

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Szomatosztatin receptorok, mint molekuláris targetek
vizsgálata humán uvealis melanomában és gyermekkori
hematológiai-onkológiai kórképekben**

Dr. Harda Kristóf Máté

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2021

Szomatosztatin receptorok, mint molekuláris targetek vizsgálata humán uvealis melanomában és
gyermekkori hematológiai-onkológiai kórképekben

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományágban

Írta: Dr. Harda Kristóf Máté okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor, PhD

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Pongrácz Judit, MTA doktora

Dr. Bodor Miklós, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, MTA doktora

tagok: Prof. Dr. Pongrácz Judit, MTA doktora

Dr. Bodor Miklós, PhD

Prof. Dr. Zupkó István, MTA doktora

Dr. Szatmári István, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2021. június. 7. 14:00 óra.

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a
harda.kristof@pharm.unideb.hu e-mail címre a vitát megelőző munkanap (2021. június 4.) 16 óráig.

A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	1
2.	Irodalmi áttekintés	2
2.1.	Szomatosztatin	2
2.2.	Uvealis melanoma.....	4
2.3.	Gyermekekben előforduló malignus és benignus daganatok és hematológiai kórképek	5
3.	Célkitűzés.....	8
4.	Anyagok és módszerek	10
4.1.1.	Sejtvonalak és tenyésztési körülmények.....	10
4.1.2.	Humán uvealis melanoma szövetminták	10
4.1.3.	RNS izolálás és RT-PCR	10
4.1.4.	Kvantitatív real-time PCR.....	11
4.1.5.	Western Blot analízis	12
4.1.6.	Radioligand kompetíciós vizsgálatok	12
4.1.7.	Statisztikai analízis.....	13
4.2.1.	Gyermekekori hematológiai és onkológiai minták.....	13
4.2.2.	Szövettan.....	14
4.2.3.	RNS izolálás.....	14
4.2.4.	RT-PCR analízis a total RNS mintákból	14
4.2.5.	Radioligand kötődési vizsgálatok	15
5.	Eredmények	16
5.1.	SSTR expressziója humán UM szövetmintákban.....	16
5.2.	SSTR expressziója humán UM sejtvonalakban.....	17
5.3.	SSTR expressziója gyermekekori solid daganatokban és hematológiai betegségekben	18
5.4.	Radioligand kötési vizsgálatok	18
5.5.	Beteg nyomon követés.....	20
6.	Megbeszélés.....	21
7.	Összefoglalás	27
8.	Köszönetnyilvánítás.....	28
9.	Függelék: Konferencia előadások, publikált absztraktok és kéziratok gyűjteménye	32

1. Bevezetés

A születéskor várható élettartam folyamatos emelkedést mutat a világ minden régiójában. Azonban vannak olyan betegségek, amelyek korábban jóval kisebb esetszámmal és mortalitással bírtak. Hazánkban a Központi Statisztikai Hivatal adatai szerint 2019-ben 129 603 halálesetből 32 012 esetben rosszindulatú daganat volt a halál oka. Ezzel Európában a standardizált mérőszámokkal is a sereghajtók között vagyunk. Az orvostudomány azonban az elmúlt években rohamos fejlődést diktál és a daganatos megbetegedések egyre jobb felderítésével, korszerűbb diagnosztikával és részletesebb hatásmechanizmus ismerettel párhuzamosan növekszik a terápiás lehetőségek száma, amivel a ma még felderíthetetlen és gyógyíthatatlan rosszindulatú daganatok száma számottevő mértékben csökkenhet.

A kezdeti megoldásként egyedül alkalmazott sebészi kimetszést fokozatosan kiegészítette a radioterápia. Azonban egyre több daganattípusnál volt megfigyelhető, hogy nem egy pontban indul meg a sejtburjánzás, hanem a szervezetben elszórtan, áttétet képezve hatalmasodik el a malignus betegség. Ez hívta életre a harmadik alappillérnek számító, az összetett gyógyszeres kezelést biztosító, komplex onkoterápiát. A mai kezelési lehetőségek közül az onkoterápiában a célzott daganatterápiához fűződik az egyik legnagyobb remény. Paul Ehrlich *magic bullet* elve alapján többek között peptidhormon analógokhoz is lehetőség van citotoxikus anyagok vagy radiofarmakonok hozzákapcsolására, amelyek elszállítják a célsejtekhez a konjugátumokat az eredeti receptorkötődési tulajdonság elvesztése nélkül. Ennek elvi alapja az, hogy a daganatos sejtek felszínén receptor fokozott expresszió figyelhető meg a normál sejtekhez képest. Ezt kihasználva bizonyos peptidek és analógjai felhasználhatóak célzott terápiás hatóanyag vagy diagnosztikai molekula hordozójaként. Ezzel a megoldással számottevően növelhető a farmakon szelektivitása, miközben csökken a perifériás mellékhatások száma. Mára már jó néhány ezen a célzott terápiás elven működő molekulát fejlesztettek ki, amivel hatékonyabb és célirányos terápiát tudtak elérni ebben a betegcsoportban. Többek között elérhetőek, illetve fejlesztés alatt állnak nagy receptor affinitással bíró szomatosztatin analógok, amelyekhez doxorubicint vagy származékait konjugálták. A citotoxikus ágens molekulárisan célzott felhasználásával alacsonyabb koncentráció is elegendő a kívánt hatás eléréséhez, mindamellett, hogy csökkenthetők a nem kívánt mellékhatások.

Ennek az innovatív megoldásnak köszönhetően lehetőség nyílik olyan daganatok szisztémás célzott terápiás kezelésére, amelyeket korábban nem, vagy csak sebészi eltávolítással tudtak kezelni. Ilyen rosszindulatú, agresszív betegség az uvealis melanoma is, valamint számos lesújtó prognózissal bíró gyermek onkológiai megbetegedés, amelyet kutatócsoportunk is vizsgált a célzott daganatterápia megvalósíthatósága érdekében.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Szomatosztatin

A szomatosztatint kezdetben hipotalamikus neurohormonként fedezték fel. A szomatosztatin egy széles körben elterjedt gátló peptid hormon, mely a központi és a perifériás idegrendszerben egyaránt megtalálható és amely részt vesz a gasztro-, endokrin- és immunfunkciókban. Megtalálható az endokrin hasnyálmirigyben, a bélben, a pajzsmirigyben, a mellékvesékben és a vesékben is. A szomatosztatin elsősorban a sejtprolifерáció és a hormonszekréció gátlója, endokrin, parakrin és autokrin aktivitással. Ezen bioaktív peptideknek két különböző formája van, amelyek emlőszökbén termelődnek. A szomatosztatin-14 ciklikus peptid, amely 14 aminosavat tartalmaz, vagyis tetradekapeptid hormon. Másik formája a szomatosztatin-28, amely 28 aminosavból áll. A szomatosztatin-receptorok (SSTR) membránhoz kötött G-fehérjék, amelyek a szomatosztatin fiziológiai funkcióit közvetítik a szervezetben. A SSTR fokozott expresszióját találták az agyalapi mirigy adenómáiban és számos humán rosszindulatú daganatban, beleértve a tüdő-, emlő- és prosztatárákot, a vastagbélráköt, a glioblasztómát és az uveális melanomát. Ez idáig öt SSTR altípust jellemeztek emberben (1, 2A, 2B, 3, 4 és 5), és ezek közül az SSTR-2-t és az SSTR-5-öt vizsgálták leginkább humán daganatos megbetegedésekben. Ezen altípusok génjei különböző kromoszómákön helyezkednek el: SSTR-1 gén helye (14q13), SSTR-2 (17q24), SSTR-3 (22q13.1), SSTR-4 (20p11.2) és SSTR-5 (16p13.3). Az SSTR-2 két izoformában létezik, mely az SSTR-2A és SSTR-2B nevet viseli, amelyek igazából C-terminális szekvenciájukban térnek el. Egyaránt kötődnek az SST-14-hez és SST-28-hoz, de valamivel nagyobb affinitásuk van az SST-14-hez. Az SSTR-2 a leggyakrabban megfigyelhető altípus, még akkor is, ha egy daganat több SSTR-t is expresszál. Az említett SST biológiai hatásait specifikus G-fehérjéhez kapcsolt plazmamembrán receptorok közvetítik, amelyek a gyomor-bél traktus, a perifériás idegrendszer és a különféle erek specifikus célsejtjein expresszálódnak.

Az SST farmakológiai hatása és a megfelelő SSTR-k magas expressziója különféle endokrin daganatokon az SST szintetikus stabil analógjainak klinikai alkalmazásához vezetett, például az akromegalia hormonális kezeléséhez. Az oktapeptid és hexapeptid SST analógok szerkezeti hasonlósága és reakcióképessége (kötési profil) alapján a receptorcsalád két alosztályra osztható: az SSTR-2, -3, -5 reagál SST oktapeptid analógokkal és egy alcsoport tagja (SRIF₁ csoport, somatotropin release-inhibiting factor); az SSTR-1, -4 rosszul reagál ezekkel a vegyületekkel és egy másik alcsoportba tartozik (SRIF₂ csoport). Számos adat azt mutatja, hogy az SRIF₁ csoport receptorai

közvetítik a szomatosztatin endokrin és antiproliferatív hatásait. Továbbá a SRIF₂ csoport valószínűleg felelős a gyulladásgátló és a nociceptív hatásokért. Az oktapeptid analógok, mint például az oktreotid (Sandostatin®), a szomatulin (Lanreotide®) és az oktasztatin (Vapreotide®) a humán terápiára fejlesztett és alkalmazott gyógyszerek, melyek magas affinitást mutatnak az SSTR-2 és SSTR-5 iránt, közepes affinitást mutatnak az SSTR-3 és az SSTR-4 és alacsony kötési affinitás az SSTR-1-hez. Beszámoltak arról, hogy az oktreotidnak van a legnagyobb affinitása az SSTR-2 iránt, majd hozzávetőlegesen hasonló az affinitása az SSTR-5-höz és az SSTR-3-hoz. Alacsonyabb kötési affinitást mutat azonban az SSTR-1-hez, és a legkisebbet az SSTR-4-hez. A Lanreotide a legmagasabb affinitást mutatja az SSTR-2 iránt, hasonlóan az SSTR-5-höz, és valamivel alacsonyabb kötési affinitást mutat az SSTR-3 és az SSTR-4-hez, továbbá a legkisebb az affinitása az SSTR-1-hez. Egy másik újabb SST analóg a pasireotid (SOM 230) jó affinitással rendelkezik az SSTR-1, SSTR-3 és SSTR-5 iránt. Ezenkívül a szintetikus SST analógok más hasznos és fontos klinikai alkalmazásokat is kínálnak a radionuklidok hordozómolekulájaként a tumor vizualizálására, valamint az SSTR-pozitív tumorok célzott radio- és kemoterápiájára.

A szomatosztatin részt vehet a tumor növekedésének szuppressziójában, mely ténytet megerősíti az SST analógok alkalmazása neuroendokrin daganatok kezelésében. Korábbi *in vitro* és *in vivo* kísérleti vizsgálatok már kimutatták a különféle SST analógok és a citotoxikus SST analóg AN-162 gátló hatását többek között mell-daganatban, tüdőrákban, glioblastomában és vastagbélrákban, ami arra utal, hogy a modern, nagy affinitású és célzott terápiára fejlesztett citotoxikus SST analógok hatékonyan alkalmazhatók rosszindulatú daganatokban szenvedő betegeknél. Az AN-162 másnéven az AEZS-124 egy célzott citotoxikus analógja a szomatosztatinnak, amelyben a hordozó molekulaként szolgáló octapeptid RC-121-hez egy glutársavval van hozzákapcsolva a citotoxikus doxorubicin.

Az SST és uveális melanóma lehetséges fejlődéstani kapcsolatának eredményeként bizonyos, még nem tisztázott összefüggés vagy kölcsönhatás állhat fenn közöttük. Az uveális melanómák az uveális melanocytekból fejlődnek ki, amelyek neuroectodermális-gerincvelő ideg eredetűek. Feltételezzük tehát, hogy ezek a daganatok SSTR-eket is expresszálhatnak. Ezért megvizsgáltuk az SSTR expressziós mintázatát uveális melanómákban. A szemszövet és a neurohormonok közötti kapcsolatot már számos tanulmány vizsgálta. Az SSTR expressziójáról és jellemzéséről azonban még mindig kevés információ áll rendelkezésre a humán UM-ben. Ezért arra törekedtünk, hogy bővítsük kutatásainkat az SSTR-altípusok expressziójával kapcsolatban a humán UM-ben, annak érdekében, hogy diagnosztikai és terápiás célokra felderítsük a membrán specifikus receptorait, mint molekuláris célpontokat.

