* in animal models (Adams *et al.*, 1994). The fact that ranitidine, another potent H₂ receptor antagonist, is less effective in our system can be partially explained by a set of earlier results. Firstly, cimetidine (but not ranitidine) dramatically elevates IFN γ production by human lymphocytes (Horvath *et al.*, 1999) via a possibly histamine-independent (non-histamine receptor mediated) pathway, most likely through cytp450 moieties.

Elevated concentrations of IFN γ result in the inhibition of cell proliferation by direct stimulation of natural killer cells. The growth-enhancing effect of DPPE alone resembles other data demonstrating the *in vivo* stimulation of tumour growth (Brandes *et al.*, 1991). In the combination experiments, however, DPPE reverses the efficacy of cimetidine. The mechanism of this novel effect is not yet understood. Nevertheless, the *in vivo* findings presented in this study correlate with our unpublished data (not shown) suggesting that the melanoma cell line HT168 expresses H₂ receptors, and their blocking by cimetidine inhibits the growth of melanomas *in vitro* if combined with DPPE.

Since HDC is strongly expressed in melanoma cells and tissues, the autocrine enhancement of melanoma growth through the H₂ histamine receptor is suggested. The occurrence of a relatively large amount of histamine in close vicinity to melanoma cells and tissues affecting melanoma growth has prompted further therapeutic trials with existing and specifically designed new antihistamines. The recently available HDC deficient murine model (Ohtsu *et al.*, 2001) provides further possibilities for studying the histamine receptor-dependent and -independent effects of the antihistamines used in human medicine.

ACKNOWLEDGEMENTS

These studies were performed with the support of the following grants: OTKA 031887, MKM-FKFP1075/97, ETT 05560, 300/2000, DEOEC Mec 421-2/99 OTE.

REFERENCES

- ADAMS WJ, LAWSON JA, MORRIS DL, 1994. Cimetidine inhibits *in vivo* growth of human colon cancer and reverses histamine stimulated *in vitro* and *in vivo* growth. *Gut* **35**: 1632-1636.
- BOLTON E, KING J, MORRIS D, 2000. H₂ antagonists in the treatment of colon and breast cancer. *Seminars in Canc Biol* **10**: 3-10.
- BOSMA MJ, CARROLL AM, 1991. The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* **9**: 323-350.
- BRANDES LJ, BEECROFT WA, HOGG GR, 1991. Stimulation of *in vivo* tumor growth and phorbol ester-induced inflammation by N,N-diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]-ethanamine HCl, a potent ligand for intracellular histamine receptors. *Biochem Biophys Res Commun* **179**: 1297-1304.
- CORNIL I, MAN S, FERNANDEZ B, KERBEL RS, 1989. Enhanced tumorigenicity, melanogenesis, and metastases of a human malignant melanoma after subdermal implantation in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **81**: 938-944.
- HAAK-FRENDSCHO M, DARVAS Z, HEGYESI H, KÁRPÁTI S, HOFFMANN RL, LÁSZLÓ V, BENCSÁTH M, SZALAI C, FÜRÉSZ J, TIMÁR J, BATA-CSÖRG Z, SZABAD G, PIVARCSI A, PÁLLINGER E, KEMÉNY L, HORVÁTH A, DOBOZY A, FALUS A, 2000. Histidine decarboxylase expression in human melanoma. *J Invest Dermatol* **115**: 345-352.
- HORVÁTH BV, SZALAI C, MÁNDI Y, LÁSZLÓ V, RADVÁNY Z, DARVAS Z, FALUS A, 1999. Histamine and histamine-receptor antagonists modify gene expression and biosynthesis of IFN γ in peripheral human blood mononuclear cells and in CD19-depleted cell subsets. *Immunol Lett* **70**: 95-99.
- JUHÁSZ I, ALBELDA SM, ELDER DE, MURPHY GF, ADACHI K, HERLYN D, VÁLYI-NAGY IT, HERLYN M, 1993. Growth and

- invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am J Pathol* **143**: 528–537.
- OHTSU H, TANAKA S, TERUI T, HORI Y, MAKABE-KOBAYASHI Y, PEJLER G, TCHOUGOUNOVA E, HELLMAN L, GERTSENSTEIN M, HIRASAWA N, SAKURAI E, BUZÁS E, KOVÁCS P, CSABA GY, KITTEL A, OKADA M, HARA M, MAR L, NUMAYAMA-TSURUTA K, ISHIGAKI-SUZUKI S, OHUCHI K, ICHIKAWA A, FALUS A, WATANABE T, NAGY A. 2001. Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Letters* **502**: 53–57.