

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**I-es típusú luteinizáló hormon-releasing hormon receptor
alapú új terápiás lehetőségek és a tumor angiogenezisének
vizsgálata magas mortalitású daganatok esetében**

Molnár-Fodor Klára

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Rövidítések jegyzéke

AEZS-108/ AN-152: az LHRH ligand D-Lys⁶ aminosavjához kapcsolt doxorubicin, célzott daganatterápiás molekula, Zoptarelin Doxorubicin®

BCG: bacillus Calmette–Guérin, a *Mycobacterium bovis* aktív formája

DAB: 3,3'-diamino--benzidin

DAG: diacilglicerol

DOX: doxorubicin

EGF-R: epidermális növekedési faktor receptor

ERB receptorok: tirozin kináz receptorok különböző csoportjai, pl: epidermális növekedési faktor receptor (EGFR)

FBS: borjú szérum albumin

FSH: follikulus stimuláló hormon

FZD6: frizzled class receptor 6

GAPDH: glicerialdhehid-3-foszfát dehidrogenáz

GHRH: növekedési hormon-releasing hormon

GnRH: gonadotropin-releasing hormon

HER2: human epidermális növekedési faktor receptor 2-es típusa

HIF-1A: hipoxia indukciós faktor 1 alfa alegység

hGH: humán növekedési hormon

HMB-45: humán melanóma marker-45

HPRT: hipoxantin foszforibozil transzferáz

HRP: torma peroxidáz

IL-6 ligand, IL-8(CXCL8) ligand: interleukin-6 ligand, interleukin-8 ligand

IP3: inozitol trifoszfát

LH: luteinizáló hormon

LHRH: luteinizáló hormon-releasing hormon

LHRH-R: luteinizáló hormon-releasing hormon receptor

MAPK: mitogén-aktivált protein kináz

MEK: MAP2K1: mitogén-aktivált protein kináz 1

MMP2: mátrix metalloproteináz 2

mTOR: rapamicin target PI3 kináz

NGFR: idegi növekedési faktor receptor

OCM1, OCM3: okuláris chorioideális melanoma 1, okuláris chorioideális melanoma 3

PBS: foszfát puffer szalina

PCP: síkbeli sejt polaritás

PD-1: programozott sejthalál receptor-1

PD-L1-2: programozott sejthalál ligand-1 és 2

PDT: fotodinámiás terápia

PKC útvonal: protein kináz C útvonal

PROM1: prominin 1

PVDF: polivinilidén fluorid

RAF/ RAS/ MEK/ERK: mitogén-aktivált protein kináz szignál transzdukciós kaszkád

ROS: reaktív oxigén gyökök

RT- qPCR: reverz transzkripció-kvantitatív polimeráz lánreakció

S-100: kis molekulású melanoma marker protein

SOX10: SRY-box transzkripció faktor 10

TCC: hámeredetű átmeneti-sejtes karcinóma (transitional cell carcinoma)

TKI: tirozin kináz inhibitor

TRIS- puffer: (Trisz-(hidroximetil)-amino-metán-puffer)

TTT: transzpupilláris termoterápia

TUR: transzuretrális reszekció

UM: uvealis melanoma

uPa: urokináz típusú plazminogén aktivátor

uPA receptor: urokináz típusú plazminogén aktivátor receptor

VEGFA és VEGFB: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A és B

VIP: vazóaktív intesztinális peptid

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	7
2. Célkitűzés.....	11
3. Irodalmi áttekintés.....	14
3.1. Uvealis melanoma.....	14
3.1.1. Az uvealis melanoma általános jellemzői, prognosztikai faktorai.....	14
3.1.2. Az UM diagnosztikája.....	15
3.1.3. Az UM prognózisa.....	16
3.1.4. Az UM hisztopatológiai csoportosítása.....	17
3.1.5. Az UM terápiás kezelése.....	17
3.2. A húgyhólyag daganatok.....	22
3.2.1. A húgyhólyag daganatok általános jellemzői, prognosztikai faktorai.....	22
3.2.2. A húgyhólyag daganatok diagnosztikája.....	23
3.2.3. A húgyhólyag daganatok hisztopatológiai csoportosítása.....	23
3.2.4. A húgyhólyag daganatok terápiás lehetőségei.....	25
3.3. A peptid hormon receptorok, mint lehetséges terápiás célpontok a daganatok célzott terápiájában.....	27
3.3.1. Luteinizing hormone- releasing hormone (LHRH) és receptoraik fiziológiája és előfordulásuk.....	27
3.4. Citotoxikus LHRH analógok.....	30
3.4.1. Korábbi eredmények a szakirodalomból az LHRH receptorok expressziójáról, valamint AN-152 molekulával való célzott terápiás lehetőségekről uvealis melanoma és húgyhólyag daganatok esetében.....	33
3.5. A daganat összejt teória, egy új megközelítés a célzott daganatterápián belül.....	35
3.5.1. A daganat összejt teória alap felvetései, megvalósult terápiás alkalmazásai.....	35
3.5.2. Az uvealis melanoma daganatok és a daganat összejt teória közötti összefüggések.....	36
3.5.3. A Wnt molekulák az angiogenezisben.....	39
4. Anyagok és módszerek.....	41
4.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülményeik.....	41
4.2. Etikai engedélyek, humán szövetminták.....	41
4.3. Az uvealis melanoma daganatokat vizsgáló kísérleteinkhez alkalmazott metodikák.....	42
4.3.1. A citotoxikus LHRH analóggal és doxorubicinnel történt <i>in vitro</i> kezelések és sejt életképességi vizsgálatok.....	42
4.3.2. RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (RT-qPCR).....	43
4.3.3. Protein analízisek.....	46
4.4. A húgyhólyag daganatokat vizsgáló kísérleteinkhez alkalmazott metodikák.....	51
4.4.1. RNS izolálás és RT-PCR.....	51

4.4.2. Húgyhólyag szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata	52
4.4.3. Húgyhólyag szövetminták membránpreparálása és ligandkötési assay	53
4.4.4. Húgyhólyag daganat sejtvonalak LRHR-R expressziójának SDS-PAGE-Western blot analízise.....	54
4.5. Statisztikai analízis	55
5. Eredmények.....	57
5.1. Az uvealis melanoma és TCC típusú húgyhólyag daganatok LHRH-R és LHRH ligand expressziójának, a receptor ligandkötő képességének vizsgálata RNS és fehérje szinten	57
5.1.1. Az I-es típusú LHRH-R expressziójának vizsgálata humán uvealis melanoma szövetmintákon és OCM3 sejtvonalon.....	57
5.1.2. Az 5 µM-os AN-152 (AEZS-108) és az 5 µM-os doxorubicin <i>in vitro</i> kezelések citotoxicitásának vizsgálata OCM3 sejteken	60
5.1.3. Az LHRH-R és LHRH ligand mRNS szintű expressziójának vizsgálata húgyhólyag daganat szövetmintákon és sejtvonalakon.....	61
5.1.4. Húgyhólyag karcinóma szövetminták LHRH-R expressziójának immunhisztokémiai analízise és statisztikai kiértékelése.....	62
5.1.5. Húgyhólyag tumorminták LHRH ligandkötési assay vizsgálatának eredményei	66
5.1.6. Húgyhólyag karcinóma sejtvonalak LHRH-R expressziójának vizsgálata fehérje szinten SDS-PAGE-Western blottal	69
5.2. Az AEZS-108 és DOX tartalmú <i>in vitro</i> kezelések hatása az angiogenezisben és a metasztázis képzésben részt vevő gének expressziójára uvealis melanoma sejtvonalon	70
5.2.1. Az 5 µM-os AEZS-108 (AN-152) kezelés és 5 µM-os DOX kezelés hatása az angiogenezisben és a metastázisban részt vevő gének expressziójára OCM3 sejteken.....	70
5.2.2. A MASPIN tumorszupresszor expressziójának és indukciójának vizsgálata uvealis melanoma sejtekben	72
5.2.3. A MASPIN és az angiogenezisben részt vevő gének fehérje szintű kifejeződésének változása 5 µM-os AEZS-108 és 5 µM-os doxorubicin kezeléseket követően OCM3 sejtekben	74
5.3. Uvealis melanomák daganat őssejt tartalmának vizsgálata a tumorok vaszkularizációjának figyelembevételével	76
5.3.1. Uvealis melanoma és egészséges uvea szövetminták őssejt tartalmára utaló marker gének expressziójának kimutatása mRNS szinten	76
5.3.2. Uvealis melanoma szövetminták FZD6 őssejtmarker, HIF-1A és VEGFA expressziójának vizsgálata fehérje szinten.....	79
5.3.3. Uvealis melanoma szövetminták FZD6, VEGFA és HIF-1A expressziójának vizsgálata, az eredmények statisztikai értelmezése a betegek túlélése és klinikopatológiai jellemzőinek figyelembevételével.....	79
5.3.4. Az uvealis melanoma tumorok sejttípusának összefüggése a túlélési esélyekkel.....	81
5.3.5. Az uvealis melanoma tumorok melanin pigment tartalma és a betegek túlélése közötti kapcsolat vizsgálata.....	82

5.3.6. Az FZD6 expressziója és az uvealis melanomás betegek túlélése közötti összefüggések vizsgálata.....	83
5.3.7. Az angiogén faktorok és az uvealis melanomás betegek túlélése közötti összefüggések vizsgálata.....	85
5.3.8. Az FZD6 és a VEGFA gének egyidejű expressziója közötti korreláció vizsgálata	87
5.3.9. Az FZD6, HIF-1A, VEGFA és a melanin pigment expressziója és egyéb patológiai markerek közötti összefüggések vizsgálata	88
6. Megbeszélés.....	89
7. Összefoglalás	101
8. Summary	102
9. Tárgyszavak.....	103
10. Köszönetnyilvánítás.....	104
11. Irodalomjegyzék	106
12. Függelék.....	116

1. Bevezetés

A célzott daganatellenes kezelések megjelenése az utóbbi évtized gyógyszerkutatásainak nagy vívmánya. Alapja, hogy a tumorsejteken kifejeződő, olyan molekulát vesz célba, mely normál sejteken nincs jelen, vagy kevésbé kifejezett, így a gyógyszermolekula közvetlenül a hibásan működő daganatsejthez tud kapcsolódni vagy egy kulcsszerepű molekula felvételét tudja így blokkolni. A célzott daganatterápia egyik ígéretes eszköze a peptid hormon-alapú gyógyszeres kezelés. Ez esetben maguk a peptid hormonok, mint hordozó gyógyszermolekulák a saját peptid hormon receptoraikon keresztül képesek citosztatikumot vagy radiofarmakont juttatni specifikusan a daganatsejtbe, megkímélve a receptort egyáltalán nem, vagy csak kis mértékben expresszáló egészséges sejteket. Az ily módon célba juttatható antineoplasztikus gyógyszermolekulából a klasszikus kemoterápiás szerekkel összevetve ugyanazon toxikus hatás eléréséhez lényegesen kisebb alkalmazott dózis is elegendő, ami tovább csökkenti az esetleges mellékhatásokat, illetve javítja a betegek életminőségét.

Számos kutatócsoport publikált már eredményeket a luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok (LHRH-R) hormonfüggő és nem hormonfüggő daganatokban megfigyelt fokozott expressziójáról, és az LHRH-R célzott daganatterápiás szerekkel való hatékony célbavételéről [1-7]. Az LHRH receptor- és az LHRH ligand interakciójának hormon indukciós képességén túlmutató szerepét akkor feltételezték először a kutatók, amikor az LHRH-R jelentős expresszióját tapasztalták nem hormon érzékeny daganatok, mint vese, hasnyálmirigy, agy, vastagbél, szájüregi, fej-nyaki karcinómák és kután melanóma esetében is, sőt tripla-negatív emlő karcinómákon is [5, 8-13]. Számos vizsgálat igazolta, hogy az LHRH-R képes az LHRH liganddal konjugált citosztatikum molekulát internalizálni, a leváló citosztatikum pedig szelektíven csak a daganatsejt pusztulását okozni, megkímélve így a szervezet egészséges sejtjeit. Az LHRH alapú célzott kemoterápiás készítmények daganatos elváltozások körében

tapasztalt hatékonyságát látva a peptid hormon alapú terápia fejlesztése számos LHRH pozitív daganattal küzdő beteg számára adhat reményt. Ilyen, LHRH-R pozitív daganatok az uvealis melanomák és a hólyagkarcinómák is. Vizsgálataink fókuszába így két olyan nagy mortalitású, gyakori relapszussal járó humán daganat típus LHRH peptid hormon receptor alapú célzott terápiájának új lehetőségeit állítottuk, melyek eddig nem kellően felderített terápiás területek.

Munkánk első részében célul tűztük ki a humán uvealis melanoma (UM) és a hólyagkarcinóma daganatok LHRH ligand és LHRH-R expressziójának vizsgálatát humán szövetmintákon és sejtvonalakon. A receptorok ligandkötési képességét, valamint LHRH-R specifikus célzott daganatterápiás szerekkel való célbavételének lehetőségét radioligand kötési assay-vel, ligandkompetíciós assay-vel, illetve sejt életképességi vizsgálattal tanulmányoztuk a kiválasztott daganat típusokon. Ezt követően vizsgálatainkat az LHRH-R specifikus citotoxikus kezelést követő jelátviteli folyamatok tanulmányozásával folytattuk, kiemelten az UM daganatok véréreképzésben és migrációban részt vevő génjeinek vizsgálatával. Az angiogenesis UM daganatok progressziójában betöltött kiemelt szerepét ismerve vizsgálatainkat további, új célzott terápiás célpontok, a daganat őssejtek vizsgálatának irányába folytattuk.

Az uvealis melanoma egy incidenciáját tekintve (1-9 fő / 1 millió ember / év) ritka, ám nagy mortalitású, rosszindulatú szemészeti megbetegedés, amely molekuláris profilját és terápiás lehetőségeit tekintve is messzemenően eltér a kután melanóma daganatoktól [14, 15]. Az UM az összes melanómák 2,9 %-át teszi ki [14]. Az elérhető terápiás lehetőségektől függetlenül, de a tumor méretétől függően 17-45%-os halálozási kockázatot jelent a megbetegedés a betegek számára 10 éves követési időre vetítve [16]. Gyakori, hogy beteg már a diagnózis időpontjában távoli áttéttel rendelkezik, mely nagy valószínűséggel (93%) a májat is érinti [17, 18]. Korábbi vizsgálataink során az uvealis melanomák jelentős részében, 46 %-ban detektáltuk az I-es típusú LHRH-R-t, valamint az OCM1 és OCM3 primer UM sejtvonalakban is igazoltuk a receptor overexpresszióját [19, 20]. Továbbá igazoltuk, hogy a OCM3 uvealis melanoma sejtek

nem csak hogy hatékonyan célba vehetőek az AEZS-108 jelölésű LHRH liganddal kapcsolt doxorubicinnel (DOX), de a sejtvonal DOX rezisztens formája is képes elpusztulni az LHRH receptorokon keresztüli DOX felvételnek köszönhetően [21]. Mivel nem ismert, hogy az AEZS-108 OCM3 sejteken való használatakor a DOX indukálta ROS-on (reaktív oxigén gyökök) kívül milyen jelátviteli folyamatok indulnak el a receptor-ligand interakciónak köszönhetően, valamint, hogy milyen jelátviteli folyamatok segítik a daganatsejt pusztulását, így munkánk során célul tűztük ki ezen jelátviteli folyamatok feltérképezését. Mivel az uvealis melanoma daganatokra fokozott vaszkularizáció és korai áttétképzés jellemző, így elsősorban ezekben a folyamatokban részt vevő gének expressziós változásait vizsgáltuk meg a citotoxikus LHRH liganddal való kezelést követően. Vizsgálataink folytatásában arra a felvetésre kerestük a választ, hogy a daganat őssejtek kapcsolatban állnak-e jelátviteli folyamatokon keresztül az angiogenezisben kulcsszerepű génekkel uvealis melanoma tumorokban? A VEGFA (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A) és a HIF-1A (hipoxia indukciós faktor 1 alfa alegység) fokozott expresszióját számtalanszor bizonyították már UM szövetmintákban, ám mégsem állítható, hogy a VEGF molekula lenne a kulcs szereplő a daganat angiogenezisében. Jelenleg a számtalan paradox eredménnyel záruló *in vivo* vizsgálat után, a VEGF inhibitorok alkalmazása uvealis melanomával küzdő betegekben arra enged következtetést tenni, hogy a VEGF szignál közvetlen gátlása nem elegendő az angiogenezis gátlásához [22]. Lehetséges-e, hogy a VEGFA gén expressziójának komplex jelátviteli útvonalai a daganat őssejtek által kifejezett receptorok is bekapcsolódnak, segítve ezzel a daganatsejtet az aktuális terápiás kezeléshez vagy épp a hematogén áttétképzéshez való alkalmazkodásban? Témafelvetésünk alapját adta, hogy az agresszív viselkedésű II-es molekuláris profilba sorolt uvealis melanoma tumorok intenzív angiogenezisük és áttétképzésük mellett erős β -katenin és E-kadherin expressziót mutatnak, mely faktorok fontos szerepet töltenek be a tumorsejtek vérér pályákon keresztüli áttétképzésében [23-27].

Kutatásaink másik vizsgált területeként a húgyhólyagdaganatok LHRH-R és az LHRH ligand expresszióját vizsgáltuk, valamint *in vitro* modelleztük a detektált receptor expresszió LHRH ligand alapú célzott daganatterápiás molekulákkal való célbavételének lehetőségét. A nemi eloszlástól függetlenül, előfordulásukat tekintve a hólyagdaganatok a 10. leggyakoribb daganatos elváltozások a világon. Az urogenitális traktust érintő malignus megbetegedések közül közvetlenül a prosztatata elváltozások után a 2. leggyakoribb tumoros elváltozások [28-30]. Leggyakoribb típusa az hámeredetű átmeneti-sejtes karcinóma (transitional cell carcinoma (TCC)), amely a hólyagdaganatok mintegy 95,7%-át teszi ki [31]. Habár a TCC daganatok alapvetően kemoszenzitívek, a legnagyobb problémát a gyakori kiújulásuk, relapszusuk jelenti a betegek hosszútávú kezelésében. A betegek közel 50%-a esetében az ismételt transzuretrális reszekciót (TUR) és a kiegészítő adjuváns kemoterápiát követően is kiújul a daganat, gyakran egyidejűleg a tumorsejtek távoli áttétképzésével [29, 32-34]. Az áttétes hólyagkarcinómák esetében a műtéti beavatkozást követően ciszplatin alapú elsővonalbeli terápia alkalmazása javasolt, amire a betegek közel 50%-a nem alkalmas a kialakuló súlyos mellékhatások miatt [28, 30, 33]. Az engedélyezett célzott daganatterápiás lehetőségek zömében az előrehaladott, áttétes hólyagdaganattal küzdő betegek gyógyítására, leginkább túlélési idejük hosszabbítására javallottak, s nem a daganat primer, ámde invazív állapotának, tovább terjedésének megakadályozására. A hólyagdaganatokat érintő gyakori relapszus, a tumortípusonként eltérő terápiás érzékenység, valamint a sikerrel alkalmazható célzott daganatterápiás molekulák számának növelése miatt fontos az új típusú peptid hormon alapú célzott terápiás lehetőségek felkutatása a rákkutatás ezen területén is.

2. Célkitűzés

Kutatócsoportunk korábbi munkái igazolták, hogy az uvealis melanoma szövetek jelentős százaléka, valamint az OCM3 sejtvonal expresszálja az I-es típusú LHRH-R-t. Igazoltuk, hogy OCM3 sejtek által kifejezett LHRH-R az AEZS-108 citotoxikus LHRH analóggal eredményesen megcélozható, továbbá az uvealis melanoma szövetminták is képesek az LHRH ligand megkötésére. Sajnos, uvealis melanoma daganatok terápiájában bármilyen eddig fejlesztett célzott terápiás gyógyszer molekulák alkalmazása nem járt áttörő sikerrel. Ennek oka feltehetően a daganat nagy fokú kemorezisztenciájában keresendő, másrészt pedig a daganat komplex, több szempontból ismeretlen angiogenezist és metasztázist szabályozó jelátviteli folyamataiban.

Vizsgálataink másik vonalában a TCC típusú hólyagkarcinóma tumorok peptid hormon receptor alapú új típusú célzott terápiás lehetőségeinek feltérképezését helyeztük. Jelenleg, az invazív hólyagkarcinómák kezelésére csak néhány célzott daganatterápiás gyógyszermolekula közül választhatunk, melyek zömében immunterápiát megvalósító antitestek. A hólyagkarcinóma tumorok grádusának és egyéb klinikopatológiai paramétereinek figyelembevételével megválasztott új célzott daganatterápiák, feltehetően javítanák a gyakori relapszust mutató hólyagdaganatok terápiájának hatékonyságát.

Kutatómunkánk során ezért a következő célokat tűztük ki:

- *Enukleált humán primer uvealis melanoma szövetminták, valamint az OCM3 humán UM sejtvonal LHRH-R expressziójának igazolása mRNS és fehérje szinten.*
- *Az LHRH-R és az LHRH ligand mRNS szintű expressziójának vizsgálata TCC típusú hólyagkarcinóma betegmintákban, valamint RT-112, UMUC3 és TCCSUP humán hólyagtumor sejtvonalakban.*

- Az LHRH-R fehérje szintű expressziójának vizsgálata immunhisztokémia és SDS-PAGE-Western blot módszerekkel TCC típusú hólyagkarcinóma betegmintákban, valamint RT-112, UMUC3 és TCCSUP hólyagtumor sejtvonalakban. Az eredmények összevetése, elemzése a daganatok grádus/státusz szerinti besorolásával a szövetminták esetében korreláció vizsgálattal.
- Az LHRH-R funkcióképességének vizsgálata radioligand kötési vizsgálattal TCC típusú hólyagkarcinóma betegmintákban. Ligand kompetíciós assay elvégzése potenciálisan alkalmazható AEZS-108 citotoxikus LHRH analóggal, illetve LHRH antagonistával, a gyógyszerjelölt molekulák TCC daganatokon való jövőbeli alkalmazásának *in vitro* vizsgálatára.
- A doxorubicinnel kapcsolt D- Lys⁶ LHRH analóg (AEZS-108) és a szabad doxorubicin citotoxicitásának vizsgálata OCM3 sejteken *in vitro* kezeléseket követően.
- Az AEZS-108 kezelés hatásának vizsgálata az angiogenezisben és a metasztázis képzésben részt vevő gének mRNS és fehérje szintű expressziójára OCM3 sejteken *in vitro* kezeléseket követően. A tapasztalt változások összevetése kontroll csoporttal és a csak doxorubicinnel kezelt OCM3 sejtekkel.
- A MASPIN tumorszupresszor génexpressziójának vizsgálata uvealis melanoma tumorokban és kezeletlen OCM3 sejtekben. Továbbá megvizsgálni, hogy hozzájárul-e önmagában a D- Lys⁶ LHRH analóg a gén indukciójához *in vitro* kezelés során, vagy csak az AEZS-108 és a szabad doxorubicin képes erre.
- Az enukleált humán primer uvealis melanoma szövetminták és normál uvea szövetminták daganatössajt tartalmát jelző marker gének kimutatása mRNS szinten.
- Az FZD6 (frizzled class receptor 6) daganat össajtmarker és angiogenezisben kulcsszerepű VEGFA és HIF-1A génekfehérje szintű expressziójának vizsgálata humán primer uvealis melanoma szövetmintákon SDS-PAGE-Western blot módszerrel.

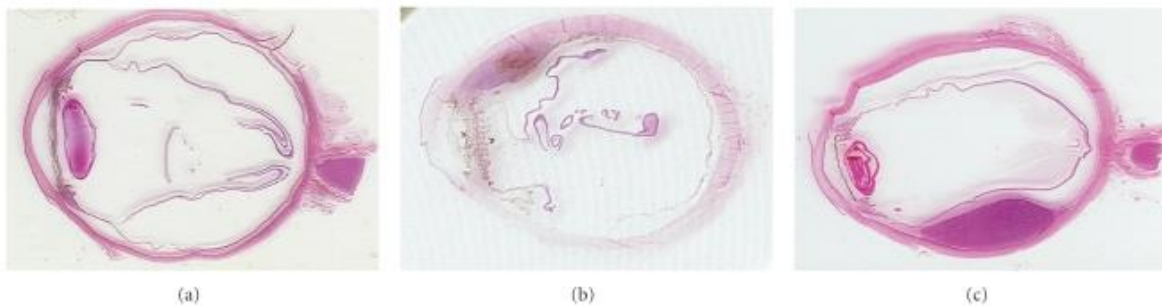
- *Enukleációval eltávolított humán primer uvealis melanoma szövetminták és normál anyajegyek FZD6, VEGFA és HIF-1A expressziójának vizsgálata TMA (tissue microarray) immunhisztokémiai módszerrel. Az eredmények összevetése a daganat progressziójával, a betegek túlélési adataival, korreláció vizsgálat az angiogenezisben részt vevő gének és az FZD6 expressziója között.*

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Uvealis melanoma

3.1.1. Az uvealis melanoma általános jellemzői, prognosztikai faktori

Az uvealis melanoma az uvea melanocita sejtjeiből kialakuló malignus melanóma, amely a szem bármely részében kifejlődhet. Az UM incidenciáját tekintve (1-9 fő / 1 millió ember / év) ritka, de nagyon súlyos, rosszindulatú szemészeti megbetegedés, amely molekuláris profilját és terápiás lehetőségeit tekintve is messzemenően eltér a kután melanóma daganatoktól [14, 15]. Az UM tumorok több mint 90%-a az érhártyában fejlődik ki, 6%-a ciliáris testben, további 4% pedig az íriszt érintik [14].



1. ábra: Az uvealis melanoma elhelyezkedése a szemgolyón belül különböző lokalizációt szemléltető képekkel: írisz (a), ciliáris test (b), érhártya (c).

(van den Bosch T, Kilic E, Paridaens D, et al.: Genetics of uveal melanoma and cutaneous melanoma: two of a kind? Dermatol Res Pract 2010: 360136, 2010. Átdolgozott kép. [35])

A betegségről epidemiológiai szempontból elmondható, hogy leggyakrabban kaukázusi típusú férfiaknál alakul ki, az UM betegek 97,8%-a ebbe a kategóriába tartozik [14]. Rendszerint felnőttkorban előforduló megbetegedés; a betegek átlag életkora 50-70 év közé tehető, a 18 év alattiak körében való előfordulása pedig rendkívül ritka [14, 36]. Az UM kialakulására hajlamosító epigenetikai tényező lehet a világos bőr- és szemszín, a veleszületett szem melanocytosis, melanocytoma, a dysplasiás naevus szindróma és a BAP1 gén mutációja [37]. Habár számos esettanulmány vizsgálta már az UV sugárzás és az UM kialakulása közötti

kapcsolatot, ez az elmélet nem bizonyított [38, 39]. Az UM betegek körében megfigyelhető, hogy 11%-kal magasabb kockázattal alakul ki náluk más daganatos megbetegedés, mint például a kután melanóma vagy a vesesejtes karcinóma. A fokozott kockázat mögött nagy valószínűséggel a BAP1 mutáció állhat [40].

3.1.2. Az UM diagnosztikája

Az UM diagnózisának felállítását nehezíti, hogy gyakran a betegeknek sokáig nincsenek specifikus tünetei (az esetek 30%-a). Az első tünetek között is csak homályos látásról a betegek (37,8%-a), látótérbe úszó homályokról (7%) számolnak be a betegek, majd a későbbiekben jelentkezik a látótér kiesés (6,1%), fényérzékenység (8,6%), fájdalom (2,4%), torzult látás (2,2%) és végül a makroszkópiusan látható tumor (3,1%) mint feltűnő tünet-együttesek [17, 41]. A primer tumorok diagnosztikáját alapvetően nem invazív módszerekkel végzik. Első körben a patológiás elváltozás fiziológiai paraméterei kerülnek kivizsgálásra, mint a tumor mérete (> 2mm <), a retina mögötti folyadék mennyisége, narancspigmentek megjelenése a szemben, a beteg panaszai, az elváltozás és a látóideg közötti távolság (>3mm<), valamint az ultrahangos képen látható képlet körüli udvar mérete és annak hiánya ([42]. Továbbvizsgálatok, amelyek segíthetik a diagnózis felállítását: ultrahang vizsgálat, vékonytűs aspirációs biopszia és a fluoreszcens angiográfia, optikai koherencia tomográfia (OCT) [18]. Az OCT-nek kiemelten fontos szerepe van a diagnosztikában a chorioideális melanomák és naevusok közötti különbségek (pl. a szubretinális folyadék a melanoma jellemzője) kivizsgálásával, a <3mm vastagságú elváltozások esetében [18]. Sajnos, a betegek közel 50%-a estében nem sikerül elkerülni az áttét kialakulását, amely sajnos többnyire a májat is érinti. Az áttétes betegek átlagos túlélése függetlenül az alkalmazott terápiáktól mindössze 5-7 hónap [43, 44]. Az áttétek késői diagnózisában nagy szerepet játszanak a mikrometasztázisok, amelyek a primer UM tumor diagnózisa, kezelése idején gyakran rejtve maradtak az orvos előtt. A metasztázisok viszont kezelés nélkül rövid időn belül szisztémásan szóródhatnak, jelentősen

rontva ezzel a beteg túlélési esélyeit. A rejtett metasztázisok, vagy mikrometasztázisok korai diagnosztikájának fejlesztésére talán az egyik legígéretesebb, fejlesztés alatt álló módszer a folyadék biopszia. Ez a módszer lehetőséget teremt a vérben keringő, áttétképzésben részt vevő daganatsejtek korai kimutatására, mellyel megelőzhető lenne a tumor szisztémás szóródása és az ezt követő magas tumor mortalitási arány [45, 46].

3.1.3. Az UM prognózisa

Mivel maga a szemgolyó nem tartalmaz nyirokereket, így az UM tumorsejtek hematogén úton képezhetnek áttéteket, mely folyamathoz a szem dús vérér hálózata is hozzájárul. A betegek túlélése a tumor rétegvastagságától függően becsülhető, mely szerint kicsi és közepes vastagságú tumorok esetében a betegek 17-18%-os halálozási kockázattal, míg nagy méretű diagnosztizált tumorok esetében 40-45%-os halálozási kockázattal kell számolniuk 10 éves követési időn belül [16]. A korai gyakran aspecifikus tüneteknek köszönhetően, illetve a tumor intenzív vaszkularizációjának köszönhetően a betegek gyakran már a diagnózis időpontjában távoli áttéttel rendelkeznek, mely a májat, a tüdőt, a csontvelőt, a bőrt és a szubkután szöveteket, valamint a nyirokcsomókat érintik [16, 47-49]. Máj metasztázis esetén a betegek átlagos túlélése 4-6 hónap, mely rövid túlélés rendszerint az áttétek nagyfokú kemorezisztenciájának és szóródásának a következménye [50]. A metasztázis rizikóját elsősorban olyan klinikai faktorok megléte alapján tudjuk megítélni, mint a tumor mérete vagy lokalizációja. A legjobb prognózissal az íriszben kialakuló tumorok rendelkeznek, míg a legrosszabbal a ciliáris test daganatai [51]. Prognosztikai markerként tartjuk számon az UM daganatok néhány, jól ismert kromoszóma mutációját is. Ilyen például a nyolcas kromoszóma hosszú karjának átrendeződése (8q), a hármas kromoszóma monoszómiája, de ismert a hármas és a négyes kromoszómaszámbéli rendellenességei közötti összefüggés is [24, 52, 53]. További markerként megemlítendő még a tirozináz transzkriptumok jelenléte a perifériás vérben, mely

vérben keringő melanóma sejtek jelenlétére utal, melyek száma korrelál a betegség stádiumával, illetve egy rossz prognózist vetít elő [54].