Ezen túlmenően az SST-14 és a szomatosztatin receptorok magas expresszióját a gyermekkori neuroblastoma és medulloblastoma mintákban, valamint a szomatosztatin receptor szcintigráfia és a

radioreceptor-irányított műtét klinikai alkalmazhatóságát már leírták. A gyermekkori hematológiai és onkológiai betegségek jelentik a balesetek után a gyermekkori halálozás második leggyakoribb okát. Következésképpen sürgető szükség van újonnan kifejlesztett módszerekre e rendellenességek korai felismerésére és újszerű kezelési lehetőségeinek kidolgozására. Noha az SST jelenlétét korábban bizonyították egyes gyermekdaganatokban, csak nagyon korlátozott információ áll rendelkezésre a SSTR-ek expressziójáról és jellemzőiről gyermekkori hematológiai és onkológiai rendellenességekben, beleértve a rosszindulatú és jóindulatú állapotokat is.

2.2. Uvealis melanoma

Az uvealis melanoma a leggyakoribb primer intraokuláris malignus betegség felnőtteknél. Éves előfordulása 4-5 eset/millió. Az intraokuláris uvealis traktus az íriszből, a choroidból és a ciliáris testből áll. Az uvealis melanoma a szem melanómáinak körülbelül 85%-át képviseli. A fennmaradó szem melanómák a kötőhártyából (~5%) vagy más helyekből (~10%) származnak. Az uvealis melanoma ritka daganatnak számít, amely az USA-ban regisztrált melanoma-esetek 3-5%-át képviseli. Az esetek körülbelül 85–90%-a érhártyát érinti, míg a fennmaradók az íriszen vagy a ciliáris testen lokalizálódnak. A bőr és az uvealis melanoma biológiailag megkülönböztethetők, és előfordulásuk tekintetében nem, faj és földrajzi terület szerint eltérnek. Az uvealis melanoma a melanociták jól meghatározott populációjából áll, amelyekből az uvealis malignus melanoma származik. Mivel a melanociták a neuroektodermális-gerincidegből származnak, elméletileg a melanoma a neuroendokrin daganatokhoz hasonló tulajdonságokat mutat.

A rosszindulatú UM kialakulásának oka ismeretlen, de ennek a meglehetősen agresszív betegségnek a kialakulásához különféle hajlamosító tényezők társulnak. Néhány egyénre jellemző, mint a világos bőr és hajszín, a világos szemszín (világos írisz), az uvealis naevusok, a diszplastikus naevus szindróma, az oculodermális és az okuláris melanocytosis és az 1. típusú neurofibromatózis (NF1), mind az UM megnövekedett esélyéhez társulnak. Az UM miatti halálozás viszonylag változatlan maradt, még a korai felismerés és ennek következtében kisebb elsődleges daganatterhelés ellenére is. Az UM-ben szenvedő betegek megközelítőleg fele metasztázist képez. Az UM kezelésének elsődleges célja a daganat metasztatikus terjedésének elkerülése a szemből. Az áttétek leggyakoribb helye a máj, és ha a máj áttétek klinikailag egyértelművé válnak, a prognózis nagyon leromlik. Az UM-hez kapcsolódó halál egyik legjelentősebb előrejelzője a 3. kromoszóma elvesztése. Az UM előfordulása a kaukázusi populációban nyolcszor nagyobb, mint a feketéknél. Az UM túlélésének fő előrejelzői a szövettani sejttípus, a legnagyobb tumorátmérő, életkor, nem és a tumor lokalizációja. Az

átfogó citomorfometriai vizsgálatoknál elfogulatlanabb osztályozási paraméterek jelentek meg. A metasztatikus betegségben szenvedő UM-betegek várható élettartama a metasztatikus folyamat gyorsaságától függ. A metasztázis kockázatát elsősorban olyan klinikai tényezők jelenléte alapján lehet megítélni, mint a tumor mérete vagy a lokalizációja. Az írisz daganatainak prognózisa a legjobb, míg a ciliáris testben lévő daganatoké a legrosszabb.

A szem nem tartalmaz nyirokereket, így az UM tumorsejtek csak hematogén módon képezhetnek metasztázisokat. Ezt a folyamatot a szem gazdag érhálózata csak tovább erősíti. A rendelkezésre álló szűk terápiás lehetőségektől függetlenül a betegek túlélése az UM diagnózisa után mindössze 2 és 8 hónap között mozog, és a betegek 50% -ának már a diagnózis felállításának időpontjában is van áttétje. A rövid túlélés hátterében az általában magas kemorezisztencia és az áttétek szóródása áll. Leggyakoribb áttétes szerv a máj (89%), de a tüdő és a csontvelő is a tumorsejtek proliferációjának rendszeres célpontja. A melanoma okozta halálozás csökkentése érdekében elengedhetetlen a metasztázis megelőzése vagy megszüntetése. Ehhez korai felismerésre és a prognosztikai tényezők javítására van szükség. Döntő fontosságú, hogy bővítsük ismereteinket a metasztázis mechanizmusáról, és megbízható progressziós paramétereket írjunk le prognosztikai markerként a primer UM-ben. Ezek a tények inspirálják az új koncepciók folyamatos keresését az életminőség javítása és a betegek túlélésének növelése érdekében. UM-ben szenvedő betegeknél nincs hatékony terápia, ha áttétek alakultak ki. Számos terápiás stratégia és a szemdaganat sikeres felszámolása ellenére az áttétes betegség szinte mindig végzetes.

2.3. Gyermekben előforduló malignus és benignus daganatok és hematológiai kórképek

A rosszindulatú daganatos megbetegedések gyermekkorban ritkák, mégis igen fontos fejezetét képezik a modern (gyermek)gyógyászatnak. Az 1 év feletti gyermekek halálozásának okai között a balesetek után a rosszindulatú daganatos betegségek a második helyen állnak hazánkban is. A 15 éves kor alatti gyermeklakosságban a daganatos betegségek gyakorisága évente 150 fő/1 millió gyermekre számítva. Ez hazánkban évente 150-200 új gyermekkori daganatos megbetegedést jelent. A gyermekkori daganatok pontos okai ismeretlenek. Hajlamosító tényezők között szerepelnek a kromoszóma-rendellenességek például a leukémia, az öröklött hajlam, környezeti-, immunológiai tényezők esetleg vírusfertőzések. Jelenleg ezen betegségek prognózisával kapcsolatosan, valamint a megelőzésükre vonatkozóan kevés adattal rendelkezünk.

A fibrózis diszplázia (FD) egy ritka genetikai, nem öröklődő, jóindulatú csontbetegség, amely monosztotikus és poliosztotikus formában fordul elő. Az FD egy olyan csontfejlődési rendellenesség,

amelyben a normál szivacsos állomány helye kóros rostos szövetekkel töltődik fel a csontok medulláris üregében, amely csontos metaplaszia által képzett, gyengén meszes primitív csont trabekuláit tartalmazza. Az infantilis myofibromatózis (IM) egy mesenchymális rendellenesség, amelyet a bőr, a csont, az izom és a zsigerek rostos felszaporodása ír le. Bár ritka, gyermekkorban a leggyakoribb fibrózis daganat. Az agresszív gyermekkori myofibromatózis egy autoszomális recesszív betegség, amelyet izom-aponeurotikus szövetből származó sejtek fibroblasztikus proliferációja jellemez. Etiológiája ismeretlen, a jelentett esetek átlagos életkora 7 év. A daganat gyors növekedést mutat komoly fájdalom nélkül, és úgy tűnik, hogy az izomszövethez és/vagy a csonthoz kapcsolódik. A kezelési lehetőség tipikusan konzervatív műtéti kivágás, azonban korai visszaesésekről számoltak már be. A teratomák különféle sejtkomponensekkel rendelkező tumorok, amelyek érett (azaz jóindulatú) vagy éretlen (rosszindulatú) proliferáló pluripotens sejteket tartalmaznak, amelyek egynél több csírasejt-rétegből származnak. A teratomák előfordulása a születések számában 1:4000-hez. A teratomák etiológiája nem teljesen ismert, azonban valószínűleg akkor fordulnak elő, ha az egyes pluripotens sejtek nem fejezik be a migrációt és továbbra is rendellenes helyen osztódnak, jellemzően a középvonal mentén. Természetüket tekintve a teratomák egyaránt lehetnek jóindulatúak és neoplasztikusak. A mesenchimális hamartoma a dezorganizált szövetek daganatszerű jóindulatú tömege, amely kevésbé ismert patogenezissel rendelkező helyi fejlődési rendellenességeket tükröz. Idősebb gyermekeknél nem gyakori, különösen 2 éves kor után. Ennek a daganatnak a diagnosztizálása nehéz, mert a tünetek és a klinikai tünetek nem specifikusak. Ebből kifolyólag megalapozott gyanúra van szükség a diagnosztizáláshoz és a kezeléshez. A gyermekek körében a rhabdomyosarcoma (RMS) a leggyakoribb lágyrész-szarkóma. Éves előfordulása 4,5 eset/1 millió gyermek, és a harmadik leggyakoribb gyermekkori koponyaűri daganat a neuroblastoma és a Wilms-tumor után. Az RMS daganatok tipikusan a vázizomzathoz kapcsolódnak, és az esetek körülbelül 50%-át az élet első évtizedében diagnosztizálják. Az akut limfoblasztos leukémia (ALL) a leggyakoribb hematológiai neoplasztikus betegség gyermekeknél, amelyet a transzformált limfoid sejtek szaporodása jellemez a csontvelőben, a perifériás vérben és más egyéb szervekben. Az ALL életkorhoz igazított incidenciája az Egyesült Államokban 1,38/100 000 fő évente, becslések szerint 2019-ben 5930 új eset és 1500 haláleset jellemzi. Az ALL a gyermekek akut leukémiájának 75–80%-át teszi ki. A Hodgkin-limfóma (HL) a gyermekkori daganat rendkívül jól gyógyítható formája, amelynek becsült 5 éves túlélési aránya meghaladja a 98%-ot kemoterápiával való kezelést követően önmagában vagy sugárterápiával kombinálva. Az örökletes szferocitózis (hereditary spherocytosis, HS) a leggyakoribb veleszületett vörösvértestmembrán-hiba, amelyben a vörösvértestek szerkezeti fehérjéinek rendellenességei az eritrocita membránfelületének elvesztéséhez vezetnek, melynek következtében gömb alakú, nagysűrűségű, rosszul deformálódó vörösvértestek képződnek, hemolízissel kísérve. A

HS előfordulása 1:5000-hez az európai származású egyének körében és az Egyesült Államokban. Az immun thrombocytopenia (ITP) az egyik leggyakoribb vérzési rendellenesség gyermekkorban, évente 100 000 gyermekre számítva körülbelül 5-10-ben fordul elő. A gyermekkori ITP gyakran önkorlátozott betegség vagy állapot, amely önmagában is megoldódik, vagyis nincs hosszú távú káros hatása az ember egészségére. A granulocytopenia a rendellenességek heterogén csoportja, amelyet a perifériás vér granulocitáinak csökkenése kísér a normál tartomány alsó határa alatt ($<0,5 \times 10^9 / l$). A krónikus jóindulatú neutropenia a gyermekkorban a leggyakoribb neutropenia. A neutropenia krónikusnak tekinthető, ha 8 hét után sem javul. A legtöbb gyermekben a neutropenia néhány évig fennmaradhat, majd spontán megszűnik. A krónikus jóindulatú neutropeniában szenvedő gyermekek általában egészségesek és normál fizikai állapottal rendelkeznek.

3. Célkitűzés

Az uvealis melanoma nem rendelkezik napjainkig átfogó szisztémás terápiával. Az eddigi innovatív célzott daganatterápiás gyógyszerkeverékek és eljárások nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket és mutattak áttörő sikereket. Ennek hátterében többek között a betegség agresszív mivolta, a terület szenzitív jellege, a tumor erős kemorezisztenciája, a daganat komplex összetétele és a nem kellően specifikus daganatterápia állhat. Jelen kísérleti tanulmányban egyrészt az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk az mRNS expresszióját a 2-es és 5-ös típusú szomatosztatin-receptoroknak (SSTR-2, -5) UM szövetmintákban és az SSTR-1-5 altípusokat humán UM sejtvonalakban. Másrészt, hogy megvizsgáljuk az SSTR fehérje jelenlétét és kötődési jellemzőit Western blot és ligand kompetíciós vizsgálatokkal. A kapott eredményeink klinikopatológiai adatokkal történő összevetése alapján célul tűztük ki az SSTR-k jövőbeni diagnosztikai és terápiás lehetőségeit.

