

Kísérletes adatok a humán uveális melanoma kezeléséhez

Dr. Kemény-Beke Ádám



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

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Az intraocularis daganatok általános jellemzői

Az intraocularis daganatok között – csakúgy, mint más szervekben – organogenetikai szempontból megkülönböztethetünk benignus (jóindulatú) és malignus (rosszindulatú) daganatokat.

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

Közülük is legnagyobb gyakorlati jelentősége az uveális melanomának van, mivel ez az egyetlen potenciálisan fatális szemészeti rosszindulatú daganat.

Az uveális melanoma egy ritka betegség, az összes melanoma 2.9%-át teszi ki. Az összes regisztrált tumor kevesebb, mint 1%-át alkotja. Magas malignitású intraocularis tumor, rossz prognózissal és jelenleg még ismeretlen aetiológiával. Lehet primer illetve secunder előfordulású. Általában egyoldali, de ismertek bilaterális megjelenései is, akár metasztázis formájában is.

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

Az intraocularis daganatok és ezen belül az uveális melanomák incidenciájáról – áttanulmányozva az utóbbi évek statisztikáit – nem áll rendelkezésre megbízható adat. Egyesek szerint az utóbbi időben nőtt, mások szerint nem változott. A pontos statisztika elkészítését az is nehezíti, hogy BNO (Betegségek Nemzetközi Osztályozása) kód alapján sem tartják nyilván precízen és különítik el a szemészeti és intraocularis tumorokat, nem tesznek különbséget primer és metasztatikus daganatok között.

Az USA-ban végzett felmérések szerint az uveális melanoma 19.4-szer gyakoribb felnőtt fehér emberben, mint feketékben és valamennyi etnográfiai

csoportban a férfiak aránya magasabb. Bármely életkorban előfordulhat, az incidencia csúcsa azonban a 40-60. életévek közé esik.

Az irodalomban eddig négy kongenitális uveális melanomát is leírtak. Gyermekkori előfordulása igen ritka, eddig 16 éven aluli gyermekeken összesen 18 esetet írtak le.

Magyarországon évente 25-30 friss esettel találkozunk, melyek döntő többségének ellátása a DE OEC Szemklinikán történik, mivel klinikánk az országban az intraocularis daganatok onkológiai centrumának szerepét látja el.

Klinikai jelentőségét és felhasználását illetően fontos az a beosztás, amely a daganatok anatómiai elhelyezkedését veszi alapul. A melanoma malignum uveae az uveális traktus bármely szövetét érintheti, bármely részéből kiindulhat: így előfordulhat az irisben, a corpus ciliarében és a chorioideában is. Előfordulási gyakoriságuk: iris 6%; corpus ciliare 9%; chorioidea 85%.

A klinikailag hasonló megjelenésű melanomák igen eltérő szöveti típust mutathatnak, az alacsony malignitású és távoli metasztázist ritkán adó orsósejtes A típustól, az orsósejtes B típuson át, a magas malignitású, gyakran metasztatizáló epithelioid sejtes melanomáig.

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

Az anatómiai lokalizáció miatt az iris melanomák felismerhetősége a legkönnyebb még kis méretűek esetén is. Ezért viszonylag könnyű a diagnosztizálásuk. Mortalitásuk 3-5% /10 év. Öt éven belül 3%-ban, 10 éven belül 5%-ban és 20 éven belül 20%-ban találtak metasztázist. A corpus ciliare melanomák prognózisa rosszabb. Eucleatio után az 5 éves mortalitás 53%, míg a chorioidea melanoma enucleatioja után 14% volt a metasztázisok aránya. A metasztázis kifejlődésének átlagos ideje 68 hónap. Metasztázis kialakulása akkor feltételezhető, ha a tumor legnagyobb prominentiája nagyobb, mint 7 mm. Habár a sugártesti melanomák átlagos mérete már diagnosztizáláskor is nagyobb, mint a chorioideában lévőké, statisztikai vizsgálatok azt mutatták, hogy esetükben a prognózis független a tumor méretétől illetve a sejtípustól.

A tumorok előfordulási gyakorisága és a melanoma malignitása is növekszik a hátsó pólus felé haladva: legritkább az irisben, leggyakoribb a

chorioideában. Legrosszabb indulatúak a chorioidea macula lutea közeli területeinek daganatai.

Előfordulhat egy szemben belül uveális melanoma és naevus egyidejűleg is.

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

1.2. Proliferáció gátlás

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

A sikeres *immunoterápia* kifejlesztését jelentősen hátráltatja az a tény, hogy a szem – bizonyos mértékig – immunológiailag privilégizált helyzetben van, mivel mind a szerzett, mind az öröklött immunválaszok elnyomottak. Ráadásul az uveális melanoma sejtek lymphocytá működést gátló reakcióit nagyban befolyásolják a szemészeti mikroökönyezet hatásai.