3.1.4. Az UM hisztopatológiai csoportosítása

Az UM tumorok esetében prognosztikai szempontból kiemelt jelentőséggel bír, hogy a tumorsejtek melyik típusba sorolhatóak. Hisztopatológiai szempontból 3 kategóriát különböztetünk meg, melyekhez prognózis társítható: epitelioid, orsósejtes vagy kevert sejt tumor [55]. Az epiteliális sejtek nagy méretű, áttetsző citoplazmával és jól elhatárolható sejtszélekkel rendelkeznek, továbbá nagy extracelluláris tereket kialakítva formálnak szövetet. Sejtmagjuk nagy méretű, eozinofil, mely jellemzően a sejt centrális régiójában foglal helyet. Nagyszámú mitotikus osztódás jellemző rájuk, amely jellemzően hozzájárul az ezzel a sejtípussal járó rossz prognózishoz. Az orsósejtes kategórián belül megkülönböztetünk orsósejtes A és orsósejtes B altípusokat. Az orsósejtes A típusú sejtek megnyúltak, sejtmagjuk elongált. Mitotikus osztódásaik száma kevés, ennek köszönhetően inkább jóindulatú okuláris daganatokra jellemző ez a sejtípus. Az orsósejtes B típusúak kisebb, kevésbé elongált sejtek nagy sejtmagokkal. Mitózis csak kisebb sejtpopulációknál követhető, a sejtek gyakran a tumor vérerei köré körkörösen csoportosulva helyezkednek el. A kevert sejtípusú tumorok változó arányban ugyan, de legalább 10%-ban tartalmazzák mindkét sejtípust [55]. Az UM daganatok diagnosztikájának további két marker analízise is részét képezi, mégpedig az S100 és a HMB-45 melanoma markerek immunhisztokémiai vizsgálata. Az S100 jelenléte neuroektodermális eredetű tumorsejtekre jellemző, a HMB-45 pedig egy melanociták által expresszált marker, amely segít megkülönböztetni az UM tumorokat az egyéb nonmelanocita tumoroktól [55].

3.1.5. Az UM terápiás kezelése

A primer UM daganatok kezelése két csoportba sorolható: a szem megtartó terápiás módszerekre és a szegolyó eltávolítását célzó eljárásra (enukleáció). Azt, hogy az orvos melyik kezelést rendel el, több tényező is befolyásolja. Ilyen tényező a tumor átmérője,

lokalizációja, mennyire infiltrálta a környező szöveteket, a kezeléssel járó kockázatok és előnyök mérlegelése, az érintett szem és a másik szem látásélessége, a beteg életkora és egészségi állapota, valamint természetesen a beteg kívánsága.

A szemet megőrző terápiák közé sorolhatjuk a különféle sugárterápiákat, valamint kisebb sebészeti vagy lézeres beavatkozásokat.

Kisebb és közepes méretű chorioidea melanómák kezelésére gyakran és jó eredményekkel alkalmazott módszer a β -sugárzó applikátorok használata. Az ún. plakk radioterápia/brachiterápia során egy radioizotópal kapcsolt lemez kerül felvarrásra a sclera felszínére, úgy, hogy az a daganatot teljesen lefedje, így egy helyi irradiációs kezelést hozunk létre. Az alkalmazott radioizotóp szempontjából két típusa lehet az applikátoroknak: β -sugárzó $^{106}\text{Ruthenium}$ és γ -sugárzó $^{125}\text{Jód}$ izotóp. A radioapplikátoros kezelések változó mértékű maradandó látásromlással járnak a kezeléseik alkalmával, mely mértéke a tumor méretétől és lokalizációjától függ. Mivel a β -sugárzás kisebb rétegvastagságon képes csak átjutni, így a $^{106}\text{Ruthenium}$ applikátor csak olyan primer UM esetében alkalmazható, amely prominenciája kisebb mint 5 mm, húrátmérője nem haladja meg a 15 mm-t, illetve nem törte át a bulbust [56]. A γ -sugárzás már nagyobb rétegvastagságú daganatok kezelésére is alkalmas [57]. A brachyterápiás eszköznek addig kell a szemgolyó külső felszínére felvarrva lennie, amíg az applikátor leadja a tumor mérete alapján meghatározott effektív sugárdózist, ekkor megtörténhet a sugárzó plakk műtéti eltávolítása. A szükséges besugárzási időt az applikátor gyártásától eltelt idő, a szöveti rétegvastagság és az izotóp felezési idejének figyelembevételével határozzuk meg [58]. Nagyobb bazális átmérőjű és/vagy extraokulárisan lokalizált tumoroknál a plakk radioterápia nem javasolt, mivel az applikátor nem fedi le kellő pontossággal a daganatot, így hatékonysága sem elégséges [58]. Közepes vagy nagyobb tumorok esetén szóba jöhet a hélium ionos terápia, illetve a fókuszált gamma sugárnyaláb terápia (gamma kés) [59]. Ezekkel a módszerekkel megkímélhetjük a szem többi, ép,

sugárérzékeny részét, úgy, hogy a tumoros régióra koncentráljuk a sugárdózist. Kisebb vagy közepes méretű tumorok további terápiás lehetősége lehet még a lézer fotokoaguláció és a transzpupilláris termoterápia (TTT). Ezek során nagyobb mennyiségű energiával célozzuk meg a tumort, ezáltal roncsoljuk érhálózatát, csökkentjük az élő tumorsejtek számát [60]. További formája a lokális terápiáknak a fotodinámiás terápia (photodynamic therapy (PDT)), mely során egy fényérzékeny anyagot juttatunk a beteg vérkeringésébe, mely anyag a megvilágítását követően szabadgyököket szabadít fel, s így roncsolja a környező tumorszövetet. Első fázisban a fényérzékeny anyagot intravénásan vagy intraperitonealisan juttatjuk a vérkeringésbe, a kezelés második fázisában pedig a tumort közvetlenül ellátó vérerekbe injekciózuk azt, csökkentve ezzel a szisztémás mellékhatások mennyiségét, illetve növelve a kezelés lokális hatását [61].

Azok az UM tumorok, amelyek kiterjedt intra- és extraokuláris jelenlétűek, nagy méretük miatt jelentős látásromlást eredményeznek, áttétképzés szempontjából magas kockázatúak, így általában enukleáció (a szemgolyó eltávolítása) útján kerülnek teljes eltávolításra. Esetenként a daganatok mikrosebészeti úton is eltávolíthatóak, a szem belsejéből vitrectomiával, kívülről pedig a sclera irányából megközelítve. Hátránya viszont ennek a terápiának, hogy gyakori a műtetet követően a daganat kiújulása a primer tumor közelében, valamint a tumorsejtek szóródása is feltételezhető a műtét közben [14].

A szem anatómiájából adódóan az intraoculáris melanómák klasszikus kemoterápiás szerekkel való kezelésének lehetőségei eltérőek a kután melanóma esetében alkalmazottaktól. Nyilvánvaló, hogy ez a szűkített terápiás lehetőség is hozzájárul ahhoz, hogy a primer uveális melanómák más típusú daganatokkal összevetve is rendkívül nagy arányban képeznek távoli áttétet. A távoli áttétek szisztémás kemoterápiás kezelését tovább nehezíti az uveális melanoma daganatra jellemző fokozott kemorezisztencia [62]. Az áttétek kezelésekor leginkább a kután melanoma kezelésére alkalmazott terápiás protokollokat alkalmazzák, melyek során olyan

gyógyszereket használnak, mint a dakarbazin, temozolomid, ciszplatin, treoszulfán, fotemusztin és ezek kombinációi [47, 63-66]. Sajnos, az áttétes betegek 93%-a májáttétellel rendelkezik, esetükben intra-hepatikus kemoterápiás módszerekkel csak részben sikeresek ezek a próbálkozások, melyre magyarázatul szolgál a kután melanóma és az uvealis melanoma közötti bizonyítottan eltérő molekuláris genetikai profil [35, 62]. Bizonyos esetekben hepatikus-kemoembolizációval vagy részleges hepatektómiával rövidebb ideig még meghosszabbítható a túlélés [50].

A célzott kemoterápiás készítmények nagyobb hatékonyságába vetett hit az utolsó reményt adhatja a távoli áttétellel rendelkező uvealis melanomával küzdő betegek és orvosaik számára. A célzott daganatterápiás készítmények működésének alapja, hogy valamely olyan struktúrát, fehérjét, receptort vagy molekulát vesznek célba a daganatos sejten belül, vagy annak felszínén, amely fokozott expressziójával megkülönbözteti a daganat sejtet a környező egészséges sejtektől. Ezt a molekuláris célpontot veszik célba ezek a készítmények, s hozzákötődve vagy bejutva a tumorsejtbe képesek annak további osztódását vagy molekuláris folyamatait blokkolni, ezzel a tumor regresszióját okozva. Elsőként ismét a kután melanómák esetében alkalmazott célzott terápiás szerek használatát kísérelték meg az uvealis melanoma kezelésében is. Ilyen például az Ipilimumab, amely monoklonális antitestként a citotoxikus T-limfocitához kapcsolt 4-es antigén (CTLA-4) molekulát veszi célba, amely ugyan számos vizsgálat során biztató eredményeket adott, de a megfigyelt 6-9,7 hónapos átlagos túlélési ráta a kezelt betegek körében nem hozott igazi áttörést a terápiában [67-69]. Mivel a kután melanómák gyakori jellemzői a BRAF mutációk, melyek háttérben RAS/RAF/MEK/ERK géneket érintő mutációk állnak, így kézenfekvő volt a MEK inhibitorok, mint a selumetinib és a temozolomid hatásának kipróbálása uvealis melanómában is (klinikai fázis vizsgálat azonosító: NCT01143402). Azonban, mivel a BRAF mutációk előfordulása ritka uvealis melanoma tumorok esetében, így ezek a terápiák csak a betegek legkisebb részének segítettek

a gyógyulásban [70]. A korábbi példáktól eltérően az uvealis melanoma tumorok genetikai eltéréseit sokkal inkább figyelembe vevő terápiás molekula a multitargetált tirozin kináz inhibitor sunitinib. A sunitinib a c-Kit tirozin kinázt célozza meg, amely a primer uvealis melanoma tumorok >63%-ában fellelhető, így feltételezhetően fontos szerepe van a daganat progressziójában. Hiába bizonyított a jelenléte, mégis egy 74 metasztázisos beteget vizsgáló klinikai kettős fázis vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a sunitinib monoterápia nem hozott jobb eredményeket mint a kontroll csoport dakarbazin terápiaja [71].

Mivel a tumor angiogenezise, a tumor asszociált véredény képzés esszenciális a daganatok progressziójában, így a VEGF jelátviteli pálya blokkolására tervezett terápiás antitestek más, erősen vaszkularizált daganatokon tapasztalt sikere után megkezdődött azok vizsgálata az uvealis melanoma terápiajában is. Sajnos az alkalmazott bevacizumab vagy ranibizumab kezelések sokszor paradox eredményeket mutattak és az ígértes eredményekkel záruló preklinikai vizsgálatok után ellentmondásos eredményeket tapasztaltak, sőt esetenként a tumor progresszió drasztikus fokozódását okozták a kezelések [22, 72-75]. A klinikai vizsgálatokat követő kutatások bizonyították, hogy a nem várt eredmények molekuláris hátterében esetenként az angiogenezisben kulcsszerepű molekulák kezelést követően megnövekedett expressziója állt [22, 76-78]. Habár az angiogenezis szabályozása ma már egy elég jól feltérképezett területe a tumorbiológiának, a VEGF faktorok expressziója mégis egy olyan komplex, szerteágazó szabályozási útvonalon megvalósuló folyamat, amely lehetőséget ad a VEGF targetáló antitestek hatásának megkerülésére, rezisztencia kialakítására. A VEGF szignál útvonal ilyen kapcsolódó szabályozói lehetnek a HER2 receptorok, az ERB receptorok, a RAS és SRC génmutációk, valamint a tumor hipoxiás állapota [79].

3.2. A húgyhólyag daganatok

3.2.1. A húgyhólyag daganatok általános jellemzői, prognosztikai faktorai

A nemi eloszlástól függetlenül, előfordulásukat tekintve a hólyagdaganatok a 10. leggyakoribb daganatos elváltozás a világon. Az urogenitális traktust érintő malignus megbetegedések közül közvetlenül a prosztatata elváltozások után a 2. leggyakoribb tumoros elváltozás [28-30]. A páciensek életkora a diagnózis időpontjában általában 40 év felett van. Incidenciáját tekintve évente körülbelül 400 000 esetet diagnosztizálnak világszerte, melyből 150 000 ember esetében bizonyul halálosnak a kór [29]. Előfordulásának kontinens alapú megoszlása szerint a férfiak körében, Egyiptomban a leggyakoribb ez a daganat, mintegy négyszer gyakrabban diagnosztizálják, mint az USA-ban. A fejlődő országokban a legfőbb rizikó tényező a *Schistosoma hematobium* fertőzés, míg nyugaton a dohányzás és a foglalkozási ártalmak a legfőbb rizikótényezők [31, 42]. A WHO kimutatása alapján Magyarországon 2020-ban 3239 új esetet regisztráltak (az összes regisztrált tumoros megbetegedés 4,8%-a), melyből 2141 eset volt férfi. Megfigyelhető, hogy a hólyagarák a férfiak körében gyakoribb előfordulású, melynek egyik lehetséges magyarázata lehet, hogy a hólyag normál működése esetén is expresszál androgén és ösztrogén receptorokat, így érzékenyen reagálhat a nemi hormonok változásaira [32, 80].

A húgyhólyagrák kialakulásában világszerte a legáltalánosabb és leggyakoribb rizikó tényező a dohányfüst, mely ezen ráktípus kialakulásának kockázatát háromszorosára növeli. Egyelőre nem tisztázott, hogy a dohányfüst mely összetevői lehetnek felelősek a daganat kialakításáért, de a dohányfüstben megtalálható 4-aminobifenil, a policiklusos aromás szénhidrogének, a *N*-nitrozamin-származékok és a telítetlen aldehidek bizonyára szerepet játszanak a kóros elváltozások elindításában [81]. Foglalkozás tekintetében leginkább a vegyiparban (festék és gumigyártás) dolgozók, festők, bőripari dolgozók vannak magasabb kockázatnak kitéve a hólyagdaganatok kialakulását tekintve. A ciklofoszfamid és az

ifoszfamid, az anilin festékek és más aromás aminok, valamint a többgyűrűs vegyületek és azok lebontási termékei a vizelettel kiválasztódnak, s mivel ezek tartósan érintkeznek a hólyag nyálkahártyával, ezért urotoxikus hatásúak [82]. A krónikus, vagy gyakran visszatérő húgyhólyaggyulladás, visszatérő húgyúti fertőzés, krónikus hólyagkatéterezés, vagy urolithiasis (tartós vesekő ürítés) mint más daganatok esetében, itt is lehet kórelőzménye a daganatnak. Közép-Keleten (különösen Egyiptomban) többnyire a *Schistosoma hematobium* fertőzés járul hozzá ezekhez a krónikus gyulladásokhoz [32, 81].

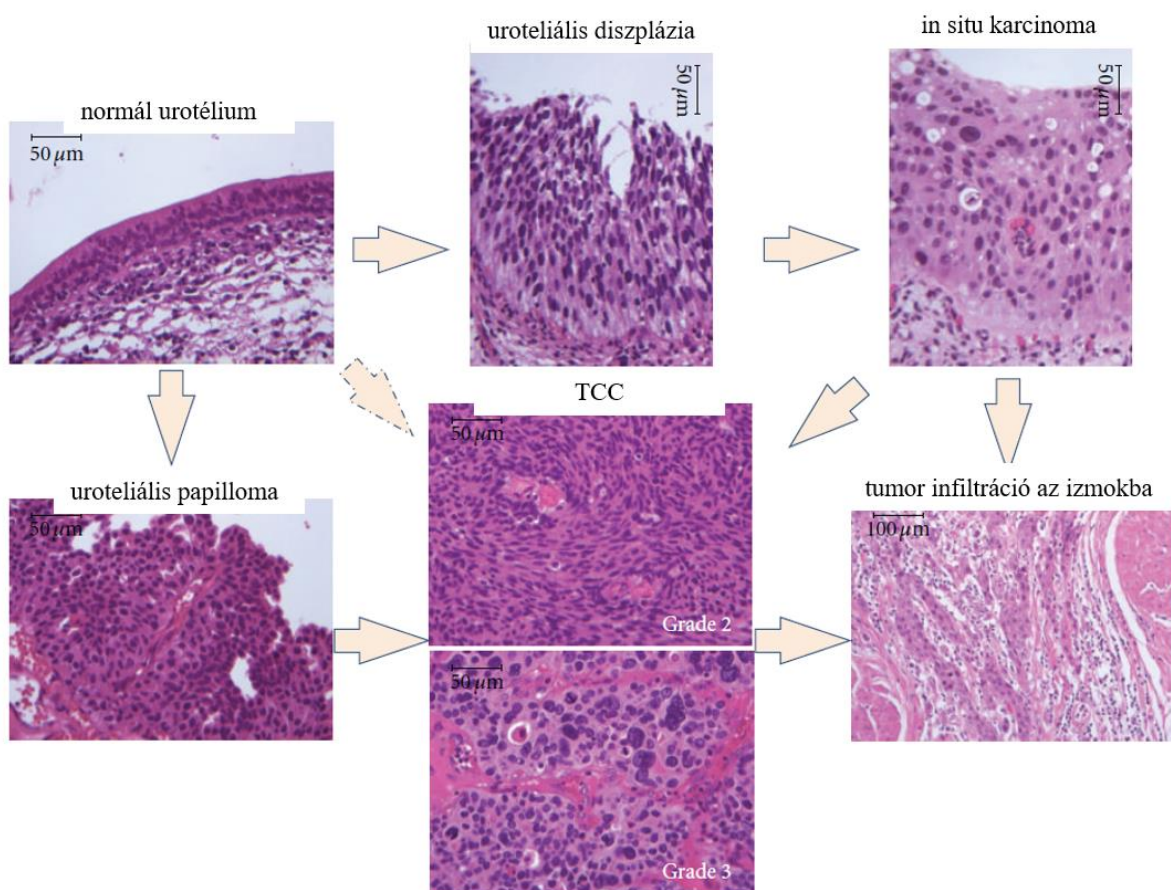
3.2.2. A húgyhólyag daganatok diagnosztikája

Az esetek nagy részében általános célú vizeletvizsgálat során derül fény először a hólyag kóros elváltozására. Ilyenkor makroszkópos szintű, alvadékos, ámde fájdalomtalan vizeléssel társuló elváltozást azonosítanak. Az esetek jóval kisebb részében társul ez az elváltozás c sípő, fájdalmas vizeléssel, rövid idejű vérvizeléssel, esetleg lázzal. Mivel a vizeletben és a vérben hólyagdaganat vonatkozásában jelenleg nem ismerünk kimutatható tumormarkert, így a makro- és mikroszkópikus vizeletvizsgálat, a vizeletben lévő vér kimutatása és a vesefunkciók vizsgálata jelent első körben alternatívát a diagnózis felállítására a képalkotó diagnosztika mellett. A továbbiakban az ultrahangos és az endoszkópos vizsgálatok tudják pontosan megállapítani a tumor elhelyezkedését, kiterjedtségét a hólyagon belül, az ezt követő citológia pedig a tumor szövettani besorolásáról ad információt [81-83].

3.2.3. A húgyhólyag daganatok hisztopatológiai csoportosítása

A húgyhólyag daganatait szövettani besorolás szerint három csoportra oszthatjuk: hámeredetű átmeneti-sejtes karcinóma (transitional cell carcinoma (TCC)), laphámsejtes karcinóma és adenokarcinóma. A hólyag daganatainak többsége úgynevezett TCC típusú, amely a hólyag daganatok mintegy 95,7%-át teszi ki. A TCC daganatok viselkedésük és molekuláris profiljuk alapján további két alcsoportra oszthatóak: alacsony kockázatúak (mindig papilláris és rendszerint felszíni tumorok) vagy magas kockázatúak (invazív papilláris vagy

nem papilláris tumorok) [32]. A felületi sejtes malignitások státusz alapján Ta, Tis (*in situ*), T1 besorolásúak, míg a magas kockázatú TCC tumorok akár már a diagnózis időpontjában T2, T3 és T4 státuszba soroltak, s gyakran metasztatizálnak. Az első vonalbeli terápiás eljárások felületes probléma megoldását mutatja, hogy a legfőbb gond a TCC daganattal, hogy az esetek mintegy 50-70%-a esetében kiújul a kezelést követően, illetve infiltrál a hólyag körüli simaizom szövetekbe. Így történhet meg, hogy a TCC típusú húgyhólyagdaganattal kezelt betegek a daganatos megbetegedések közül a legmagasabb túlélési idő / összes kezelési költség arány [28, 32].



2. ábra: Hámeredetű átmeneti-sejtes húgyhólyagkarcinóma daganatok progressziója, különböző státuszai reprezentatív szövettani festések fotóin keresztül szemléltetve.

(Tanaka T, Miyazawa K, Tsukamoto T, Kuno T, Suzuki K: *Pathobiology and chemoprevention of bladder cancer. Journal of oncology* 2011, 2011:528353, Átdolgozott kép. [32])

3.2.4. A húgyhólyag daganatok terápiás lehetőségei

Alacsony kockázatú daganatok esetében a diagnózist követően az első műtéti beavatkozás rendszerint az altatásban végzett transzuretrális reszekció (TUR), mely során a daganatos szövetek eltávolítása mellett a környező izomszövetek tumor általi beszűrődését is ellenőrzik [83]. A Ta státuszú felületi sejtes elváltozások első vonalbeli kezelésére a klinikum gyakran nem alkalmaz semmilyen más szisztémás kezelést a TUR-t követően [81, 83]. Egyes szakértők a műtétet követő 24 órán belül elvégzendő intravezikális (hólyagon belüli) gyógyszer-instillációt javasolnak (pl. doxorubicinnel) [83]. *In situ* vagy T1 státuszú, szintén alacsony kockázatú TCC tumoroknál az igény szerint ismételt TUR-beavatkozásokat követően rendszerint BCG (bacillus Calmette–Guérin)-, esetleg mytomicin-instillációt javasolnak a nemzetközi protokollok a betegek kezelésére. A BCG-instilláció lényege, hogy a *Mycobacterium bovis* aktív formáját a hólyagba injektálva, az olyan celluláris immunválaszt vált ki, amely növeli a tumor-asszociált antigének felismerésének hatékonyságát, illetve citokin indukció révén olyan antiangiogén környezetet teremt a hólyagban, amely hatékonyan gátolja a tumor progresszióját [81, 83, 84]. Az izom infiltráló elváltozások (T2-T4 státusz) esetében a radikális cisztektómia, a kismedencei nyirokcsomók kimetszése és a műtétet követően adjuváns kemoterápia alkalmazása jelenti a standard terápiát. Az invazív viselkedésű TCC tumorok kemoterápiájára leggyakrabban metotrexátot, vinblasztint, doxorubicint (Adryamicin) és ciszplatint (Platinol) alkalmaznak [32, 81, 83, 85].

Az áttét nélküli laphámsejtes karcinóma és adenokarcinóma hólyagdaganatok kezelésére azok alacsony kemoszenzitivitása miatt a klinikum többnyire radikális cisztektómiát és sugárkezelést alkalmaz. A metasztázissal rendelkező hólyagdaganatos betegek kezelésére leginkább ciszplatin-alapú multidrog kezelést alkalmaznak, például az MVAC-terápiát (metotrexát, vinblaszin, doxorubicin (Adryamicin), ciszplatin) [32, 83, 85]. Sajnos, az ilyen kombinált terápiák esetében az első kezeléseket követően jelentkező súlyos mellékhatások miatt a betegek

közel 50%-a nem alkalmas a terápia folytatására. Esetükben jelenleg rendkívül kevés nemzetközileg elfogadott más terápiás eljárás közül választhatunk [83].

A hólyagdaganatok egyik legrégebbi immunterápiás kezelése, az 1970-es évek óta sikerrel alkalmazott BCG-instilláció, melyet az *in situ* vagy T1 státuszú TCC tumoroknál az igény szerint ismételt TUR beavatkozásokat követően alkalmaznak. A BCG-instilláció kizárólag a nem infiltráló, alacsony kockázatú TCC tumorok esetében alkalmazható sikerrel [32, 84]. A hólyagtumorok immunterápiájának másik példája az anti-PD-1/PD-L1 inhibitorok pl. atezolizumab alkalmazása előrehaladott stádiumú megbetegedés esetén [84]. Az FDA javaslata alapján elsővonalbeli terápiaként alkalmazandó ciszplatin terápiára nem alkalmas betegeknél, illetve másodvonalbeli terápiára várakozó előrehaladott stádiumú betegeknél alkalmazzák [84]. Az immunterápiák előrehaladott stádiumban lévő hólyagtumoros betegek esetében látott sikerét látva az FDA további PD-1/PD-L1 antitestek, a durvalumab, az avelumab, a nivolumab és a pembrolizumab használatát is engedélyezte a másodvonalbeli terápiák között [84, 85]. A PD-1/PD-L1 antitest alapú célzott daganatterápiák lényege, hogy a készítmény az immunrendszer T-sejtjein megtalálható PD-1 receptorokhoz kötődik, megakadályozva ezzel, hogy a hólyagtumor sejtek által termelt PD-L1 és PD-L2 fehérjék ahhoz hozzákötődjenek. Ezzel a lépéssel az inhibitorok megőrzik a T-sejtek érzékenységét, fokozzák azok tumorsejt felismerő képességét, támogatva ezzel a szervezet daganat felismerő képességét.

A hólyagdaganatok kezelésének egyéb célzott terápiás lehetőségei a daganat számos ismert mutációját tekintve (melyek rendszerint a karcinogenezisben jól definiált szerepű gének) igencsak széles palettán mozoghatnak, de a klinikai tapasztalatok gyakran mást mutatnak [32, 85]. Az engedélyezett célzott terápiás lehetőségek zömében az előrehaladott, áttétes hólyagdaganattal küzdő betegek gyógyítására, túlélési idejük hosszabbítására javallottak, s nem a daganat primer, ámde invazív állapotának, tovább terjedésének megakadályozására. Példaként említhető a dovitinib, mely egy multitargetált TKI (tirozin kináz inhibitor), mely

előrehaladott, áttétes hólyagdaganatok terápiájára csekély sikerrel alkalmazható [83, 85]. Habár az mTOR aktivációjára utaló markerek már igazoltan jelen vannak az előrehaladott stádiumú tumorok esetében, jelenleg csak vese karcinóma esetében engedélyezett a temsirolimus és everolimus mTOR inhibitorok alkalmazása [85]. Sajnos eredménytelen volt az EGF-R pozitív hólyagdaganatok esetében a lapatinib EGF-R TKI alkalmazása is [83, 85]. Mint számos más daganat esetében, úgy a hólyagkarcinómáknál is felmerült a vaszkularizációt blokkoló antitestek használatának lehetősége, melyet a RANGE nevű klinikai vizsgálatban 530 metasztatikus uroteliális karcinómában szenvedő beteg bevonásával vizsgáltak. A vizsgálat során minden beteg docetaxel kemoterápiában részesült, egy részük kezelését ramucirumab anti-VEGFR2 antitest terápiával kombinálták. A kombinált kezelés egyértelmű sikert mutatott, ugyanis a docetaxel + ramucirumab kezelt betegek túlélése 4,07 hónapra nőtt, a docetaxel + placebo csoport esetében tapasztalt 2,76 hónappal szemben [85].

Számos kutatás bizonyította már, hogy androgén és ösztrogén receptorok expressziója is megfigyelhető a normál urotélium és az uroteliális karcinómák esetében egyaránt [80, 86]. A nemi hormon receptorok szerepe a hólyagtumor progressziójában nem tisztázott, de a többnyire a betegség incidenciáján alapuló megfigyelések alapján az androgén hormonok valamilyen módon növelik a betegség kockázatát, míg a női hormonok protektív hatásúak [87].

3.3. A peptid hormon receptorok, mint lehetséges terápiás célpontok a daganatok célzott terápiájában

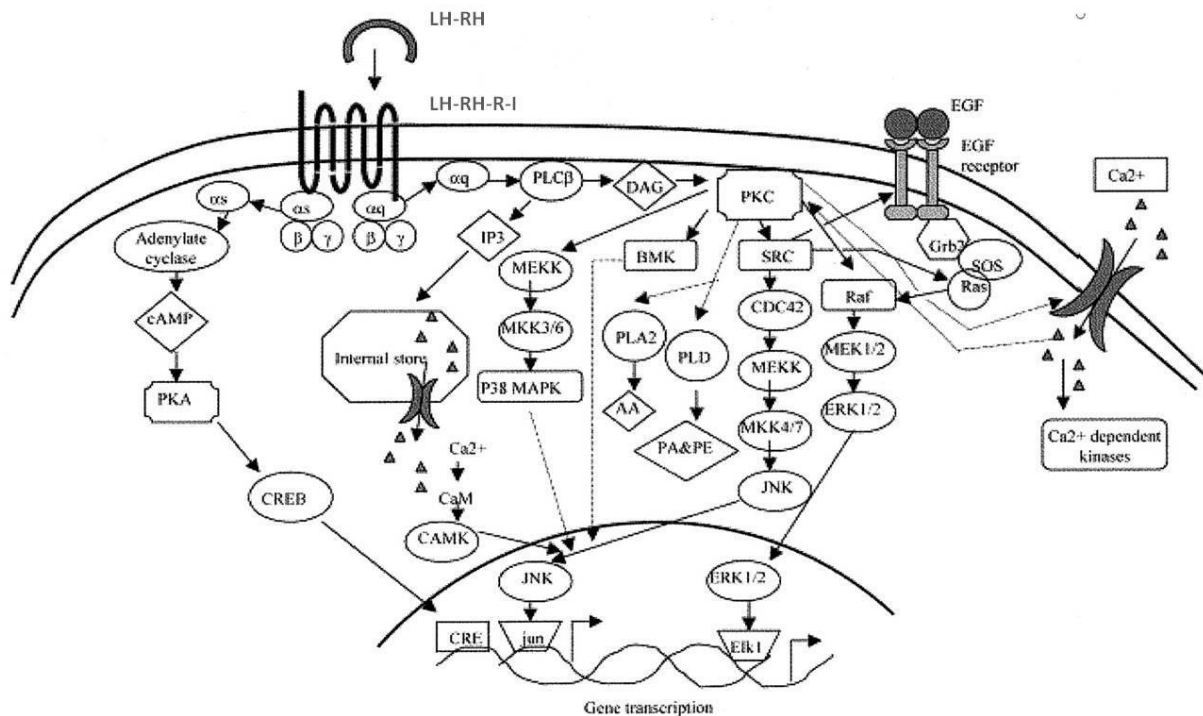
3.3.1. Luteinizing hormone- releasing hormone (LHRH) és receptoraik fiziológiája és előfordulásuk

A hipotalamikus hormonok és receptoraik tumoros sejtekben való fokozott expressziójának felfedezése mérföldkőnek számít a hormonérzékeny daganatok célzott terápiáinak fejlesztésében. A LHRH hormont vagy más néven gonadotropin releasing hormont (GnRH) hormont alapvetően a hipotalamusz sejtjei választják ki, amely az endokrin

szabályozáson keresztül az ivarsejtképzésben és a nemi hormonok szintézisének aktiválásában vesz részt. A termelődött LHRH nagy affinitással képes kötődni a hipofízis sejtjeinek felszínén lokalizált LHRH receptorhoz (LHRH-R), így aktiválva a gonadotrop sejteket luteinizáló hormon (LH) és folliculus stimuláló hormon (FSH) termelésre [88]. Az LHRH-R és ligandjainak expressziója egészséges emberben leginkább a véragyúgáttal elzárt hipotalamusz-hipofízis agyi területekre lokalizálódik, de kisebb mértékű expressziója megfigyelhető az ivarszerveken is. Mindkét szervrendszerre jellemző, hogy a nem osztódó sejtek expresszálják a receptort és/vagy a ligandot a szteroid hormon szekréció szabályozásának céljából. Ugyanakkor, a receptornak és a ligandnak egyaránt megfigyelték a megnövekedett expresszióját a reprodukív szerveket érintő hormon érzékeny daganatokban, mint ovárium, emlő, endometrium és prosztatata karcinómában [1, 3, 4, 89, 90]. Az LHRH receptor-ligand interakciójának hormon indukciós képességén túlmutató szerepét akkor feltételezték először a kutatók, amikor jelentős expresszióját tapasztalták nem hormon érzékeny daganatok, mint vese, hasnyálmirigy, agy, vastagbél, szájüregi, fej- és nyaki karcinómák, valamint kután melanóma esetében is, sőt tripla-negatív emlő karcinómákon is [5, 8-13]. Kutatócsoportunk volt az első, aki humán uvealis melanoma szövetmintákban, valamint az OCM1 és OCM3 primer UM sejtvonalakban is igazolta az I-es típusú LHRH-R és ligandja expresszióját [19, 20]. Későbbi vizsgálataink alapján azt is bizonyítottuk, hogy ez a membrán receptor expresszió alkalmas LHRH ligand alapú célzott daganatterápiás molekula tumorsejtek általi felvételére is, még a citosztatikum rezisztens UM sejtekben is [21].