A továbbiakban, munkánkat annak irányába folytattuk, hogy megvizsgáljuk a szomatosztatin receptorok expresszióját egy másik, eddig nem vizsgált betegség csoporton nevezetesen a gyermekkori hematológiai és onkológiai mintákon. Az SST receptorok mRNS expressziós vizsgálata mellett az SSTR fehérje kötési jellemzőit is tanulmányoztuk ligand kompetíciós assay-vel. Ezenkívül elemeztük a korrelációt az SSTR altípusok expressziós mintázata és a gyermekgyógyászati betegek klinikopatológiai jellemzői között. Továbbá elvégeztük a betegek 5 éves nyomonkövetését is. Legjobb tudomásunk szerint ez az első tanulmány, amely bemutatja az SSTR-ek expresszióját különböző gyermekkori daganatokban és hematológiai rendellenességekben. Eredményeink új utat nyithatnak meg a szomatosztatin-analógok lehetséges diagnosztikai és terápiás alkalmazásában a gyermekonkológia/hematológia területén.

Így PhD értekezésem alapjául szolgáló kutatómunkámban a következő konkrét célokat tűztük ki:

- Az enukleáció során eltávolított humán primer UM szövetminták SSTR expressziójának felderítését mRNS szinten
- A humán primer UM szövetminták SSTR expressziójának fehérje szintű vizsgálatát SDS- PAGE- Western blot módszerrel
- Az SSTR-k expressziójának vizsgálatát humán UM sejtvonalakban
- Az UM betegek életkorának, nemének, daganat szövettani típusának, esetleges összefüggését az SSTR-k expressziójával
- A humán UM szövetminták SSTR ligandkötési tulajdonságainak, karakterisztikájának meghatározását
- SST receptorok mRNS expressziós vizsgálatát gyermekkori hematológiai és onkológiai mintákon
- Az SSTR-ek fehérje szintű kötési jellemzőinek tanulmányozását ligand kompetíciós assay-vel és a terápiásan alkalmazható SST analógok receptorkötési képességének vizsgálatát a gyermekkori daganatos minták membránreceptoraihoz
- Receptoriális eredmények és a daganatok klinikopatológiai adatainak összevetését és ezen gyermekek túlélési elemzését, nyomonkövetését

4. Anyagok és módszerek

4.1.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülmények

Az *in vitro* sejtes vizsgálatainkhoz használt OCM-1 és OCM-3 (ocular choroidal melanoma) primer humán UM sejtvonalakat a Debreceni Egyetem Biofizikai és Sejtbiológiai Tanszéke biztosította számunkra. Valamennyi *in vitro* kísérletünk során pozitív kontrollként a CACO-2 (humán vastagbél adenokarcinóma) sejtvonalat használtuk, amelyet a Debreceni Egyetem Gyógyszertechnológia Tanszék bocsátotta a rendelkezésünkre. Az OCM-1 és OCM-3 sejtvonalak tenyésztése L-glutaminnal, 10% -os FBS-sel (szarvasmarha-magzati szérum) és 1% penicillin/sztreptomicinnel kiegészített RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) médiumban történt 37 °C-on, 5%-os CO₂-al dúsított inkubátorban párás körülmények között. A CACO-2 sejtvonalat 3,7 g/l NaHCO₃-tal, 10% (V/V) hő inaktivált, steril FBS-sel, 1% (V/V) nem esszenciális aminosav oldattal, 1% (V/V) L-glutaminnal és 100 NE/ml penicillin/sztreptomicin oldattal kiegészített DMEM (Dulbecco Modified Eagle's) tápfolyadékban 37 °C-on, 5%-os CO₂ tartalmú nedves inkubátorban tenyésztettük és passzáltuk. A sejtek passzálására szükség szerint 3 naponta került sor, standard tripszinezési eljárással.

4.1.2. Humán uvealis melanoma szövetminták

A vizsgálatainkhoz 46 primer humán UM szövetmintát használtunk fel, melyek gyűjtése a Debreceni Egyetem Szemklinikáján végzett műtétek során történt. A tumoros szövetminták a műtéti eltávolítást követően azonnal folyékony nitrogénben lettek lefagyasztva, és további feldolgozásig -80 °C-on tárolva. A minták gyűjtése és felhasználása a Debreceni Egyetem Kutatás Etikai Bizottságának jóváhagyásával történt. Engedélyszáma: DERKEB/IKEB 4172-2014. Továbbá, a vizsgálatokhoz a betegek tájékoztatáson alapuló beleegyezésüket adták. A daganat jelenlétének és típusának meghatározása érdekében az egyes minták szövettani vizsgálata is megtörtént. Valamennyi betegből származó szövetminta primer daganatként lett azonosítva, áttetre utaló jelek nem voltak észlelhetők.

4.1.3. RNS izolálás és RT-PCR

Az UM szövetminták és UM sejtvonalak homogenizálását késes homogenizátor (Tissue Ruptor-ral, IKA®-WERKE GmbH, Németország) segítségével végeztük. A homogenizált szövetmintákból, valamint az OCM-1 és OCM-3 sejtekből teljes RNS-t a NucleoSpin

DNS/RNS/Protein Kit (Macherey-Nagel, Németország) segítségével izoláltunk a gyártó leírása alapján. Az RNS mennyiségi és minőségi vizsgálatait NanoDrop spektrofotométerrel (ND-1000, Bioscience, Magyarország) végeztük. Minden mintából 250 ng RNS-t írtunk át cDNS-é TetrocDNS Synthesis Kit (Bioline Reagents, Egyesült Királyság) segítségével. A reakciósort a gyártó utasításai szerint hajtottuk végre. Az RT-PCR reakció 25 µl végtérfogatban történt random hexamer vagy oligo dT segítségével. A reakció 35 ciklusból állt (95 °C-on 15 mp, 60 °C-on 30 mp, 72 °C-on 10 mp), melyet 72 °C-on 2 perces extenziós lépés követett.

Az átírt cDNS mintákkal az SSTR-2 és SSTR-5 gén expressziójának vizsgálatát gén specifikus primereket használva a PCR-t a MyTaq Master Mix-ben (Bioline Reagents, Egyesült Királyság) végeztük el. A PCR reakciót C1000 TM Thermal Cycler RT-PCR rendszerben hajtottuk végre (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Az SSTR-2, és -5 esetében a kezdeti denaturálási lépés 94 °C-on 30 mp-ig tartott, amelyet 30 PCR-ciklus követett (94 °C-on denaturálás 15 mp, 60 °C-on °C annealing 30 mp és 72 °C-on szintetizálás, 15 mp).

A PCR reakció során pozitív belső kontrollként β -aktint használtunk. A PCR-terméket 1,5% -os, GelRedet tartalmazó agaróz-gélben választottuk szét, melyet UV-fényben detektáltunk és digitalizáltunk az AlphaDigiDoc™ RT (Alpha Innotech, USA) rendszer segítségével. A DNS méretének meghatározásához 50 bp DNS-létrát (Bioline Reagents, Egyesült Királyság) használtunk.

4.1.4. Kvantitatív real-time PCR

A kvantitatív real-time PCR elvégzéséhez 1000 ng total RNS-t írtunk át cDNS-sé reverz-transzkripcióval a Tetro cDNS Synthesis Kit (Bioline Reagents) segítségével a gyártó utasításai szerint. Az SSTR-1, -2, -3, -4 és -5 mRNS mennyiségének meghatározása real-time-PCR módszerrel az iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix-et (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) használva 20 µl végső térfogatú reakcióelegyben a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készülék segítségével történt.

A 95 °C-os 10 perces denaturálási lépést 45 ciklus követte, mely két lépésből állt (95 °C-on denaturálás, 15 mp; 60 °C-on annealing 60 mp). Minden egyes mintával a reakciót triplikátumban végeztük el. Háztartási génként β -aktint használtunk. Az SSTR-ek relatív mRNS-expresszióját $\Delta\Delta Ct$ módszerrel határoztuk meg, az egyes SSTR génekre és a háztartási β -aktin génre kapott C_p értékek figyelembevételével. A templát- és reverz transzkripció mentes kontrollok kizárták a nem specifikus amplifikációt és a DNS szennyeződést.

4.1.5. Western Blot analízis

A Western blot elemzéshez a kitapadt OCM-1 és OCM-3 sejteket proteáz inhibitorral (Sigma-Aldrich, St. Louis, IL, USA) kiegészített M-PER lízis pufferben (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vettük fel. A teljes fehérje koncentrációt a Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével mértük 590 nm-en a Fluostar OPTIMA spektrofotométer segítségével. Az SDS-PAGE gélelektroforézist 10% poliakrilamid gél használva végeztük el. Azonos mennyiségű fehérjét (40 ug) vittünk fel a gélre, majd nedves transzfer alkalmazásával a PVDF membránra. Öt %-os TBST-tejjel való blokkolás után a membránokat egy éjszakán át 4 °C-on elsődleges SSTR-5 antitestekkel (anti-szomatosztatin-receptor-2-nyúl, 1:1000 hígítású, [monoklonális, ab134152, Abcam, Egyesült Királyság] és anti-szomatosztatin-receptor-5-nyúl, 1:1000 hígítású [monoklonális, ab109495, Abcam, Egyesült Királyság]) inkubáltuk. Háztartási géneként anti-HPRT-t alkalmaztunk 1:1000 hígításban (poliklonális, PA-22281; Cell Signaling Technology, USA) alkalmaztuk. A mosási lépéseket követően a membránt alkalikus foszfatázzal konjugált poliklonális nyúl-anti-egér szekunder antitesttel inkubáltuk (sc-2771, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) 1: 3000 hígításban. A fehérjéket Alkalikus-foszfatáz Konjugátum Szubsztrát kit (BCIP/NBT kolorimetriás assay, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével detektáltuk.

4.1.6. Radioligand kompetíciós vizsgálatok

A membránok receptorkötési vizsgálatokhoz való előkészítéséhez a mintákat felolvasztottuk és tisztítottuk, majd a mintákat 50 mmol/l Tris-HCl pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk és proteázgátlókkal (0,25 mmol/l fenilmetilszulfonilfluorid, 2 mg/ml pepstatin A és 0,4% (V/V) aprotininnel egészítettük ki, majd Ultra-Turrax szövethomogenizátorral (IKA Works, Wilmington, NC, USA) homogenizáltuk jégen. A homogenizátumot 500 x g-vel 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk a törmelék és a lipréteg eltávolítása érdekében. A nyers membránfrakciót tartalmazó felülúszót kétszer 70 000 x g-n 50 percig 4 °C-on ultracentrifugáltuk (L8-80M, Beckman Coulter, Inc., Kalifornia, USA), miután újra szuszpendáltuk friss pufferben. A végső pelletet homogenizáló pufferben szuszpendáltuk és a vizsgálatig -80 °C-on tároltuk. A fehérjekoncentrációkat Bradford módszerrel határoztuk meg, egy protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) alkalmazásával.

Az RC-160 radiojódozott származékait kloramin-T módszerrel állítottuk elő, és fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztítottuk. A szomatosztatin-receptor-kötési vizsgálatokhoz *in vitro* ligand kompetíciós assay-eket alkalmaztunk, amelyek az [¹²⁵I] RC-160 radioligandumként a gyermekminták membránfrakcióihoz való kötődésén alapultak. Ez a radioaktív

jóddal jelölt ligand jól jellemzett és nagy affinitással bír az SSTR-2 és az SSTR-5 iránt. A 40–120 mg fehérjét tartalmazó tumor membrán homogenizátumokat 50 000–70 000 cpm radiojódózott RC-160 és növekvő koncentrációjú 10^{-12} – 10^{-6} M nem radioaktív peptidekkel mint kompetitorokkal inkubáltuk. Két órán át tartó szobahő inkubálás után a kötési reakciókat 250 μ l jéghideg assay puffer hozzáadásával leállítottuk. A kötött ligandumokat 4500 x g-n, 10 percig, 4 °C-on végzett centrifugálással elválasztottuk a szabad ligandumtól és gamma számlálóval mértük. Munson és Rodbard LIGAND-PC számítógépes görbeillesztési szoftverét használtuk a receptor-kötés típusának, a disszociációs állandó (K_d) és az SSTR-ek maximális kötőképességének (B_{max}) meghatározásához. A kísérlet Prof. Dr. Halmos Gábor témavezetőm segítségével került kivitelezésre.