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

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

Nemrégén kimutatták, hogy amennyiben dendritikus típusú sejtekhez apoptotikus melanoma sejteket adtak, akkor képesek voltak proliferatív és citolitikus T-sejt választ produkálni. Ez azt sugallja, hogy az ilyen módon előállított dendritikus sejtek mind *in vivo* képesek voltak növelni az apoptózist indukáló tumorelles szerek hatékonyságát, mind *in vitro* képessé teszik az effektor T-sejteket adaptációs transzfer terápiára létrehozására.

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

Az utóbbi néhány évben a klinikai kutatásokban a növényi eredetű szerek vizsgálata előtérbe került a tumorok keletkezésének megelőzésére illetve a már kialakult tumorok kezelésére. Napjainkra az ilyen eredetű vegyületek egyre elterjedtebbek lettek a tumorok terápiájában.

A *Chelidonium majus*-ból és más *Papaveraceae* növényi családból izolált alkaloidokról már korábban bizonyítást nyert, hogy széles körű biológiai aktivitással rendelkeznek az antimikrobás hatástól kezdve a gyulladáscsökkentő hatásig.

A *Chelidonium majus* alkaloidjait kémiai szerkezetük alapján csoportosíthatjuk: protopin típusú (pl. a- és b-allokraptopin, protopin), protoberberin típusú (pl. berberin) és benzofenantridin típusú (pl. chelidonin, sanguinarin, chelerytrin, chelilutin, chelirubin, macarpin) alkaloidokat különböztethetünk meg. Az utóbbiak gyulladásgátló és tumorelleses hatását már igazolták. Közülük is behatóbban az eddigi vizsgálatokban a chelidonint, a sanguinarint (más néven pseudochelerytrin) és a chelerytrint tanulmányozták.

Az említett három vegyületről elsősorban az igazolódott, hogy számos tumorféleségben főleg a sejtnövekedés gátlását érik el apoptózis indukálásán keresztül. Ezzel azt sugallva, hogy potenciálisan használhatók proapoptotikus szerekként a tumorterápiában. Különösen figyelemfelkeltő, hogy ezek a vegyületek hatásosnak bizonyultak olyan tumorokkal szemben is, amelyek a korábban ismert standard terápiákkal szemben rezisztensek voltak.

Napjainkban még kevés megbízható adat áll rendelkezésünkre a *Chelidonium majus* fő komponensének számító chelidonin hatásáról, de a jelenlegi adatok azt jelzik, hogy ez a típusú benzofenantridin alkaloid is indukálhat apoptózis típusú sejthalált megváltozott belső szignálú és malignus sejtekben is. Bizonyítást nyert, hogy a chelidonin gátolja a mikrotubulus polimerizációt ($IC_{50} = 24 \mu M$), ezáltal szétszakítja a sejtek mikrotubuláris rendszerét.

A sanguinarin – számos hatásán túl – gátolja a Na^+/K^+ ATP-ázt, a protein kináz A-t valamint a $\text{NF}\kappa\text{B}$ aktiválódását. A chelerytrin pedig gátolja a protein kináz C-t és fokozza a citokró-m-c felszabadulást, mely folyamat az apoptózis indukciójában, illetve a folyamat továbbvitelében játszik fontos szerepet.

Korábban ezeket a típusú vegyületeket nem vizsgálták uveális melanoma sejtvonal ellen, ezért fordult érdeklődésünk ezen szerek alkalmazása felé.

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

Számos vegyületet próbáltak már ki uveális melanoma sejteken, amelyeknek antitumor aktivitását feltételezték.

Munkacsoportunk korábban már beszámolt arról, hogy a 35-tagú oligo-4-tio-2'-dezoxi-uridin-5'-monofoszfát (dUMP) jelentős antiretrovirális hatása mellett kifejezetten hatékonyak bizonyult a sejtproliferáció gátlásában is.

A tio-dezoxiuridilát-tartalmú oligonukleotidok részletesebb biológiai aktivitásának vizsgálata során váratlanul hatásosnak bizonyult a 4-tio-dUMP (s^4dUMP) és a 4-tio-UMP (s^4UMP) mellett maga a 4-tio-uridin nukleozid is. Bizonyítást nyert, hogy bár a rövid oligomerek inaktívak, a monomer – mely a természetben is előforduló anyag – tumor sejtekben apoptózist indukál.

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

Bár az utóbbi években, évtizedekben sokat fejlődött a tumorkutatás és a terápiás beavatkozások köre is bővült, mégis a melanoma malignum chorioideae kezeléséhez nem áll még rendelkezésünkre olyan lehetőség, amely

segítségével *in vivo* sejtszinten tudnánk beavatkozni a tumor növekedési folyamatába.