Az LHRH-R molekuláris szerkezetének és a ligand-receptor interakció által indukált jelátviteli útvonal feltérképezésekor kimutatták, hogy a receptor alapműködésén túl képes működésbe hozni az EGF-R-t, ezáltal az autokrin-parakrin jelátvitelen keresztül segítve a daganat növekedését [91, 92]. Alapvetően, az LHRH-R egy G-protein kapcsolt, hét transzmembrán doménnel rendelkező membrán receptor, mely decapeptid LHRH ligandjával

(pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) való interakciója után internalizál a sejtplazmába és aktiválja az IP₃-mat és a DAG-ot [93]. Ez az aktiváció Ca²⁺ felszabadulást vált ki, amely szükséges az LH és az FSH granulumból való exocitóziséhoz, a DAG pedig aktiválja a PKC útvonalat [94]. A PKC útvonal a MAPK-ok aktivációjához vezet, melyek a sejtmagba vándorolva további transzkripciós faktorok átírását indukálják [95].



3. ábra: Az I-es típusú LHRH receptor aktivációja és az indukált jelátviteli folyamatok.

(Harrison GS, Wierman ME, Nett TM and Glode LM: Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells. *Endocr Relat Cancer* 11: 725–748, 2004 [9])

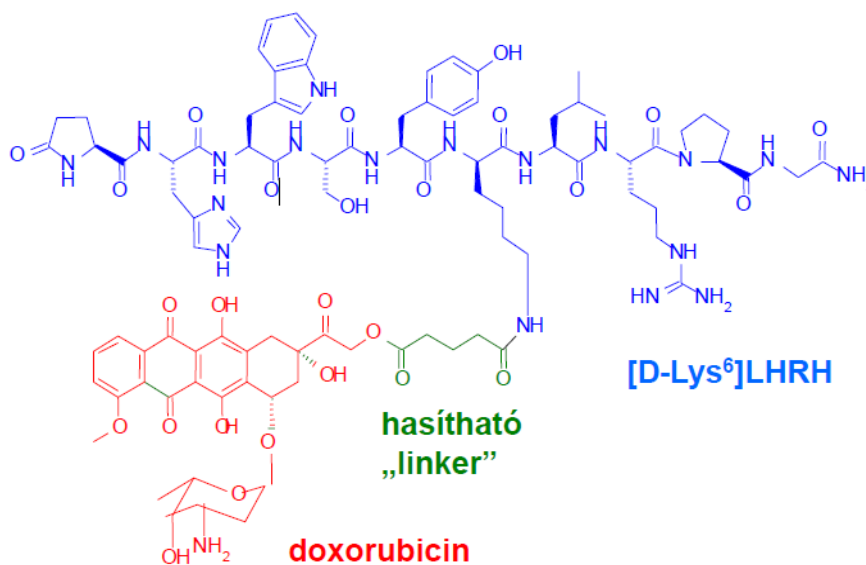
Az LHRH-R további funkcióit differenciálja, hogy három típusát különböztetjük meg emlősökben, megfigyelhetően szervtípustól függő eltérő előfordulási gyakorisággal. Az I-es típusú LHRH-R-ok jellemzően a hipofízisben fellelhetőek, de számos más hormonérzékeny és nem hormonérzékeny daganatokban egyaránt megfigyelték fokozott expressziójukat [96]. Az I-es típusú LHRH-R 328 aminosavból áll, jellemzően citoplazmatikus C-terminális farki része hiányzik. Kódoló génszakasza a 4q21.2 lókuszon található, 3 exonból áll, melyet 2 intron tagol. A II-es típusú LHRH-R rendelkezik ezzel a citoplazmatikus fark részével is, de a receptor

transzkripciója során a kettes exon részben eltűnik így csak 248 aminosavból áll. Az LHRH-R harmadik transzkript variánsából a teljes kettes exon hiányzik, így ez csak 177 aminosavból áll [97, 98]. A csonka receptorok funkciója egészséges vagy tumoros szövetekben egyelőre nem tisztázott, de valószínűleg a csonka receptor is képes ligand megkötésére *in vivo* körülmények között is [21]. A ligand esetében is több izoforma ismert: az I-es típusú LHRH a 8p11.2-p21 kromoszómaszakaszon lokalizálódik, 4 exonból áll, melyet 3 intron tagol. A II-es típusú LHRH kisebb méretű génszakaszon kódolt (2,1 kb) mint az I-es izoforma (5 kb), lokalizációját tekintve a 20p13 génszakaszon helyezkedik el, és leginkább az agyi területeken kívül expresszálódik [99]. Érdekes, hogy mindkét izoforma expressziója kimutatható normál emlő mintákban, illetve overexpressziójuk is emlő daganatos mintákban [100].

3.4. Citotoxikus LHRH analógok

Az LHRH receptorok számos daganat általi overexpressziójának igazolásakor a világ több pontján, párhuzamosan indultak el kutatások, melyek mindegyike olyan daganatterápiás készítményeket kívánt fejleszteni, amely célzottan az LHRH receptorok általi felvételen keresztül szelektíven képes a tumorsejtek pusztítására. Andrew Victor Schally kutatócsoportjának sikerült először izolálni és mesterségesen szintetizálni az első LHRH analógokat, mely munkájáért 1977-ben egyik kutató társával megosztva Nobel-díjban részesült [89]. Az analógok a receptor-ligand kölcsönhatás szempontjából lehetnek agonisták vagy antagonisták. A későbbiekben több típusú citotoxikus analóg is kifejlesztésre került: antimetabolittal (metotrexát), DNS alkiláló szerrel (ciszplatin), nehézfém ionnal (Cu (II) vagy Ni (II)) vagy DNS interkalátorral (doxorubicin) konjugált LHRH analógok [3, 6, 101-103]. Az ilyen citosztatikummal kapcsolt célzott terápiás készítmények előnye, hogy akár az arra rezisztens daganatsejtekben is képesek vagyunk gyógyszer felvételt indukálni a citosztatikumok szelektív, LHRH receptor mediált endocitózisával úgy, hogy az egészséges sejtek nem, vagy minimálisan károsodnak.

Ilyen citotoxikus célzott terápiás készítmény az AEZS-108 (AN-152, klinikai fázis vizsgálatban a neve Zoptarelin Doxorubicin®) amely egy doxorubicinnel kapcsolt LHRH agonista. Az AEZS-108 esetében a D-Lys⁶ aminosavhoz egy 14-O hemiglutarát hasítható linker szakaszon keresztül sikerült kapcsolni a doxorubicin molekulát, a létrehozott célzott terápiás vegyület a konjugálást követően is megőrizte magas LHRH-R kötési affinitását és specifitását [3, 6, 101]. A továbbiakban kifejlesztésre került a molekulának egy toxikusabb formája is, melyben a [D-Lys⁶]LHRH ligand egy 2-pirollino-DOX molekulával lett összekapcsolva (AN-207). Ez alacsonyabb LHRH receptor expresszió esetében is hatékony lehet a tumorsejtek elpusztításában [6, 101].

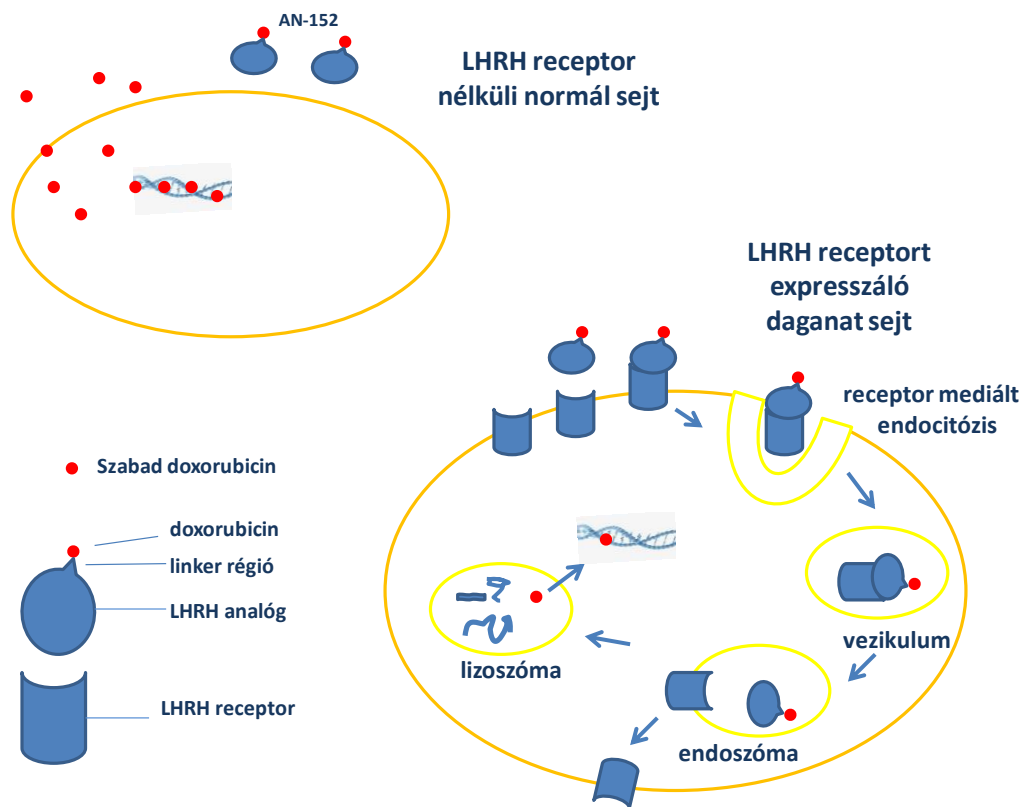


4. ábra: A citotoxikus LHRH analóg AEZS-108 (AN-152) szerkezete.

(Engel, J., Emons, G., Pinski, J., Schally, A. V.: AEZS-108: a targeted cytotoxic analog of LHRH for the treatment of cancers positive for LHRH receptors, *Curr Drug Targets* 17:5: 488-94, 2012., Átdolgozott kép. [104])

A doxorubicin kapcsolt LHRH analógok a receptorhoz kötődésüket követően előbb a citoplazmába internalizálódnak, majd lizoszomatikus degradációt követően felszabadul belőlük a bevitt DOX alegység, mely a sejtmagba vándorolva az osztódó sejtek DNS láncai közé interkalálódik [1, 6, 104]. A DOX molekula ezt követően a topoizomeráz II által felhasított

dupla szálú DNS közé interkalálódva megakadályozza a DNS újra ligálását, ezzel gátat képez a későbbi DNS és RNS szintézisnek [10, 105]. További hatása a DOX-nek, hogy reaktív oxigén gyökök (ROS) felszabadulását indukálja, melyek a lipidperoxidáción és a direkt sejtkárosításon keresztül vesznek részt a sejt elpusztításában [105]. A DNS károsodását követően számos tumorelles kaszkád-szerű folyamat indul el, mint például a p53 tumorszupresszor aktivációja, mely szintén az apoptózist segíti [106].



5. ábra: Az AN-152/AEZS-108 szerkezete és receptor-mediált internalizációjának folyamata.

(Saját szerkesztés.)

Az AEZS-108 (AN-152) hatékonyságát számos klinikai fázis vizsgálatban tesztelték, például a klinikai II. és III. fázis vizsgálatokban ovárium (NCT00569257) és endometrium (NCT01767155) karcinóma esetében, illetve klinikai II. fázis vizsgálatban kasztráció rezisztens prosztata (NCT01240629) karcinómás betegeken [104, 107, 108]. Az eddigi *in vivo* és a klinikai

tesztelések eredményei alapján az AEZS-108 hatékonyabban képes a daganatsejtek szelektív elpusztítására a daganat multidrog rezisztenciájától függetlenül, mindezt kevesebb mellékhatással mint a szabad DOX [6, 109]. A betegek kezelése során a leggyakoribb mellékhatásként neuropénia és leukopénia, limfopénia jelentkeztek, a DOX-ra jellemző kardiotoxikus mellékhatások pedig a kis dózisonak köszönhetően enyhébbek voltak [107, 108, 110]. A kezeléseket követően megvizsgálták a fiziológiásan LHRH-R expresszióval rendelkező szervek (hipofízis és reproduktív szervek) károsodását, az eredmények alapján nem éri maradandó károsodás sem a hipofízis sejtjeit, sem a vér-agy gáton kívüli LHRH receptort expresszáló szerveket. Ennek, hogy a molekula nem lépi át a vér-agy gátat, az extrahipofizeális egészséges szervek receptor expressziója pedig túl alacsony a maradandó károsodások létrejöttéhez [6, 110-112].

3.4.1. Korábbi eredmények a szakirodalomból az LHRH receptorok expressziójáról, valamint AN-152 molekulával való célzott terápiás lehetőségekről uvealis melanoma és húgyhólyag daganatok esetében

Kutatócsoportunk volt az első, aki igazolta az LHRH-R-ok és ligandjuk expresszióját uvealis melanoma daganatok és az OCM1 és OCM3 sejtvonalak esetében [20, 53]. Radioligand kötési assay-vel vizsgáltuk a sejtvonalak által expresszált receptorok LHRH ligandkötési képességét, majd megerősítettük a sejtvonalakból készített xenotranszplantált tumorok LHRH-R expresszióját is, feltételezve, hogy későbbi *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban célbavehető a receptor citotoxikus LHRH analógokkal is [20]. A későbbiekben *in vitro* kezelésekkal igazoltuk, hogy az OCM3 uvealis melanoma sejtek nem csak hogy hatékonyan célba vehetőek az AEZS-108 jelölésű LHRH liganddal kapcsolt DOX-nel, de a sejtvonal DOX rezisztens formája is képes elpusztulni az LHRH-R keresztüli DOX felvételnek köszönhetően [21]. A szakirodalom eddig nem vizsgálta, hogy az AEZS-108 OCM3 sejteken való használatakor a

DOX indukálta ROS-on kívül milyen jelátviteli folyamatok indulnak el a receptor-ligand interakciónak köszönhetően, melyeknek szerepe lehet a sejtek pusztulásában.

Egyes húgyhólyag daganatok LHRH-R és LHRH expresszióját néhány korábbi publikációban már leírták, de számos megválaszolatlan kérdés maradt még a kutatók számára a témában [113]. Bahk és munkatársai 4 húgyhólyag karcinóma sejtvonalban, valamint 5 TCC típusú hólyagtumorban igazolták az LHRH ligand és az LHRH-R expresszióját mRNS és fehérje szinten egyaránt, valamint szérumból izolált LHRH- val *in vitro* sejtproliferációs assay-t végeztek. Eredményeik alapján az *in vitro* LHRH kezelés semmilyen hatással nem volt a vizsgált sejtvonalak növekedésére, sejtosztódására [113]. Habár eredményeik 2008-ban hiánypótlóak voltak a hólyagdaganatok peptid hormon alapú terápiájában, azonban az alacsony mintaszám (sejtvonal és betegminta egyaránt) miatt további vizsgálatok voltak szükségesek az LHRH receptorok hólyagtumorokban betöltött szerepéről. Szepesházi és munkatársai egy 2012-es publikációjukban 4 további húgyhólyag karcinóma sejtvonal és 18 humán húgyhólyag szövetminta LHRH-R expresszióját igazolták [114]. Radioligand kötési assay-t végeztek ([D-Trp⁶]LHRH analóggal) a sejtvonalak felhasználásával, mely alapján az analóg képes a sejtfelszíni LHRH-R-hoz kötődni. Vizsgálataik során immunhiányos egerekben xenotranszplantált tumorokat alakítottak ki a sejtvonalak állatokba oltásával, melyeket később AN-152-vel, illetve szabad DOX-nel kezeltek. Eredményeik alapján az AN-152 (AEZS-108) nem csak hatékonyan képes gátolni a xenotranszplantált hólyagtumorok növekedését, de kevesebb mellékhatást is indukált, mint a DOX kezelések [114]. Vizsgálataik nem terjedtek ki a szövetminták LHRH expressziójának vizsgálatára, az LHRH-R státusz és a betegminták klinikopatológiai paramétereinek közötti összefüggések vizsgálatára, illetve a szövetminták által expresszált LHRH-R-ok ligand kötési képességének vizsgálatára.

3.5. A daganat őssejt teória, egy új megközelítés a célzott daganatterápián belül

3.5.1. A daganat őssejt teória alap felvetései, megvalósult terápiás alkalmazásai

A daganat őssejt teória egy viszonylag új, 10-15 évvel ezelőtt elterjedt elmélet, amely, mint a célzott daganatterápia egy speciális típusa egy egészen új fajta, személyre szabott, illetve a daganatra szabott kezelést valósíthat meg. A teória szerint a daganatok olyan kevésbé differenciált őssejt-szerű sejtpopulációkat is tartalmaznak, melyek felelősek lehetnek a tumor kemoterápiás kezelést követő relapszusáért, ismeretlen eredetű kemorezisztenciájáért. Ezek a malignus transzformáción átesett szöveti őssejtek nem csak a tumor többi részét felépítő differenciáltabb tumorsejtek pótlásáért felelősek, hanem sokkal ellenállóbbak az alkalmazott terápiás eljárásokkal szemben, mivel molekuláris profiljuk részben más, mint a többi, a kemoterápiával elpusztított tumorsejté. Ez a képességük teszi lehetővé, hogy a kezdetben sikeresnek látszó kemoterápiát/célzott daganatterápiát követően a tumor újbóli megújítására képesek, ezáltal már a megelőzőleg terápiával szemben rezisztens daganatsejtekkel [115, 116]. Feltételezések szerint ezek a daganat őssejtek felelősek a hematogén áttétképzéskor végbemenő felszíni molekuláris profil váltásért is, az ún. vaszkuláris mimikri folyamatért, illetve a metasztázis kialakulásáért [117]. A daganat őssejt teória számos daganat esetében már beigazolódott, s mind RNS, mind fehérje szinten sikerült igazolni ezeknek az őssejt-szerű sejtpopulációknak a jelenlétét a tumoron belül [118, 119]. Az elmélet további iránymutatása szerint a daganatok sikeres és végleges eliminálásához a kulcs, hogy ezeket a tumor őssejteket vegyük célba először célzott terápiát alkalmazva ellenük, majd azt követően lehetne a differenciáltabb tumorsejteket pusztító daganat terápiákat alkalmazni. Ezzel a daganat újbóli kiújulását és rezisztenciáját biztosító csírasejteket pusztítanánk el először. Mivel a daganat őssejtek folyamatos kapcsolatban állnak a többi tumorsejttel is, számos jelátviteli folyamatban támogatva azok életben maradását, a tumor progresszióját, így a csírasejtek elpusztítása is egy súlyos csapás lehetne a daganatsejtek számára.

Sem az uvealis melanoma, sem a húgyhólyag daganatok kezelésére ugyan nem alkalmaznak jelenleg daganat őssejt célpontú terápiát a klinikumban, de *in vitro* már történtek ilyen irányú vizsgálatok. Wei Dai és munkatársai a SIRTUIN1/2 hiszton deacetilázok működését gátolták egy bizonyos Tenovin-6 nevű molekulával [92, 1, Mel 270, Omm 1 és Omm 2.3 uvealis melanoma sejttenyészetek *in vitro* kezelése során. A kezelés apoptózist indukált a sejtekben a p53 tumorszupresszor aktivációjával, továbbá reaktív oxigén gyökök (ROS) felszabadulásával tovább segítette a sejtek pusztulásának folyamatát [120].

3.5.2. Az uvealis melanoma daganatok és a daganat őssejt teória közötti összefüggések

Az uvealis melanoma tumorok daganat őssejt tartalmát eddig keveset vizsgálták. A daganat őssejt szubpopulációk kimutatásánál nem csak műtéti minták immunhisztokémiai festésével jártak sikerrel, de egyes uvealis melanoma sejttenyészetek 2D vagy 3D sejt kultúráiban is sikerült kimutatni ezeket a kóros őssejt-szerű tumorsejteket [121]. Kevés publikációban ugyan, de olvashatunk a szakirodalomban egyes uvealis melanoma daganatok esetében megfigyelt CD133, nestin, NOTCH1, SOX10, PAX3 daganat őssejtmarkerek expressziójáról. Emellett a VE-kadherin agresszív melanoma marker sejt felszíni jelenlétét és a Wnt jelátviteli útvonal fontos tagjai közül a FZD6 és a β -katenin expresszióját is vizsgálták már, ám a vizsgálatok még számos kérdést hagytak maguk után [24, 25, 115, 116, 121, 122].

Az elmúlt 10 évben számos kutatócsoport végzett olyan átfogó genetikai vizsgálatokat uvealis melanoma sejteken, melyek célja minden esetben az volt, hogy választ kapjunk arra a kérdésre, hogy: mi áll az uvealis melanoma daganatok gyakori kemorezisztenciájának és fokozott áttétképzési / véréreképzési hajlamának hátterében? Egy ilyen vizsgálat eredményeként Michael D. Onken és munkatársai arra a megállapításra jutottak, hogy az uvealis melanoma tumorok alapvetően egy I-es és egy II-es csoportba sorolhatóak agresszivitásuk és molekuláris profiljuk alapján [24]. A molekuláris klasszifikáció alapján a jobb prognózist mutató I-es csoportba tartozó tumorok leginkább differenciált idegsejt-jellegű vagy melanocita fenotípust

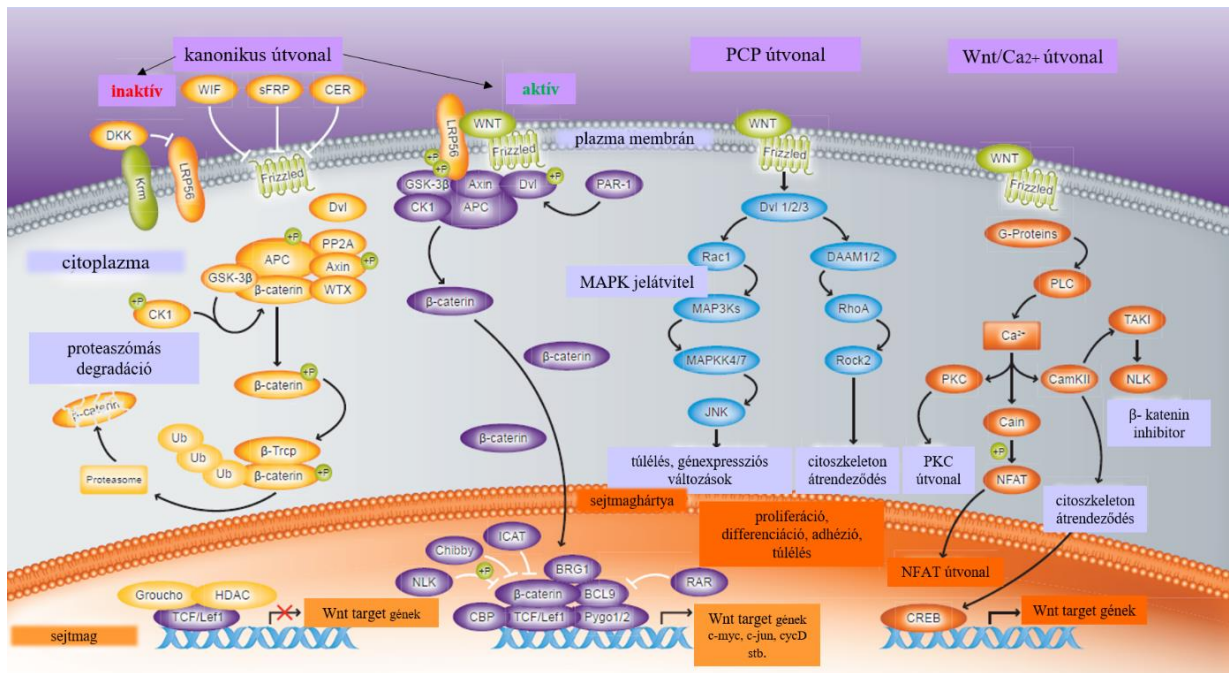
mutatnak, míg a II-es csoportba sorolt tumorok nagyobb mennyiségben tartalmaznak primitív neuro-ektodermális profilt mutató sejtpopulációkat. A II-es csoportba sorolt agresszívebb viselkedésű tumorok túlnyomóan epitheloid típusú sejtekből épülnek fel, mely megállapítás összecseng az uvealis melanoma tumorok szövettani osztályozásához társuló túlélési esélyekkel. További jellemző a II-es csoport molekuláris profiljára, hogy membránjukban erős β -katenin és E-kadherin expressziót mutatnak (mely szintén az epitheloid sejtípusú uvealis melanoma tumorokra jellemző), valamint overexpresszált HIF-1A és VEGF faktorokon keresztül intenzív angiogenezist és áttétképzést valósítanak meg [25]. Ezzel szemben az I-es csoportba sorolt tumorok membránja alacsonyabb β -katenin és E-kadherin expressziót mutat, ezek a molekulák inkább a sejtmagban és a citoplazmában lokalizálódnak [23]. Meglepő, de E-kadherin a szakirodalom által inkább, mint egy gyakran downregulált tumorszupresszor ismert a tumorbiológiában, mint sem a daganatok progressziójában kulcsszerepű membránfehérje. Azonban, szerepének megértéséhez figyelembe kell venni az aktuálisan vizsgált tumort és annak mikrokozonyezetét is. Számos előrehaladott stádiumú daganat (kután melanóma, hepatocelluláris karcinóma és gyulladással járó emlőrák) esetében figyelték meg az E-kadherin overexpresszióját a távoli áttétek sejtmembránjában [27, 123, 124]. Feltételezések szerint, az E-kadherin segíti a vérben keringő daganatsejteket a túlélésben, illetve a vaszkuláris-mezenhimális tranzícióban, aminek feltétele, hogy a tumorsejt „sejt-sejt” kapcsolatokat alakítson ki a környező sejtekkel, kilépve így a véráramból a szövetek közé [23]. Másrésztől, ezek a kontaktok segítik az éppen távoli áttétet képező tumorsejtet az apoptózis elkerülésében is.

Mivel maga a szemgolyó nem tartalmaz nyirokereket, így a szemészeti daganatoknak a hematogén szóródás az egyetlen lehetőség a távoli áttétek létrehozására, így az angiogenezis is méginkább jelentős szerepet játszik az UM progressziójában. A rossz prognózissal járó II-es csoportba sorolt uvealis melanoma tumorok erőteljes vaszkularizációjában feltételezhetően

fontos szerepe van ezeknek az overexpresszált E-kadherin membránreceptoroknak, azonban pontos működésük még nem tisztázott.

A II-es csoportba sorolt uvealis melanoma tumorokban jellemzően overexpresszált másik molekula a β -katenin membránreceptor. A β -katenin molekulák megtalálhatóak a sejtmembránban, illetve szabad, citoszolikus formában is a tumorsejten belül. A β -katenin molekulák a Wnt szignalizációs útvonalba kapcsolódva képesek a sejtmagba bejutni és ott a LEF/TCF transzkripciós faktorokkal komplexet alkotva számos gén átírását aktiválni [125]. A Wnt molekulák szekretált glikoproteinek, melyek a célsejt felszínén lévő Frizzled (FZD)-receptorukhoz kötődve számos bonyolult, több lépéses jelátviteli folyamatot indítanak el. A Wnt/Frizzled jelátviteli útvonalak gyakori jellemzői az őssejt szerű tulajdonságokkal rendelkező sejteknek, mivel kulcsszerepük van a sejtek polaritásának, osztódási képességének és migrációjának szabályozásában [125]. További ismert funkcióik az őssejtek fenntartásában, a gasztrointesztinális, valamint a vérképző rendszer kialakításában és az öregedésben ismeretes [126]. A Wnt molekulák indította jelátviteli folyamatok karcinogenezisben betöltött szerepe is egyre több daganat esetében igazolódni látszik, egérm modellen sikerült a Wnt aktivációt követő tumor növekedést serkentő hatást is kimutatni [125, 127, 128]. A szakirodalom szerint eddig 19 Wnt molekulát ismerünk, melyek 10-féle FZD receptorukhoz képesek kapcsolódni és különböző további jelátviteli útvonalakt aktiválni [129]. A Wnt molekulák indukálta jelátviteli folyamatoknak két típusa lehet, ún. kanonikus- vagy nem kanonikus- útvonalak. Amennyiben a Wnt ligand-FZD receptor komplex a kialakulását követően az LRP5/6 ko-receptorral dimerizálódik, úgy a kanonikus útvonalat megvalósítva aktiválja a citoszolikus β -katenint, amely a sejtmagba kerülve gén átírást indukál. Wnt-FZD kötődés hiányában a β -katenin proteaszómás degradáció következtében elbomlik [125]. A nem kanonikus jelátviteli útvonalakat további két alcsoportra oszthatjuk, de sem a LRP5/6 ko-receptor, sem a β -katenin nem játszik szerepet, egyik aktivációjában sem. Az említett alcsoport egyik típusa a kalmodulin

kináz II-n és a protein kináz C-n keresztül aktiválódó ún. Wnt/Ca²⁺ jelátviteli útvonal, míg a másik útvonal a Jun N-terminális kináz által aktivált PCP útvonal [125, 129].



6. ábra: A Wnt jelátviteli útvonal típusai és indukált génexpressziós változások.

(*abcam.com, Átdolgozott kép.*)

3.5.3. A Wnt molekulák az angiogenezisben

A Wnt molekulák közül a szakirodalom által egyik legrészletesebben leírt glikoprotein a Wnt5 molekula. A Wnt5 molekula receptorához való bekötődést követően alapvetően a Wnt/Ca²⁺ nem kanonikus útvonalon fejt ki hatását, azonban ismert róla, hogy FZD3/FZD6 receptoraihoz kötődését követően képes a PKC útvonal aktiválására is. Feltételezhetően az a multifunkcionális aktivációs képessége segíti a daganatok komplex angiogenezis szabályozásában betöltött kulcsszerepében, melyet emésztőrendszeri daganatokban sikerült igazolni is [130]. A Wnt5a különböző útvonalakon keresztüli működésének szerepe ismert az érképződés szabályozásában. Yang és munkatársai kimutatták, hogy a Wnt5a képes az egér embrionális őssejtjeikben indukálni az endotél sejtek differenciálódását a β-katenin és PKCα függő útvonalon keresztül egyaránt [131]. A Wnt5 expresszióját kimutatták egérmodellben

több szerv, úgy, mint a bőr, máj és a méh érrendszerének fejlődése során is. Szintén egérmodellekben figyelték meg az endotél sejtekben való fokozott expresszióját, valamint, hogy képes serkenteni ezeknek a sejteknek az osztódását, túlélését és migrációját is [132]. A Wnt5 fejlődő érrendszerben, valamint endotél sejtekben való fokozott expresszióját figyelembe véve nem meglepő, hogy számos intenzív vaszkularizációt és áttétképzést mutató tumor esetében feltételezik a működését [133, 134].