4.1.7. Statisztikai analízis

Az OCM-1 és OCM-3 sejtvonalakban az SSTR-1, -2, -3, -4, és -5 receptorok mRNS expressziójának mennyiségi meghatározása érdekében korrelációs analízist végeztünk a GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., USA) alkalmazásával, az egyirányú ANOVA teszt kiértékelést figyelembe véve.

4.2.1. Gyermekkori hematológiai és onkológiai minták

A kutatási munkám másik része 15 gyermek hematológiai és onkológiai minta vizsgálatát foglalja magába. Az összes rendelkezésre álló klinikopatológiai adatot, beleértve a diagnózis pontjában az illető korát, a nemet, a tumor vagy a hematológiai rendellenesség típusát, a hisztopatológiai vizsgálati besorolását és a túlélését a későbbiekben az eredmények fejezetben foglaltam össze. A betegek átlagos életkora 8,03 év volt (tartomány: 9 hónap - 15 év). Humán mintákat a Debreceni Egyetem Gyermek Hematológiai-Onkológiai Tanszékén kezelt beteg gyermekektől gyűjtöttük. Hét betegnél solid daganat, nyolc gyermek esetében rossz- vagy jóindulatú hematológiai rendellenesség állt fenn. Hét minta csontvelő-aspirátum volt, egy hematológiai mintát pedig perifériás vérből nyertünk. A tumoros szöveteket primer műtétek alkalmával gyűjtöttük. Az összes minta rutinszerű hisztopatológiai vizsgálata és a diagnózis felállítása tapasztalt patológus által történt. A molekuláris biológiai elemzések során SSTR-pozitív kontrollként humán hólyagdaganat szövetet használtunk. A vizsgálatba bevont mintáknak a gyűjtése és felhasználása a helyi Kutatás Etikai Bizottság jóváhagyásával történt. Engedélyszáma: TUKEB/DERKEB 2284-2004. A mintavételt követően a tumor szövetek azonnal folyékony nitrogénben lettek lefagyasztva, és további feldolgozásig -80 °C-

on tárolva. Minden diagnosztikai beavatkozást a daganatos állapot feltételezett jelenléte alapján hajtottunk végre.

4.2.2. Szövettan

A vizsgálatunkba bevont 15 humán gyermek hematológiai és onkológiai minta szövettani vizsgálata alapján öt beteg szenvedett akut limfoblasztos leukémiában, két minta rhabdomyosarcomaként lett osztályozva, egy-egy mintát szövettanilag teratoma-, infantilis myofibromatózis-, fibrózus diszplázia-, Hodgkin-limfóma-, hamartoma-, immun thrombocytopenia-, hereditær spherocytosis- és krónikus jóindulatú neutropeniaként volt azonosítható.

4.2.3. RNS izolálás

A minták homogenizálását Tissue Ruptor-ral (IKA®-WERKE GmbH, Németország) végeztük. A total RNS-t RNS izoláló kittel (Macherey-Nagel, Németország) izoláltuk a gyártó leírása szerint. Az izolált teljes RNS-t RNS-mentes vízben oldottuk fel, továbbá a mennyiségi- és a minőségi RNS meghatározást NanoDrop spektrofotométerrel (ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc.) mértük. Amennyiben elegendő vizsgálati anyag állt rendelkezésre, a kísérleteket három sorozatban hajtottuk végre.

4.2.4. RT-PCR analízis a total RNS mintákból

A total RNS-t MMLV kit (Promega Co., USA) segítségével írtuk át cDNS-é. 200 ng RNS-templáttal a 25 mM MgCl₂-t, 10x PCR puffer-t [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3], desztillált, autoklávozott vizet, 1 mM dinukleotidokat, 2,5 U/L MuLV reverz transzkriptázt, 1 U/L RNáz-gátlót és 2,5 M oligo dT-t tartalmazó elegyben végeztük el a reverz transzkripciót. A 20 µl végtérfogatú elegyet 23 °C-on 10 percig, 42 °C-on 15 percig, majd 99 °C-on 5 percig inkubáltuk.

Az SSTR1-5 génekre specifikus PCR reakciót 25 µl reakciótérfogatban hajtottuk végre génspecifikus primerekkel. Az SST receptor altípusok között a lehető legkisebb homológiájú primer szekvenciákat választottuk a korábbiakban leírtak szerint.

A PCR-reakcióelegyhez 1 x PCR puffert, 1 U Taq-polimerázt (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂-t, 200 µM dNTP-t (Fermentas), 0,5 µM génspecifikus primert (SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-5),

(Invitrogen) és 3 μ l cDNS templátot alkalmaztunk 25 μ l reakciótérfogatban. Az SST-4 PCR reakcióhoz 300 μ M dNTP-t (Fermentas) és 3 μ l cDNS templátot használtunk 25 μ l végtérfogatban. A PCR-reakciót C1000 TM Thermal Cycler RT-PCR rendszerben (Bio-Rad Laboratories, Inc.) hajtottuk végre. Az RT-PCR futtatásához a következő PCR protokollt használtuk:

- SST-1, SST-2, SST-4, SST-5 esetében: denaturálás (3 perc 94 °C-on), 40 ciklus (94 °C 45 mp, 60 °C 30 mp és 70 °C 90 mp);
- SST-3 esetében: a denaturálást (3 perc 94 °C-on) 40 ciklus követte (94 °C 45 mp, 63 °C 30 mp és 70 °C 90 mp).

A PCR reakciót 72 °C-os, 10 perces inkubálást követően állítottuk le. A PCR-termékeket 1,5% -os, GelRedet tartalmazó agarózgélben választottuk el, UV fényben detektáltuk és az AlphaDigiDoc RT (Alpha Innotech) géldokumentációs rendszerrel digitalizáltuk. A DNS méretének meghatározásához 50 bp DNS-markert (Bioline, Egyesült Királyság) használtunk. Az RT-PCR reakció minőségének teszteléséhez β -aktint használtunk pozitív belső kontrollként.

4.2.5. Radioligand kötődési vizsgálatok

Az UM-nál ismertetett metodikához hasonlóan az SST analóg RC-160 radio-jódozott származékait kloramin-T módszerrel állítottuk elő és fordított fázisú nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (RP-HPLC) tisztítottuk. A szomatosztatin-receptor kötődési vizsgálatokat *in vitro* ligand kompetíciós vizsgálatokkal végeztük, mely a [125 I] RC-160 radioligandként a minták membránfrakciójához való kötődésén alapul. Ez a radioaktív jóddal jelzett ligand korábban számos tanulmány alapján nagy affinitású kötődést mutatott az SST-2 és SST-5 iránt. A tumor membrán homogenizátumokat 50 000–70 000 cpm radiójódos RC-160-nal és 10^{-12} – 10^{-6} M nem-radioaktív peptiddel, mint kompetitorral inkubáltuk. Két órás inkubálás után a kötési reakciókat leállítottuk, a megkötött ligandumot elválasztottuk, majd gamma-számlálóban mértük a kötött frakciók radioaktivitását. Munson és Rodbard LIGAND-PC számítógépes görbeillesztési szoftverét alkalmaztuk a receptorkötés típusának, a disszociációs állandó (K_d) és a receptorok maximális kötőképességének (B_{max}) azonosítására. Az SST analógok és a citotoxikus SST analóg AN-162 SST-4-hez való kötődési hatékonyságát az [125 I] RC-160 kötődés kiszorításával szintén meghatároztuk. A végső kötődési affinitásokat IC_{50} -értékekben fejeztük ki. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerével határoztuk meg Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA.) alkalmazásával.

5. Eredmények

5.1. SSTR expressziója humán UM szövetmintákban

Kísérleti munkánkban 46 humán UM szövetmintát vizsgáltunk. Huszonkilenc mintát gyűjtöttünk férfiaktól és 17 mintát nőktől. A betegek több mint fele (24, 52%) 66 évnél idősebb volt, míg a fennmaradó minták egyenlően oszlottak meg a különböző korcsoportok között.

Az UM szövetmintákból izolált jó minőségű RNS korlátozott mennyisége miatt 46 mintát vizsgáltunk az SSTR-2 mRNS expressziójára és 9 mintát az SSTR-5 expressziójára. Ezeknek a mintáknak a kórszövettani osztályozása azt mutatta, hogy közülük 10 orsósejtes típushoz tartozik. Hét mintát határoztak meg epithelioid típusúnak, és 2 mintát orsósejtes és epithelioid típusú, kevert mintának állapítottak meg. Két mintát nem osztályoztunk szövettanilag. Az SSTR-2 mRNS expresszióját a 46 humán UM mintából 30-ban detektáltuk (65,2%). Kilenc darab humán UM szövetmintát vizsgáltunk SSTR-5 expresszióra, és azt találtuk, hogy ezen minták 66,6% -a (6 minta) pozitív lett az SSTR-5 szempontjából. Az SSTR-2 pozitív esetei közül 60,0% volt férfi és 40,0% nő. Az SSTR-2-pozitív minták korcsoportonkénti további megoszlása a következő eredményeket mutatta: 30–45 éves kor közöttiekben: 62,5% pozitív; 46–55 éves kor: 75,0%; 56–65 éves kor: 66,7%; 66 év feletti életkor: 66,7% pozitív. Nem volt összefüggés a különböző SSTR-altípusok expressziója és az életkor csoportok között. Az SSTR-2-re pozitív minták 40% -a orsósejtes, 36,7% epithelioid és 10% kevert szövettani típus volt. Négy SSTR-5-pozitív minta orsósejtes (66,7%) volt, két minta pedig epithelioid (33,3%).

Az SSTR-ek jelenlétét, ezen SST-kötőhelyek jellemzőit és a radioaktív jóddal kezelt RC-160 membránreceptorokhoz való specifikus kötődését humán UM-mintákon ligand kompetíciós vizsgálatokkal határoztuk meg. A 20 vizsgált minta közül 14 (70%) mutatott SSTR-kötést. A receptorok kötődési affinitását és az SSTR-ek koncentrációját a tumor minták membránjaiban leszorítási kísérletekkel mértük. Az [¹²⁵I] RC-160 tipikus leszorítási görbéinek elemzése ugyanazon jelöletlen peptid (RC-160) segítségével azt mutatta, hogy az egy kötőhelyes modell biztosította, illetve mutatta a legjobb illeszkedést. Ezen eredmények alapján a humán UM mintákból származó membránokban a nagy affinitású SSTR egy homogén populációjú, egy kötőhelyes jelenléte volt megfigyelhető. A számítógépes nem-lineáris görbeillesztési program és az SST receptor kötődési adatainak Scatchard-model szerinti elemzése 14 receptor pozitív tumormintában azt mutatta, hogy a kötőhelyek egyetlen osztályának átlagos disszociációs állandója (K_d) 7,14 nM (3,18–11,8 nM tartomány) és átlagos maximális membránreceptor fehérje kötődési képessége (B_{max}) 604,0 fmol/mg (260–1052 fmol/mg fehérje tartomány). Meghatároztuk a specifikus kötőhelyek jellemzéséhez

elengedhetetlen biokémiai specifikációkat és paramétereket is. Így a [^{125}I] RC-160 kötődését reverzibilisnek, hőmérséklet- és időfüggőnek, valamint a fehérje koncentrációjával lineárisnak találtuk a vizsgált humán UM mintákban. A kompetitív kötődési vizsgálatok az SST kötőhelyek specifitását is bizonyították, számos peptidet felhasználva, beleértve azokat, amelyek strukturálisan rokonok és amelyek nem hasonlók az SST-hez. A radioaktívan jelölt RC-160 kötését teljesen kiszorította az SST-14 növekvő koncentrációja (10^{-12} – 10^{-6} M), míg a szerkezetileg és funkcionálisan különböző és összefüggésbe nem hozható peptidek egyikét sem. A luteinizáló hormont felszabadító hormon (LHRH), a növekedési hormon felszabadító hormon (GHRH), az epidermális növekedési faktor (EGF), a [Tyr⁴] bombezin és az inzulinszerű növekedési faktor-I nem gátolta a radioaktív jódozott RC-160 kötődését még 1 μM magas koncentrációban sem.