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

2. CÉLKITŰZÉSEK

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

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

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

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

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. OCM-1 sejtkultúra

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

A sejteket a benzofenantridinnel való kísérletekhez RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 tápfolyadékba helyeztük el, amely 10%-os FCS-t (fetal calf serum) 0.3 g/ml L-glutamint és antibiotikumként gentamycint tartalmazott, és 5% CO₂-ot tartalmazó párás közegben 37 °C-on inkubáltuk. A sejteket hetente kétszer-háromszor passzáltuk a standard tripszines módszert alkalmazva.

3.2. Kísérletek benzofenantridin alkaloidokkal

3.2.1. Alkalmazott benzofenantridin alkaloid vegyületek

A benzofenantridin alkaloidok közül a chelidonint, a chelerytrint és a sanguinarint használtuk, melyeket a Sigma Aldrich Co. cégtől szereztük be. A chelidonin dimetil-szulfoxidban, míg a chelerytrin-klorid és a sanguinarin-klorid DMSO/víz (1:2) közegben volt oldva.

3.2.2. Kezelés benzofenantridin alkaloidokkal

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

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

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

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

3.2.2.1. DNS fragmentációs assay

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

Az apoptotikus sejteket onnan lehetett felismerni, hogy kisebb volt a DNS koncentrációjuk, pl. a karakterisztikus sub-G₁ csúcs a DNS-tartalom (PI-intenzitás) frekvencia hisztogrammon.

Az s⁴UMP-vel kapcsolatos vizsgálatok során átlagosan 2x10⁶ sejtet kezeltünk s⁴UMP-vel 24, illetve 48 órán át, majd centrifugálással gyűjtöttük be a sejteket.

Ezt követően kétszer mostuk PBS-sel, majd izoláltuk a DNS-t és agaróz-gélre vittük. Az agaróz géleket Alphamager™ 2200 szoftverrel értékeltük ki és archiváltuk.

3.2.2.2. A sejtek annexin V-FITC/PI festése benzofenantridin alkaloidokkal való kísérletek során

Az élő és a nekrotikus sejtekből az apoptotikus sejtek elkülönítése az annexin V-FITC (fluorescein isothiocyanate) és PI (propidium-jodid) használatával történt Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit alkalmazásával. A lecentrifugált sejteket a kötő pufferrel (10 mM HEPES/NaOH, 0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH=7.5) hígítottuk 1x10⁶ sejt/ml koncentrációra. A mintákat 0.5 µl/ml annexin V-FITC és 2 µg/ml PI elegyében inkubáltuk szobahőmérsékleten 10 percen keresztül és aztán mértük FACScan áramlási citométerrel. Az annexin V-FITC és PI fluoreszcenciát az FL-1 (zöld) és az FL-2 (vörös) csatornán mértük, illetve a két csatorna közötti spektrum átfedések korrekciója után értékeltük az eredményeket, melyeket WinMDI 2.8 vagy FLEX software segítségével elemeztünk.

Az apoptotikus és a nekrotikus sejtek megkülönböztetése az annexin V-FITC aktivitáson és a PI kizáráson alapultak. Az apoptotikus sejtek intenzív zöld (FITC) és alacsony vagy közepes vörös (PI) fluoreszcenciát mutattak (a korai vagy késői apoptotikus fázisnak megfelelően). A késői apoptotikus fázisban levő sejteknek megváltozik a permeabilitása, ez a plazma membránjuk megváltozott integritásának a következménye. A nekrotikus sejtek mindkét reagens szempontjából festhetőnek bizonyultak és ezért erős zöld és vörös fluoreszcenciát mutattak. Az élő sejtek pedig egyáltalán nem festődtek.

3.2.2.3. A sejt morfológia elemzése

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

3.2.2.4. MTT-assay

Az MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid) assay kivitelezése az American Type Culture Collection (ATCC) használati utasítása szerint történt. A sejteket 48 lyukú plate-be tettük ki, mintegy 0.6×10^5 sejt volt lyukanként 200 μ l tápoldatban 15 órán keresztül és ezután kezeltük a jelzett dózisu alkaloidokkal vagy azok nélkül csak az oldószerrel. 24 órás inkubációs idő után a sejt kultúrát 20 μ l MTT-oldattal kevertük össze és további 3 órán át inkubáltuk, majd 200 μ l savas izo-propanol oldattal felszuszpendáltuk és ezen homogén elegy 200 μ l-ét vittük 96 lyukú plate-re és ELISA olvasóval olvastuk le.