A Wnt útvonal angiogenezisben betöltött szerepét igazolja, hogy sikerült igazolni a Wnt molekulák serkentő hatását a vastagbél daganatok VEGF expressziójára [135]. A Wnt5 esetében bizonyították, hogy melanoma tumorokban képes egyes pro-angiogenikus faktorok, mint a IL-6, IL-8 (CXCL8), VEGF és MMP2 exoszómális felszabadulását indukálni [26]. Nem kissejtes tüdődaganatokban szintén sikerült igazolni, hogy az angiogenezist támogató jelátviteli folyamatokat képes elindítani [136].

4. Anyagok és módszerek

4.1. Sejtvonalak és tenyésztési körülményeik

Az uvealis melanoma daganatokat vizsgáló kísérleteinkhez OCM3 (okuláris chorioideális melanóma 3) elnevezésű, primer uvealis melanoma daganatból tenyésztett sejtvonalat használtunk, melyet a Debreceni Egyetem, ÁOK, Biofizika és Sejtbiológiai Intézete biztosított számunkra. A húgyhólyag daganatokat érintő kísérleteinkhez RT-112, UMUC3 és TCCSUP sejtvonalatokat használtunk, melyeket Roman Blaheta Professor (Goethe University, Frankfurt, Németország) szíves felajánlása jóvoltából vizsgálhattunk. Az RT-112 sejtvonala egy invazív (T2 státusz, grádus 2/3), az UMUC3 szintén egy invazív (grádus 3) *in vitro* modellje a hólyagdaganatoknak, míg a TCCSUP egy 4. grádusba sorolt TCC típusú hólyagkarcinóma modell. A sejtek fenntartásához és tenyésztéséhez a forgalmazó javaslata alapján 10%-os FBS-t, 1% L-glutamint és 1% antibiotikumot tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékot használtunk. A sejteket 5% CO₂-ot tartalmazó, 37 °C-os, 90%-os páratartalmú inkubátorban tenyésztettük.

4.2. Etikai engedélyek, humán szövetminták

A felhasznált humán uvealis melanoma szövetminták gyűjtése az egyetemi Etikai Bizottság engedélye (ID azonosító: DERKEB/IKEB 4172-2014) után történt, a minták a Debreceni Egyetem, Klinikai Központjának Szemklinikáján enukleált betegekből származtak. A vizsgált húgyhólyag tumorminták gyűjtése szintén az egyetemi Etikai Bizottság engedélyével (ID azonosító: UD REC/IEC 4831-2017) történt a Debreceni Egyetem, Klinikai Központjának Urológia Klinikáján. Az diagnózis és pontos szövettani osztályozása minden szövetminta esetében patológus által is megerősítésre került. A sebészi eltávolítást követően a minták általunk felhasználásra kerülő része vagy paraffin blokkokba került beágyazásra, vagy -70 °C-on tároltuk azokat felhasználásig. A kontrollként használt humán hipofízis, egészséges anyajegy és máj, placenta és vese minták a Debreceni Egyetem, ÁOK, Patológia Intézete által gyűjtött és felajánlott minták voltak.

4.3. Az uvealis melanoma daganatokat vizsgáló kísérleteinkhez alkalmazott metodikák

4.3.1. A citotoxikus LHRH analóggal és doxorubicinnel történt *in vitro* kezelések és sejt életképességi vizsgálatok

Az általunk felhasznált [D-Lys⁶]LHRH analóg és a doxorubicinnel kapcsolt [D-Lys⁶]LHRH analóg AEZS-108 (más néven AN-152/ Zoptarelin Doxorubicin Acetát®) kollaborációs partnerünk, Andrew V. Schally és munkacsoportja, valamint az Æterna Zentaris (Frankfurt am Main, Németország) által szintetizált és felajánlott molekulák. A molekulákat felhasználásig liofilizált formában tároltuk, majd 0.01 M vízben oldott ecetsav tartalmú NaCl-ban (Salsol-A, TEVA Gyógyszergyár Zrt., Magyarország) 100 µM végkoncentrációjú oldatára hígítottuk. Korábbi toxicitási vizsgálatok eredményei alapján az *in vitro* sejtes kezeléseknél a tápfolyadék 5 µM-os hígításban tartalmazta az említett analógokat [21, 137]. A kezeléseknél citosztatikus kontrollként felszánt Doxorubicin HCl (2 mg/ml) (DOX) a TEVA Gyógyszergyár Zrt.-től vásárolt és felhasználásig 4 °C-on tárolt készítmény, az *in vitro* sejtes kezeléseknél a tápfolyadék 5 µM-os hígításban tartalmazott DOX-t. A kezeléseket minden esetben ekvivalens környezeti paraméterekkel, 24 vagy 48 órás inkubációval, nem kezelt kontroll sejtek párhuzamos fenntartásával, biológiai replikákban végeztük.

A kezelést követően a sejtek életképességi vizsgálatára MTS assay-t végeztünk. Ehhez a sejteket 10 000 sejt/ lyuk arányban 96 lyukú-plate-en szélesztettük, majd 24 órát követően elvégeztük a 24 órás citotoxikus 5 µM-os AEZS-108 és a DOX kezeléseket. Ezt követően a megmaradt sejtek életképességét a CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay-vel (Promega, Madison, WI) végeztük el a gyártói utasításoknak megfelelően. Minden életképességi vizsgálathoz végzett kezelést hexaplikában (n=6) és háromszori ismétléssel, vagyis biológiai replikákban végeztünk el. Az eredményeket 490 nm-en FLUOstar Optima Counter (BMG Labtech GmbH, Németország) készüléken mértük le.

4.3.2. RNS izolálás, reverz transzkripció PCR és kvantitatív valós idejű polimeráz lánreakció (RT-qPCR)

LHRH-R expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel OCM3 sejteken és UM szövetmintákon

Az OCM3 sejtekből és UM szövetmintákból RNS izolálást végeztünk az AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával a gyártói utasítások szerint. A reverz transzkripciót mintánként 500 ng RNS QuantiTect Reverse Transcription kittel (Qiagen, Németország) való átírásával végeztük. Az alábbi primerpárt használtuk a receptor kimutatására: LHRH-R- I:forward: 5'-GAC CTT GTC TGG AAA GAT CC-3', reverse: 5'-CAGGCT GAT CAC CAC CAT CA-3' (Sigma-Aldrich Corporation, USA). A primerpárt a Primer3web szoftver használatával terveztük. A célgéneket Fermentas (Németország) RT-PCR cDNS amplifikációs kittel szaporítottuk fel az alábbi lépésekből álló cikluson keresztül: 95 °C - 45 mp, 60 °C - 30 mp és 72 °C - 1,5 perc 35 db ismétléssel, majd záró ciklusként 10 perc 72 °C. A PCR termékeket gélelektroforézissel 1,5%-os GelRed (Biotinum, USA) tartalmú agaróz gélen szeparáltuk, majd UV fény alatt detektáltuk.

Humán uvealis melanoma és normal uvea szövetek MASPIN génexpressziójának vizsgálata RT-PCR-rel

RNS izolálást végeztünk a szövetekből az AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával a gyártói utasítások szerint. Ezt követően 500 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Németország) felhasználásával. A MASPIN primer szekvenciája az alábbi volt: MASPIN- forward: 5'-GGC AAT GTC CTC TTC TCT C-3', reverse: 5'-GCC GCT TGA TTA GTT TCA GT-3'. A célgént Fermentas (Németország) RT-PCR cDNS amplifikációs kittel szaporítottuk fel az alábbi lépésekből álló cikluson keresztül: 95 °C - 45 mp, 60 °C - 30 mp és 72 °C - 1,5 perc 35 db ismétléssel, majd záró ciklusként 10 perc 72 °C. A PCR termékeket gélelektroforézissel 1,5%-os GelRed (Biotinum, USA) tartalmú agaróz gélen szeparáltuk, majd UV fény alatt detektáltuk.

Daganat őssejtmarkerek expressziójának vizsgálata RT-PCR-rel uvealis melanoma szövetekből

A 18 fagyasztott uvealis melanoma szövetmintából és 3 normál uvea szövetmintából total RNS izolálást végeztünk az AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, Hilden, Németország) felhasználásával a gyártói utasítások szerint. A reverz transzkripciót mintánként 250-500 ng RNS QuantiTect Reverse Transcription kittel (Qiagen, Németország) való átírásával végeztük. A célgéneket Fermentas (Németország) RT-PCR cDNS amplifikációs kittel szaporítottuk fel az alábbi lépésekből álló cikluson keresztül: 95 °C - 45 mp, 60 °C - 30 mp és 72 °C - 1,5 perc 35 db ismétléssel, majd záró ciklusként 10 perc 72 °C. A PCR termékeket gélelektroforézissel 1,5%-os GelRed (Biotinum, USA) tartalmú agaróz gélen szeparáltuk, majd UV fény alatt detektáltuk.

A primer párokat a Primer3web szoftverrel terveztük meg és a Sigma-Aldrich Corporation (USA) gyártotta őket (1. táblázat). Háztartási génként a β -aktint használtuk, a NTC (no template control) minták a reakcióközeg tisztaságának ellenőrzésére szolgáltak.

1. táblázat: Humán uveális melanoma szövetek daganat őssejtmarker tartalmának RT-PCR módszerrel való vizsgálatára felhasznált primerek és szekvenciáik

Célgén	Forward primer	Reverse primer
β-aktin	5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA-3'	5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3'
Nestin	5'-AGA ACT CCC GGC TGC AAA-3'	5'-GCA CAG GTG TCT CAA GGG TAG-3'
NGFR	5'-TGC CAG GAC AAG CAG AAC-3'	5'-GGG TGT GGA CCG TGT AAT C-3'
SOX10	5'-CGT CAG CCA GGT GCT CAG-3'	5'-CGC TTG TCA CTT TCG TTC AG-3'
PROM1	5'-GCA CTT ACG GCA CTC TTC AC-3'	5'-TTC CAC AAG CAG CAA AAT CC-3'
FZD6	5'-TGA GCA AGT GAA CAG GAT TAC C-3'	5'-CCC AGA AGA CAG CAG AGA TG-3'

A citotoxikus kezeléseket követően indukált génexpressziós változások kvantifikálása RT-qPCR-rel OCM3 sejteken

A citotoxikus kezelések után az OCM3 sejtekből totál RNS-t izoláltunk TRIzol reagenssel (MRC, USA) a gyártói utasításoknak megfelelően. Ezt követően 500 ng RNS-t írtunk át cDNS-sé IScript Reverse Transcriptase Kit (Bio-Rad Laboratories, USA) felhasználásával. A kvantitatív PCR vizsgálatokat MyiQ2 real time PCR (BIO-RAD, USA) készüléken végeztük Human Angiogenesis 96 StellArray™ (Lonza Ltd., USA) plate-ek felhasználásával. Az array reakciókhoz, illetve a további MASPIN qPCR vizsgálatokhoz közegként SYBR Green Supermixet (Bio-Rad Laboratories, USA) használtunk a gyártó utasítása szerint. A PCR ciklusok az alábbi lépésekből álltak: 50 °C - 2 perc, 95 °C - 3 perc, 95 °C - 15 mp és 60 °C - 1 perc 40 db ismétléssel, végül 81 db melting ciklus (55 °C – 98 °C/ 0,5 perc/°C). Az eredményeket az array esetében gyártói utasításoknak megfelelően Global Pattern Recognition algoritmussal (Bar Harbor Bio Technology Inc.'s, USA) normalizáltuk és 2^{40-Ct} módszerrel kvantifikáltuk, a MASPIN vizsgálata esetében β-aktin és HPRT (hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz) expresszióra normalizáltuk és szintén 2^{40-Ct} módszerrel kvantifikáltuk. A MASPIN további qPCR alapú expressziós vizsgálatára általunk tervezett

primerpárokat használtunk. A felhasznált primerek szekvenciái az alábbiak voltak: MASPIN-forward: 5'-GGC AAT GTC CTC TTC TCT CC-3', reverse: 5'-GCC GCT TGA TTA GTT TCA GT-3', β -aktin-forward: 5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA-3', reverse: 5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3', HPRT-forward: 5'-GTA TTC ATT ATA GTC AAG GGC ATA TCC-3', reverse: 5'-AGA TGG TCA AGG TCG CAA G-3'. Minden qPCR futtatáskor indítottunk egy NTC mintát is a reakcióközeg tisztaságának ellenőrzésére.

4.3.3. Protein analízisek

LHRH receptor immuncitokémiai detektálása OCM3 sejteken

Az OCM3 sejteket fedőlemezen növesztettük 25 000 sejt szélesztésével, majd 24 órát követően a tápfolyadékot eltávolítottuk, a sejtek felszínét PBS-sel átmostuk. Ezt követően 4 °C-os hideg metanollal fixáltuk a sejteket a fedőlemezre 10 percen keresztül. Az endogén peroxidázok blokkolására 3% H₂O₂-val inkubáltuk a sejteket. Ezt követően 0,1% Triton X-100/PBS oldattal permeabilizáltuk a sejteket, majd blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket 1% FBS-0,1% Triton X-100/PBS oldattal való 60 perces, szobahőmérsékleten végzett inkubációval. Az I-es típusú LHRH membrán receptor detektálására nyúl anti-humán LHRH-R (FL328, sc-13944 Santa Cruz, USA) antitestet alkalmaztunk 1:100-ban hígításban. Az éjszakai inkubációt és a PBS-mosási lépéseket követően anti rabbit-HRP-vel (tormaperoxidáz) kapcsolt szekunder antitestet alkalmaztunk (EnVision FLEX /HRP, EnVision+ kit, DM822, Dako, Dánia). Az előhívás mikroszkópos ellenőrzés mellett DAB Substrate puffer + Chromogen (Agilent Technologies, USA) segítségével történt. Negatív kontrollként elkészített mintákon kihagytuk az elsődleges antitesttel való inkubációt, a protokoll további részei megegyezők voltak.

Poliakrilamid-gélelektroforézis (PAGE)-Western blot analízis uvealis melanoma szövetminták vizsgálatára

A szövetminták esetében totál proteint izoláltunk AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kittel, majd a fehérje frakciókat a gyártói utasítás szerint 100 µl Buffer ALO protein oldó pufferben - 80 °C-on tároltuk felhasználásig. Vizsgálatunk során 40 µg fehérjét szeparáltunk mintánként 12%-os SDS (nátrium dodecil szulfát) tartalmú PAGE-gélen, majd a fehérjéket PVDF (polivinilidén fluorid) membránra transzferáltuk metanol tartalmú pufferben. Az aspecifikus kötőhelyek blokkolását 0,1% Tween-20 + 5% zsírszegény tejpor tartalmú TRIS-pufferben (Trisz-(hidroximetil)-amino-metán-puffer) való inkubációval végeztük, majd ezt követte a primer antitestekkel való inkubáció. A szövetminták Western blot vizsgálatára felhasznált antitesteket a 2. táblázat foglalja össze. Szekunder antitestként alkalikus foszfatázzal kapcsolt antitesteket használtunk (Santa Cruz Biotechnology, USA), előhívó oldatként pedig AP Conjugate Substrate Kitet (Bio-Rad Laboratories, USA) használtunk. Az eredmények detektálására és kvantifikálására a Molecular Image Chemidoc XRS+ rendszert és Image Lab Software-t 5.2-t (Bio-Rad Laboratories, USA) használtuk. A target gén fehérje szintű expresszióját minden minta esetében a háztartási gén (GAPDH) fehérje expressziójának intenzitása alapján normalizáltuk.

2. táblázat: Humán uvealis melanoma szövetminták SDS-PAGE-Western blot módszerrel való vizsgálatára felhasznált antitestek

Target gén	Alkalmazott hígítás	Antitest kódszám, gyártó
HIF-1A	1:200	H-206, sc-10790, Santa Cruz, USA
VEGFA	1:100	A-20; sc-152, Santa Cruz, USA

FZD6	1:100	E-19; sc-32148, Santa Cruz, USA
GAPDH	1:1000	D16H11 XP ^(R)), Cell Signaling Technology, USA

OCM3 sejtekből izolált fehérje minták vizsgálata citotoxikus kezelést követően poliakrilamid-gélelektroforézis (PAGE)-Western blottal

A kezelések után az OCM3 sejtekből TRIzol reagenssel izolált totál fehérjét izopropil alkohollal, 300 mM guanidium-kloriddal (Amresco, VWR) és 96% etanollal (Scharlab, Magyarország) tisztítottuk, majd felhasználásig -80 °C-on tároltuk 100 µl 1% - SDS + proteáz inhibitor koktélnban. A vizsgálat további részében az előző pontban ismertetett protokoll szerint szeparáltuk, majd blottoltuk és detektáltuk a fehérjéket. A mosási lépésekhez a választott előhívó oldathoz igazodva TRIS-puffert vagy PBS-puffert használtunk. Az előhíváshoz AP Conjugate Substrate Kitet vagy WesternBright™ ECL Substrate Kitet (Advantra Corporation, USA) használtunk a gyártói utasításoknak megfelelően. Az eredmények detektálására és kvantifikálására a Molecular Image Chemidoc XRS+ rendszert és Image Lab Software 5.2-t (Bio-Rad Laboratories, USA) használtuk.

3. táblázat: Citotoxikus analóggal kezelt OCM3 sejtek SDS-PAGE-Western blot módszerrel való vizsgálatára felhasznált antitestek

Target gén	Alkalmazott hígítás	Antitest kódszám, gyártó
MASPIN	1:100	C-8, sc- 271694, Santa Cruz, USA
HIF-1A	1:200	H-206, sc-10790, Santa Cruz, USA

VEGFA	1:100	A-20; sc-152, Santa Cruz, USA
VEGFB	1:200	MM0008-7B43; sc-101581, Santa Cruz, USA
GAPDH	1:1000	D16H11 XP ^(R)), Cell Signaling Technology, USA
β -aktin	1:1000	I-19, sc-1616, Santa Cruz, USA

Uvealis melanoma szövetminták Tissue microarray (TMA) immunhisztokémiai vizsgálata

Az enukleációt követően a formalin fixált, paraffin blokkokba öntött szövetmintákból TMA-blokkok (2 db) készültek. A TMA paraffin blokkok elkészítéséhez TMA Master készüléket (3DHISTECH, Budapest, Magyarország) használtunk. A számítógép vezérelt automata 52 uvealis melanoma, 12 máj és 2 egészséges anyajegy szövetmintát szúrt be a paraffin blokkba duplikátumokban a beállított blokk térkép alapján. Az elkészült blokkokból 3-4 μ m vastagságú metszetek készültek, melyekkel elvégeztük a deparaffinizálás, etanolos rehidráció, endogén peroxidáz blokkolás (EnVision™ FLEX Peroxidase-Blocking Reagent, DM821, Dako, Dánia), hőindukált epitóp feltárás (Novocastra™ Epitope Retrieval Solution pH9, RE7119, Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) és a blokkolás (2,5% normál kecske vagy nyúl szérum, Millipore Sigma, USA) műveleteket. A mosási lépéseket követően megtörtént a metszetek primer antitesttel való inkubálása 4 °C-os nedves kamrában, egy éjszakán keresztül. Az elsődleges antitesteket és hígításukat a 4. táblázat összegzi. Másodlagos antitestként HRP-kapcsolt IgG (Fab)2 anti-kecske antitestet (Impress™ HRP polymer detection kit, MP7405, Vector Labs, UK) vagy anti-nyúl antitestet EnVision™ FLEX /HRP, DM822,

Dako, Dánia) használtunk. A minták melanin tartalmára tekintettel lilás színű jelet adó előhívót használtunk (VectorVIP DAB+ Chromogen Substrate Kit, SK-4600, Vector® Labs, UK), a háttér festésére pedig metilzöldet (H-3402, Vector® Labs, UK) alkalmaztunk. A placenta és a vese pozitív kontroll minták festése külön metszeten történt. Az eredmények digitalizálása a Panoramic Scan készülékkel történt, a kiértékeléskor Panoramic Viewer szoftvert (3DHISTECH Ltd., Magyarország) használtunk. Az eredmények kiértékelésében kettő, egymástól független szakértő vett részt, a mintákhoz tartozó betegek kórképét, betegségük lefolyását nem ismerve. A minták a detektálható jel intenzitásától és a pozitív sejtek arányától függően kerültek besorolásra az alábbi skála szerint: 0 (negatív), 1⁺ (1–25%), 2⁺ (26–50%), 3⁺ (51–75%) és 4⁺ (76–100%). A minták melanin tartalom szerinti besorolására az alábbi skálát használtuk: enyhe expresszió (1⁺), erős expresszió (2⁺) és nagyon erős expresszió (3⁺).

**4. táblázat: Humán uvealis melanoma szövetek IHC-val való vizsgálatára
felhasznált antitestek**

Target gén	Alkalmazott hígítás	Antitest kódszám, gyártó
FZD6	1:100	E-19; sc-32148, Santa Cruz, USA
HIF-1A (csak immunhisztokémiára)	1:3000	Pab50130, Covalab, Villeurbanne, Franciaország
VEGFA	1:100	A-20; sc-152, Santa Cruz, USA

4.4. A húgyhólyag daganatokat vizsgáló kísérleteinkhez alkalmazott metodikák

4.4.1. RNS izolálás és RT-PCR

A 24 fagyasztott húgyhólyag daganatból, a normál hipofízis szövetmintákból, valamint a 3 sejtvonalból totál RNS izolálást végeztünk a Nucleospin Total RNA and Protein Isolation Kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) felhasználásával a gyártói utasítások szerint. A reverz transzkripciót mintánként 150-200 ng RNS felhasználásával oligo (dT) 15 primer és MMLV reverz transzkriptáz tartalmú közegben (Promega Corporation, Madison, WI, USA) végeztük a gyártói utasítások szerint. A célgéneket Invitrogen, Birmingham, UK kittel szaporítottuk fel az alábbi lépésekből álló cikluson keresztül: 95 °C - 45 mp, 60 °C - 30 mp és 72 °C - 1,5 perc 45 db ismétléssel, majd záró ciklusként 10 perc 72 °C következett. A PCR termékeket gélelektroforézissel 1,5%-os GelRed (Biotinum, USA) tartalmú agaróz gélen szeparáltuk, majd UV fény alatt detektáltuk.

Az RT-PCR vizsgálatokat Bio-Rad C1000™ Thermal Cycler PCR készüléken (BIO-RAD, USA) végeztük az 5. táblázatba foglalt primerpárokkal. A primerpárokat a Primer3web

szoftverrel terveztük meg és a Sigma-Aldrich Corporation (USA) gyártotta őket (5. táblázat). Háztartási géneként a β -aktint használtuk, a NTC (no template control) minták a reakcióközeg tisztaságának ellenőrzésére szolgáltak. A PCR termékeket gélelektroforézissel 1,5%-os GelRed (Biotinum, USA) tartalmú agaróz gélen szeparáltuk, majd UV fény alatt detektáltuk. Az RNS izolálásban és az RT-PCR analízisekben Szabó Zsuzsanna és Szabó Erzsébet, valamint a doktorjelölt, Molnár-Fodor Klára, mint társszerző vett részt (a munka 70%-ában).

5. táblázat: Húgyhólyag szövetminták és sejtvonalak RT-PCR vizsgálatára felhasznált primerek és szekvenciájuk

Célgén	Forward primer	Reverse primer
LHRH-R-1	5'-GAC CTT GTC TGG AAA GAT CC-3'	5'-CAG GCT GAT CAC CAC CAT CA-3'
LHRH ligand	5'-CTA CTG ACT TGG TGC GTG GA-3'	5'-CTG CCC AGT TTC CTC TTC AA-3'
β -aktin	5'-GGC ATC CTC ACC CTG AAG TA-3'	5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCAA-3'

4.4.2. Húgyhólyag szövetminták immunhisztokémiai vizsgálata

A műtéti eltávolítást követően 12 húgyhólyag karcinóma betegminta, valamint 3 normál hólyagminta formalin fixált, paraffin blokkokba öntött 2-3 μ m-es metszeteivel dolgoztunk tovább. A tumorminták mindegyike primer daganat volt, egyik beteg sem részesült a műtétet megelőzően kemoterápiás kezelésben. A metszeteken elvégeztük a deparaffinizálást, az etanolos rehidrációt és a hőindukált epitóp feltárását 0,1 M-os citrát pufferben (pH 6.0; Target Retrieval Solution, Dako, Glostrup, Dánia). A biotin-mentes immunfestéshez a 'Bond-TM Automated Immune-Stainer'-t (Leica Microsystems, Newcastle, Egyesült Királyság) használtunk. A blokkolás és mosási lépéseket követően megtörtént a metszetek primer antitesttel való inkubálása, melyhez 1:20-ban hígításban inkubáltuk a metszeteken az LHRH-R-I specifikus antitestet (mAB; NCL-GnRHR A9E4; Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, Egyesült Királyság). A specifikus kötődések vizualizálására 3,3'-diamino-benzidin (DAB)

festést alkalmaztunk. A metszetek háttérfestésére Mayer's hematoxilín oldatot alkalmaztunk. Az eredményeket 12 Mpixel digitális kamerával felszerelt Leica-DM2500 mikroszkóppal rögzítettük (Leica-Microsystems, Newcastle, Egyesült Királyság). Az eredmények kiértékelésében kettő, egymástól független szakértő vett részt, a mintákhoz tartozó betegek kórképét, betegségük lefolyását nem ismerve. A minták a detektálható jel intenzitásától és a pozitív sejtek arányától függően kerültek besorolásra az alábbi skála szerint: 0 (negatív), 1+ gyenge (1–25%), 2+ mérsékelt (26–50%), 3+ intenzív (51–75%) és 4+ erős (76–100%). Az immunhisztokémiai festések kivitelezése, digitalizálása és szakértői kiértékelése Prof. Dr. Dezső Balázs felügyelete, irányítása mellett történtek.

4.4.3. Húgyhógyag szövetminták membránpreparálása és ligandkötési assay

A receptor LHRH ligandkötési képességének vizsgálatához 12 szövetminta membránfrakciójának izolálását a korábbiakban alkalmazott és publikált módszerrel végeztük el [138, 139]. Ligandkötési vizsgálatunkhoz a radioaktívan jódozott LHRH analógot ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]\text{LHRH}$) chloramine-T módszerrel állítottuk elő és reverz fázisú HPLC-vel (High performance/pressure liquid chromatography) tisztítottuk [138, 140]. Az ily módon elkészült radioligand korábbi tanulmányok eredményei alapján nagy hatékonysággal képes kötődni az LHRH-R-hoz számos vizsgált daganatokon [3, 138, 140, 141]. A vizsgálat során direkt leszorítási ún. ligand kompetíciós assayt végeztünk a $[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]\text{LHRH}$ -val és a jelöletlen LHRH liganddal, ily módon mértük a membránfrakciókban lévő aktív LHRH-R-ok ligandkötési tulajdonságait. Továbbá, elvégeztük a leszorítós ligand kompetíciós assay-t a nem- radioaktív LHRH ligandot helyettesítve más nem- radioaktív LHRH analógokkal is, mint az LHRH agonista analóg $[\text{D-Lys}^6]\text{LHRH}$ -val, ennek citotoxikus DOX-kapcsolt formájával az AN-152-vel ($[\text{D-Lys}^6]\text{LHRH-DOX}$), az LHRH antagonistá analóg Cetrorelix-szel ($[\text{Ac-D-Nal}(2)^1, \text{DPhe}(4\text{Cl})^2, \text{D-Pal}(3)^3, \text{D-Cit}^6, \text{D-Ala}^{10}]\text{LHRH}$), valamint nem LHRH-R specifikus jelöletlen peptidekkel (szomatosztatin, human hGH, GHRH, VIP, epidermális növekedési

faktor). Vizsgálatunk célja volt megállapítani, hogy a terápiás felhasználású LHRH agonisták és antagonisták, valamint a célzott terápiás AN-152 (AEZS-108) molekula milyen receptor kötési affinitással (IC_{50}) rendelkezik a TCC daganatokból izolált membránpreparátumokon. Minden mérést duplikátumokban végeztünk el minden betegminta esetében.

A vizsgálatok során az alábbi protokollt alkalmaztuk: a 150 μ l végtérfogatú, 60-150 μ g fehérjét tartalmazó membrán homogenizátumot szövetmintánként duplikátumokban inkubáltuk 70-90,000 cpm (counts per minute (percenkénti beütésszám)) [125 I][D-Trp⁶]LHRH liganddal. Ezt követően, a radioaktív ligandot leszorítottuk a kötési helyekről az egyre növekvő koncentrációban (10^{-12} - 10^{-6} M) alkalmazott jelöletlen LHRH liganddal. Az inkubációt követően 125 μ l-t pipettáztunk a szuszpenzióból 1 ml jéghideg, 1,5%-os BSA tartalmú kötőpuffer felszínére szilikonnal bevont polipropilén csőbe, melyet a mintával 3 percig, 12,000 g, 4 °C-on centrifugáltunk. A centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk, a csövek alját levágtuk a pelletekkel együtt és gamma-számláló készülékkel megmértük a pelletek radioaktív ligand tartalmát. A protein koncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg a Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, USA) felhasználásával. A mért radioaktivitásból a minták receptor kötési affinitását és koncentrációját az IC_{50} érték, a disszociációs konstans (K_d) és a receptor maximális kötő kapacitása (B_{max}) értékek felhasználásával, a LIGAND-PC (Munson and Rodbard) program használatával határoztuk meg [19, 138]. A kísérlet témavezetőm, Prof. Dr. Halmos Gábor irányítása alatt került kivitelezésre.

4.4.4. Húgyhólyag daganat sejtvonalak LRHR-R expressziójának SDS-PAGE-Western blot analízise

A korábbi RNS szintű vizsgálatokban használt RT-112, UMUC3 és TCCSUP hólyagkarcinóma sejtvonalak LHRH-R expressziójának fehérje szintű megerősítésére SDS-PAGE-Western blot analízist alkalmaztunk. Első lépésben, a tenyésztett sejteket M-PER protein lízis pufferben lizáltuk (Thermo Fisher Scientific, USA), majd proteáz inhibitor koktél

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) hozzáadásával meggátoltuk a későbbi protein degradációt. A protein koncentrációt BCA reagens kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) végeztük a gyártói utasításoknak megfelelően. Minden mintát 4x-es Laemmli-pufferben oldottunk be. Mintaelőkészítésként, egységesen minden sejtvonal fehérjemintából 40 µg fehérjét 8 percig denaturáltunk 90 °C-os vízfürdőn. A fehérje mintákat 10%-os SDS tartalmú PAGE-gélen szeparáltuk, majd PVDF membránra (Millipore, Burlington, MA, USA). transzferáltuk. Protein markerként Precision Plus Protein Kaleidoscope Standardot (BioRad Laboratories, Irvine, CA, USA) használtunk. Az 5%-os tejpor oldattal történő blokkolás után 4 °C-os, overnight inkubációt indítottunk az alábbi primer antitestekkel: anti-LHRH-R, 1:200 hígításban (sc-13944 rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA), anti-GAPDH, 1:1000 hígításban (D16H11 rabbit monoclonal; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Másnap, a háromszori TBS-Tween puffer mosásokat követően a HRP enzimmel kapcsolt anti-mouse IgG másodlagos antitesttel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1:1000 hígításban inkubáltuk a membránokat 2 órán keresztül. Előhívó oldatként WesternBright™ ECL Substrate Kitet (Advantra Corporation, USA) használtunk a gyártói utasításoknak megfelelően. Az eredmények detektálására és kvantifikálására a Molecular Image Chemidoc XRS+ rendszert és Image Lab Software 5.2-t (Bio-Rad Laboratories, USA) használtuk. A target gén fehérje szintű expresszióját minden minta esetében a háztartási gén (GAPDH) fehérje expressziójának intenzitása alapján normalizáltuk.