5.2. SSTR expressziója humán UM sejtvonalakban

RT-PCR és qRT-PCR eredményeink egyértelműen azt mutatják, hogy az SSTR-1-5 mindkét vizsgált humán UM sejtvonalban expresszáldott. A CACO-2 sejtvonal mint pozitív kontroll mind az öt vizsgált SSTR altípust expresszálta. Az összes vizsgált SSTR közül a legnagyobb expressziót az OCM-3 sejtvonalban figyeltük meg. Azonban mindkét sejtvonalban az SSTR-2 és -5 expressziója erősebb volt, mint az SSTR-1, -3 és -4 expressziója. Mind az öt vizsgált SSTR jelentősen ($p < 0,0001$) magasabb expressziót mutatott az OCM-3 UM sejtvonalban, mint az OCM-1-ben. A qRT-PCR eredmények azt mutatják, hogy az SSTR-1, -2, -3, -4, -5 kifejeződik mindkét vizsgált humán UM sejtvonalban. CACO-2 sejtvonalat használtunk pozitív kontrollként. A GraphPad Prism segítségével kapott egyértékű ANOVA tesztet szignifikánsnak ítéltük ($*p < 0,0001$).

A Western blot-analízis szintén megerősítette az SSTR-2 és SSTR-5 receptor fehérje jelenlétét az OCM-1 és OCM-3 humán UM sejtvonalakban. A receptoriális mRNS-sel kapcsolatos eredményeinkhez hasonlóan Western blottal is magasabb expressziós értéket kaptunk az SSTR-2 és az SSTR-5 receptorfehérjére az OCM-3 tumorsejtvonalban, mint OCM-1 sejtvonalban. CACO-2 humán vastagbél adenokarcinóma sejtvonalat használtunk pozitív kontrollként és anti-HPRT-t (1:1000 hígítás) használtunk háztartási géneként.

Az OCM-1 és az OCM-3 humán UM sejtvonalak sejtmembránjaiban a ligand kompetitív vizsgálataink szintén egyetlen, magasabb expressziós értéket mutattak ki az SST-hez tartozó nagy affinitású kötőhelyekről, átlagosan 5,34 és 6,72 nM disszociációs állandóval (K_d). Az SSTR-ek koncentrációja 433 fmol/mg membránfehérje volt az OCM-1 sejtekben, míg az OCM-3 sejtek szignifikánsan magasabb receptorszintet mutattak: 981 fmol/mg membránfehérje.

5.3. SSTR expressziója gyermekkori solid daganatokban és hematológiai betegségekben

Altípus-specifikus RT-PCR elemzést végeztünk 15 gyermek hematológiai és onkológiai mintán, hogy megvizsgáljuk az SSTR altípusok mRNS expresszióját. A génspecifikus primerekkel amplifikált PCR-termékek várható mérete 216 bp az SSTR-1, 168 bp az SSTR-2, 188 bp az SSTR-3, 222 bp az SSTR-4 és 191 bp az SSTR-5 esetében.

Megállapíthatjuk, hogy a gyermekkori hematológiai/onkológiai minták a szomatosztatin receptor mind az öt altípusára erős mRNS expressziót mutattak. Az SSTR-2 altípus mRNS expresszióját a minták mindegyikében (15/15) detektáltuk, szövettani típusuktól függetlenül. A 15 minta közül csak egy HL-minta expresszált mRNS-t mind az öt SSTR altípusra, és az IM, FD és ITP csak egy receptor altípust, az SSTR-2-t expresszált. Az SSTR-5 expresszióját két rosszindulatú solid tumor mintában detektáltuk (4. eset, HL és 5. eset, RMS). A 15 gyermek hematológiai és onkológiai minta közül az SSTR-3 PCR-termékei csak rosszindulatú mintákban voltak kimutathatók, két szolid tumor (HL és RMS) és két másik esetben (ALL és HS) expresszáldott az SSTR-3. Az SSTR-3 és SSTR-5 altípusok a minták kisebb számában fejeződtek csak ki, egész pontosan négy, illetve két mintában voltak megtalálhatóak. Az SSTR-1 és az SSTR-4 előfordulása hasonló volt (9/15, 60%) az elemzett 15 mintában. A kilenc SSTR-4-pozitív minta közül kettő rhabdomyosarcoma volt, két minta ALL, egy HL, egy teratoma típusú, egy szövettani szempontból hamartoma, egy HS és egy krónikus jóindulatú neutropenia volt. Vizsgálatunkban mindkét RMS minta pozitív volt az SSTR-1, SSTR-2 és SSTR-4 vonatkozásában. Mindkét szolid jóindulatú daganatminta SSTR-2 receptor expressziót mutatott, de egyikük sem expresszált az SSTR-3 és SSTR-5-t.

A templátmentes és reverz transzkriptáz-mentes kontrolllok kizárták a nem specifikus amplifikációt és a DNS-szennyezést. Az β -aktin specifikus primereivel végzett PCR-amplifikáció minden mintában egyetlen terméket eredményezett, ami megerősítette, hogy a mintákban nincs RNS-degradáció. Pozitív kontrollként humán hipofízis mintákat használtunk.

5.4. Radioligand kötési vizsgálatok

Az SSTR fehérje jelenlétét, ezen SST-kötőhelyek jellemzőit és a radioaktív jódval jelölt SST analóg az RC-160 specifikus kötődését humán gyermek szilárd tumor minták membrán homogenizátumaihoz ligand kompetíciós vizsgálatokkal határoztuk meg. A hét vizsgált minta közül öt rosszindulatú daganat és két jóindulatú daganatminta mutatott SSTR-kötést. Ugyancsak megvizsgáltuk az SSTR-ek kötési affinitását és az SSTR-ek koncentrációját a tumor minták membránfrakcióiban. Az [125 I] RC-160 tipikus leszorítási elemzése és a specifikus kötési adatok Scatchard-szerinti kiértékelései azt mutatták, hogy az egykötőhelyes modell biztosította a legjobb

illeszkedést. Ezen receptorkötési eredmények alapján kimutatható volt nagy affinitású SSTR-k homogén populációjának jelenléte a humán gyermekkori mintákból származó tumor membránokban. A számítógépes nem-lineáris görbeillesztési program és az SST-receptor-kötési adatok Scatchard-model-elemzése a hét darab vizsgált receptor-pozitív tumor mintában azt mutatta, hogy az SSTR-k átlagos disszociációs állandója (K_d) 6,00 nM (tartomány: 4,02–8,12 nM), az átlagos SSTR-koncentráció (maximális kötőképeség, B_{max}) 391,1 fmol/mg membránfehérje (tartomány: 255,1–760,8 fmol/mg fehérje). Meghatároztuk a specifikus kötődési helyek jellemzéséhez elengedhetetlen biokémiai specifikációkat és paramétereket is. Így a [125 I] RC-160 kötését specifikus, reverzibilis, hőmérséklet- és időfüggőnek, valamint fehérje-koncentrációval lineárisnak találtuk a vizsgált humán gyermekkori daganatos mintákban. Az SST kötőhelyek specificitását kompetitív kötődési vizsgálatokban is kimutattuk. Különböző, az SST-hez szerkezetileg rokon vagy hasonló peptideket használtunk ezekben a vizsgálatokban. A radioaktív jóddal jelzett RC-160 kötődését teljesen kiszorította az SST-14 növekvő koncentrációja (10^{-12} – 10^{-6} M), míg a szerkezetileg és funkcionálisan eltérő peptidek egyike sem (például az epidermális növekedési faktor (EGF), a luteinizáló hormont felszabadító hormon (LHRH), a növekedési hormon felszabadító hormon (GHRH), a [Tyr⁴] bombezin és az inzulinszerű növekedési faktor I) gátolta a radioaktívan jelölt SST oktapeptid analóg RC-160 kötődését 1 μ M koncentrációban sem.

Az SSTR altípusok mRNS expressziója az összes vizsgált gyermekkori daganat mintában a SST ligand receptorkötési képességével járt együtt. A radioreceptor-vizsgálatok és az SSTR altípusok mRNS-vizsgálati eredményeinek összehasonlító elemzése kimutatta, hogy az SSTR-2 és/vagy SSTR-5 altípusok expressziója 100%-ban összhangban áll az [125 I] RC-160 specifikus kötőhelyeinek jelenlétével. Az SST-analógok és a citotoxikus SST-analóg AN-162 kötődési affinitását az SSTR-t expresszáló humán gyermekkori daganatos minták (HL és RMS) membrán receptoraihoz szintén ligand kompetíciós mérésekkel vizsgáltuk. Meghatároztuk a [125 I] RC-160 mint radioligand leszorítását a jelöletlen SST analógokkal, mint kompetitorral. Eredményeink azt mutatták, hogy az RC-160 (vapeotid) és RC-121 (mint az AN-162 hordozópeptidje) SST oktapeptid analógok és az AN-162 citotoxikus SST analóg alacsony nanomoláris koncentráció mellett effektív módon nagy affinitással képesek kötődni az SSTR-hez. Mindazonáltal az AN-162 citotoxikus SST konjugátumnak csak kissé alacsonyabb kötődési affinitása volt a specifikus SSTR-ekhez, mint az RC-121 szabad peptid hordozónak, vagyis a doxorubicinnel való összekapcsolás után is megőrizte nagy kötési affinitását. Eredményeink tehát azt mutatták, hogy az RC-121 hordozópeptid nagy affinitású kötődése a tumoros SSTR-ekhez teljes mértékben megmaradt a célzottterápiára kifejlesztett citotoxikus SST analóg AN-162-ben.

5.5. Beteg nyomon követés

A vizsgált minták csoportjában 5 gyermek halt meg 5 éven belül (2 RMS-es, egy teratomás és kettő ALL-es). A férfi és a nő aránya a vizsgált csoportban 2:1 volt (10 fiú, 5 lány). A solid tumoros csoportban négy beteg maradt életben 5 év után, három gyermek meghalt; a fiú és a lány arány 1,33:1 volt (4 fiú és 3 lány). A hematológiai betegségek csoportjában hat beteg volt életben öt év után, két ALL-ben szenvedő gyermek 5 éven belül elhunyt, a fiú és a lány aránya 3:1 volt (6 fiú és 2 lány). Vizsgálatunkban az öt elhunyt beteg közül csak két gyermeknél fordult elő relapszus (mindkettő ALL beteg volt), ami e betegek halálát okozta. Nem találtunk szignifikáns összefüggést a szomatosztatin receptor expressziós mintázata és a klinikai kimenetel, illetve a klinikopatológiai jellemzők között.

6. Megbeszélés

A szomatosztatin hipotalamikus neuropeptid mindkét formája (szomatosztatin-14 és -28) megtalálható a gyomor-bél traktusban, és funkciója között szerepel számos hormon szekréciójának gátlása, úgymint a növekedési hormon, inzulin és gasztrin, glükagon, szekretin és kolecisztokinin. Az általános endokrin hatások mellett az SST autokrin / parakrin szabályozóként működhet. Jelen van a gyomor nyálkahártyájában, a hasnyálmirigyben és a duodenumban is, ahol elnyomja az exokrin váladékot, beleértve a gyomorsavat és a hasnyálmirigy enzimjeit.

Az SST-14 rövid felezési ideje (3 perc) miatt stabilabb és erőteljesebb szintetikus SST analógokat fejlesztettek ki, köztük az oktreotidot (Sandostatin®), a vapreotidot (RC-160, Octastatin®) és a lanreotidot (Somatulin®). Az SST-analógok plazma felezési ideje 120 perc, és ezek a peptid-analógok körülbelül 50-szer erősebbek az SST-nél.

Jól ismert, hogy az SST és oktapeptid analógjai specifikus G-fehérjéhez kapcsolt membránreceptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. Míg a natív SST hasonló nagy affinitást mutat az SSTR-1-5-hez, a szintetikus oktapeptidek, például az oktreotid, az RC-160 és az RC-121 különösen az SSTR-2-hez és az SSTR-5-hez kötődnek a legnagyobb affinitással, mérsékelt affinitást mutatnak az SSTR-3-hoz, és alacsony affinitás az SSTR-1 és az SSTR-4 iránt. Kimutatták, hogy a szomatosztatin-analógok, köztük az RC-160, hatékony tumor növekedés-gátlóként is működnek különböző daganatok kísérleti modelljeiben. A terápiás hatékonyság növelése érdekében további új analógokat állítottak elő, amelyek tartalmazzák a ciklohexapeptidet, például ilyen a SOM230 (pasireotid) készítmény, amely nagy affinitással kötődik az SSTR-1, -2, -3 és az SSTR-5-hez.