3.3. Kísérletek 4-tio-uridin-5'-monofoszfáttal (s^4 UMP)

3.3.1. A 4-tio-uridin-5'-monofoszfát (s^4 UMP) előállítása

Az s^4 UMP tiolált mononukleotidot a citidin-5'-monofoszfát H_2S kezelésével állítottuk elő és ioncserélő kromatográfiával tisztítottuk, ahogy ez munkacsoportunk korábbi publikációiban már szerepel. 10 mg/ml törzsoldatot készítettünk és szövetkultúrában hígítottuk közvetlenül minden használat előtt.

3.3.2. Kezelés s^4 UMP-vel

Az OCM-1 sejteket az s^4 UMP-vel kezeléshez RPMI 1640 tápoldatba helyeztük, mely 10%-os hő által inaktivált FBS-t [phosphate-buffered saline] és antibiotikumként penicillint tartalmazott 100 nemzetközi egység/ml, valamint streptomycint 100 μ g/ml dózisban. A sejteket 37 °C-on, 5%-os CO_2 -os párasított közegben tároltuk.

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

3.3.2.1. MTT-assay

A sejtek életképességének vizsgálatához a sejteket 24 lyukú lemezekre oltottuk.

A sejteket a fent ismertetett módon 6 órán keresztül tenyésztettük 1 ml tápközegben, majd különböző koncentrációkban kezeltük azokat az s^4 UMP-vel. Az MTT-assay kivitelezése az ATCC által kiadott kézikönyv szerint történt.

3.3.2.2. Morfológiai elváltozások

A nukleotid kezelés hatására a morfológiában bekövetkező változásokat May-Grünwald-Giemsa festés után Zeiss Axiovert 135 mikroszkóppal fényképeztük.

A karakterisztikus apoptotikus változásokat és a sejtszám változást vizsgáltuk.

3.3.2.3. DNS-fragmentáció teszt

A fent említett módon 24 valamint 48 órán keresztül $30\ \mu\text{M}$ ($10\ \mu\text{g/ml}$) s^4 UMP-vel kezeltünk 2×10^6 sejtet, azokat centrifugálással összegyűjtöttük, kétszer mostuk PBS-sel, majd DNS-t izoláltunk a mintákból és agaróz gélelektroforézisnek vetettük alá. Az agaróz géleket Alphamager™ 2200-vel értékeltük és archiváltuk.

3.3.2.4. Kaszpáz-9 aktivitás mérése

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

Az s^4 UMP-vel kezelt OCM-1 sejteket 1000 rpm-en 10 percen keresztül centrifugáltuk és kétszer mostuk PBS-sel. Az aktivitást Caspase-9/Mch6 Colorimetric Assay Kit felhasználásával vizsgáltuk a használati utasításban leírt módon.

3.3.2.5. Áramlási citometria s⁴UMP-vel való kezelés után

Mind az s⁴UMP-vel kezelt, mind a kezeletlen OCM-1 sejteket (5×10^5 sejt/lyuk) 72 órán keresztül inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk 10 percen keresztül, 10 °C-on. A sejteket ezután újraszuszpendáltuk 0.5 ml kötő pufferben (25 mM HEPES, 125 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) és megjelöltük 5 µl annexin FITC-el és 5 µl propidium-jodiddal a felhasználási utasításnak megfelelően (Medical and Biological Laboratories Co. Ltd, Nagoya, Japan).

Az áramlási citometriás méréseket úszkáló, nem fixált sejteken FacsCalibur áramlási citométerrel végeztük el, excitációra 488 nm-es argonlézert használva. Az eredményeket CellQuest software-rel értékeltük ki. Minden esetben a fluoreszcens adatok 20 000 eseményt gyűjtöttek egybe.

3.4. Statisztikai elemzés

A statisztikai adatok, az átlagok és a szórás értékek kiszámítását WinMDI 2.8, FLEX, CellQuest valamint GraphPad PRISM[®] 4 software-ekkel végeztük el.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Eredmények benzofenantridin alkaloidokkal való kezelés hatására

4.1.1. A chelidonin sanguinarintól és chelerytrintől eltérő hatásai

A benzofenantridin alkaloidokról korábban bebizonyították már, hogy különböző típusú daganatokban a tumor sejtek növekedését gátolják. Annak bizonyítására, hogy hasonló antiproliferatív hatást kifejtenek-e az OCM-1 uveális melanoma sejteken, elvégeztük a kolorimetriás MTT-assay-t. Az OCM-1 sejtek életképessége már 24 órás sanguinarin és chelerytrin kezelés után erős és dóziszfüggő csökkenést mutatott.

Ugyanakkor a chelidonin okozta proliferáció-csökkenés csak alig volt számottevő és a vizsgált összes koncentrációtartományban (0.5 µg/ml – 8 µg/ml) a hatása nem szignifikánsan dózis-függő. A chelidonin esetében megfigyelhető a másik két alkaloidtól eltérő antiproliferatív effektust korábban is leírták már különböző más sejtípusok esetében.