4.5. Statisztikai analízis

Az ábrázolt értékek minden esetben az átlag +/- standard hibát (SEM) mutatják. Az MTT- assay-k, az RT- qPCR analízisek és a Western blot eredmények statisztikai kiértékelését Prism 5 szoftverrel (GraphPad Software, Inc., USA) és IBM SPSS Statistics programmal (IBM Corp. Released 2014. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.) végeztük Student t-próba és egy-utas ANOVA tesztek alkalmazásával. A szignifikancia

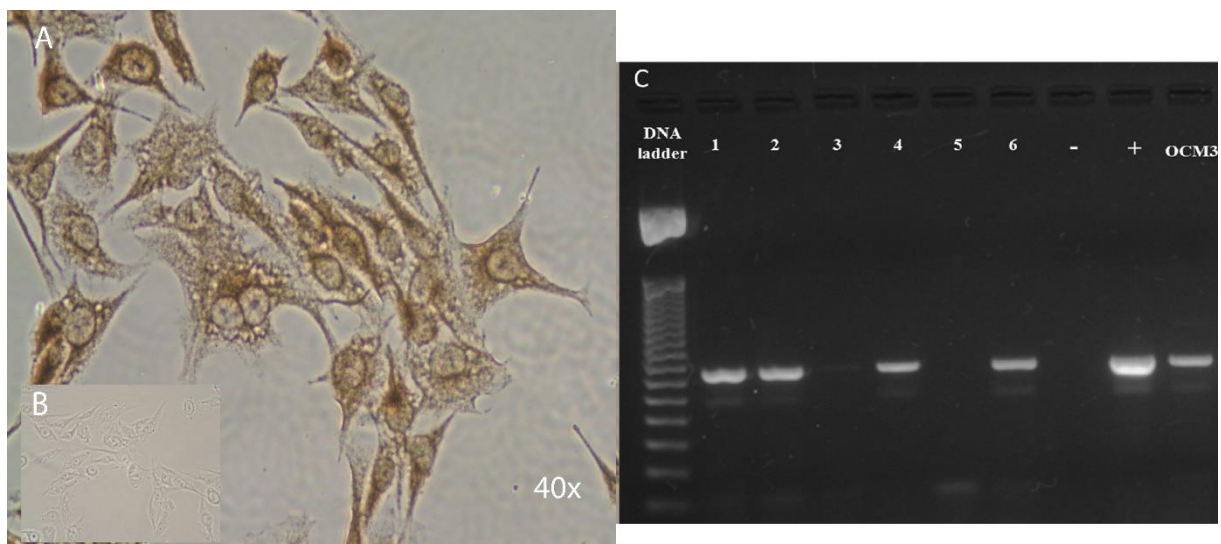
szintek minden vizsgálat esetében az alábbiak voltak: p érték * $< 0,05$: statisztikailag szignifikáns, p érték ** $< 0,01$: erősen szignifikáns, p érték *** $< 0,005$: nagyon erőteljesen szignifikáns. Az RT-qPCR array eredményeit a Global Pattern Recognition algoritmussal (Bar Harbor Bio Technology Inc.'s, USA) normalizáltuk és 2^{40-Ct} módszerrel kvantifikáltuk. Az immunhisztokémiai festések eredményeit a betegek túlélési adataival és egyéb klinikopatológiai jellemzőivel IBM SPSS Statistics programmal vizsgáltuk, Spearman-féle korreláció és Kaplan-Meier túlélés analízis alkalmazásával. A húgyhólyagminták LRHR-R expressziója és a tumorstátusz/grádus közötti korreláció analízist Excel táblázatkezelő programban elvégzett Pearson analízissel készítettük.

5. Eredmények

5.1. Az uvealis melanoma és TCC típusú húgyhólyag daganatok LHRH-R és LHRH ligand expressziójának, a receptor ligandkötő képességének vizsgálata RNS és fehérje szinten

5.1.1. Az I-es típusú LHRH-R expressziójának vizsgálata humán uvealis melanoma szövetmintákon és OCM3 sejtvonalon

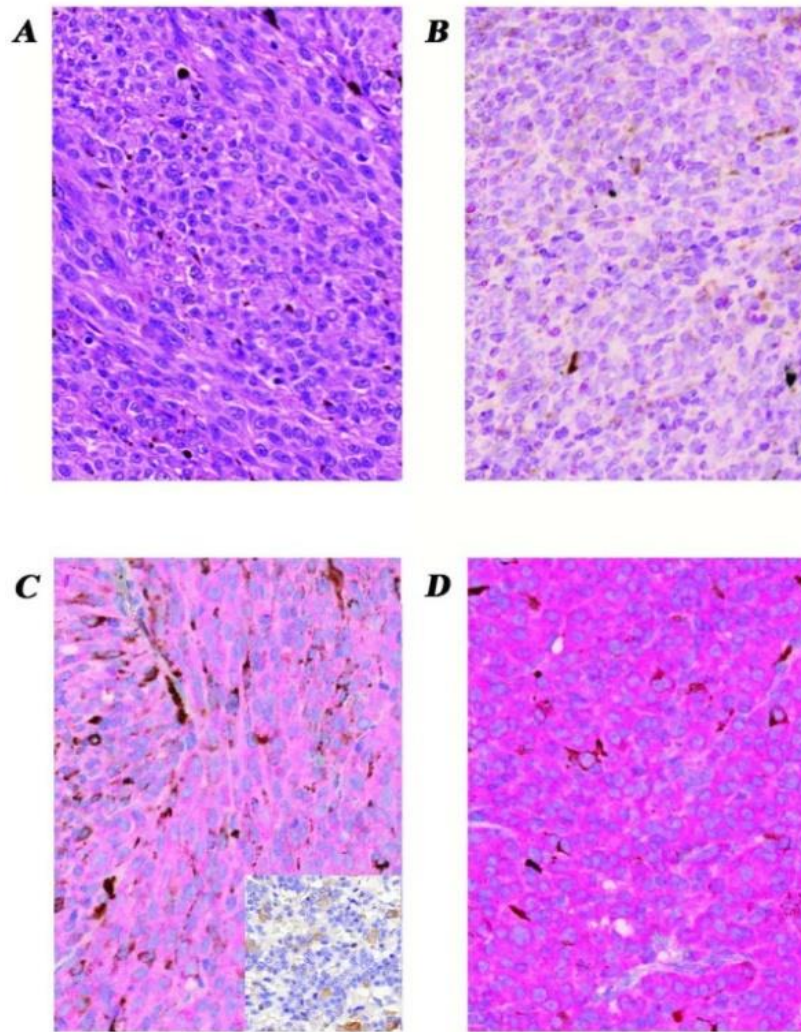
Munkánk során 6 darab enukleációval eltávolított, fagyasztott uvealis melanoma szövetminta, illetve az *in vitro* tenyésztett OCM3 sejtek I-es típusú LHRH-R expresszióját vizsgáltuk. Pozitív kontrollként humán hipofízist használtunk. A receptor kifejeződését mRNS szinten és fehérje szinten is igazoltuk. Az RT-PCR vizsgálatok során a 319 bp méretű specifikus LHRH-R PCR termék felszaporodását 4 szövetmintánál és az OCM3 sejtvonalnál detektáltuk (7. ábra). A receptor fehérje szintű kifejeződését az OCM3 sejtek esetében immuncitokémiával vizsgáltuk. Az eredmények mikroszkópikus vizsgálata során a barna DAB-immunperoxidáz festés egyértelműen jelzi az LHRH-R membrán és citoszólikus és részleges sejtmagi lokalizációját (7. ábra).



7. ábra: Az OCM3 sejtvonal és uveális melanoma szövetminták LHRH-R expressziójának vizsgálata.

(A) Az I-es típusú LHRH-R DAB-immunperoxidáz festése OCM3 sejtekben (40x-es nagyítás). (B) Az inzert ábra a negatív kontroll OCM3 sejteket mutatja, melyek primer antitesttel nem kerültek inkubálásra. (C) Humán szövetminták és OCM3 sejtek I-es típusú LHRH-R expressziójának vizsgálata RT-PCR-t követő agaróz gélelektroforézissel. A primer specifikus termék 319 bp méretű, szövetminták sorszám: 1-6., DNS létra: 50 bp- os, '+': hipofízis pozitív kontroll, '-': NTC negatív kontroll.

A szövetminták fehérje szintű LHRH-R expresszióját Oláh Gábor és Treszl Andrea Molnár-Fodor Klára jelölt közösen vizsgálta immunhisztokémiai módszerrel, melynek eredményeit Oláh Gábor PhD védése részét képező publikációjában közölte le (8. ábra). Eredményei megerősítették a korábbi mRNS szintű vizsgálatokat a szövetminták receptor expressziója tekintetében.

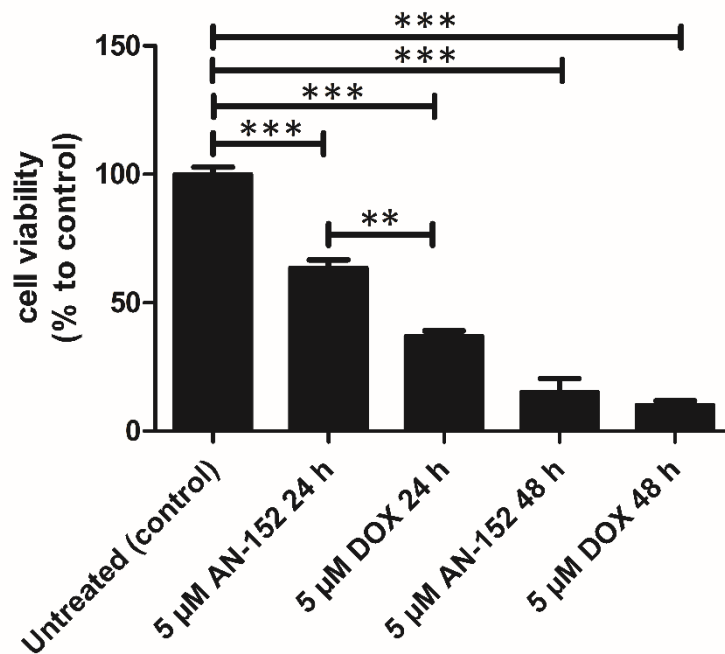


8. ábra: Az LHRH-R fehérje szintű expressziójának vizsgálata immunperoxidáz festéssel reprezentatív uveális melanoma szövetmintákon.

(A) Kevert tumorsejtes típusú szövet hematoxilin-eozin festése. (B) mRNS szinten LHRH-R negatív minta negatív IHC festése (C) Közepes intenzitású IHC festődést mutató tumorminta, az inzerit kép a negatív kontroll, mely esetében nem történt inkubáció primer antitesttel. (D) Intenzív IHC festődést mutató tumorminta. Nagyítás: 40x, magfestés: hematoxilin (Treszl A, Steiber Z, Schally AV, Block NL, Dezsó B, Olah G, Rozsa B, Fodor K, Buglyó A, Gardi J et al: Substantial expression of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor type I in human uveal melanoma. *Oncotarget* 2013, 4(10):1721-1728. [19]).

5.1.2. Az 5 μ M-os AN-152 (AEZS-108) és az 5 μ M-os doxorubicin *in vitro* kezelések citotoxicitásának vizsgálata OCM3 sejteken

Vizsgálatunk célja volt megállapítani, hogy a citotoxikus, doxorubicin tartalmú AN-152 (AEZS-108) és a szabad doxorubicin 24 és 48 órás *in vitro* kezelések során milyen mértékben csökkenti az OCM3 sejtek életképességét, illetve a két terápiás szer hatása mennyire összevethető. A kezelések után elvégzett MTS assay eredményei szerint a 24 órás kezelés során az AN-152 36,3%-al, míg a doxorubicin 62,9%-al csökkentette az élő sejtek számát (9. ábra). A 48 órás kezelést követően már nem tapasztaltunk ilyen számottevő különbséget, így az AN-152 84,7%-al, míg a doxorubicin 89,7%-al csökkentette az élő sejtek számát (9. ábra). Eredményeinkből látható, hogy mivel az AN-152 receptor mediált endocitózissal jut be az OCM3 sejtekbe, így adott idő alatt kisebb sejtpopulációra fejt ki toxikus hatást mint a sejtmembránon átdiffundáló szabad doxorubicin. 48 óra elteltével azonban a két szer toxicitása közötti különbségek mérséklődnek. Feltételezhetően ekkorra telítődtek az LHRH-R-ok és a ligandól lehasadó doxorubicinnek köszönhetően mutatott hasonló eredményeket az életképességi vizsgálat.



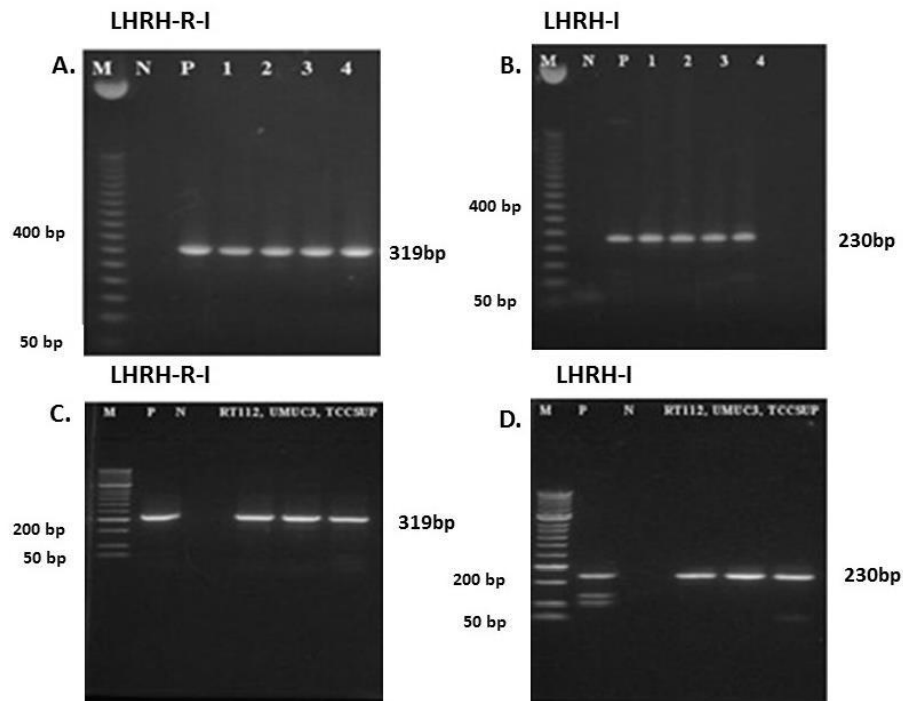
9. ábra: Az 5 μM-os AN-152 (AEZS-108) és az 5 μM-os doxorubicin kezelések citotoxicitásának vizsgálata MTS assay-vel 24 és 48 órás *in vitro* kezelések során OCM3 sejteken.

Átlag ± SEM, egy utas ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns ha **: $p < 0,01$ és ***: $p < 0,005$.

5.1.3. Az LHRH-R és LHRH ligand mRNS szintű expressziójának vizsgálata húgyhólyag daganat szövetmintákon és sejtvonalakon

Munkánk során 24 műtéileg eltávolított, hámeredetű átmeneti-sejtes karcinóma (TCC) típusú húgyhólyag daganat szövetmintán, illetve az *in vitro* tenyésztett RT-112, UMUC3, TCCSUP sejtvonalakon vizsgáltuk az I-es típusú LHRH-R és az LHRH ligand expresszióját. Pozitív kontrollként humán hipofízist használtunk. A vizsgálatok során az LHRH-R-t reprezentáló 319 bp méretű PCR termék felszaporodását a minták 83%-ánál (20/24 minta), valamint mindhárom sejtvonal esetében igazoltuk (10. ábra). A 230 bp méretű LHRH ligand jelenlétét a szövetminták 79%-ában (19/24 minta) és mindhárom sejtvonal esetében sikerült

kimutatnunk (10. ábra). Eredményeinket a szövetminták klinikopatológiai paramétereivel kiegészítve a 6. táblázat foglalja össze.



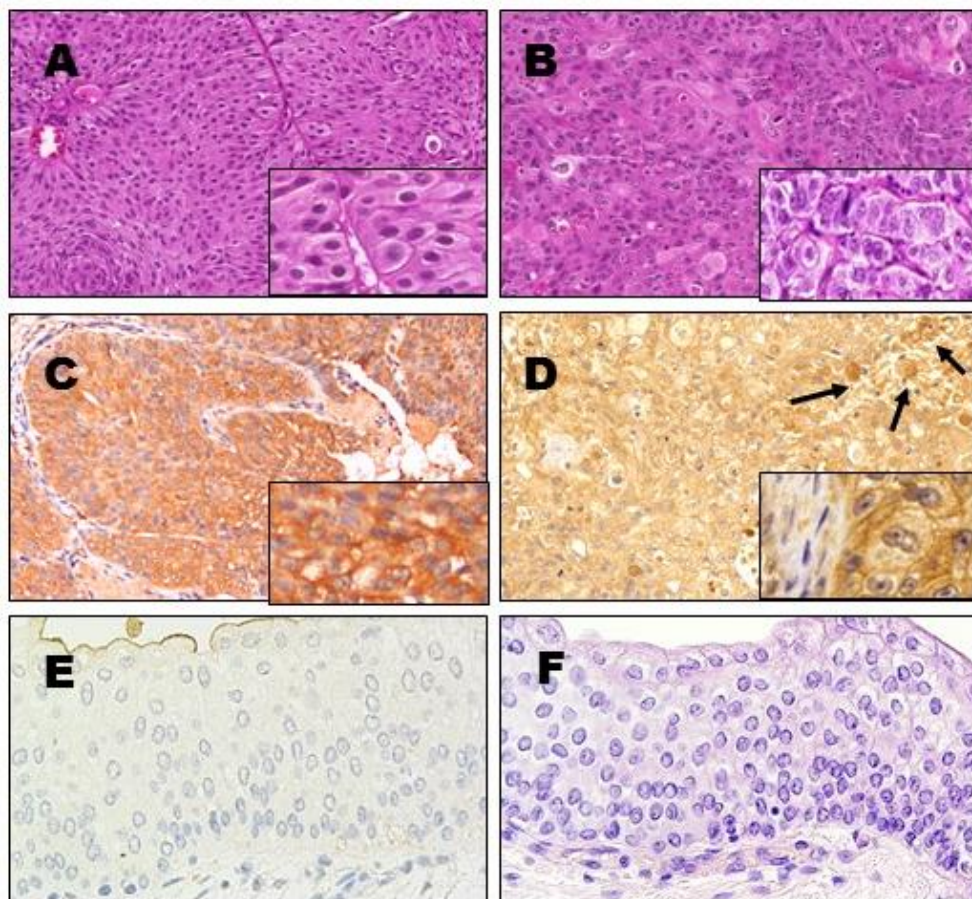
10. ábra: Húgyhólyag szövetminták és kísérleti hólyag daganat sejtvonalak LHRH-R és LHRH ligand mRNS szintű expressziójának vizsgálata RT-PCR-agaróz gélelektroforézissel.

(A) Szövetminták LHRH-R expressziójának gélfotója. M: DNS marker, N: no template control, P: pozitív kontroll hipofízis, 1-4: TCC húgyhólyag szövetminták. (B) Szövetminták LHRH ligand expressziójának gélfotója. M: DNS marker, N: negatív kontroll, P: pozitív kontroll hipofízis, 1-4: TCC húgyhólyag szövetminták. (C) Sejtvonalak LHRH-R expressziójának gélfotója. M: DNS marker, N: negatív kontroll, P: pozitív kontroll hipofízis, RT-112, UMUC3, TCCSUP: húgyhólyag sejtvonalak. (D) Sejtvonalak LHRH ligand expressziójának gélfotója. M: DNS marker, N: negatív kontroll, P: pozitív kontroll hipofízis, RT-112, UMUC3, TCCSUP: húgyhólyag sejtvonalak.

5.1.4. Húgyhólyag karcinóma szövetminták LHRH-R expressziójának immunhisztokémiai analízise és statisztikai kiértékelése

A műtéti eltávolítást követően 12 húgyhólyag karcinómás betegmintán, valamint 3 normál hólyagmintán végeztük el az LHRH-R fehérje expressziójának vizsgálatát IHC

módszerrel. A minták mindegyikében sikerült a receptor fehérje szintű jelenlétét igazolni, azonban különböző intenzitást tapasztaltunk a receptor festődésekor (11. ábra). A minták többnyire 2⁺-os festődési intenzitást mutattak, a receptort kimutató DAB festéssel vizualizált barna színváltozások jellemzően a citoplazmában és a membránban voltak megfigyelhetőek. Az eredmények vizuális kiértékelésekor arra a következtetésre jutottunk, hogy az LHRH-R expressziója a tumor grádusának növekedésével csökken, tehát jóval magasabb expressziót mutattak az alacsonyabb grádusba sorolt tumorminták, mint az előrehaladottabb állapotú (3-4. grádus) tumorok. A megfigyelésünket Pearson analízissel is alátámasztottuk, mely szerint az LHRH-R expressziója negatív korrelációban állt a vizsgált szövetminták patológiai grádusával ($r = -0,91$, $n = 12$). A betegek kora nem állt semmilyen összefüggésben a receptor státusszal. A megvizsgált 3 egészséges húgyhólyag szövetminta negatívnak bizonyult LHRH-R expresszió tekintetében (11. ábra).



11. ábra: LHRH-R-ok protein szintű kifejeződésének vizsgálata IHC-val húgyhólyagtumor szövetminták és normál hólyagminták esetében.

(A- B) Reprezentatív fotók a néhány tumorminta hematoxilin-eozin festéséről. A- papilláris TCC, G1 besorolás, B- invazív TCC, G3 besorolás. (C-D) Reprezentatív fotók tumorminták LHRH receptor expressziójának intenzitásáról, C- papilláris TCC, G1 besorolás, 3⁺ festődés citoplazma és membrán szinten, D- alacsony kockázatú TCC (státusz 1) irreguláris receptor expresszióval (többnyire 1⁺ de foltokban néhány 2⁺ sejt), Az inzerterek a festődés sejten belüli lokalizációját és az irreguláris festődést szemléltetik. (E- F) Normál húgyhólyag nyálkahártya LHRH-R negativitását szemléltető reprezentatív fotók, E- nyomokban pozitívítást fedezhető fel apikális síkon, mely valószínűleg háttérfestődés eredménye, F- ugyanazon normál húgyhólyag nyálkahártya hematoxilin-eozin festéssel. A képek nagyítása: A-D: 200x, inzerterek és E- F: 400x.

6. táblázat: Humán húgyhólyag daganatos betegek klinikopatológiai paramétereit, valamint a daganatminták LHRH-R és LHRH ligand expressziójának eredményeit

Sorszám	Kor/neme	Klinikopatológiai paraméterek	Grádus	Státusz	LHRH-I	LHRH-R-I	IHC festődés
1	43/nő	transitional cell carcinoma	G3	pT2	-	+	1+
2	69/férfi	transitional cell carcinoma	G1-2	pT1	+	-	N/A
3	56/férfi	transitional cell carcinoma	G3	pT3	+	+	1+
4	63/nő	transitional cell carcinoma	G1	N/A	+	-	N/A
5	89/nő	transitional cell carcinoma	G3	pT2	+	+	1+
6	51/férfi	transitional cell carcinoma	G1-2	pT1	+	+	2+
7	66/férfi	transitional cell carcinoma	G2	pT2, pNx, pMx	+	+	2+
8	67/férfi	transitional cell carcinoma	G3	pT3, pNx, pMx	+	+	1+
9	69/férfi	transitional cell carcinoma	G1	pT1, pNx, pMx	+	+	2+
10	50/férfi	transitional cell carcinoma	G1	pT1, pNx, pMx	+	+	N/A
11	68/férfi	transitional cell carcinoma	G1	pT1, pNx, pMx	+	+	N/A
12	42/nő	transitional cell carcinoma	G2-3	N/A	-	+	N/A
13	79/férfi	transitional cell carcinoma	G1-2	pT1	+	+	2+
14	84/nő	transitional cell carcinoma	G1	N/A	+	+	N/A

15	63/férfi	transitional cell carcinoma	G2	N/A	+	+	2+
16	70/nő	transitional cell carcinoma	G3	pT2	+	-	N/A
17	63/nő	transitional cell carcinoma	G2	pT1	-	+	N/A
18	51/nő	transitional cell carcinoma	G1	N/A	-	+	3+
19	71/nő	transitional cell carcinoma	G3	pT2	+	+	1+
20	86/férfi	transitional cell carcinoma	G2	pT1	+	+	N/A
21	57/férfi	transitional cell carcinoma	G1	N/A	+	+	N/A
22	50/férfi	transitional cell carcinoma	G3	pT3	-	+	1+
23	84/férfi	transitional cell carcinoma	G2	pT1	+	-	N/A
24	74/férfi	transitional cell carcinoma	G3	pT2	+	+	N/A

pT: felszíni, neminvazív papilláris karcinóma; **pT1**: korai invazív, **T2, T3**: invazív; **pT3**: mély invázió a környező szövetekbe. **pNx**: a környező nyirokcsomók nem kerültek kiértékelésre; **pMx**: metasztázis nem került kiértékelésre.

5.1.5. Húgyhólyag tumorminták LHRH ligandkötési assay vizsgálatának eredményei

Vizsgálatainkban 12 szövetminta LHRH membrán receptorának ligand kötési értékeit vizsgáltuk radioaktív [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH felhasználásával. A ligandkompetíciós assay eredménye alapján 10 betegmintából izolált LHRH-R volt képes *in vitro* környezetben a nagy affinitással kötődő radioligand megkötésére. A mérések alapján a 10 szövetminta átlagos disszociációs konstansa (K_d) 4,98 nM (3,61-6,85 nM tartományban) volt, a maximális kötési kapacitásuk (B_{max}) 473,09 fmol/mg membrán protein (255,0-721,4 fmol/mg protein tartományban) értéket mutatott (7. táblázat). A radioligand a mérések során specifikusan és reverzibilisen bekötődött a tumorszövetekből izolált membrán frakcióban lévő LHRH

receptorokhoz. A receptoriális kötődés a mérések alapján idő- és hőmérséklet függő, valamint egyenesen arányos a minta fehérje koncentrációjával.

7. táblázat: Húgyhólyag karcinóma szövetminták LHRH receptor mRNS expressziója és membránpreparátumaik radioaktív LHRH analóg kötési jellemzői

Sorszám	LHRH-R pozitivitás mRNS szinten	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg (protein))
3	+	5,76	274,5
4	-	-	-
6	+	6,85	273,1
7	+	4,94	255,0
8	+	6,26	685,2
10	+	5,02	721,4
12	+	3,61	704,5
14	+	4,92	578,9
16	-	-	-
18	+	4,38	445,3
19	+	3,83	421,6
22	+	4,31	371,4

K_d : disszociációs konstans; B_{max} : maximális kötési kapacitás; az értékek a duplikában elvégzett mérések eredményeit mutatják.

Méréseink során elvégeztük a leszorításos ligand kompetíciós assay-t a nem radioaktív LHRH ligandot helyettesítve más nem radioaktív LHRH analógokkal is, mint az LHRH agonista analóg [D-Lys⁶]LHRH-val, ennek citotoxinnal kapcsolt formájával az AN-152-vel ([D-Lys⁶]LHRH-DOX), az LHRH antagonistá analóg Cetrorelix-szel ([Ac-D-Nal(2)¹,DPhe(4Cl)²,D-Pal(3)³,D-Cit⁶,D-Ala¹⁰]LHRH), valamint nem LHRH-R specifikus jelöletlen peptidekkel (szomatosztatin, human hGH, GHRH, VIP, epidermális növekedési faktor). Eredményeinkből elmondható, hogy mindegyik nem radioaktív LHRH vegyület képes

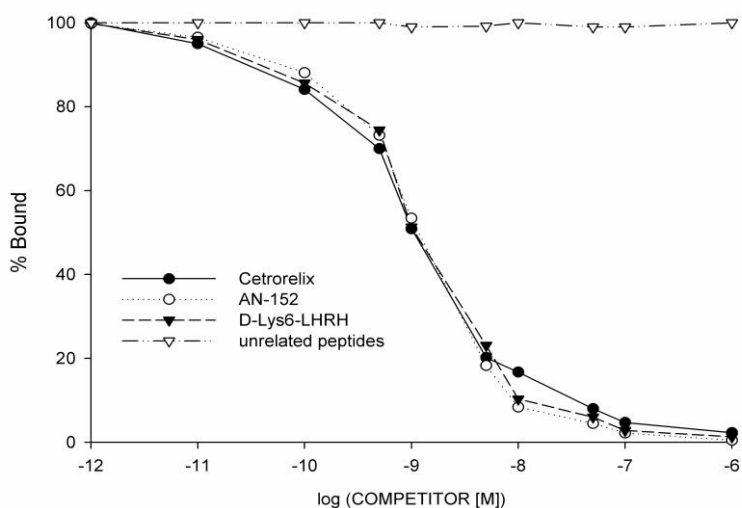
volt az LHRH-R-hoz kötődni nanomolos koncentrációban (8. táblázat, 12. ábra). A jövőbeli potenciálisan alkalmazható új terápiák szempontjából biztató eredmény, hogy az AN-152 affinitása csak kis mértékben tért el a szabad „carrier-ligandjának”, a [D-Lys⁶]LHRH kötődési affinitásától (8. táblázat). Egyúttal *in vitro* igazoltuk, hogy a [D-Lys⁶]LHRH carrier-ligand alapú citotoxikus LHRH analóg AN-152 (AEZS-108) célzott terápiás molekula ígéretes lehet TCC típusú daganatok klinikai terápiájában is.

8. táblázat: Nem radioaktív LHRH analógok receptor kötési affinitásai (IC₅₀ érték) humán TCC húgyhólyagkarcinóma membrán preparátumokon végzett ligandkötési assay alapján.

nem radioaktív LHRH analógok	IC ₅₀ értékek (nM)
[D-Lys ⁶]LHRH	0,98
Cetrorelix	0,86
AN-152	1,39

Az IC₅₀ értékek a felhasznált LIGAND-PC program által rajzolt görbéről kerültek leolvasásra.

Az IC₅₀ érték azt a koncentrációt jelöli, amely szükséges a radioaktív ligand receptorokról történő 50%-os leszorításához. A kísérleteket duplikátumokban végeztük el mind a 10 betegmintával.

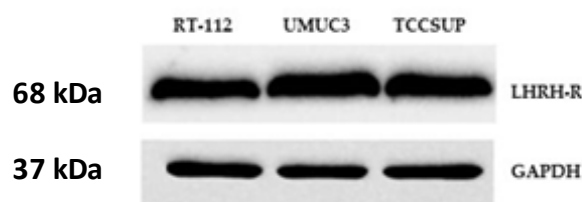


12. ábra: Reprezentatív diagram a radioaktív jelölésű [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH-val, illetve a nem radioaktív LHRH antagonista analóg Cetorelix-szel (●), a citotoxikus LHRH analóg AN-152-vel (○), a carrier agonista analóg [D-Lys⁶]LHRH-val (▼), valamint nem LHRH-R specifikus egyéb jelöletlen peptidekkel (Δ) (szomatosztatin, human hGH, GHRH, VIP, epidermális növekedési faktor) végzett ligand kompetíciós assay eredményéről.

A nem radioaktív peptidek növekvő koncentrációja logaritmikus ábrázolással személtetett az (x) tengelyen, míg az (y) tengely a bekötődött ligandok mennyiségét adja meg %-os értékben.

5.1.6. Húgyhólyag karcinóma sejtvonalak LHRH-R expressziójának vizsgálata fehérje szinten SDS-PAGE-Western blottal

Vizsgálataink során sikerült igazolnunk az RT-112, UMUC3 és a TCCSUP sejtvonalak LHRH-R fehérje szintű megjelenését is. A fehérje szintű expresszió összhangban áll a korábban igazolt mRNS szintű receptor expresszióval.