A szomatosztatin receptorok, főként az SSTR-2 jelenléte a daganatokon, lehetővé teszi bizonyos primer tumorok és metasztázisaik hatékony lokalizálását is szcintigráfias technikák alkalmazásával. Az SST radiojelzéssel ellátott analógjait, például az [¹¹¹In-DTPA-D-Phe1] oktreotidot (OctreoScan®) klinikailag alkalmazzák a szomatosztatin receptorokat expresszáló tumorok lokalizálására. A célzott sugárterápia ígéretes megvalósítása érdekében, amelynek során a szomatosztatin analógok számos radionuklidhoz kapcsolódnak, például ⁶⁸Galliumhoz vagy ⁹⁰Itriumhoz, szintén klinikailag előrehaladott állapotban van.

Jelen kutatásainkban célul tűztük ki olyan ritka, eddig nem vizsgált kórképekben, mint amilyen a humán uvealis melanoma, valamint különböző gyermekkori hemato-onkológiai betegségekben az SSTR-ek expressziójának és terápiában való potenciális felhasználásának vizsgálatát, felderítését. Kutatásaink első fázisában a humán uvealis melanomára fókuszáltunk.

Az uvealis melanoma a leggyakrabban diagnosztizált primer malignus intraokuláris daganat felnőtteknél, és a melanoma második leggyakoribb formája a bőr melanoma után. Az elmúlt 50 évben

a diagnózis és a sikeres lokális terápiák terén elért eredmények ellenére komoly előrelépés az UM-halálozási arány tekintetében lényegében nem történt, és továbbra is jelentős mortalitással jár. A máj a metasztázis leggyakoribb és legfontosabb célpontja, és az áttétek miatti májelégtelenség a legtöbb halál közvetlen oka.

Az UM-ben szenvedő betegek súlyos prognózissal szembesülnek, mivel mintegy 45% -uk metasztázis miatt hal meg, függetlenül attól, hogy a daganatot leggyakrabban azelőtt diagnosztizálják és lokálisan kezelik, mielőtt az elterjedő betegség klinikai jelei megjelennek. Ez ahhoz az elmélethez vezetett, hogy a mikrometasztázisok már a betegség korai szakaszában jelen vannak, de sok évig inaktívak maradnak, mielőtt klinikailag észrevehető makrometasztázis alakulna ki.

A ciliáris test és az érhártya daganatai súlyos veszélyt jelentenek az életre. Az elsődleges uveális melanoma kezelése továbbra is vitatott. Még mindig többnyire egyetértés van abban, hogy az enukleáció elkerülhetetlen sok nagy ciliáris testes és choroidealisan melanoma esetén. Indokoltnak tűnik a klinikailag viszonylag kicsi, „aktív” melanomák valamilyen típusú kezelésnek való alávetése. Számos nagy méretű melanomát és a legtöbb közepes méretű melanomát manapság hőkezeléssel vagy anélkül végzett besugárzással vagy enukleációval kezelnek. Javaslatok születtek arra is, hogy mivel a helyi kezelések nem eredményeznek semmilyen figyelemre méltó javulást a túlélésben, ezért a jövőbeni kutatásoknak az áttétes betegségek kezelésére kell irányulnia.

Az UM szisztémás kezelése nagyon korlátozott. Az adjuváns szisztémás terápiát elsősorban azoknál a betegeknél alkalmazzák, akiknek nagy a metasztázis kockázata, vagy előrehaladott metasztatikus betegeknél, viszont a klasszikus kemoterápiás szerek válaszaránya mindössze 7% és 25% között marad. Az UM kezelésére szolgáló szisztémás kemoterápia hatástalan. A metasztatikus UM genetikai és molekuláris hátterének megismerése ellenére jelenleg nincs kielégítő szisztémás kezelési megközelítés. Jelenleg nem állnak rendelkezésre olyan hatékony szisztémás terápiák, amelyek alkalmazhatók lennének az elsődleges daganatban. A primer UM diagnózisának és terápiájának javulása ellenére az áttétes halálozások száma az elmúlt 20-30 évben nem csökkent jelentősen. Ezért sürgető szükség van új innovatív terápiás módszerekre.

Jelen munkákban SSTR-2-nek az mRNS expresszióját 46 darab UM mintában, az SSTR-5 expresszióját 9 darab UM tumor mintában vizsgáltuk. A primer daganatokat fehérje szinten is tanulmányoztuk. Az SSTR-ek UM mintákban történő kimutatása mellett az OCM-1 és OCM-3 UM sejtvonalakat kvantitatív, real-time RT-PCR-rel is elemeztük a receptor mRNS expressziójának szempontjából. A vizsgált UM minták közül harmincegy (65,2%) minta mutatott SSTR-2 pozitivitást, és kilenc minta közül 6 (66,6%) volt SSTR-5 pozitív. Ezzel szemben Ardjomand et al. egy korábbi tanulmányban a 25 tesztelt UM minta szinte mindegyikében azonosította az SSTR-2 expressziót. Saját munkákban ligand kompetitív vizsgálattal is megvizsgáltuk a radioaktív jódval kezelt RC-160 kötését

20 UM minta membránfrakcióihoz. Megállapítottuk, hogy a vizsgált humán UM-minták 70% -ában specifikus nagy affinitású SSTR-ek jelenléte igazolható, átlagos K_d 7,14 nM és átlagos B_{max} 604 fmol/mg membránfehérje receptorális kötési karakterisztikákkal. Fontos megjegyezni azt is, hogy az összes receptor-pozitív daganatminta egybeillő módon jól detektálható mennyiségben expresszálta az SSTR-2 vagy SSTR-5 receptor gént is.

Az elemzett minták szövettani eloszlása azt mutatta, hogy a minták több mint fele (56,1%) orsósejtes, 36,6% epithelioid volt és a fennmaradó 7,3% szövettanilag kevert. A kapott értékek alapján, megállapíthatjuk, hogy a beteg neme és kora nem prognosztizáló tényezők. Eredményeink egyértelműen megerősítik, hogy SSTR-2 és SSTR-5 altípus expresszálódik humán UM mintákban. A qRT-PCR eredmények azt mutatják, hogy az SSTR-2 és az SSTR-5 szintén erősen expresszálódik mindkét vizsgált UM sejtvonalban. Ebben a tanulmányban egyértelműen kimutattuk az SSTR-ek expresszióját két eddig nem tanulmányozott humán UM sejtvonalban is, és bemutattuk, hogy az OCM-3 sejtek szignifikánsan magasabb szinten fejezik ki az SSTR-eket, mint az OCM-1 sejtek ($p < 0,0001$). Az SSTR-2 vagy SSTR-5 mRNS által kódolt receptorfehérjét mindkét UM sejtvonalban Western blot segítségével is megerősítettük.

A célzott terápiára fejlesztett doxorubicinnel konjugált citotoxikus SST analóg, az AN-162 alapvetően a terápiában hatékonyabb és kevésbé toxikus, mint a hagyományos szisztémás kemoterápia. Ezen analógok egyetlen fő mellékhatása a mieloszuppresszió, amelyet a doxorubicin, mint citotoxikum hasítása okoz. Az SST-receptorok magas előfordulási gyakorisága az UM-ben felveti annak a lehetőségét, hogy ez a daganattípus alkalmas lehet az SST-analógokkal, köztük a célzott daganatterápiára fejlesztett citotoxikus SST analóg AN-162 peptiddel való kezelésre. Mivel az UM eddigi terápiája komoly kihívást jelent, munkánk eredménye segít a további specifikus molekuláris célpontok meghatározásában, a metasztázis megelőzésében vagy a disszeminált metasztázisok további elterjedésében.

Kísérleti munkáink következő fázisában a gyermekekben előforduló malignus és benignus daganatok és hematológiai kórképek SSTR expressziós vizsgálataival foglalkoztunk.

Az 1990-es évek közepe óta tapasztalt lenyűgöző fejlődés ellenére a hematológiai és onkológiai betegségek továbbra is a gyermekkori halálozások egyik fő okai. A felnőttkori onkológiához képest ebben a pillanatban a célzott onkoterápiák sokkal kevésbé fontos szerepet játszanak a rákos gyermekek körében. Ezenkívül a kombinált kemoterápiás protokollokat nem lehet tovább fokozni az akut toxicitás és a késői szövődmények elfogadhatatlan növekedése nélkül. Ezért sürgősen szükség van a korai felismerés, a pontos nyomon követés és a nemrégiben azonosított molekuláris célpontokon alapuló újszerű és hatékony kezelési módszerek továbbfejlesztésére.

A gyermekdaganatok viszonylag ritkák, világszerte kevesebb mint 13 500 eset és évente körülbelül 1500 haláleset tapasztalható a 0–14 éves gyermekek körében. A leukémia messze a leggyakoribb neoplasztikus rendellenesség, amely a gyermekkori daganatok körülbelül 33% -át teszi ki, ezt követik az agydaganatok (25%), a limfómák (8%), a neuroblastoma (7%) és más ritka gyermekkori rosszindulatú daganatok, mint a Wilms tumor, a lágyszövet és csontszarkómák, valamint csírasejtdaganatok hasonlóan alacsony relatív gyakorisággal. A gyermekkori rák kezelése a betegség típusától (szövetten és egyre inkább a genotípus) és a betegség stádiumától függ. A gyakori kezelési megközelítések közé tartozik a kemoterápia, a műtét, a sugárterápia és az őssejt-transzplantáció. Az olyan innovatív kezelési módok, mint az immunterápia és a célzott kis molekulájú gyógyszerek, egyre fontosabb elemeivé válnak az első vonalbeli kezelésnek a gyermek onkológiájában.

Jelen munkánk eredményei azt mutatják, hogy a megvizsgált 15 gyermekminta meggyőzően expresszálja az mRNS-eket az SSTR-ek mind az öt altípusára. Nem volt olyan minta, amelyik legalább az egyik SSTR altípust ne fejezte volna ki. Figyelemre méltó, hogy csak egy HL-minta fejezte ki az mRNS-t mind az öt SSTR altípus esetében. Hasonlóképpen csak az SSTR-2 volt megfigyelhető IM-ben, FD-ben és ITP-ben. Az SSTR-5 expressziója két rosszindulatú szolid tumor mintában mutatkozott, és az SSTR-3 PCR termékei csak rosszindulatú mintákban voltak kimutathatók. Az SSTR-1 és az SSTR-4 előfordulása hasonló volt (9/15, 60%) az elemzett 15 mintában. A kilenc SSTR-4 pozitív minta közül kettő RMS volt, két ALL, egy HL, egy teratoma típusú, egy szövettanilag hamartoma, egy HS és egy krónikus jóindulatú neutropenia volt. Az öt ALL minta közül csak a női beteg mintája volt pozitív az SSTR-3-ra nézve, és a négy fiúgyermekből származó minta közül egyik sem expresszálta az SSTR-3 mRNS-ét. A biológiai minták nagysága, korlátozott mennyisége nem tette lehetővé Western blot vagy immunhisztokémia elvégzését. Hét esetben azonban homogenizált membránfehérje-frakciókat tudunk izolálni radioligand kötő vizsgálatokhoz, hogy bemutassuk a specifikus SSTR kötőhelyek jelenlétét. A radioligand kötési vizsgálatok szintén megerősítették a specifikus, nagy affinitású SSTR jelenlétét a szolid gyermek daganatokban, amelyeket 6,00 nM átlagos disszociációs állandóval (K_d) és 391,1 fmol/mg átlagos maximális kötődési kapacitással (B_{max}) voltak jellemezhetőek. A molekuláris biológiai elemzések és a radioligand kötési vizsgálatok egyértelműen kimutatták, hogy az mRNS expressziója az SSTR-2 és SSTR-5 altípusok esetében 100% -ban összhangban áll a radioaktívan jelölt SST oktapeptid analóg RC-160 specifikus receptorális kötődésének jelenlétével.

Bár a vizsgált csoport mintaszáma limitált volt és összetétele heterogén, érdemes megjegyezni, hogy a vizsgáltak közül öt rákos gyermek halt meg az 5 éves követési időszak alatt. Az öt ALL betegből három életben maradt, de két gyermek 5 éven belül meghalt. A rhabdomyosarcomával és a teratomával diagnosztizált betegek mutatták a legrosszabb kimenetet ebben a vizsgált csoportban. A

SSTR expresszió és a klinikai adatok között nem figyeltünk meg összefüggést. További eredményeink alapján a rosszindulatú gyermekmintákban a szintetikus oktapeptid-analógok az SSTR-hez való magas kötődési affinitása azt jelzi, hogy az SSTR-pozitív daganatos gyermekek a jövőben ígéretes jelöltek lehetnek az SST-analógokkal, köztük a célzott citotoxikus SST-analóg AN-162-vel történő terápiára.