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

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

Azokban a mintákban, amelyekben csak vivőanyag volt, a sejtek kitapadtak a plate falára, míg a chelidoninnal kezelt sejtek leváltak a plate-ek faláról és közülük sokan a plazma membrán blebbing jelenségét, az apoptózisra jellemző egyik markáns elváltozást mutatták.

A fénymikroszkópos vizsgálat a sanguinarin és a chelerytrin eseteiben is dóziszfüggő elváltozásokat mutatott. Nagy dózisú (8 µg/ml) sanguinarinnal és chelerytrinnel kezelve a sejteket kifejezettebben mutatták a sejtduzzadás jelenségét, amely elváltozás a nekrozis korai fázisában figyelhető meg. A hatóanyag koncentráció csökkentésekor a nekrotikus sejtek száma is csökkent, és ugyanakkor megjelentek apoptózisra jellemző sejt morfológiai elváltozások is.

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

4.1.3. A benzofenantridin alkaloidok által okozott apoptózis kvantitatív analízise

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

4.1.3.1. A DNS fragmentáció értékelése

Az apoptózis jelenségének egyik karakterisztikus jellemzője a fragmentált, kis molekulású DNS-ek megjelenése. Ezeket áramlási citometriával lehet kimutatni. Ezért az alkaloidok apoptózis indukáló hatását először a DNS fragmentációs képességükkel értékeltük. Négy órás kezelés után sem a chelidonin, sem a sanguinarin nem okozott szignifikáns DNS degradációt, viszont 24 órás inkubáció után a fragmentált DNS-ekkel rendelkező sejtek aránya jelentősen megnőtt. Ezzel szemben a chelerytrin képes volt szignifikáns DNS fragmentációt okozni már akár 4 órás inkubációs idő után is és az

apoptótikus sejtek száma a hosszabb inkubációs idővel egyenes arányban növekedett.

A chelidonin esetében a kiváltott válasz nem volt dózisfüggő a vizsgált koncentrációtartományon belül. Ugyanakkor a sanguinarin és a chelerytrin hatására bekövetkező elváltozások bifázisos jelleget mutattak.

4.1.3.2. Annexin V-FITC/PI festés elemzése

A DNS fragmentációs assay-jel szimultán módon készítettünk mintákat, amelyeket annexin V-FITC-el és propidium-jodiddal festettünk meg és áramlási citometriával értékeltünk ki. Egy sejtnak az a képessége, hogy köti az annexin V-t – a plazmamembrán külső felszínén levő foszfatidil-szerinhez kapcsolódóan – az apoptózis egy újabb specifikus jele. Ráadásul a DNS degradációs teszttel ellentétben, amennyiben a sejteknél kettős festődést alkalmazunk – fluoroforral kapcsolt annexin V-t és egy plazmamembrán integritást vizsgáló markert (azaz propidium-jodidot) használva –, akkor nemcsak az apoptótikus sejteket tudjuk láthatóvá tenni, hanem ezen módszer alkalmazásával a nekrotikus és az élő sejteket is el lehet egymástól különíteni.

Meg kell jegyezni, hogy az apoptótikus sejtek abszolút száma az előbb említett két assay esetében nem szükségszerűen volt azonos. Ez az eltérés adódhatott abból, hogy a két eltérő módszer alkalmazásakor különböző celluláris válaszokat kaptunk, de származhatott abból is, hogy különböző módon történt a minták előkészítése, mérése és elemzése.

Vizsgáltuk az apoptótikus sejtek arányát 4 és 24 órás benzofenantridin alkaloidokkal való inkubálás után.

A DNS degradáció eredményeihez hasonlóan a chelidonin esetében az annexin V-FITC/PI festéssel sem találtunk szignifikáns apoptózis indukáló hatást.

Ha megnöveltük az inkubációs időt, akkor az apoptótikus sejtek száma jelentősen megnőtt, ami szintén a dózisfüggőségre utal. Ezt a dózisfüggőséget azonban a DNS fragmentációs assay-jel kimutatni nem lehetett.

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

Kísérleteinkben az irodalmi adatoknak megfelelően mi is a sanguinarin indukálta apoptotikus válasz bifázisos mintázatát tapasztaltuk. Míg sanguinarin esetében az apoptotikus sejtek száma a két kvantitatív módszerrel vizsgálva időben fordított arányt mutatott, chelerytrinre a két különböző kísérlet hasonló eredményt produkált.

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

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

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

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

4.2. Az s⁴UMP hatása OCM-1 sejtekre

4.2.1. MTT-assay

Először az MTT-assay-t végeztük el azért, hogy vizsgáljuk a különböző dózisok és a különböző időtartamú kezelések sejtproliferációra gyakorolt hatását.