13. ábra: Az LHRH-R expressziójának vizsgálata fehérje szinten SDS- PAGE-Western blottal RT-112, UMUC3 és a TCCSUP sejtvonalakon

Az LHRH-R 68 kDa-nál detektálható, háztartási génként GAPDH-t használtunk (37kDa).

5.2. Az AEZS-108 és DOX tartalmú *in vitro* kezelések hatása az angiogenezisben és a metasztázis képzésben részt vevő gének expressziójára uvealis melanoma sejtvonalon

5.2.1. Az 5 μ M-os AEZS-108 (AN-152) kezelés és 5 μ M-os DOX kezelés hatása az angiogenezisben és a metasztázisban részt vevő gének expressziójára OCM3 sejteken

Kísérleteinkben 94, az angiogenezisben részt vevő gén kifejeződését vizsgáltuk a kezeletlen és az 5 μ M AEZS-108-cal kezelt OCM3 sejteken RT-qPCR-array-vel. A kvantitatív RT-PCR array eredményei szerint a kontroll OCM3 mintákhoz képest az AEZS-108-cal kezelt mintákban 5 gén expressziójában szignifikáns emelkedést, 7 gén expressziójában pedig szignifikáns csökkenést tapasztaltunk ($p < 0,05$) (9-10. táblázat). A legjelentősebb változást az upregulált gének közül a SERPINB5/MASPIN tumor szupresszor esetében (203,19-szeres expresszió növekedés), míg a downregulált gének közül a daganat progressziójában központi szerepű HIF-1A gén esetében (8,67-szeres expresszió csökkenés) tapasztaltuk.

9. táblázat: Az 5 μ M-os AEZS-108 kezelés hatására szignifikánsan fokozódott expressziójú (upregulált) gének OCM3 sejtekben.

Az eredményeket a Global Pattern Recognition algoritmussal (Bar Harbor Bio Technology Inc.'s, USA) normalizáltuk és 2^{40-Ct} módszerrel kvantifikáltuk.

Gén neve	Upreguláció (kezelt/kontroll)	p-érték
<i>MASPIN (SERPINB5)</i>	+203,19	0,0021
<i>SERPINE1 (PAI1)</i>	+52,59	0,0109
<i>CXCR4</i>	+15,45	0,0052
<i>VEGFA</i>	+3,48	0,0005
<i>MAPK7</i>	+2,27	0,0354

10. táblázat: Az 5 μ M-os AEZS-108 kezelés hatására szignifikánsan csökkent expressziójú (downregulált) gének OCM3 sejtekben.

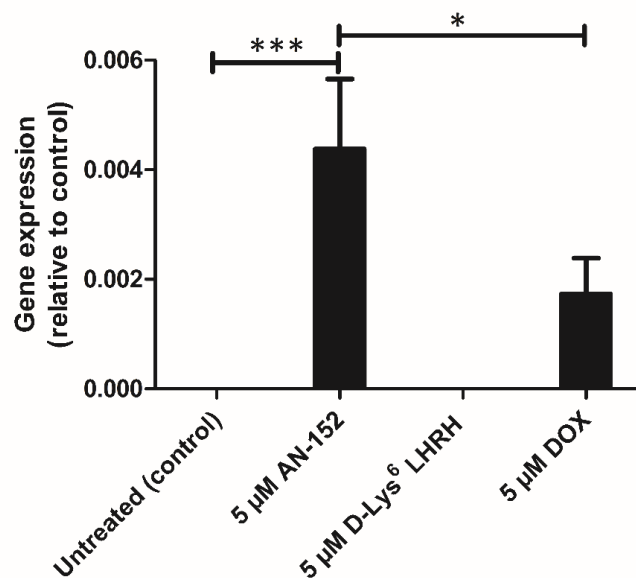
Az eredményeket a Global Pattern Recognition algoritmussal (Bar Harbor Bio Technology Inc.'s, USA) normalizáltuk és 2^{40-Ct} módszerrel kvantifikáltuk.

Gén neve	Downreguláció (kezelt/kontroll)	p-érték
<i>ANGPT1</i>	-32,00	0,0220
<i>HIF1A</i>	-8,67	0,0187
<i>ANGPTL3</i>	-6,57	0,0433
<i>ETS1</i>	-5,66	0,0036
<i>VEGFB</i>	-5,10	0,0230
<i>CEACAM1</i>	-4,14	0,0082
<i>SURVIVIN</i>	-3,91	0,0007

5.2.2. A MASPIN tumorszupresszor expressziójának és indukciójának vizsgálata uvealis melanoma sejtekben

Az RT-qPCR eredményei alapján az AEZS-108 kezelés során indukált MASPIN tumorszupresszornak kiemelkedő szerepe lehet az OCM3 daganatsejtek pusztulásában, ezért szerepének további vizsgálatát tűztük ki célul. Először 18 fagyasztott uvealis melanoma szövetmintán a MASPIN gén alap expresszióját vizsgáltuk meg RT-PCR-rel, mely eredmények alapján a daganatsejtek nem mutattak detektálható mennyiségben MASPIN expressziót. A MASPIN mRNS expresszióját 3 egészséges uvea szövetmintában is megvizsgáltuk, de a normál minták sem mutattak detektálható mennyiséget. Ezt követően megvizsgáltunk, hogy a

tumorszupresszor 5 μ M-os AEZS-108 (AN-152) kezelés hatására tapasztalt jelentős mértékű indukcióját az LHRH receptor-ligand kölcsönhatás is fokozta-e, vagy az upreguláció csupán a doxorubicin működésének köszönhető. Az 5 μ M-os AEZS-108, [D-Lys⁶]LHRH analóg és doxorubicin 24 órás *in vitro* kezeléseket követő RT-qPCR méréseink igazolták, hogy önmagában az LHRH ligand bekötődése a receptorhoz nem indukálja a MASPIN tumorszupresszort (***) $p < 0,005$) (14. ábra). A gén upregulációja kizárólag a doxorubicinhez köthető, azonban az AEZS-108 kezelés szignifikánsan magasabb expressziót váltott ki, mint a megegyező dózisú doxorubicin kezelés (* $p < 0,05$) (14. ábra).

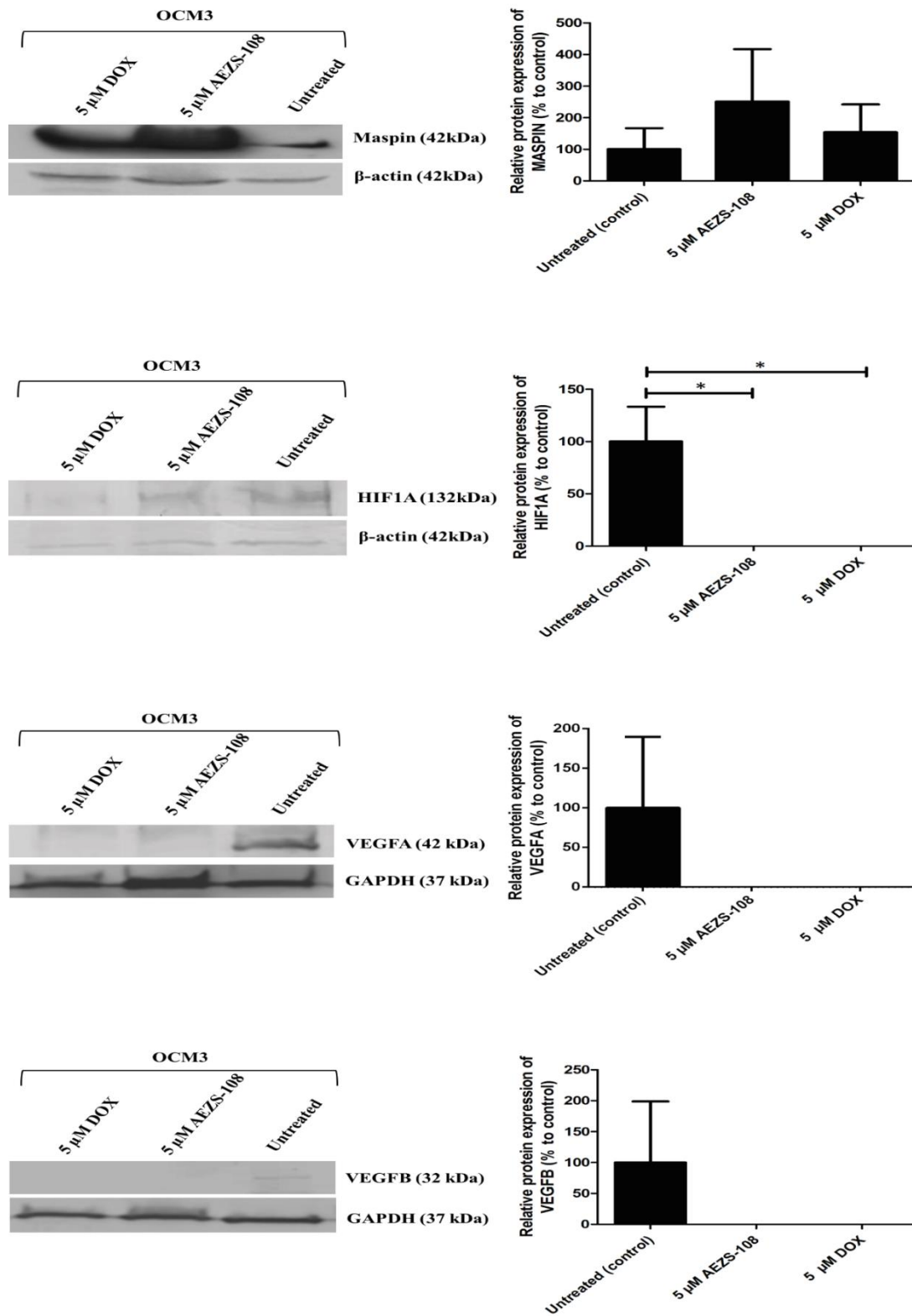


14. ábra: A [D-Lys⁶]LHRH analóg, az AN-152 és a szabad doxorubicin szerepének vizsgálata a MASPIN tumorszupresszor indukciójában *in vitro* kezelést követően.

Átlag \pm SEM, egy utas ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns ha *: $p < 0,05$ és ***: $p < 0,005$.

5.2.3. A MASPIN és az angiogenezisben részt vevő gének fehérje szintű kifejeződésének változása 5 μ M-os AEZS-108 és 5 μ M-os doxorubicin kezeléseket követően OCM3 sejtekben

Az RT-qPCR array-vel detektált mRNS szintű változások fehérje szintű igazolására SDS-PAGE- Western blot vizsgálatot végeztünk a 24 órás 5 μ M-os AEZS-108 és 24 órás 5 μ M-os doxorubicin kezeléseket követően. A fehérje analízis során kimutattuk, hogy az mRNS szintű változások összhangban vannak a gének fehérje szintű megjelenésével. Az AEZS-108 erőteljesebb upregulációját okozta a MASPIN tumorszupresszornak, mint a vele megegyező dózisban alkalmazott doxorubicin (15. ábra). Ezenkívül, fehérje szinten is igazoltuk, hogy mind az AEZS-108, mind a doxorubicin szignifikánsan képes a HIF-1A, VEGFA és a VEGFB gének kifejeződését csökkenteni (15. ábra).



15. ábra: SDS-PAGE-Western blot analízis a MASPIN, HIF-1A, VEGFA és VEGFB gének fehérje szintű expressziójának vizsgálatára 24 órás 5 μM-os AEZS-108 és 5 μM-os doxorubicin kezelések hatására OCM3 sejtekben.

Átlag ± SEM, egy utas ANOVA teszt, ahol a különbség szignifikáns ha *: $p < 0,05$.

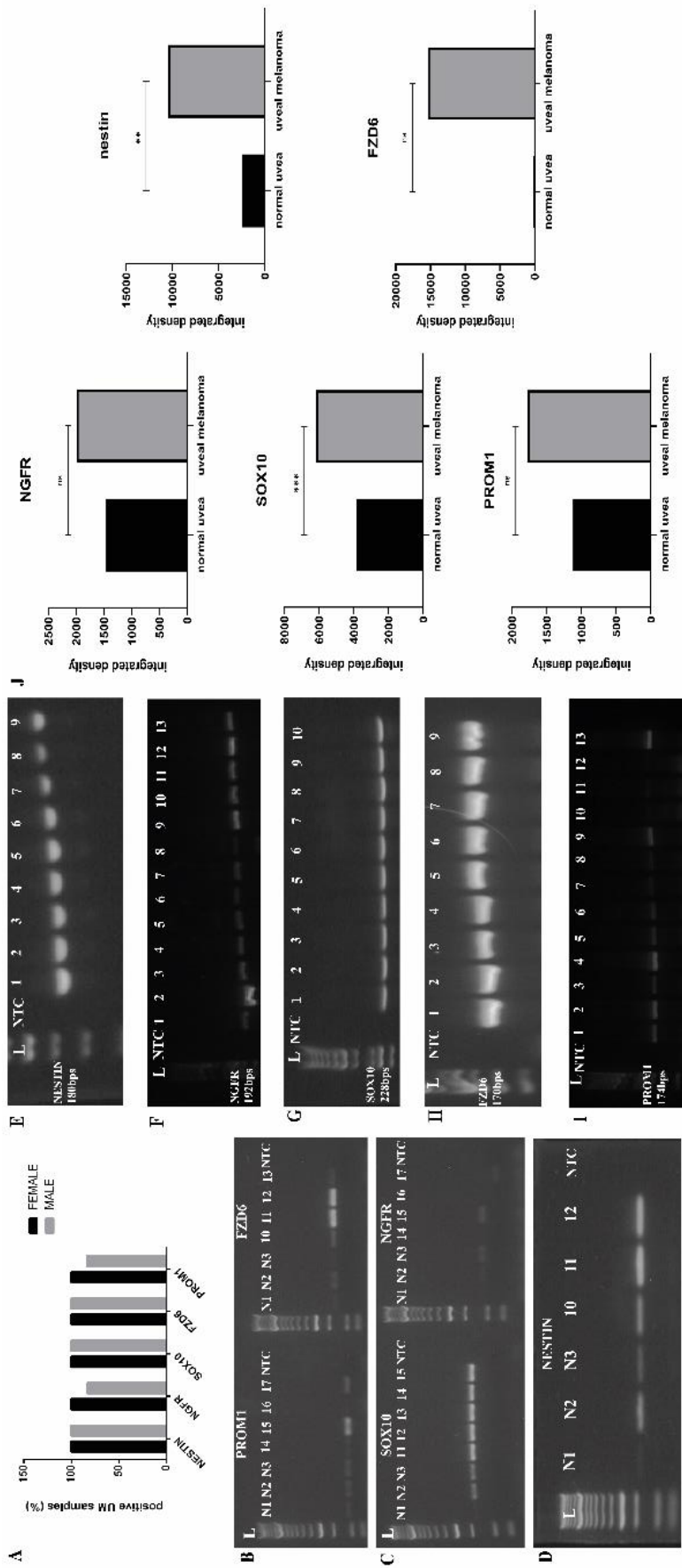
5.3. Uvealis melanomák daganat őssejt tartalmának vizsgálata a tumorok vaszkularizációjának figyelembevételével

5.3.1. Uvealis melanoma és egészséges uvea szövetminták őssejt tartalmára utaló marker gének expressziójának kimutatása mRNS szinten

A fagyasztott uvealis melanoma szövetminták közül 7 az epiteloid, 8 az orsósejtes és 3 a kevert sejttípusba tartozott, összesen 6 női betegtől és 12 férfi páciénstől. A 18 beteg közül 5 részesült Ruténium-applikátor kezelésben az enukleációt megelőzően. A betegek átlag életkora 63,1 (30–84) év volt, az átlagos túlélési ideje 3,71 (1,70–6,37) év volt (11. táblázat). Vizsgálataink során 18 fagyasztott human uvealis melanoma és 3 egészséges uvea szövetmintában vizsgáltuk a nestin, NGFR, SOX10, FZD6 és PROM1 őssejtmarkerek expresszióit RT-PCR-rel, majd az eredményeket denzitometriás analízissel összevetettük (16. ábra). A normal uvea szövetek kisebb mértékben ugyan, de mindegyik őssejtmarkere pozitivitást mutattak. A daganatos szövetekben erőteljesebb expresszióját tapasztaltuk ezeknek a markereknek, melyeket a malignus elváltozású szövetekben daganat őssejtek markereinként értelmez a szakirodalom. A nestin és a SOX10 markerek esetében szignifikáns különbséget (nestin: $p = 0,007$; SOX10: $p = 0,004$) tapasztaltunk a normal uvea és az uvealis melanoma minták őssejtmarker expresszióját összevetve (16. ábra). A vizsgált 18 tumoros szövetből a minták 100%-a volt pozitív a nestin, SOX10 és FZD6 őssejtmarkerekre, míg a PROM1-et a minták 82%-a, az NGFR-t pedig a minták 94%-a expresszálta (16. ábra). A megelőzően Ruténium-applikátor kezelésben részesült betegek (betegsorszám: 1, 4, 9, 12, 14) őssejtmarker expressziója nem mutatott különbséget a kezelésben nemrészesült betegekkel összevetve (11. táblázat).

11. táblázat: A 18 uvealis melanómás beteghez társuló klinikopatológiai paraméterek

Klinikai és patológiai jellemzők	n= 18
Átlagos életkor (év)	63,1 (30–84)
Nő (db)	6
Férfi (db)	12
Epiteoid tumoros sejttípus (db)	7
Orsósejtes tumoros sejttípus (db)	8
Kevert tumoros sejttípus (db)	3
Átlagos tumor átmérő (mm)	9,22 (2,5–23)
Átlagos tumor vastagság (mm)	7,19 (1–16)
Páciensek sclera infiltrációval (db)	9
Páciensek sclera infiltráció nélkül (db)	9
Páciensek nervus opticus infiltrációval (db)	2
Páciensek nervus opticus infiltráció nélkül (db)	16
Átlagos túlélési idő (év)	3,71 (1,70–6,37)
Ruténium-applikátor kezelésben részesült betegek (db)	5

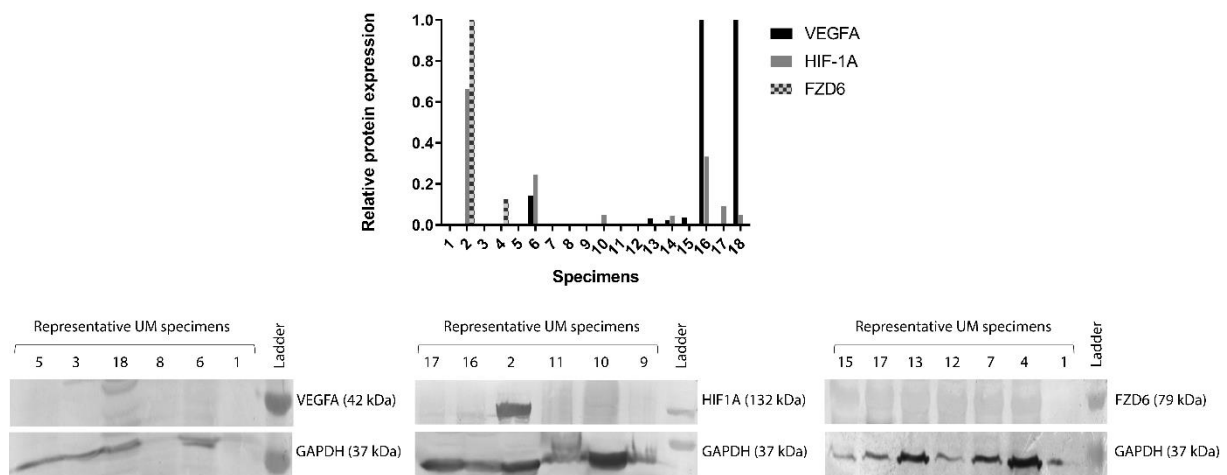


16. ábra: Uveális melanoma és normál uvea szövetminták összesjtmarker expresszióját bemutató reprezentatív RT-PCR-agaróz gélelektroforézis fotók és denzitometriás analízisek.

(A) Uveális melanoma szövetminták nemi eloszlás és összesjtmarker pozitivitás szerinti ábrázolása oszlopdiagramon (B-I) Szövetminták összesjtmarker expressziójának reprezentatív gélfotói RT-PCR-agaróz gélelektroforézist követően, tumoros szövetminták sorszáma: 1-18., normál uvea minták sorszáma: N1-N3, L: 50 bp-os DNS létra, NTC: negatív kontroll. Átlag \pm SEM, Student t- próba, ahol a különbség szignifikáns ha *: $p < 0,01$, ***: $p < 0,005$. (J) Tumoros és normál szövetminták összesjtmarker expressziójának denzitometriás ábrázolása

5.3.2. Uvealis melanoma szövetminták FZD6 őssejtmarker, HIF-1A és VEGFA expressziójának vizsgálata fehérje szinten

Az mRNS szintű eredmények megerősítésére SDS-PAGE-Western blot vizsgálatot végeztünk az előzőleg vizsgált 18 uvealis melanoma szövetmintán. Az eredmények szerint csak a minták csekély része pozitív fehérje szinten is FZD6-ra (11,11%), míg HIF-1A-ra és VEGFA-ra a minták 38,88%-a és 33,33%-a mutatott pozitivitást (17. ábra).



17. ábra: Reprezentatív fotók és denzitometriás analízis 18 uvealis melanoma szövetminta fehérje szintű FZD6, HIF-1A és VEGFA expressziójának vizsgálatáról.

Tumoros szövetminták sorszáma: 1-18., Ladder: protein létra.

5.3.3. Uvealis melanoma szövetminták FZD6, VEGFA és HIF-1A expressziójának vizsgálata, az eredmények statisztikai értelmezése a betegek túlélése és klinikopatológiai jellemzőinek figyelembevételével

Az 52 paraffinba ágyazott uvealis melanoma szövetmintából 16 az epiteloid, 24 az orsósejtes és 12 a kevert sejttípusba tartozott, összesen 22 női és 30 férfi páciensből (12. táblázat). Az 52 beteg közül 3 részesült Ruténium-applikátor kezelésben az enukleációt megelőzően. A betegek átlag életkora 59,55 (35–83) év, az átlagos túlélési idő 4,43 (1,1–7,33) év volt (12. táblázat).

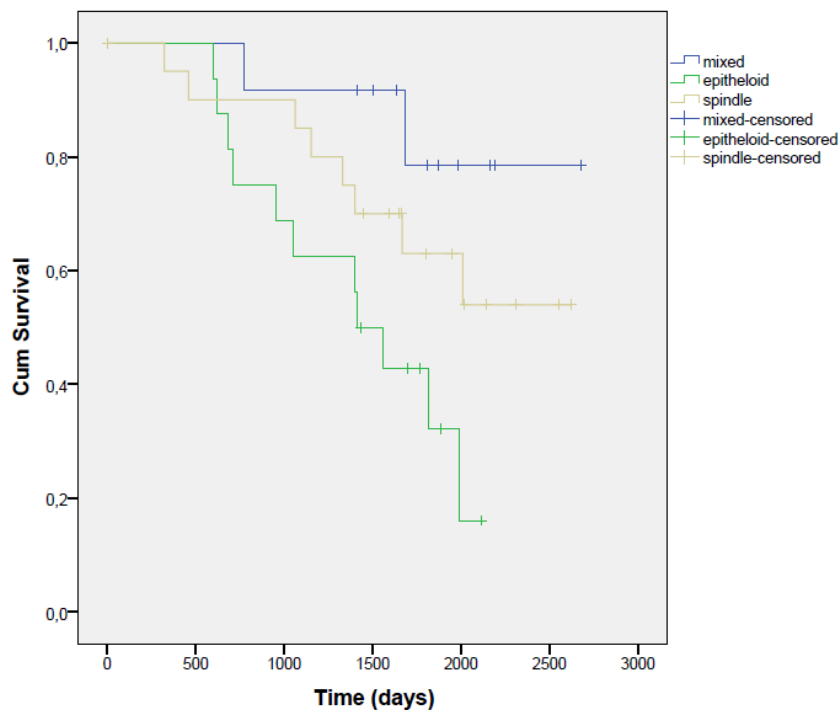
**12. táblázat: Az 52 paraffin blokkba ágyazott uvealis melanoma szövetmintához társuló
 klinikopatológiai paraméterek**

Klinikai és patológiai jellemzők	n= 52
Átlagos életkor (év)	59,55 (35–83)
Nő (db)	22
Férfi (db)	30
Epiteloid tumoros sejttípus (db)	16
Orsósejtes tumoros sejttípus (db)	24
Kevert tumoros sejttípus (db)	12
Átlagos tumor átmérő (mm)	12,68 (2,5–23)
Átlagos tumor szélesség (mm)	9,56 (5–14)
Átlagos tumor vastagság (mm)	6,47 (1–16)
Páciensek sclera infiltrációval (db)	26
Páciensek sclera infiltráció nélkül (db)	26
Páciensek nervus opticus infiltrációval (db)	3
Páciensek nervus opticus infiltráció nélkül (db)	49
Átlagos túlélési idő (év)	4,43 (1,1–7,33)
Ruténium-applikátor kezelésben részesült betegek (db)	3

Az immunfestések a TMA blokkba foglalt tumorminták közül FZD6 esetében 52 mintánál, HIF-1A esetében 50 mintánál, VEGFA esetében 48 mintánál voltak kiértékelhetőek. A blokkba foglalt 2 normál anyajegy esetében mindegyik génre alkalmazott immunfestés kiértékelhető volt.

5.3.4. Az uvealis melanoma tumorok sejttípusának összefüggése a túlélési esélyekkel

A szövetminták tumor sejttípus besorolását és a betegek túlélési idejét összevető Kaplan-Meier túlélési analízis szerint az epitheloid sejttípus rosszabb prognózisra hajlamosító tényező (Mantel-Cox test, $n=49$, $p=0,02$), mint az orsósejtes vagy a kevert sejttípus (18. ábra). Ez az eredményünk egybevág a szakirodalom által korábban már ismert ténnyel, de fontos volt az analízist elvégeznünk, hogy ismerjük a vizsgálatunk tárgyát képező mintacsoport pontos sejttípus- prognózis szerinti megoszlását.

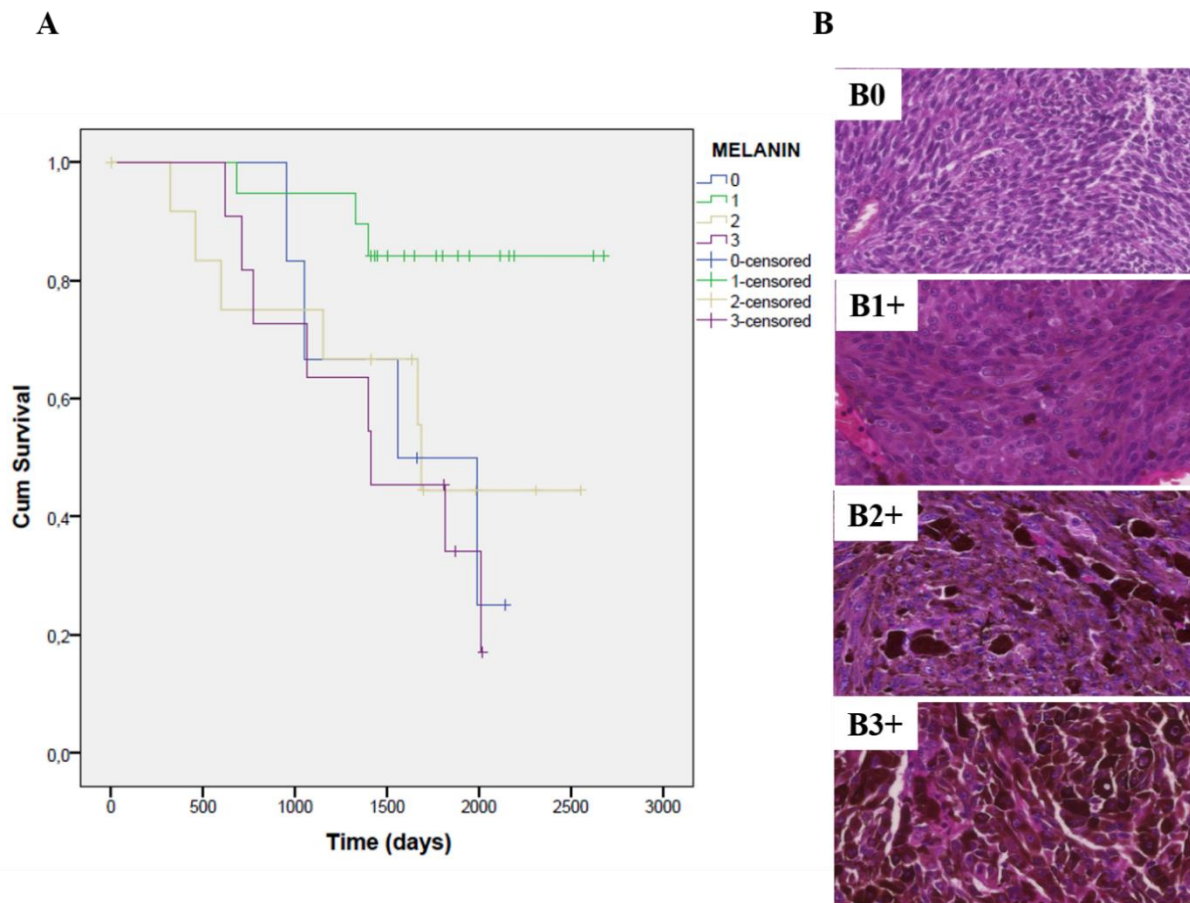


18. ábra: Uvealis melanomás betegek Kaplan-Meier túlélési analízise a betegek tumoros sejttípusának és túlélési idejének összevetésével (Mantel-Cox test, $n=49$, $p=0,02$).

A betegek túlélési ideje a műtétet követő eltelt napok számában mért és ábrázolt.

5.3.5. Az uveális melanoma tumorok melanin pigment tartalma és a betegek túlélése közötti kapcsolat vizsgálata

52 uveális melanoma minta melanin tartalmát vizsgáltuk meg a minták metilzöld festése mellett, mely eredmények alapján 10 esetben (20,4%) 3⁺ intenzitást, 13 esetben (26,53%) 2⁺ intenzitást, 20 esetben (40,81%) 1⁺ intenzitást tapasztaltunk, illetve 6 esetben (12,24%) nem tudtuk detektálható mennyiségű melanint kimutatni (19. ábra). A minták melanin tartalma és a betegek túlélési adatai alapján készített Kaplan-Meier túlélési analízis alapján az 1⁺ melanin expressziójú betegeknek a legkedvezőbb a túlélési esélyük, ellentétben a zero expresszióval vagy a magasabb melanin expresszióval (19. ábra).