Ezen eredmények alapján az SST peptid-analógok és az SSTR-ek jelentős diagnosztikai és terápiás potenciállal bírhatnak a gyermekek hematológiájában és onkológiájában. A felnőttek onkológiájához hasonlóan a radioaktívan jelölt szomatosztatin-analógok is hatékony eszközt kínálhatnak a daganatok lokalizációjának és kiterjedésének azonosításához a gyermekeknél. Nagyon korlátozott adatok állnak rendelkezésre a gyermekkori daganatok szomatosztatin vonatkozásairól. Ezen adatok többsége nem a rosszindulatú daganatokról szól, és szinte minden adatot oktreotiddal nyertek. Ezenkívül Dishop és Kuruvilla arról számoltak be, hogy az SST analógokat terápiásan is alkalmazzák a kemoterápia tüneteinek és mellékhatásainak csökkentésére, valamint a differenciálódás elősegítésére a gyermekkori onkológiában. Még nem kellően megállapított, hogy az SSTR-eket fel lehet-e használni a gyermekek hematológiai és onkológiai rendellenességeinek lokalizálására és kezelésére, mivel az eddig rendelkezésre álló eredmények hiányosak vagy nem meggyőzőek. Ezért jelen tanulmányunkban arra törekedtünk, hogy megvizsgáljuk a SSTR altípusok (SSTR-1–5) mRNS expresszióját humán gyermekkori szolid daganatokból származó mintákban, valamint hematológiai betegségben szenvedő gyermekek csontvelő aspirátumaiban és perifériás vérében. Radioreceptor vizsgálattal tanulmányoztuk az SSTR fehérje kötődési jellemzőit is. Ezenkívül elemeztük az SSTR-ek expressziója, a kötődési jellemzőik és a gyermekgyógyászati betegek klinikopatológiai adatainak lehetséges összefüggését.

Összegzésként megállapíthatjuk, hogy a tumorhoz társított peptidek vonzó tulajdonságokat nyújtanak a kezelési stratégiák számára a könnyű hozzáférés, a kényelmes tisztítás és tárolás miatt. Továbbá kevésbé immunogének, mint az antitestalapú immunterápiák, magas a szöveti penetrációjuk és nagy affinitásuk van olyan specifikus sejtalkotókhoz, amelyek befolyásolják a daganatos sejtek túlélését, szaporodását és differenciálódását. Gyors clearance jellemzi őket és kiemelkedő jelöltek az egyszerű konjugációs stratégiák számára, ahogyan azt már korábban ismertettük. Az SST peptidhormon antiproliferatív hatása és az SSTR-eknek a humán endokrin daganatokban való jelenlétének bizonyítása kifejezetten hatékony és biológiailag stabil szintetikus oktapeptid analógokhoz vezetett, például RC-160 (oktasztatin/Vapreotide®), SMS-201-995 (ocreotide/Sandostatin®), SOM 230 (pasireotid) és BIM-23014 (somatuline/Lanreotide®) a rosszindulatú daganatok hormonális kezelésére és az endokrinológia számára. Ezeket az SST analógokat széles körben alkalmazzák akromegália, hasnyálmirigy, neuroendokrin daganatok, a gasztroenterohepatikus rendszer endokrin daganatainak kezelésére, beleértve a karcinoid tumorokat,

glükagonomákat, gasztrinómákat, inzulinómákat és VIPomákat. Legjobb tudásunk szerint a szakirodalomban nem állnak rendelkezésre konkluzív vagy meggyőző adatok, amelyek más receptorok ezen SST oktapeptid analógok általi potenciális aktiválását mutatnák be. Ezenkívül bebizonyosodott, hogy az SST analógok hatékonyan alkalmazhatók radionuklid vagy citotoxikum hordozójaiként az SSTR-pozitív tumorok vizualizációjához és célzott radio- vagy kemoterápiájához. Számos, különböző eredetű daganatsejt, például jól differenciált gasztroenteropankreatikus neuroendokrin daganatok, valamint más daganatos megbetegedések mutatják az SSTR túlexpresszióját, amely a célzott diagnosztikai és kezelési módszerek molekuláris alapjaként szolgálhat. A 14. ábrán láthatók a sematikus SSTR-alapú potenciális downstream utak és jelátviteli kaszkádok, amelyek a hormonszekréció, a sejtnövekedés és az apoptózis modulációjához vezetnek.

Megállapításaink, miszerint a humán UM minták nagy százaléka expresszálja az SST receptorokat, alátámasztják azt a nézetet, hogy SST analógok és célzott citotoxikus SST analógok, például AN-162 ígéretes jelöltek lehetnek az UM hatékony kezelésére. Jövőbeli vizsgálatokra van szükség jelen eredményeink terápiás és klinikai jelentőségének alaposabb bizonyítására, valamint a humán UM patofiziológiájának jobb megértéséhez. Vizsgálataink remélhetőleg segítséget nyújtanak az áttétek korai diagnosztizálásában és az SST analógok későbbi, célzott terápiákban történő alkalmazásában.

További eredményeink először mutatták be, hogy szomatosztatin receptorok expresszálódnak számos gyermekkori jóindulatú és rosszindulatú szolid daganatban, valamint a gyermekkori hematológiai rendellenességek mintáiban. Ezek az eredmények új utat nyithatnak a SST peptid hormon analógok lehetséges alkalmazásának, lehetőséget adva a gyermek onkológiai és hematológiai rendellenességek kimutatására és kezelésére. Az SST-receptorok terápiás és klinikai jelentőségének tisztázása érdekében a gyermekek onkológiájában és hematológiájában további vizsgálatokra van szükség. Eredményeink segíthetnek a gyermekkori hematológiai és onkológiai rendellenességek pontos mechanizmusának jobb megértésében is, és jobb megközelítéseket nyújthatnak ezeknek a rosszindulatú daganatoknak a korai felismerésére. Megállapításaink megkönnyíthetik a szomatosztatin szintetikus analógjainak vagy radionuklidjainak vagy azok citotoxikus származékainak klinikai alkalmazását diagnosztikai vagy terápiás célokra.

7. Összefoglalás

Az uvealis melanoma (UM) a leggyakoribb primer intraokuláris malignus daganat felnőtteknél. Előfordulása 4-5 eset/millió. A hematológiai és onkológiai rendellenességek jelentik a gyermekkori halálozás egyik vezető okát. A neuropeptid szomatosztatin (SST) jelenlétét korábban már bizonyították különféle gyermekdaganatokban, de korlátozott információ áll rendelkezésre az SST receptorok (SSTR) expressziójáról és jellemzőiről a gyermekek hematológiai és onkológiai rendellenességeiben, valamint a humán UM-ban.

Jelen tanulmányban az volt a célunk, hogy megvizsgáljuk az SSTR-2 és -5 mRNS és fehérje expresszióját humán UM szövetmintákban és OCM-1 és OCM-3 humán UM sejtvonalakban qRT-PCR, Western blot és ligand kompetíciós vizsgálatokkal. Valamint célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az mRNS expresszióját az SSTR-1–5 altípusoknak 15 gyermek hematológiai/onkológiai mintában RT-PCR-rel. Az SSTR-ek jelenlétét és kötődési jellemzőit további ligand kompetitív vizsgálattal elemeztük.

Az SSTR-2 mRNS-e szignifikánsan gyakoribb expressziót mutatott az UM szövetekben, mint az SSTR-5. Az SSTR-ek jelenlétét az UM minták 70% -ában igazoltuk ligand kompetitív vizsgálattal, és mindkét humán UM modell specifikus, nagy affinitású SSTR expressziót mutatott. Az öt SSTR közül az SSTR-2 és SSTR-5 mRNS szinten humán UM sejtvonalban erősen expresszáldott, de az SSTR-5 mutatta a legnagyobb expressziót. Az SSTR-2 és SSTR-5 receptor fehérjék jelenlétét mindkét UM sejtvonalban Western-blot segítségével is igazoltuk. További eredményeink azt mutatták, hogy a gyermek daganatminták különböző mintázatokkal, de erőteljesen expresszálták az mRNS-t az öt SSTR altípusra. Az SSTR-2 mRNS-ét minden mintában kimutattuk, szövettani típusuktól függetlenül. Egy HL minta együttesen expresszált az mRNS-t mind az öt SSTR altípusra. Az SSTR-3 és az SSTR-5 csak rosszindulatú mintákban, például RMS-ban, HL-ban, ALL és egyetlen nem rosszindulatú állapotban, az örökletes szferocitózisban voltak jelen. Az SSTR-1 és az SSTR-4 előfordulása hasonló volt (60%) a 15 vizsgált mintában. A radioligand kötési vizsgálatok kimutatták a specifikus SSTR-ek jelenlétét és az SST analógok nagy affinitású kötését a vizsgált gyermekkori solid daganatokban.

Összefoglalva, a SSTR-k expressziója a humán UM mintákban, az OCM-1 és OCM-3 humán UM sejtvonalakban, valamint a gyermekek hematológiai és onkológiai rendellenességeiben arra utal, hogy ezek potenciális molekuláris célpontként szolgálhatnak ezen betegségek terápiájában, többek között például modern, citotoxikus SST analógok felhasználásával.

8. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom TDK-s korom óta témavezetőmnek, Prof. Dr. Halmos Gábornak a messzemenő támogatásáért, szakmai segítségnyújtásáért, leírhatatlan sok és szerteágazó patronálásáért mind szakmailag mind az azon túlmutató területeken. Minden segítséget megadott és minden feltételt megteremtett számomra a kísérletek elvégzéséhez, publikálásához és a PhD értekezésem elkészítéséhez. A kutatási munka elvégzésén kívül lehetőséget adott számos konferencián való részvételre, külföldi tanulmányutakon való tapasztalatszerzésre és változatos oktatási feladatokra. Ez a disszertáció emléket állít Dr. Treszl Andreának, aki szintén segített elindítani a kutatói pályán, viszont áttétes emlőrákban mindeközben elhunyt.

Nagyon fontos szerepet játszottak és ösztönzőleg hatottak rám a kutatás terén a közvetlen munkatársaim. Köszönöm a Biofarmácia Tanszék valamennyi munkatársának, különösképpen Dr. Szabó Zsuzsannának fáradhatatlan segítségnyújtását és a közlemények minden társszerzőjének. Külön kiemelve a DE KK Gyermekgyógyászati Klinika, Gyermekhematológia és Onkológiai Tanszékéről Prof. Dr. Kiss Csongort és Dr. Juhász Évát, valamint Dr. Molnár Annát és a DE KK Szemklinikáról Dr. Steiber Zitát, hogy segítségünkre voltak a humán daganatos szövet- és hematológiai minták gyűjtésében és szakterületi támogatásukban, illetve a klinikopatológiai adatok gyűjtésében. Köszönettel tartozom, Prof. Dr. Méhes Gábornak, Prof. Dr. Dezső Balázsnak és Dr. Szász Csabának a patológiai elemzéseikért. Köszönöm további közvetett munkatársaimnak, többek között Dr. Szabó Erzsébetnek a Western blot vizsgálatokban nyújtott segítségét, valamint Suppné Dr. Csorvási Enikőnek az áldozatos és sokrétű segítségnyújtást.

Az egyik legnagyobb megtiszteltetés volt a Nobel díjas Prof. Andrew V. Schally- vel, mint kollaborációs partnerrel együttműködni, és élvezni végtelen szakmai hozzáértését és támogatását.

Szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, testvéremnek, feleségemnek és barátaimnak, hogy mindvégig hittek bennem, támogattak és bátorítottak a munkám elvégzésében, miközben a sok lemondás ellenére megértő hozzáállásukról biztosítottak.

Kutatási támogatás:

A munkát a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (H.G.) projekt finanszírozta. A projektet az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap és az EFOP-3.6.1-16-2016-00022 is társfinanszírozta (H.K., H.G.). A kutatást az Emberi Erőforrások Minisztériumának Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Programja is finanszírozta, a Debreceni Egyetem Biotechnológiai Tematikus Programja keretében (H.G.).

A kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium az ÚNKP-19-3 új nemzeti kiválósági programja (H.K.) és a Felsőoktatási Intézményi Kiválóság Programja NKFIH-1150-6 / 2019 és TKP 2020-IKA-04 is támogatta, a Debreceni Egyetem Biotechnológiai Tematikus Programja (H.G.) keretében. A projektet az Európai Unió támogatásával az Európai Regionális Fejlesztési Alap és az Európai Szociális Alap társfinanszírozta.