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

4.2.2. Morfológiai elváltozások

Számos lehetséges magyarázat van a sejtek életképességének csökkenésére, köztük az apoptózis is. Azért, hogy információt nyerjünk az s⁴UMP hatásmechanizmusáról először a nukleotid sejt morfológiára gyakorolt hatását vizsgáltuk.

Kiválasztva az s⁴UMP nukleotid 150 µM-os (50 µg/ml) dózisát és a 48 valamint a 72 órás inkubációs időket a morfológiában karakterisztikus apoptotikus változásokat és csökkent sejtszámot láthattunk a kezelés után.

4.2.3. A DNS fragmentáció értékelése

Az apoptózis egyik markáns jele a DNS degradáció megjelenése és a karakterisztikus DNS-létra jelenléte mintegy 180 nukleotidnyi fragmentekkel. Az OCM-1 sejteket 30 µM (10 µg/ml) s⁴UMP-vel kezeltük 24 és 48 órán át, aztán a DNS-t izoláltuk és elemeztük agaróz gél elektroforézissel. A DNS-degradáció időfüggő volt, bizonyítva ezzel az apoptotikus degradáció karakterisztikus jeleit.

4.2.4. A kaszpáz-9 aktivitás meghatározásának értékelése

Az s⁴UMP további hatásmechanizmusának vizsgálatára meghatároztuk a kaszpáz-9 aktivitást a kezelés előtt és után.

A kaszpáz-9 aktivitás 90 µM (30 µg/ml) s⁴UMP-vel való kezelés hatására 48 óra múlva volt a legmagasabb.

A DNS-degradáció mintázata és a megemelkedett kaszpáz-9 aktivitás nyomatékosan azt sugallta, hogy az s⁴UMP apoptózist okozott.

4.2.5. Áramlási citometria eredmények

Ezt követően meghatároztuk az annexin-pozitív és annexin és propidium-jodid-pozitív sejtek arányát FACS analízissel úgyszintén a kezelés előtt és után. Az eredmény azt jelezte, hogy az s⁴UMP hatásának fő módja apoptózis indukció és csak másodlagosan jelentkezhethet nekrozis.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Benzofenantridin alkaloidok hatása

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

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

Amellett, hogy a dendrit-sejt alapú immunoterápiákban az uveális melanoma sejtek esetében biztató eredményeket lehet elérni apoptózis indukcióban kombinációban a kostimuláns molekulák termékeivel, ezen tumorok adjuváns kezelésének újszerű lehetőségei is nyílhatnak.

Úgy tűnik, hogy a chelidonin hatására valamint a sanguinarin és a chelerytrin jelenlétében a nekrozis indukálásában kialakuló jelentős különbségek a különböző alkaloidok eltérő antiproliferatív hatásával magyarázhatók. Érdekes konklúziót lehet levonni abból, ha összehasonlítjuk a nekrotikus és az apoptotikus sejtek arányát egy-egy alkaloidnál.

A chelidonin esetében az apoptotikus sejtek száma szignifikánsan fölülmúlja a nekrotikus sejteket utalva arra, hogy az alkalmazott kísérletes körülmények között a chelidonin predominánsan apoptotikus típusú sejthalált okozott.

Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a sanguinarin és a chelerytrin esetében a két sejthalál típus versenyez egymással és az eredő hatás (az apoptotikus és nekrotikus sejtek aktuális aránya) a koncentrációtól, az inkubálási időtől és az egyéb körülményektől (pl. a sejtek összezsugorodásától) függ.

A kísérletes eredmények alapján megállapítható, hogy nagyobb koncentrációnál a nekrozis a domináns sejthalálforma, míg kisebb dózis esetén az apoptózis hatékonysága fölülmúlhatja a nekrozisét.

Ezek az eredmények jó összhangban állnak a fénymikroszkópos morfológiai eltérésekkel és magyarázzák a sanguinarin és a chelerytrin bifázisos mintáját.

Ezeket az eredményeket újra csak megerősítik a sejtek áramlási citometriás fényszóródásos tulajdonságai (azaz a méret és a morfológia). Az időben előrehaladó változások és a sejtek fényszóródásos tulajdonságai alátámasztják azt a nézetet, hogy azok a sejtek, amelyeket chelidoninnal kezeltünk főleg apoptózist mutattak, míg a sanguinarin és a chelerytrin bimodális sejthalált okoztak. A sanguinarin által okozott bimodális sejthalált korábban már számos sejtípusnál leírták azt sugallva, hogy ez egy általános jelenség. A sanguinarin és a chelerytrin által okozott sejtszintű válasz közötti hasonlóságok feltételezhetően a két alkaloid közötti szerkezeti hasonlóságokból adódnak.

Ismereteink szerint ez az első tanulmány, amely a benzofenantridin alkaloidok humán uveális melanoma ellenes lehetőségét vizsgálja.