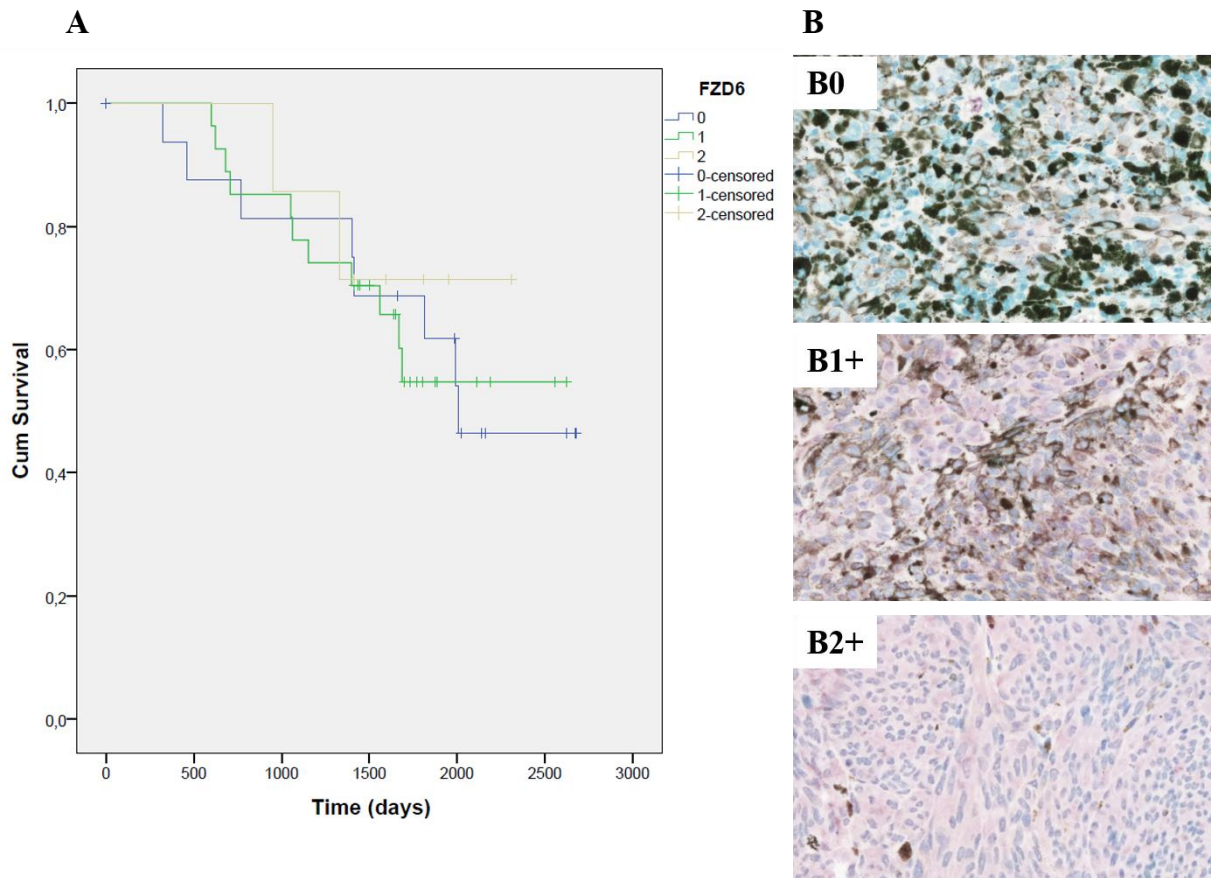


19. ábra: A melanin pigment kifejeződésének vizsgálata IHC módszerrel 52 uveális melanoma szövetmintában

5.3.6. Az FZD6 expressziója és az uveális melanómás betegek túlélése közötti

összefüggések vizsgálata

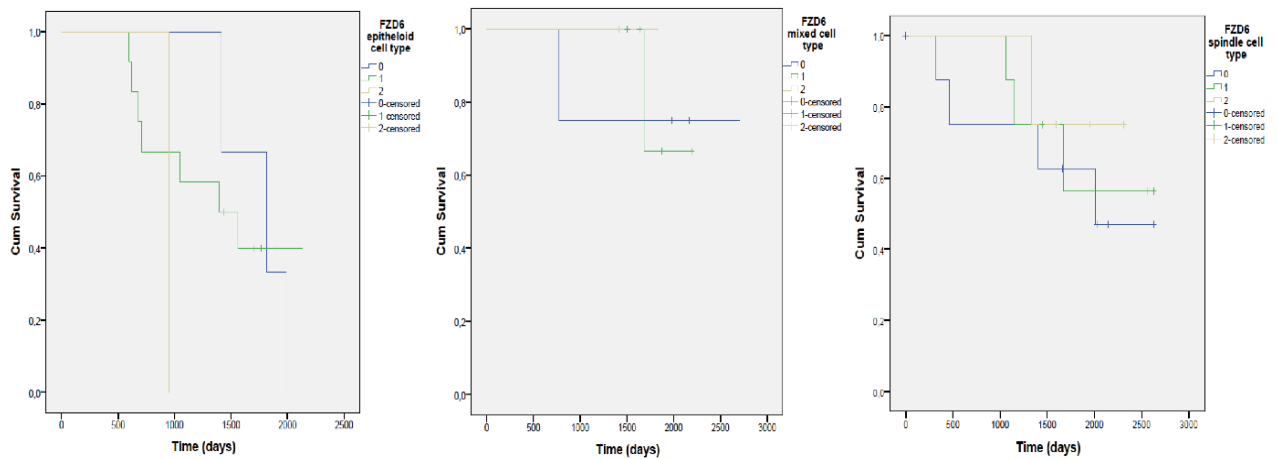
52 uveális melanoma minta immunhisztokémiai festését vizsgáltuk meg az FZD6 génre. Az eredmények alapján 7 esetet találtunk (13,7%) 2⁺ intenzitásúnak, 28 esetet (58,8%) 1⁺ intenzitásúnak, 17 esetben (29%) pedig nem találtunk detektálható mértékű expressziót. A normál anyajegy minták negatívnak bizonyultak FZD6 expresszióra (20. ábra). Az FZD6 expresszió és a betegek túlélési esélyei közötti kapcsolat vizsgálata között nem mutatott szignifikáns korrelációt, habár a 0 és az 1⁺ festődésű minták túlélési görbéje egy meglehetősen rossz prognózist szemléltet (Kaplan-Meier analízis, Mantel-Cox teszt, n= 51, p= 0,867) (20. ábra).



20. ábra: Az FZD6 daganat őssejtmarker expressziójának vizsgálata enukleált uveális melanoma szövetmintákon.

(A) 52 uveális melanoma szövetminta FZD6 expresszója immunfestődési intenzitásuk alapján és a betegek túlélése közötti összefüggések vizsgálata Kaplan-Meier analízissel (Mantel-Cox teszt, $n=51$, $p=0,867$). (B) Reprezentatív fotók az uveális melanoma szövetminták FZD6 immunfestésének eredményeiről. B0: nincs detektálható expresszió, B1+: 1-25% pozitivitás, B2+: 26-50% pozitivitás.

Amennyiben az uveális melanoma mintákat sejttípusuk alapján külön kategorizálva ábrázoltuk azok FZD6 expressziója és a betegek túlélésének figyelembe vételével, egy nem szignifikáns, de egyértelműen az epiteloid sejttípusú betegekhez társuló rosszabb prognózist tudunk igazolni (Mantel-Cox teszt, $n=16$, $p=0,541$, epiteloid sejttípus) (21. ábra).



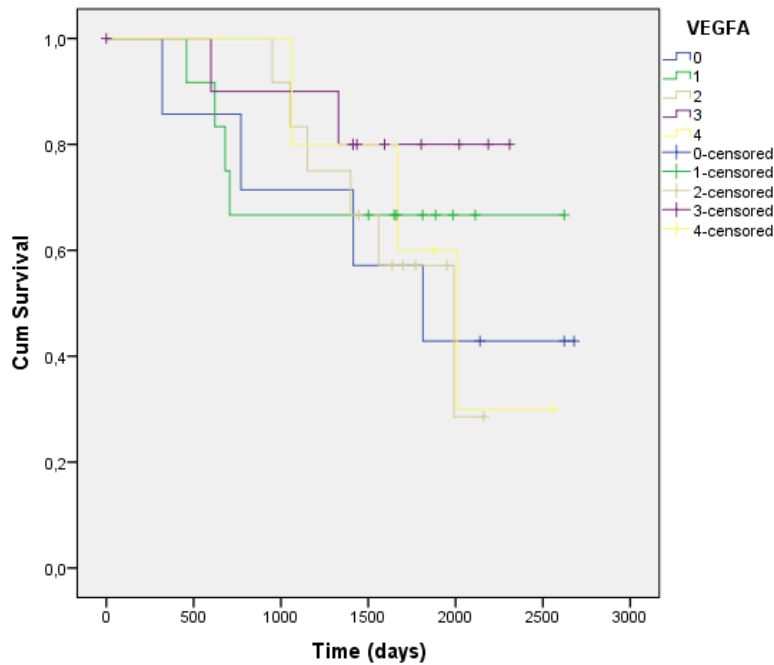
21. ábra: Az uveális melanomas betegek túlélési görbéi külön ábrázolva azok FZD6 expressziója és tumor sejtípusuk alapján.

A vizsgálat alapján az FZD6 pozitív, epithelioid sejtípusú tumoros betegek rosszabb túlélési eséllyel számolhatnak mint az orsósejtes vagy a kevert sejtípusú FZD6 pozitív tumoros betegek (Mantel-Cox teszt, $n=16$, $p=0,541$, epithelioid sejtípus).

5.3.7. Az angiogén faktorok és az uveális melanomás betegek túlélése közötti összefüggések vizsgálata

48 uveális melanoma minta immunhisztokémiai festését vizsgáltuk meg a VEGFA génre, mely eredményei alapján 5 esetben (10,4%) 4⁺ pozitivitást, 12 esetben (25%) 3⁺ pozitivitást, 12 esetben (25%) 2⁺ pozitivitást, 12 esetben (25%) 1⁺ pozitivitást tapasztaltunk, illetve 7 esetben (14,6%) nem mutattunk ki detektálható expressziót. A normal anyajegy minták nem mutattak detektálható VEGFA expressziót.

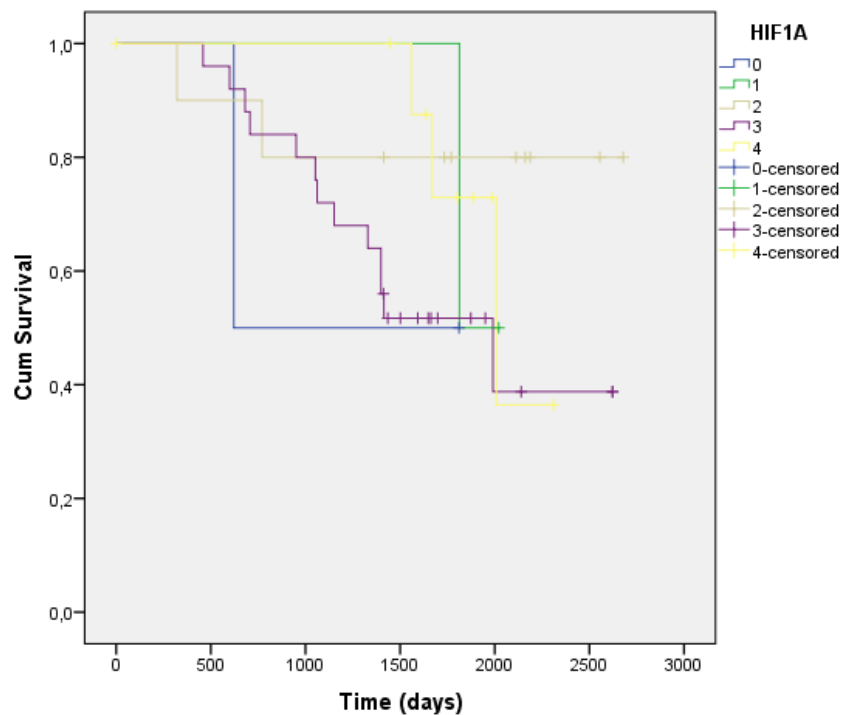
A túlélési analízis nem mutatott egyértelmű és szignifikáns összefüggést a betegek VEGFA szintje és a túlélésük között (Mantel-Cox teszt, $n=47$, $p=0,757$) (22. ábra).



22. ábra: Az uveális melanomás betegekhez tartozó Kaplan-Meier görbék a VEGFA expresszió és a túlélési adatok függvényében. (Mantel-Cox teszt, $n=47$, $p=0,757$)

50 uveális melanoma minta immunhisztokémiai festését vizsgáltuk meg a HIF-1A génre, mely eredményei alapján 10 esetben (20%) 4⁺ pozitivitást, 26 esetben (52%) 3⁺ pozitivitást, 10 esetben (20%) 2⁺ pozitivitást, 2 esetben (4%) 1⁺ pozitivitást tapasztaltunk, illetve 2 esetben (4%) nem mutattunk ki detektálható expressziót. A normal anyajegy minták mindegyike 3⁺ pozitivitást mutatott.

A túlélési analízis nem mutatott egyértelmű és szignifikáns összefüggést a betegek HIF-1A szintje és a túlélésük között (Mantel-Cox teszt, $n=49$, $p=0,336$) (23. ábra).



23. ábra: Az uvealis melanomas betegek Kaplan-Meier görbéi a HIF-1A expresszió és a túlélési adatok függvényében. (Mantel-Cox teszt, n= 49, p= 0,336)

5.3.8. Az FZD6 és a VEGFA gének egyidejű expressziója közötti korreláció vizsgálata

Az FZD6 és a VEGFA gének expressziójának tumor progresszióban betöltött szerepének feltárása céljából Spearman analízist végeztünk a két gén expressziója közti korreláció vizsgálatára. Eredményünk alapján statisztikailag szignifikáns, erős korreláció áll fenn az FZD6 és VEGFA expressziója között uvealis melanomas betegekben (Spearman $r=0,411$, $n= 48$, $p= 0,004$). Ezzel ellentétben, az FZD6 és a HIF-1A között nem mutattunk ki szignifikáns korrelációt (Spearman $r= 0,061$, $n= 50$, $p= 0,672$), amely a gének szinkronizált expressziójára utalna.

5.3.9. Az FZD6, HIF-1A, VEGFA és a melanin pigment expressziója és egyéb patológiai markerek közötti összefüggések vizsgálata

Hogy megvizsgáljuk, van-e valamilyen összefüggés a tanulmányozott 52 uvealis melanoma daganat esetében azok FZD6, HIF-1A, VEGFA és a melanin kifejeződése, valamint a daganat sclera és nervus opticus infiltrációja között Spearman analízist végeztünk. A vizsgálat kizárólag a HIF-1A és a sclera infiltrációja között mutatott szignifikáns összefüggést ($p=0,042$, $n=41$), a többi vizsgált parameter között nem találtunk korrelációt (13. táblázat).

13. táblázat: Az 52 paraffinba ágyazott uvealis melanoma szövetminta FZD6, HIF-1A, VEGFA és melanin expressziójának összevetése a minták sclera és nervus opticus infiltrációjával Spearman analízissel

Spearman analízis eredményei					
		FZD6	HIF1A	VEGFA	Melanin
Sclera infiltráció	Korrelációs koefficiens	-0,200	319*	0,035	-0,020
	p-érték	0,198	0,042	0,830	0,902
	N	43	41	39	41
Nervus opticus infiltráció	Korrelációs koefficiens	-0,192	0,139	-0,007	-0,126
	p-érték	0,192	0,358	0,962	0,406
	N	48	46	44	46

*p-érték szignifikáns ha $< 0,05$.

6. Megbeszélés

A célzott daganatterápia egyik ígéretes eszköze a peptid hormon-alapú gyógyszeres kezelés. Az LHRH-R jelentős expresszióját már számos hormonérzékeny és nem hormonérzékeny daganat esetében igazolták. Számos vizsgálat igazolta, hogy az LHRH-R képes az LHRH liganddal konjugált citotoxikus molekulát internalizálni, a leváló citotoxin pedig szelektíven csak a daganatsejt pusztulását okozni, megkímélve így a szervezet egészséges sejtjeit. Az LHRH-R alapú célzott kemoterápiás készítmények daganatos elváltozások körében tapasztalt hatékonyságát látva a peptid hormon alapú terápia fejlesztése számos LHRH-R pozitív daganattal küzdő beteg számára adhat reményt. Ilyen, LHRH-R pozitív daganatok az uvealis melanomák és a hólyag karcinómák is. Vizsgálataink fókuszába így két olyan nagy mortalitású, gyakori relapszussal járó humán daganat típus LHRH peptid hormon receptor alapú célzott terápiájának új lehetőségeit állítottuk, melyek eddig nem kellően felderített terápiás területek.

Számos kutatócsoport vizsgálta már az LHRH-R-ok hormonfüggő és nem hormonfüggő daganatokban megfigyelt fokozott expresszióját, s a receptor célzott daganatterápiás szereklle való hatékony célbavételéről is több közlemény számolt be [1-3, 5, 6, 89, 93, 138]. Alapvetően az LHRH a hipotalamusz sejtjei által kiválasztott hormon, melyek a hipofízis felszínén lokalizált LHRH receptorukhoz bekötődve LH és FSH termelést indukálnak. Kiseb receptor számban, de megfigyelhető az LHRH-R-ok jelenléte az ivarszervek felszínén is [88]. Az LHRH receptor-ligand interakciójának nemi hormon indukciós képességén túlmutató szerepét akkor feltételezték először a kutatók, amikor jelentős expresszióját tapasztalták nem hormonérzékeny daganatok, mint vese, hasnyálmirigy, agy, vastagbél, szájüregi és kután melanóma esetében is, sőt tripla-negatív emlő karcinómákon is [5, 8-11]. Az LHRH-R molekuláris szerkezetének megismerésekor, valamint a receptor-ligand interakció által indukált jelátviteli útvonal feltérképezésekor kimutatták, hogy a receptor alap működésén túl képes működésbe hozni az

EGF-R-t is, ezáltal egy autokrin-parakrin jelátvitelen keresztül segítve a daganat növekedését. Alapvetően, az LHRH-R egy G-protein kapcsolt, hét transzmembrán doménnel rendelkező membrán receptor, mely LHRH ligandjával való interakciója után internalizál a sejtplazmába és aktiválja az IP₃-mat és a DAG-ot. Ez az aktiváció Ca²⁺ felszabadulást vált ki, amely szükséges az LH és az FSH granulumokból való exocitóziséhoz, a DAG pedig aktiválja a PKC útvonalat. A PKC útvonal a MAPK-ok aktivációjához vezet, melyek a sejtmagba vándorolva további transzkripciós faktorok átírását indukálják. Daganatos elváltozások esetében feltételezhetően ez a PKC útvonal lehet a valódi célja az LHRH-R overexpressziójának, illetve, hogy más a növekedést támogató receptorok (pl. EGF-R) aktivációjával egy szerteágazó szabályozást indító faktorra tesz szert a daganat az LHRH-R-okkal [92, 94, 95]. Számos vizsgálat igazolta, hogy receptor képes az LHRH liganddal konjugált citosztatikum molekulát internalizálni, a leváló citosztatikum pedig szelektíven csak a daganatsejt pusztulását okozni, megkímélve így a szervezet egészséges sejtjeit [6, 104, 108, 110, 137].

A húgyhólyag daganatok egyes típusainak LHRH ligand és LHRH-R expresszióját néhány korábbi publikációban már leírták, de számos megválaszolatlan kérdés maradt még a kutatók számára a témában [113, 114]. A hólyagdaganatok peptid hormon expresszióját érintő vizsgálatok alacsony publikációs számának és a téma hiányos feltérképezésének oka, hogy a regionális klinikai centrumokban is általában csak hosszú idő alatt sikerült összegyűjteni reprezentatív vizsgálatra alkalmas mennyiségű betegmintát a klinikopatológiai adatokkal együtt. Ennek hiányában gyakoribbak az állatmodelleken elvégzett, xenotranszplantációt alkalmazó vizsgálatok. Szepesházi és munkatársai egy 2012-es publikációjukban 4 további húgyhólyag karcinóma sejtvonal és 18 humán húgyhólyag szövetminta LHRH-R expresszióját igazolták [114]. Eredményeik alapján a célzott terápiára fejlesztett citotoxikus LHRH analóg AN-152 (AEZS-108) nem csak képes hatékonyan gátolni a xenotranszplantált hólyagtumorok növekedését, de kevesebb mellékhatást is okozott, mint a DOX kezelések. Vizsgálataik nem

terjedtek ki a szövetminták LHRH expressziójának vizsgálatára, az LHRH-R státusz és a betegminták klinikopatológiai paramétereinek közötti összefüggések vizsgálatára, illetve a szövetminták által expresszált LHRH-R-ok ligand kötési képességének vizsgálatára.

A nemi eloszlástól függetlenül, előfordulásukat tekintve a hólyagdaganatok a 10. leggyakoribb daganatos elváltozások a világon. Az urogenitális traktust érintő malignus megbetegedések közül közvetlenül a prosztatata elváltozások után a 2. leggyakoribb tumoros elváltozás a húgyhólyag karcinóma [28-30]. A húgyhólyag daganatait szövettani besorolás szerint három csoportra oszthatjuk: hámeredetű átmeneti-sejtes karcinóma (transitional cell carcinoma (TCC)), laphámsejtes karcinóma és adenokarcinóma. A hólyag daganatainak többsége úgynevezett TCC típusú, amely a hólyag daganatok mintegy 95,7%-át teszi ki. Az első vonalbeli terápiás eljárások nem kielégítő probléma megoldását mutatja, hogy a legfőbb probléma a TCC daganattal, hogy az esetek mintegy 50-70%-a esetében kiújul a kezelést követően, illetve infiltrál a hólyag körüli simaizom szövetekbe. Így történhet meg, hogy a TCC típusú húgyhólyagdaganattal kezelt betegek a daganatos megbetegedések közül a legmagasabb túlélési idő/összes kezelési költség arány [28, 32, 85]. Ez az arány jól mutatja, hogy egy kemoterápiára és sebészeti kezelésre alapvetően jól reagáló daganatos megbetegedés terápiája mennyire nem személyreszabott. A terápiás protokollok sokszor ismétlődően ugyanazt a kezelést írják elő (pl. TUR+ hólyag instilláció kemoterápiás szerrel) a beteg számára egy személyre szabottabb terápiára váltás helyett. Ezzel nemcsak romlik a beteg teljes gyógyulásának esélye, de ez nagyban megnöveli a beteg terápiás összköltségeit is. A hólyagdaganatok egyéb célzott terápiás lehetőségei a daganat számos ismert mutációját tekintve (melyek rendszerint a karcinogenezisben jól definiált szerepű gének) igencsak széles palettán mozoghatnak, de a klinikai tapasztalatok gyakran mást mutatnak [32, 83, 85]. Az engedélyezett célzott terápiás lehetőségek zömében az előrehaladott, áttétes hólyagdaganattal küzdő betegek gyógyítására, túlélési idejük hosszabbítására javallott, s nem a daganat primer,

ámde invazív állapotának, tovább terjedésének megakadályozására. Az immunterápiák előrehaladott stádiumban lévő hólyagtumoros betegek esetében alkalmazottak sikerrel, míg a docetaxellel kombinált ramucirumab anti-VEGFR2 kemoterápiában részesült betegek kezelése szintén egyértelmű sikert mutatott [83-85].

Vizsgálataink során az LHRH-R-ok tumor progresszióban betöltött szerepének tanulmányozását, illetve LHRH liganddal kapcsolt citotoxikus célzott terápiájának lehetőségét húgyhólyag tumor sejtvonalakon és TCC típusú betegmintákon is elvégeztük.

Először 24 műtétieltávolított, fagyasztott TCC húgyhólyag daganat szövetmintán, illetve az *in vitro* tenyésztett RT-112, UMUC3, TCCSUP sejtvonalakon vizsgáltuk az I-es típusú LHRH-R és az LHRH ligand expresszióját. Az LHRH-R a minták 83%-ában, míg az LHRH ligandot 79%-ában sikerült mRNS szinten RT-PCR-rel kimutatnunk. Mindhárom sejtvonal pozitívnak bizonyult mRNS szinten mind a receptorra, mind a ligand expresszióra. A sejtvonalakban fehérje szinten is megerősítettük az LHRH-R expresszióját SDS-PAGE-Western blottal. A vizsgált mintákban tapasztalt nagy arányú LHRH-R és vele egy idejű LHRH ligand expresszió arra enged következtetni, hogy a receptor és ligandja egyfajta autokrin-parakrin hatás okán expresszáldhat, melynek hatása lehet a tumor progressziójára.

Ezt követően, a korábban vizsgált 24 betegből kiválasztott 12 beteg parafinba ágyazott TCC tumormintáján IHC festést végeztünk az LHRH-R-ra. A minták mindegyikében sikerült a receptor expresszióját igazolni. Az eredmények vizuális kiértékelésekor arra a következtetésre jutottunk, hogy az LHRH-R expressziója a tumor grádusának növekedésével csökken, tehát jóval magasabb expressziót mutattak az alacsonyabb grádusba sorolt tumorminták, mint az előrehaladottabb állapotú (3-4. grádus) tumorok. A megfigyelésünket Pearson analízissel is alátámasztottuk, mely szerint az LHRH-R expressziója negatív korrelációban állt a vizsgált szövetminták patológiai grádusával ($r = -0,91$, $n = 12$). A statisztikai analízis eredménye szintén alátámasztja azt a felvetésünket, mely szerint az LHRH-R-ok és ligandjuk expressziója

autokrin-parakrin faktorként segíti a korai stádiumú TCC daganatok áttétképzését és progresszióját. A betegek kora nem állt összefüggésben a receptor státusszal. A receptor festést csak primer daganatokon, kemoterápiában korábban nem részesült betegektől származó mintákon végeztük, így a receptor státusz metasztázisokon bekövetkező, illetve kemoterápiás kezelést követő esetleges változásairól nincs információnk. A megvizsgált 3 egészséges húgyhólyag szövetminta negatívnak bizonyult LHRH-R expresszió tekintetében. Vizsgálatainkat a korábban LHRH-R és LHRH ligand expresszióra mRNS szinten vizsgált 12 hólyagtumor betegminta radioligand kötési assay vizsgálatával folytattuk. Elsőként a szövetekből készült membránpreparátumok radioaktív [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH kötő affinitását vizsgáltuk meg. A ligandkötési assay eredménye alapján 10 betegmintából izolált LHRH-R-t kifejező membránpreparátum volt képes *in vitro* környezetben a nagy affinitással kötődő radioligand megkötésére. Méréseink során elvégeztük a leszorításos ligand kompetíciós assay-t a nem radioaktív LHRH ligandot helyettesítve más nem radioaktív LHRH analógokkal is, mint az LHRH agonista analóg [D-Lys⁶]LHRH-val, ennek citotoxinnal kapcsolt formájával az AN-152-vel, az LHRH antagonistá analóg Cetrorelix-szel, valamint nem LHRH-R specifikus jelöletlen peptidekkel. Eredményeinkből elmondható, hogy mindegyik nem- radioaktív LHRH ligand képes volt az LHRH-R-hoz kötődni nanomolos koncentrációban. A jövőbeli potenciálisan alkalmazható új terápiák szempontjából biztató eredmény, hogy az AN-152 kötődési affinitása csak kis mértékben maradt el a szabad „carrier-ligandjának”, a [D-Lys⁶]LHRH bekötődési affinitásától, így elmondható, hogy ez a citotoxikus LHRH analóg alkalmas lehet TCC daganatok *in vivo* célzott kezelésében, majd akár klinikai terápiájában is.

Kutatócsoportunk több korábbi publikációjában számolt már be az LHRH-R uvealis melanoma daganatok és az OCM1 és OCM3 sejtvonalak esetében tapasztalt fokozott expressziójáról, valamint a receptor szerepéről, mint potenciális daganatterápiás célpontról [20, 21, 53]. Továbbá igazoltuk, hogy a OCM3 uvealis melanoma sejtek nem csak hogy hatékonyan

célba vehetőek az AEZS-108 (AN-152) jelölésű LHRH liganddal kapcsolt DOX-nel, de a sejtvonal DOX rezisztens formája is képes elpusztulni az LHRH-R-on keresztüli DOX felvételnek köszönhetően [21].

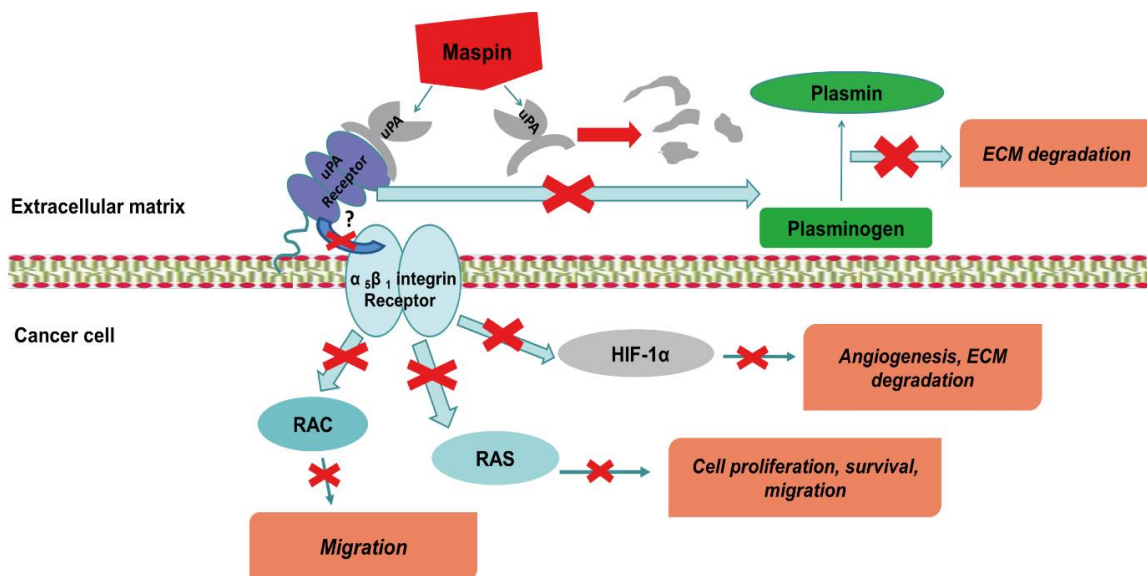
Az uvealis melanoma a szem egyik leggyakoribb intraokuláris daganata. A statisztikák szerint a betegek közel 50%-a már a diagnózis idejében távoli áttéttel rendelkezik, mely 93%-ban a májat is érinti [47]. Ez a rendkívül magas áttétképzési hajlam arra enged következtetni, hogy az uvealis melanoma daganat rendkívül hatékony hematogén áttétképzése által még jóval a diagnózis felállítása előtt mikrometasztázisok formájában biztosítja a daganat túlélését. A betegek túlélési ideje a májáttét kialakulásától számítva átlagosan 4-6 hónap [14]. A betegség terápiájának további nehézsége, hogy tapasztalatok szerint meglehetősen gyakran kemorezisztens és a kután melanoma genetikai profiljától eltérő tulajdonságú ez a daganattípus. A primer daganatok terápiás lehetőségeit tovább szűkíti, hogy a szem egy olyan speciális szervünk, mely szerv daganatos elváltozásainak kezelésére számos kemoterápiás szer használata nem megengedett, így egészen speciális eljárásokhoz kell folyamodnunk. Kis és közepes méretű primer daganatok kezelésében jelenleg a leginkább alkalmazott eljárás a radioaktív plakk terápia, amely a tumor méretétől és lokalizációjától függően eltérő mértékű látásvesztéssel járhat [57]. Nagy méretű, vagy a szemüregget infiltráló daganatok esetében az egyetlen hatékony kezelési módszer a szemgolyó eltávolítása (enukleáció). A távoli áttétek terápiás protokolljában leggyakrabban a kután melanoma kezelésére alkalmazott terápiákat alkalmazzák, de ezek a próbálkozások csak részben sikeresek. Magyarázatul szolgálhat erre a kután melanóma és az uvealis melanoma közötti bizonyítottan eltérő molekuláris genetikai profil [35, 62].

A célzott kemoterápiás készítmények fejlesztése, valamint a mikrometasztázisok elleni hatékonyabb diagnosztika és terápia fejlesztése adhat újabb reményt a távoli áttéttel rendelkező uvealis melanomával küzdő betegek és orvosai számára.