Nyilvántartási szám: DEENK/97/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Harda Kristóf Máté

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Harda, K. M.**, Szabó, Z., Juhász, É., Dezső, B., Kiss, C., Schally, A. V., Halmos, G.: Expression of Somatostatin Receptor Subtypes (SSTR-1-SSTR-5) in Pediatric Hematological and Oncological Disorders.
Molecules. 25 (23), 1-14, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25235775>
IF: 3.267 (2019)
2. **Harda, K. M.**, Szabó, Z., Szabó, E. K., Oláh, G., Molnár-Fodor, K., Szász, C. S., Méhes, G., Schally, A. V., Halmos, G.: Somatostatin Receptors as Molecular Targets in Human Uveal Melanoma.
Molecules. 23 (7), 1-13, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23071535>
IF: 3.06

További közlemények

3. **Harda, K. M.**, Halmos, G.: Amitől minden nő retteg: policisztás ovárium szindróma.
Gyógyszerészet. 64 (4), 214-218, 2020.
4. Oláh, G., Dobos, N., Vámosi, G., Szabó, Z., Sipos, É., Molnár-Fodor, K., **Harda, K. M.**, Schally, A. V., Halmos, G.: Experimental therapy of doxorubicin resistant human uveal melanoma with targeted cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog (AN-152).
Eur. J. Pharm. Sci. 123, 371-376, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.002>
IF: 3.532





5. Szabó, Z., Szegedi, K., Gombos, K., Mahua, C., Flaskó, T., **Harda, K. M.**, Halmos, G.: Expression of miRNA-21 and miRNA-221 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their possible role in the development of ccRCC.
Urol. Oncol.-Semin. Orig. Investig. 34 (12), 533, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.06.011>.
IF: 3.767
6. **Harda, K. M.**: Nem megfelelően kihasznált lehetőségek: a probiotikumok hazai eladási tendenciái.
Gyógyszerár. 15 (9), 4-5, 2016.
7. **Harda, K. M.**: Öntsünk tiszta probiotikumot a pohárba!
Gyógyszerár. 14 (4), 10-12, 2015.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13,626

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,327

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.03.12.



9. Függelék: Konferencia előadások, publikált absztraktok és kéziratok gyűjteménye

Előadás szakmai nemzetközi konferencián:

Professzorok az Európai Magyarországért Egyesület, XIX. Nemzetközi Tudományos Konferenciája, Budapest, 2019. 11. 14. Előadás címe: Szomatosztatin receptorokon alapuló, célzott daganatterápia lehetősége.

Előadás nemzetközi szakmai konferencián, publikált absztrakt:

MedPECS: Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences, Pécs 2019. november 09. Részvétel jellege: poszter előadás. Poszter címe és szerzői: Investigation of somatostatin receptor expression in renal tumors. **Harda Kristóf**, Szabó Zsuzsanna, Szabó Erzsébet, Szegedi Krisztián, Flaskó Tibor, Halmos Gábor.

7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfüred, 2017. 10. 5-7. Részvétel jellege: poszter előadás. Poszter címe és szerzői: Somatostatin receptors as molecular targets in human uveal melanoma. **Harda Kristóf**, Treszl Andrea, Steiber Zita, Szabó Zsuzsa, Oláh Gábor, Halmos Gábor.

Nemzetközi szakmai konferencián való részvétel, publikált absztrakt:

7th BBBB International Conference on Pharmaceutical Sciences, Balatonfüred, 2017. 10. 5-7. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Expression of miRNA-21 and -221 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) and their possible role in the development of ccRCC. Zsuzsanna Szabó, Krisztián Szegedi, Katalin Gombos, Tibor Flaskó, **Kristof Harda**, Éva Sipos, Klára Fodor, Gábor Halmos.

Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV. poszter szekció, Budapest 2014. 04. 10-12. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Szomatosztatin receptorok, mint molekuláris célpontok vizsgálata humán uveális melanomában. **Harda Kristóf**; Treszl Andrea; Steiber Zita; Halmos Gábor.

Szakmai konferencián való előadás, publikált absztraktok:

Magyar Onkológusok Társasága (MOT) XXXIII. Kongresszusa, Budapest, 2019. november 28-30. Részvétel jellege: poszter előadás: **Első helyezett**. Poszter címe és szerzői: Szomatosztatin receptorok, expressziójának vizsgálata vesetumorkban és humán vesedaganatokban. **Harda Kristóf**, Szabó Zsuzsa, Szabó Erzsébet, Szegedi Krisztián, Flaskó Tibor, Halmos Gábor.

Szív és érutatási kiválóságközpont - Ironheart Tudományos ülés, Debrecen, 2019. november 7. Részvétel jellege: poszter előadás. Poszter címe és szerzői: Terápiás célpontként alkalmazható szomatosztatin receptorok expressziójának vizsgálata vesetumorkban és humán vese daganat sejtvonalakon. **Harda Kristóf**, Szabó Zsuzsanna, Szabó Erzsébet, Szegedi Krisztián, Flaskó Tibor, Halmos Gábor.

Előadás szakmai konferencián:

Biotechnológia a Debreceni Egyetemen - 2019 tudományos szimpózium, Debrecen, 2019.11.21. Előadás címe: A szomatosztatin receptorok, mint molekuláris célpontok a humán uveális melanomában.

Cholnoky László Szakkollégium Nyitónap tudományos előadás: Szomatosztatin receptorokon alapuló, új, célzott daganatterápia lehetősége humán uveális melanomában, Pécs, 2014.09.20.

Szakmai konferencián való részvétel, publikált absztrakt:

Magyar Onkológusok Társasága (MOT) XXXIII. Országos Kongresszusa, Budapest, 2019. november 28–30. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: A shikonin humán vesedaganat sejtvonalakra kifejtett apoptotikus hatása. Szerzők: Szabó Erzsébet, Szabó Zsuzsanna, Fejes Zsolt, Nagy Béla, **Harda Kristóf**, Szegedi Krisztián, Halmos Gábor.

Magyar Klinikai Farmakológusok XX. Jubileumi Kongresszusa (Magyar Klinikai Farmakológusok XX. Továbbképző Napok - GCP Tanfolyam), Debrecen, Kölcsey Központ, 2018. december 13-15. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Possibility of targeted tumor therapy based on somatostatin receptors in human uveal melanoma. **Harda Kristóf**, Szabó Zsuzsanna, Szabó Erzsébet, Oláh Gábor, Fodor Klára, Halmos Gábor.

Szív és érutatási kiválóságközpont - Ironheart Tudományos Ülés; Debreceni Egyetem, Klinikai Központ, In Vitro Diagnosztikai Tömb; 2018. november 22. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Possibility of targeted tumor therapy based on somatostatin receptors in human uveal melanoma. **Harda Kristóf**, Szabó Zsuzsanna, Szabó Erzsébet, Oláh Gábor, Fodor Klára, Halmos Gábor.

Magyar Klinikai Onkológiai Társaság X. Jubileumi Kongresszusa, Budapest Marriott Hotel, 2018. november 8-10. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: A VHL és PTEN mutációk, mint a vesedaganatok kialakulását befolyásoló genetikai tényezők, vizsgálata a személyre szabott terápia tükrében. Szabó Zsuzsanna, Szabó Erzsébet, Szegedi Krisztián, Gombos Katalin, **Harda Kristóf**, Kállai Judit, Flaskó Tibor, Halmos Gábor.

XIX. Klinikai Farmakológus Továbbképző Kongresszus és GCP napok, Debrecen, 2017. 12. 7-9. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Szomatosztatin receptorok, mint lehetséges terápiás célpontok a human uveális melanomában. **Harda Kristóf**, Treszl Andrea, Steiber Zita, Szabó Zsuzsa, Oláh Gábor, Halmos Gábor.

XIX. Klinikai Farmakológus Továbbképző Kongresszus és GCP napok, Debrecen, 2017. 12. 7-9. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Intratumor heterogenitás és epigenetikai faktorok szerepe a világossejtes vesecarcinóma kialakulásában? Szabó Zsuzsanna, Szegedi Krisztián, Bereczky Zsuzsanna, Kállai Judit, Sipos Éva, Oláh Gábor, Dobos Nikoletta, Flaskó Tibor, **Harda Kristóf**, Halmos Gábor.

Magyar Onkológusok Társasága XXXII. Kongresszusa, Debrecen, 2017. 11. 16-18. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Szomatosztatin receptorok, mint molekuláris célpontok a human uveális melanomában. **Harda Kristóf**, Treszl Andrea, Steiber Zita, Szabó Zsuzsa, Oláh Gábor, Halmos Gábor.

Magyar Onkológusok Társasága XXXII. Kongresszusa, Debrecen, 2017. 11. 16-18. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Az intratumor heterogenitás és epigenetikai faktorok szerepe a világossejtes vesecarcinoma kialakulásában. Szabó Zsuzsanna, Szegedi Krisztián, Kállai Judit, Sipos Éva, Oláh Gábor, Bereczky Zsuzsanna, **Harda Kristóf**, Szász Csaba, Szabó Zsuzsanna, Flaskó Tibor, Halmos Gábor.

Magyar Onkológusok Társaságának Kongresszusa Budapest 2015. 11. 19-21. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Micro-RNS-ek szerepe a világossejtes vesecarcinoma kialakulásában. Szabó Zsuzsanna, Szegedi Krisztián, Flaskó Tibor, Gombos Katalin, **Harda Kristóf**, Oláh Gábor, Fodor Klára, Sipos Éva, Halmos Gábor.

XVII. Klinikai Farmakológus Továbbképző Kongresszus és GCP napok, Debrecen, 2015. 12. 3-5. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: MikroRNS-ek expressziójának tanulmányozása humán hólyagkarcinómában. Szabó Zsuzsanna, Szegedi Krisztián, Flaskó Tibor, Gombos Katalin, Hevér Zsófia, **Harda Kristóf**, Mogyorósi Rita, Oláh Gábor, Halmos Gábor.

XVI. Klinikai Farmakológus Továbbképző Kongresszus és GCP napok, Debrecen, 2014. 11. 27-29. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Onkogén jellegű miR-ek expressziójának vizsgálata humán világossejtes vese karcinómában. Szabó Zsuzsanna, Szegedi Krisztián, Flaskó Tibor, Gombos Katalin, Oláh Gábor, **Harda Kristóf**, Halmos Gábor.

Magyar Urológus Társaság Kongresszusa Siófok 2014. 10. 16-18. Díjazott poszter. Részvétel jellege: poszter. Poszter címe és szerzői: Onkogén jellegű miR-ek expressziójának vizsgálata humán világossejtes vese karcinómában. Szabó Zsuzsanna, Szegedi Krisztián, Flaskó Tibor, Gombos Katalin, Oláh Gábor, **Harda Kristóf**, Halmos Gábor.

Könyvfejezet: Pharmaceutical Care Practical Study Notes – 4. Chapter: Possible ways of pharmaceutical care in gastrointestinal tract 105- 128. old. 2015

Könyvfejezet: Selected chapters of pharmaceutical bioanalytical methods –7. Chapter: Blotting techniques 100-115 old. 2015

Könyvfejezet: Gyógyszerészi gondozási példák 4. fejezet: Gasztrointesztinális rendszert érintő gyógyszerészi gondozási példák 89-120. old. 2015

Könyvfejezet: Válogatott fejezetek a gyógyszerészi bioanalitikából 7. fejezet: Blottolási technikák 111-126. old. 2015 .

Magyar nyelvű közlemény, cikk:

Amitől minden nő retteg: policisztás ovárium szindróma. Szerzők: **Harda Kristóf**, Halmos Gábor. Gyógyszerészet. 64 : 4 (2020), p. 214-218.

Egy hónap Amerikában – gyógyszerész szemmel, **Dr. Harda Kristóf**, Dr. Lakatos Linda, Dr. Tóth Eszter. Gyógyszertár XIV. évf. 3. szám 2015. március 18-20. old.

Nem megfelelően kihasznált lehetőségek - A probiotikumok hazai eladási tendenciái. **Dr. Harda Kristóf**. Gyógyszertár XV. évfolyam 9. szám. 2016. szeptember

Öntsünk tiszta probiotikumot a pohárba! **Dr. Harda Kristóf** Gyógyszertár XIV. évf. 4. szám 2015. április 10-12. old.