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

5.2. s⁴UMP kezelés hatása

Munkacsoportunk korábban már beszámolt egy kizárólag 4-tio-dezoxiuridilátból álló 35-tagú oligonukleotid molekula *in vitro* anti-HIV hatásáról. A molekula részletes hatásmechanizmusának vizsgálata vezetett

arra az eredményre, hogy a 4-tio-dUMP monomer számos sejtvonal – köztük az OCM-1 uveális melanoma sejtek – életképességét csökkenti. Ez az eredmény azért volt váratlan, mert a kizárólag 4-tio-dezoxiuridilátból álló oligonukleotidok rövidebb lánchosszúságoknál elvesztették biológiai aktivitásukat.

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

Mivel kémiai szerkezetét tekintve az s^4 UMP egy nukleotid, így nem valószínű, hogy bejut a sejtbe, ezért az apoptózis indukáló aktivitása a módosult nukleotid és a sejtfelszíni proteinek közötti interakciónak a következménye. Mindez kémiai alátámasztható, mivel a 4-tiono csoport hajlamos tautomer átalakuláson átmenni és így reaktív –SH-csoportokat képezni a 4-es pozícióban. Ezek kölcsönhatásba kerülhetnek a sejtfelszíni fehérjék –SH-csoportjaival és így diszulfid hidakat alkothatnak. A sejtfelszín redukív funkciója a sejtfelszíni szulfhidril-csoportok – mint például a protein diszulfid izomeráz – közvetítésével már ismert tény. Elképzelhető, hogy az s^4 UMP targetjei ezek az –SH-tartalmú proteinek.

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

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

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

A 30 μM -os (10 $\mu\text{g/ml}$) s^4UMP hatásait vizsgálva megállapítható, hogy a sejtek életképességének csökkenése 24, 48 és 72 óra múlva 32%, 40% és 9% volt.

A 72 órás inkubáció utáni mindössze 9%-os életképességcsökkenés jelzi, hogy ekkorra a sejtek kiheverték a 48 órás kezelésnél mért életképességcsökkenést (40%), valószínűleg metabolizálva a nukleotid analógot. Ez a megfigyelés magyarázatul szolgálhat a vegyület nem toxikus természetére.

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

A vegyület hatásmechanizmusának tisztázásához elvégeztük a DNS degradációs tesztet, a kaszpáz-9 aktivitás mérését is. Az utóbbit azért, mert az apoptotikus eseménysor elindításában és végrehajtásában kulcsszerep hárul a kaszpázokra.

A kaszpázok tulajdonképpen cisztein-proteázok, melyek szubsztrátjaikat az aszparaginsav után hasítják. A kaszpázoknak, mint enzimcsaládnak számos tagját és szerepét azonosították mára és funkciójuk szerint több csoportba sorolták őket. Vannak közülük olyanok, amelyek az apoptotikus folyamatban először aktiválódnak: ezek az iniciátorkaspázok. Ezek a kaszpáz-2, -8, -9, -10. A citokróm-c a citoplazmában egy másik kulcsfaktorról, az APAF-1-gyel (apoptosis activating factor), valamint a dATP-vel vagy ATP-vel együtt alkotja az apoptoszómát. Ennek a nagy, többtagú komplexnek a tagja a kaszpáz-9 is. A komplex feladata a kaszpáz-9 aktiválása és ezzel a kaszpázkaskád elindítása.

A citokróm-c-kibocsátás és a kibocsátás módjától függő mitokondrium membrándepolarizáció előbb következik be, mint a kaszpázok, főként pedig az effektorkaspázok aktivációja.

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

Vizsgálatainkhoz egy különösen agresszív és rezisztens sejtvonalat, az OCM-1 uveális melanoma sejtvonalat használtunk.

Az uveális melanomák proliferációjának gátlására alkalmazott benzofenantridin alkaloidokat és az s⁴UMP-t összehasonlítva megállapítható, hogy mindkét vegyületnek van előnyös és kevésbé előnyös tulajdonsága. Az alkaloidok lényegesen agresszívebb antitumor ágensek, de sokkal toxikusabbak is. Az s⁴UMP nem annyira toxikus, viszont kevésbé erős antiproliferatív hatással rendelkezik.

5.3. Szabadalom

A kísérleteinkben használt s⁴UMP-vel kapcsolatban a Debreceni Egyetem, illetve a DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., mint meghatalmazott szabadalmat nyújtott be a Magyar Szabadalmi Hivatalba 2006. januárban.

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

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

6. ÖSZEFoglalás, ÚJ EREDMÉNYEK

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

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

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

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

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

7. KÖZLEMÉNYEK

7.1. A disszertáció alapjául szolgáló in extenso közlemények

Kemény-Beke Á., Aradi J., Damjanovich J., Beck Z., Facskó A., Berta A., Bodnár A.: Apoptotic response of uveal melanoma cells upon treatment with chelidonine, sanguinarine and chelerythrine. *Cancer Letters* 237, 67-75 (2006).

I.F.: 2.938

Kemény-Beke Á., Berényi E., Facskó A., Damjanovich J., Horváth A., Bodnár A., Berta A., Aradi J.: Antiproliferative effect of 4-thiouridylate on OCM-1 uveal melanoma cells. *European Journal of Ophthalmology* (Közlésre elfogadva és nyomdába továbbítva) (2006).

I.F.: 0.534

7.2. Más témában megjelent és közlésre benyújtott közlemények

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

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

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

7.3. Idézhető absztraktok

Kemény-Beke Á., Facskó A., Szatmári I., Dósa A., Berta A., Aradi J.: Kezdeti eredmények a telomeráz enzim vizsgálatával szemészeti tumorokban.
Szemészet 137, S38 (2000).

Kemény-Beke Á., Facskó A., Szatmári I., Aradi J., Berta A.: Kezdeti eredmények telomeráz aktivitás in vitro mérésére humán uveális melanoma sejtvonalakból.
Szemészet 139, S108 (2002).

Kemény-Beke, Á., Facskó A., Szatmári I., Aradi J., Berta A.: Telomerase activity by a new tp-trap assay: Detection of telomerase re-expression in intraocular tumors.
Clinical and Experimental Ophthalmology 30, P1215, A454 (2002).

I.F.:0.709

Kemény-Beke Á., Bodnár A., Aradi J., Facskó A., Damjanovich J., Berta A.: A sanguinarin, chelerythrin és chelidonin hatására bekövetkező apoptózis OCM-1 uveális melanoma sejtekben.
Szemészet 142, S32 (2005).

7.4. A disszertáció témakörében elhangzott külföldi előadások és poszterek

Kemény-Beke Á., Facskó A., Szatmári I., Dósa A., Berta A., Aradi J.: Telomerase activity in ocular tumors; testing with modified telomeric repeat amplification protocol.
XIIIth Congress of the European Society of Ophthalmology, 2001. június 03-07.
Istanbul, Turkey

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

XXIXth International Congress of Ophthalmology, 2002. április 21-25.

Sydney, Australia

Kemény-Beke Á., Facskó A., Aradi J., Berta A.: Effect of inhibition of BCL-2
expression in uveal melanoma cells.

XIVth Congress of the European Society of Ophthalmology, 2003. június 07-12.

Madrid, Spain

Kemény-Beke Á., Bodnár A., Aradi J., Facskó A., Damjanovich J., Berta A.:
Sanguinarine, chelerythrine and chelidonine induce apoptosis and necrosis in
OCM-1 uveal melanoma cells.

XVth Congress of the European Society of Ophthalmology, 2005. szeptember
24-29.

Berlin, Germany

7.5. A disszertáció témakörében elhangzott magyar nyelvű előadások

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

Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, 2000. augusztus 28-30.

Székesfehérvár

Kemény-Beke Á.: Telomeráz aktivitás mérésének jelentősége intraocularis
tumorokból.

Továbbképző Tanfolyam, DE OEC Szemklinika, 2001. március 18-19.

Debrecen

Kemény-Beke Á., Facskó A., Szatmári I., Aradi J., Berta A.: Telomeráz aktivitás mérésének jelentősége intraocularis tumorokból: jelen és jövő.

Magyar Szemorvostársaság Retina Szekció Ülése, 2001. október 25-27. Pécs

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

Magyar Szemorvostársaság Kongresszusa, 2002. augusztus 29-31. Miskolc

Kemény-Beke Á.: Protonbesugárzás intraocularis daganatok esetén.

Továbbképző Tanfolyam, DE OEC Szemklinika, 2003. március 11-12.

Debrecen

Kemény-Beke Á.: Bcl-2 antiszensz oligonucleotid és benzofenantridin alkaloidok együttes hatása OCM1 uveális melanoma sejtekre.

Magyar Szemorvostársaság Fialat Kutatók Fóruma, 2003. november 28.

Budapest

Kemény-Beke Á.: Bcl-2 antiszensz oligonucleotid és benzofenantridin alkaloidok hatása OCM1 uveális melanoma sejtekre.

Tudományos Ülés, DE OEC Szemklinika, 2004. március 29. DAB Székház,

Debrecen

Kemény-Beke Á.: Bcl-2 antiszensz oligonucleotid és benzofenantridin alkaloidok együttes hatása OCM1 uveális melanoma sejtekre.

Ph.D. és TDK hallgatók Tudományos Diáktalálkozója, 2004. április 10-15.

Debrecen

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

Semmelweis Egyetem I. sz. Szemészeti Klinika Továbbképzés, Szemhétyvége,

2004. december 10-12. Tapolca

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

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

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

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