Mivel nem ismert, hogy az AEZS-108 OCM3 sejteken való alkalmazásakor a DOX indukálta ROS-on kívül milyen jelátviteli folyamatok indulnak el a receptor-ligand interakciónak köszönhetően és hogy milyen jelátviteli folyamatok segítik a daganatsejt pusztulását így munkánk során először célul tűztük ki ezen jelátviteli folyamatok feltérképezését. Mivel az uvealis melanoma daganatokra fokozott vaszkularizáció és korai áttétképzés jellemző, így elsősorban ezekben a folyamatokban részt vevő gének expressziós változásait vizsgáltuk meg a citotoxikus LHRH liganddal való kezelést követően. Először az *in vitro* kezelések során felhasználandó OCM3 sejteken immuncitokémiával igazoltuk az I-es típusú LHRH-R membrán és citoplazmatikus kifejeződését, majd igazoltuk a receptorok alkalmasságát célzott terápiás molekula felvételére. Ehhez, az 5 μ M-os AEZS-108 molekulával végzett kezeléseket követően MTS assay életképességi vizsgálatot végeztünk, mely során megállapítottuk, hogy 24 órás kezelés során az AEZS-108 36,3%-al, míg a doxorubicin 62,9%-al csökkentette az élő sejtek számát. A 48 órás kezelést követően már nem tapasztaltunk ilyen számottevő különbséget, így az AEZS-108 84,7%-al, míg a doxorubicin 89,7%-al csökkentette az élő sejtek számát. Eredményeinkből látható, hogy mivel az AEZS-108 receptor mediált endocitózissal jut be az OCM3 sejtekbe, így adott idő alatt kisebb sejtpopulációra fejt ki toxikus hatást, mint a sejtmembránon átdiffundáló szabad doxorubicin. 48 óra elteltével azonban a két szer toxicitása közötti különbségek elenyészőek.

A sejtpusztulás hátterében álló génexpressziós változások nyomonkövetésére 94, az angiogenezisben részt vevő gén kifejeződését vizsgáltuk a kezeletlen és az 5 μ M AEZS-108-cal 24 órán át kezelt OCM3 sejteken kvantitatív RT-qPCR-array-vel. Az eredmények szerint a kontroll OCM3 mintákhoz képest az AEZS-108-cal kezelt mintákban 5 gén expressziójában szignifikáns emelkedést, 7 gén expressziójában pedig szignifikáns csökkenést tapasztaltunk ($p < 0,05$). A legjelentősebb változást az upregulált gének közül a SERPINB5/MASPIN tumor szupresszor esetében (203,19-szeres expresszió növekedés), míg a downregulált gének közül a

daganat progressziójában központi szerepű HIF-1A gén esetében (8,67-szeres expresszió csökkenés) tapasztaltuk. Hogy igazoljuk, a mRNS szintű változások összhangban állnak-e a gének fehérje szintű mennyiségével is, a továbbiakban SDS-PAGE-Western blot vizsgálatot végeztünk a MASPIN, HIF-1A és VEGFA génekre az 5 μ M-os AEZS-108 és 5 μ M-os doxorubicin kezeléseket követően. Eredményeinkkel fehérje szinten is igazoltuk, hogy mind az AEZS-108, mind a doxorubicin szignifikánsan képes a HIF-1A, VEGFA és a VEGFB gének kifejeződésének csökkentésére. Továbbá kimutattuk, hogy az AEZS-108 erőteljesebb upregulációját okozta a MASPIN tumorszupresszornak, mint a vele megegyező dózisban alkalmazott doxorubicin.



24. ábra: A MASPIN meggátolja az urokináz típusú plazminogén aktivátor (uPA)-uPA receptor komplex kialakulását, ezzel megakadályozza a rendellenes extracelluláris mátrix (ECM) degradációt, amely az angiogenezishez és a metasztázis képzéshez járul hozzá.

Ezt követően megvizsgáltunk, hogy a MASPIN tumorszupresszor 5 μ M-os AEZS-108 kezelés hatására tapasztalt indukcióját az LHRH-R-ligand kölcsönhatás is fokozta-e, vagy az upreguláció csak a doxorubicinnek köszönhető. Az 5 μ M-os AEZS-108, a [D-Lys⁶]LHRH

analóg és a doxorubicin 24 órás *in vitro* kezeléseket követő RT-qPCR méréseink igazolták, hogy önmagában az LHRH ligand bekötődése a receptorhoz nem indukálja a MASPIN tumorszupresszort (** $p < 0,005$). A gén upregulációja kizárólag a doxorubicinhez köthető, azonban az AEZS-108 kezelés szignifikánsan magasabb expressziót váltott ki, mint a megegyező dózisú doxorubicin kezelés ($p < 0,05$). A citotoxikus kezelések által indukált MASPIN expressziójának vizsgálata után megvizsgáltuk annak kifejeződését normál uvea és uvealis melanoma szövetmintákban is RT-PCR módszerrel. Eredményeink alapján sem a normál, sem a tumoros minták nem expresszálnak kimutatható mennyiségben MASPIN tumorszupresszort.

Kutató munkánk folytatásában az uvealis melanomák daganat őssejt tartalma és a vaszkularizációjuk szabályozása közötti összefüggéseket vizsgáltuk a betegek túlélésének tükrében enukleált műtéti tumormintákon. Téma kijelölésünk alapja volt az a szakirodalmi megállapítás, hogy a II-es molekuláris profilú uvealis melanomák membránjukban erős β -katenin és E-kadherin expressziót mutatnak, valamint overexpresszált HIF-1A és VEGF faktorokon keresztül intenzív angiogenezist és áttétképzést valósítanak meg [25]. A β -katenin molekulák a Wnt szignalizációs útvonalba kapcsolódva képesek a sejtmagba bejutni és ott a LEF/TCF transzkripciós faktorokkal komplexet alkotva számos gén átírását aktiválni [125]. A Wnt molekulák Frizzled (FZD) receptorukhoz kötődve számos bonyolult, több lépéses jelátviteli folyamatot indítanak el, melyek gyakori jellemzői az őssejt szerű tulajdonságokkal rendelkező sejteknek, mivel kulcsszerepük van a sejtek polaritásának, osztódási képességének és migrációjának szabályozásában [125]. Mivel a Wnt5 esetében egy elég jól feltérképezett jelátviteli hálózat ismert a szakirodalomban, illetve bizonyított, hogy melanoma tumorokban képes egyes pro-angiogenikus faktorok, mint a IL-6, IL-8 (CXCL8), VEGF és MMP2 exoszómális felszabadulását is indukálni, így választásunk az ehhez kapcsolódó receptorok és target gének további vizsgálatára esett. Vizsgálataimat összesen 70 enukleált uvealis melanoma

minta felhasználásával végeztem, mindegyik minta esetében rendelkezésünkre álltak a donor beteg klinikai paraméterei, a megelőző terápiára vonatkozó információk. Először 18 fagyasztott uvealis melanoma szövetmintában vizsgáltam a daganat őssejtek jelenlétére utaló markerek, mint nestin, NGFR, SOX10, FZD6 és PROM1 gének expresszióját RT-PCR-el. Kontroll csoportként 3 normál uveamintán is elvégeztük a vizsgálatokat. A normál uveaszövetek kisebb mértékben ugyan, mindegyik őssejtmarkerre pozitivitást mutattak. A daganatos szövetekben erőteljesebb expresszióját tapasztaltuk ezeknek a markereknek, melyeket a malignus elváltozású szövetekben daganat őssejtek markereinként értelmezhetünk a szakirodalom alapján. A nestin és a SOX10 markerek esetében szignifikáns különbséget (nestin: $p=0,007$; SOX10: $p=0,004$) tapasztaltunk a normál uvea és az uvealis melanoma minták őssejtmarker expresszióit összevetve. A vizsgált 18 tumoros szövetből a minták 100%-a volt pozitív a nestin, SOX10 és FZD6 őssejtmarkerekre, míg a PROM1-et a minták 82%-a, az NGFR-t pedig a minták 94%-a expresszálta. A megelőzően Ruténium-applikátor kezelésben részesült betegek őssejtmarker expressziója nem mutatott különbséget a kezelésben nem részesült betegekkel összevetve. A továbbiakban a Wnt5 molekula receptorát, az FZD6 expresszióját vizsgáltuk tovább a minták VEGFA és HIF-1A vaszkularizációs faktorainak expressziójával összevetve. Elvégeztük a korábban vizsgált 18 fagyasztott uvealis melanoma szövetminta SDS-PAGE-Western blot analízisét a kiválasztott génekre. Az eredmények szerint csak a minták csekély része pozitív fehérje szinten is FZD6-ra (11,11%), míg HIF-1A-ra és VEGFA-ra a minták 38,88%-a és 33,33%-a mutatott pozitivitást.

Vizsgálatainkat a továbbiakban 52 paraffin blokkba ágyazott, enukleált uvealis melanoma minta FZD6, HIF-1A és VEGFA expressziójának immunhisztokémiai vizsgálatával folytattuk. Kontroll csoportként 2 normál anyajegy, illetve máj, placenta és vese szövetmintákat használtunk. Minden szövetminta esetében rendelkezésünkre álltak a betegek klinikopatológiai paraméterei és a megelőző terápiára vonatkozó információk. A VEGFA és a HIF-1A fokozott

expresszióját számtalanszor bizonyították már UM szövetmintákban, ám mégsem állítható bizonyosan, hogy a VEGF molekula lenne a kulcs faktor a daganat angiogenezisében. Jelenleg a számtalan paradox eredménnyel zárult *in vivo* vizsgálat után, a VEGF inhibitorok alkalmazása uvealis melanomás betegeken arra enged következtetést tenni, hogy a VEGF szignál közvetlen gátlása nem elegendő az angiogenezis gátlásához [22]. Vizsgálataink eredményei is megerősítették ezt a szakirodalom által tett kijelentést. Az általunk elvégzett Kaplan-Meier analízisek szerint sem a HIF-1A ($p=0,336$), sem a VEGFA ($p=0,757$) nem állt szignifikáns összefüggésben a betegek túlélésével. Feltételezhetően a tumoros érhálózat kialakításában résztvevő VEGF szignál sokkal komplexebb és több szálon szabályozott folyamat, így a VEGF inhibitorok hatása ellensúlyozható más jelátviteli útvonalakon keresztül. Ezt az elméletet támasztják alá eredményeink is, hogy bár jelentős mintaszámban vizsgáltunk uvealis melanoma tumormintákat, mégsem tudtuk a HIF-1A és a VEGFA gének kulcs szerepét megerősíteni a daganat progressziójában és angiogenezisében a túlélés szempontjából. Ezen megfigyelésekből és a korábban vizsgált 18 uveális melanoma minta fokozott daganat őssejtmarker expressziójából kiindulva azt a felvetést tettük, hogy lehetséges-e, hogy a daganat őssejtek is kapcsolatban állnak egyéb jelátviteli folyamatokon keresztül az angiogenezisben kulcsszerepű génekkel uvealis melanoma tumorokban? Lehetséges-e, hogy a VEGFA gén expressziójának komplex jelátviteli útvonalaiba a daganat őssejtek által kifejezett receptorok is bekapcsolódnak, segítve ezzel a daganatsejtet az aktuális terápiás kezeléshez vagy épp a hematogén áttétképzéshez való alkalmazkodásban? Vizsgálataink további részében ezért az FZD6 daganat őssejtmarker szerepét vizsgáltuk a betegek túlélése tükrében, valamint expresszióját statisztikai módszerekkel összevetettük a tumorok HIF-1A és VEGFA expressziójával.

Az FZD6 expresszió és a betegek túlélése közötti kapcsolat vizsgálata céljából végzett Kaplan-Meier analízis nem mutatott szignifikáns összefüggést ($p=0,867$), ellenben a Spearman analízissel, mely szerint erős korreláció áll fenn az FZD6 és a VEGFA gének expressziója

között uvealis melanomás betegekben ($p= 0,004$). Ezzel ellentétben, az FZD6 és a HIF-1A között nem mutattunk ki szingifikáns korrelációt (Spearman analízis, $p= 0,672$) amely a gének szinkronizált expressziójára utalna. Amennyiben az uvealis melanoma mintákat sejttípusuk alapján (epiteloid, orsósejtes, kevert) külön ábrázoltuk a túlélési görbéken azok FZD6 expresszója és a betegek túlélésének figyelembe vételével, egy nem szignifikáns, de egyértelműen az epiteloid sejttípusú betegekhez társuló rosszabb prognózist mutattunk ki (Kaplan-Meier, $p= 0,541$, epiteloid sejttípus). Bár az eredmények ebben a vizsgálatban nem voltak szignifikánsak, figyelembe kell vennünk, hogy a sejttípus alapján készített külön kategóriákban olyan alacsony mitaszámú tumorok vizsgálatát végeztük el, hogy így az eredmények helytállóságát is megkérdőjelezhetjük ebben az analízisben (epiteloid sejttípus, $n= 16$). Hogy az FZD6 daganat őssejt marker, valamint a HIF-1A és a VEGFA angiogén faktorok daganat progressziójával való összefüggéseit is megvizsgáljuk Spearman analízist végeztünk a gének expressziója és a betegeknél tapasztalt nervus opticus és sclera infiltráció között. A vizsgálat kizárólag a HIF-1A és a sclera infiltrációja között mutatott szignifikáns összefüggést ($p= 0,042$, $n= 41$), a többi vizsgált paraméter között nem találtunk korrelációt. Eredményeink kiegészítéseként megvizsgáltuk a minták melanin pigment tartalma és a betegek túlélése közötti kapcsolatot is. A minták melanin tartalma és a betegek túlélési adatai alapján készített Kaplan-Meier túlélési analízis alapján az 1+ melanin expressziójú betegeknek a legkedvezőbb a túlélési esélyük, ellentétben a zéró expressziót vagy a magasabb melanin expressziót mutató tumorminták betegeivel.

7. Összefoglalás

Vizsgálataink fókuszába két olyan nagy mortalitású, gyakori repalszussal járó daganat LHRH peptid hormon alapú célzott terápiájának új lehetőségeit kívántuk feltérképezni, melyek eddig nem képezték meghatározó klinikai fázis vizsgálatok részét a vizsgált daganatok esetében. Kísérleti munkánk során igazoltuk a TCC hólyagkarcinómák és sejtvonalak LHRH-R és LHRH ligand expresszióját, mely negatív korrelációban áll a progressziót jelző tumorgrádussal. A szövetmintákon végzett radioligand kompetíciós assay alapján az AN-152, vagy akár a Cetrorelix is alkalmasak lehetnek a jövőben LHRH alapú célzott terápiák TCC daganatokon végzett *in vivo*, vagy klinikai fázis vizsgálataiban való alkalmazásra. További munkánk során igazoltuk az OCM3 sejtvonal LHRH-R expresszióját, majd megvizsgáltuk, hogy az AEZS-108 *in vitro* kezelés a DOX indukálta sejtpusztuláson kívül milyen az apoptózist támogató jelátviteli folyamatokat indukál OCM3 sejteken és azok mennyiben térnek el az ekvivalens dózisú DOX kezelés esetében tapasztaltaktól. Vizsgálataink során elsősorban az angiogenezisben és a migrációban részt vevő gének expressziós változásait helyeztük fókuszba. Eredményeink alapján, az AEZS-108 a DOX indukálta toxikus hatáson kívül hatékonyabban képes a MASPIN tumorszupresszor indukciójára, mint a szabad DOX, de az expressziót önmagában az LHRH ligand nem képes indukálni. Továbbá, az AEZS-108 kezelés hatással van számos angiogén faktor, illetve több a migrációban részt vevő gén expressziójára is. Az uvealis melanoma angiogenezisét érintő vizsgálatinkat a tumor szövetminták daganat őssejt tartalma és a vaszkularizációjuk szabályozása közötti összefüggések vizsgálatával folytattuk. Először RT-PCR-el igazoltuk daganat őssejtek fokozott jelenlétét a tumormintákban a nestin, NGFR, SOX10, FZD6 és PROM1 őssejtmarkerek vizsgálatával. IHC vizsgálataink alapján végzett Spearman analízis szerint szignifikáns korreláció figyelhető meg a tumorminták FZD6 és VEGFA expressziója között. A statisztikai analízisek szerint sem a HIF-1A sem a VEGFA nem állt szignifikáns összefüggésben a betegek túlélésével.

8. Summary

In our study we aimed to support the development of targeted therapeutic strategies focusing on LHRH-R positive tumors with high mortality and recurrence rate. In our first study we demonstrated high rate of expression of LHRH-R and LHRH ligand in human specimens with TCC type of bladder cancers and in bladder cancer cell lines. The expression of LHRH-R showed negative correlation with TCC grade. Radioligand binding studies also showed the presence of specific LHRH-Rs and high binding affinity of LHRH analogs like AN-152 or Cetrorelix. In our further study we investigated the LHRH-R expression of UM cancers and the altered expression of regulatory factors related to angiogenesis and metastasis by *in vitro* treatments with AEZS-108 or equal dose of DOX. Our analysis revealed that AEZS-108 is a more potent inducer of MASPIN tumor suppressor than free DOX in OCM3 cells and free LHRH ligand is not able to induce its overexpression. Furthermore, the treatment with AEZS-108 altered the expression of many angiogenic factors e.g. VEGFA, VEGFB, HIF-1A, ANGPT1, ANGPTL3 and of key regulators of migration e.g. CXCR4, ETS1 and SERPINE1. In the last part of our studies, we investigated the regulation of angiogenesis in uveal melanoma in correlation with the presence of cancer stem cells (CSCs). RT-PCR analysis showed high expression of CSC markers, particularly nestin, FZD6 and SOX10 and somewhat lower expression of NGFR and PROM1. The protein expression of FZD6, HIF-1A and VEGFA was further evaluated in 52 uveal melanoma specimens by IHC-TMA. We report for the first time that Spearman analysis showed a significant correlation between FZD6 and VEGFA expression in uveal melanoma. The observed correlation between FZD6 and VEGFA suggests the presence of CSCs in UM that are associated with the vascularization process. Surprisingly, statistical analyses showed no correlations between the overall survival and expression of HIF-1A or VEGFA, despite targeting angiogenesis, often be assumed to be a promising way to treat a densely vascularized UM tumors.

9. Tárgyszavak

humán uvealis melanoma, human uveal melanoma

célzott daganatterápia, targeted cancer therapy

citotoxikus LHRH analóg AN-152 (AEZS-108), cytotoxic LHRH analog AN-152 (AEZS-108)

luteinizáló hormon-felszabadító hormon receptor (LHRH-R), luteinizing hormone-releasing hormone receptor (LHRH-R)

daganat őssejtek, cancer stem cells (CSCs)

angiogenezis- angiogenesis

hámeredetű átmeneti-sejtes húgyhólyag karcinóma (TCC) - transitional cell carcinoma (TCC)

type of bladder cancer

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Halmos Gábornak (DE GYTK Biofarmácia Tanszék) hogy doktori munkámat mindvégig támogatta, motivált, minden feltételt biztosított számomra a kísérletek elvégzéséhez, publikálásához és a disszertációm elkészítéséhez. Köszönettel tartozom Dr. Treszl Andreának, aki elindított a kutatói pályán, de sajnos doktoranduszi éveim elején súlyos betegség következtében elhunyt. Kettőjük emberi és szakmai támogatása nélkül ez a dolgozat nem születhetett volna meg. További köszönettel tartozom a Biofarmácia Tanszék minden dolgozójának, kiemelve Dr. Szabó Zsuzsannát, hogy támogattak a mindennapi munkában, doktori munkám elkészítésében, s szakmai támogatásuk mellett barátságukat is adták számomra.

Köszönetet mondanék minden társszerzőnknek, külön kiemelve a DE KK Szemklinika országos területi ellátási kötelezettségű Tumor szakrendelését és munkatársait, mint Dr. Damjanovich Juditot, Dr. Surányi Évát, továbbá Dr. Steiber Zitát. Külön köszönettel tartozom a DE KK Urológiai Klinikáról Dr. Flaskó Tibornak és Dr. Szegedi Krisztiánnak, hogy segítségünkre voltak a humán daganatos szövetminták és klinikopatológiai adataik gyűjtésében.

Megtiszteltetés volt a Nobel-díjas Prof. Andrew V. Schally-vel, mint kollaborációs partnerrel együttműködni, külön köszönet számára a munkánk támogatásáért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak. Kisfiam, férjem és szüleink türelme, bátorítása és odaadó támogatása mindig erőt adott számomra a folytatáshoz.

Köszönettel tartozunk pályázati támogatóinknak a munka anyagi támogatásáért:

- (OTKA) K 81596 (H.G.), „Rosszindulatú daganatokban expresszáldó luteinizáló hormon- releasing hormon receptorok, mint új molekuláris célpontok a pozitron emissziós tomográfia számára”
- TAMOP 4.2.2.A- 11/1/KONV-2012-0025 (H.G.), Molekuláris Onkológia
- TAMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 (H.G.) Kutató Egyetemi Projekt
- GINOP-2.3.2-15-2016-00043 (H.G.), Szív és érutatási kiválóságközpont (IRONHEART)
- TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001” Nemzeti Kiválóság Program” (M-F.K.),
- Richter Gedeon Talentum Alapítvány (M-F.K.),
- EFOP-3.6.1-16-2016-00022 (H.G.)
- NKFIH-1150-6/219 (H.G.) Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja
- TKP2020-IKA-04 (H.G.), Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja

A projektek az Európai Unió támogatásával, a Magyar Állam és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

11. Irodalomjegyzék

1. Engel JB, Tinneberg HR, Rick FG, Berkes E, Schally AV: **Targeting of Peptide Cytotoxins to LHRH Receptors For Treatment of Cancer**. *Current drug targets* 2016, **17**(5):488-494.
2. Schally AV, Engel JB, Emons G, Block NL, Pinski J: **Use of analogs of peptide hormones conjugated to cytotoxic radicals for chemotherapy targeted to receptors on tumors**. *Current drug delivery* 2011, **8**(1):11-25.
3. Schally AV, Nagy A: **Chemotherapy targeted to cancers through tumoral hormone receptors**. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2004, **15**(7):300-310.
4. Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T: **Gonadotropin-releasing hormone receptor in gynecologic tumors. Frequent expression in adenocarcinoma histologic types**. *Cancer* 1994, **74**(9):2555-2561.
5. Gaiser T, Ruschoff J, Schally AV, Keller G, Engel JB: **[Receptors for luteinizing hormone releasing hormone expressed on melanoma, renal cell carcinoma and non Hodgkin lymphoma can be used for targeted chemotherapy with cytotoxic luteinizing hormone releasing hormone analogues]**. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 2006, **90**:186-192.
6. Mezo G, Manea M: **Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones**. *Expert opinion on drug delivery* 2010, **7**(1):79-96.
7. Murányi J, Varga A, Gyulavári P, Péntes K, Németh CE, Csala M, Pethő L, Csámpai A, Halmos G, Peták I *et al*: **Novel Crizotinib-GnRH Conjugates Revealed the Significance of Lysosomal Trapping in GnRH-Based Drug Delivery Systems**. *International journal of molecular sciences* 2019, **20**(22).
8. Buchholz S, Seitz S, Schally AV, Engel JB, Rick FG, Szalontay L, Hohla F, Krishan A, Papadia A, Gaiser T *et al*: **Triple-negative breast cancers express receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and respond to LHRH antagonist cetrorelix with growth inhibition**. *International journal of oncology* 2009, **35**(4):789-796.
9. Harrison GS, Wierman ME, Nett TM, Glode LM: **Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in normal and malignant cells**. *Endocrine-related cancer* 2004, **11**(4):725-748.
10. Krebs LJ, Wang X, Nagy A, Schally AV, Prasad PN, Liebow C: **A conjugate of doxorubicin and an analog of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone shows increased efficacy against oral and laryngeal cancers**. *Oral oncology* 2002, **38**(7):657-663.
11. Sion-Vardi N, Kaneti J, Segal-Abramson T, Giat J, Levy J, Sharoni Y: **Gonadotropin-releasing hormone specific binding sites in normal and malignant renal tissue**. *The Journal of urology* 1992, **148**(5):1568-1570.
12. Mező G, Dókus L, Schlosser G, Lajkó E, Szász Z, Randelović I, Biri-Kovács B, Tóvári J, Kőhidai L: **[Comparison of therapeutic peptides targeting pancreatic cancer]**. *Magyar onkologia* 2019, **63**(4):301-308.
13. Pethő L, Murányi J, Péntes K, Gurbi B, Brauswetter D, Halmos G, Csík G, Mező G: **Suitability of GnRH Receptors for Targeted Photodynamic Therapy in Head and Neck Cancers**. *International journal of molecular sciences* 2019, **20**(20).
14. Singh AD, Turell ME, Topham AK: **Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival**. *Ophthalmology* 2011, **118**(9):1881-1885.

15. Jager MJ, Shields CL, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH, Grossniklaus HE, Stern MH, Carvajal RD, Belfort RN, Jia R, Shields JA *et al*: **Uveal melanoma**. *Nature reviews Disease primers* 2020, **6**(1):24.
16. Shields CL, Furuta M, Thangappan A, Nagori S, Mashayekhi A, Lally DR, Kelly CC, Rudich DS, Nagori AV, Wakade OA *et al*: **Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes**. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 2009, **127**(8):989-998.
17. Damato B: **Does ocular treatment of uveal melanoma influence survival?** *British journal of cancer* 2010, **103**(3):285-290.
18. Tarlan B, Kıratlı H: **Uveal Melanoma: Current Trends in Diagnosis and Management**. *Turkish Journal of Ophthalmology* 2016, **46**(3):123-137.
19. Treszl A, Steiber Z, Schally AV, Block NL, Dezso B, Olah G, Rozsa B, Fodor K, Buglyo A, Gardi J *et al*: **Substantial expression of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor type I in human uveal melanoma**. *Oncotarget* 2013, **4**(10):1721-1728.
20. Sipos E, Dobos N, Rozsa D, Fodor K, Olah G, Szabo Z, Szekvolgyi L, Schally AV, Halmos G: **Characterization of luteinizing hormone-releasing hormone receptor type I (LH-RH-I) as a potential molecular target in OCM-1 and OCM-3 human uveal melanoma cell lines**. *OncoTargets and therapy* 2018, **11**:933-941.
21. Olah G, Dobos N, Vamosi G, Szabo Z, Sipos E, Fodor K, Harda K, Schally AV, Halmos G: **Experimental therapy of doxorubicin resistant human uveal melanoma with targeted cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog (AN-152)**. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2018, **123**:371-376.
22. el Filali M, Ly LV, Luyten GP, Versluis M, Grossniklaus HE, van der Velden PA, Jager MJ: **Bevacizumab and intraocular tumors: an intriguing paradox**. *Molecular vision* 2012, **18**:2454-2467.
23. Onken MD, Ehlers JP, Worley LA, Makita J, Yokota Y, Harbour JW: **Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas**. *Cancer research* 2006, **66**(9):4602-4609.
24. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW: **Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death**. *Cancer research* 2004, **64**(20):7205-7209.
25. Chang SH, Worley LA, Onken MD, Harbour JW: **Prognostic biomarkers in uveal melanoma: evidence for a stem cell-like phenotype associated with metastasis**. *Melanoma research* 2008, **18**(3):191-200.
26. Ekström EJ, Bergenfelz C, von Bülow V, Serifler F, Carlemalm E, Jönsson G, Andersson T, Leandersson K: **WNT5A induces release of exosomes containing pro-angiogenic and immunosuppressive factors from malignant melanoma cells**. *Molecular cancer* 2014, **13**:88.
27. Danen EH, de Vries TJ, Morandini R, Ghanem GG, Ruiters DJ, van Muijen GN: **E-cadherin expression in human melanoma**. *Melanoma research* 1996, **6**(2):127-131.
28. Hanna KS: **Updates and novel treatments in urothelial carcinoma**. *Journal of oncology pharmacy practice : official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners* 2019, **25**(3):648-656.
29. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A: **Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries**. *CA: a cancer journal for clinicians* 2018, **68**(6):394-424.

30. Volpe A, Racioppi M, D'Agostino D, D'Addessi A, Marangi F, Totaro A, Pinto F, Sacco E, Battaglia S, Chiloiro G *et al*: **Advanced bladder cancer: new agents and new approaches. A review.** *Urologic oncology* 2013, **31**(1):9-16.
31. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA: a cancer journal for clinicians* 2011, **61**(2):69-90.
32. Tanaka T, Miyazawa K, Tsukamoto T, Kuno T, Suzuki K: **Pathobiology and chemoprevention of bladder cancer.** *Journal of oncology* 2011, **2011**:528353.
33. Serrano C, Morales R, Suárez C, Núñez I, Valverde C, Rodón J, Humbert J, Padrós O, Carles J: **Emerging therapies for urothelial cancer.** *Cancer treatment reviews* 2012, **38**(4):311-317.
34. Lei AQ, Cheng L, Pan CX: **Current treatment of metastatic bladder cancer and future directions.** *Expert review of anticancer therapy* 2011, **11**(12):1851-1862.
35. van den Bosch T, Kilic E, Paridaens D, de Klein A: **Genetics of uveal melanoma and cutaneous melanoma: two of a kind?** *Dermatology research and practice* 2010, **2010**:360136.
36. Al-Jamal RT, Cassoux N, Desjardins L, Damato B, Konstantinidis L, Coupland SE, Heimann H, Petrovic A, Zografos L, Schalenbourg A *et al*: **The Pediatric Choroidal and Ciliary Body Melanoma Study: A Survey by the European Ophthalmic Oncology Group.** *Ophthalmology* 2016, **123**(4):898-907.
37. Nayman T, Bostan C, Logan P, Burnier MN, Jr.: **Uveal Melanoma Risk Factors: A Systematic Review of Meta-Analyses.** *Current eye research* 2017, **42**(8):1085-1093.
38. Guénel P, Laforest L, Cyr D, Févotte J, Sabroe S, Dufour C, Lutz JM, Lynge E: **Occupational risk factors, ultraviolet radiation, and ocular melanoma: a case-control study in France.** *Cancer causes & control : CCC* 2001, **12**(5):451-459.
39. Shah CP, Weis E, Lajous M, Shields JA, Shields CL: **Intermittent and chronic ultraviolet light exposure and uveal melanoma: a meta-analysis.** *Ophthalmology* 2005, **112**(9):1599-1607.
40. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, Council ML, Matatall KA, Helms C, Bowcock AM: **Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas.** *Science (New York, NY)* 2010, **330**(6009):1410-1413.
41. Damato EM, Damato BE: **Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients.** *Ophthalmology* 2012, **119**(8):1582-1589.
42. **Accuracy of diagnosis of choroidal melanomas in the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 1.** *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill : 1960)* 1990, **108**(9):1268-1273.
43. Yang H, Cao J, Grossniklaus HE: **Uveal Melanoma Metastasis Models.** *Ocular oncology and pathology* 2015, **1**(3):151-160.
44. Dopierala J, Damato BE, Lake SL, Taktak AF, Coupland SE: **Genetic heterogeneity in uveal melanoma assessed by multiplex ligation-dependent probe amplification.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2010, **51**(10):4898-4905.
45. Torres V, Triozzi P, Eng C, Tubbs R, Schoenfield L, Crabb JW, Sauntharajah Y, Singh AD: **Circulating tumor cells in uveal melanoma.** *Future oncology (London, England)* 2011, **7**(1):101-109.
46. Singh AD: **Uveal melanoma: implications of tumor doubling time.** *Ophthalmology* 2001, **108**(5):829-831.
47. Carvajal RD, Schwartz GK, Tezel T, Marr B, Francis JH, Nathan PD: **Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects.** *The British journal of ophthalmology* 2017, **101**(1):38-44.

48. Pons F, Plana M, Caminal JM, Pera J, Fernandes I, Perez J, Garcia-Del-Muro X, Marcoval J, Penin R, Fabra A *et al*: **Metastatic uveal melanoma: is there a role for conventional chemotherapy? - A single center study based on 58 patients.** *Melanoma research* 2011, **21**(3):217-222.
49. Kaliki S, Shields CL: **Uveal melanoma: relatively rare but deadly cancer.** *Eye (London, England)* 2017, **31**(2):241-257.
50. Augsburger JJ, Correa ZM, Shaikh AH: **Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma.** *American journal of ophthalmology* 2009, **148**(1):119-127.
51. Coleman K, Baak JP, Van Diest P, Mullaney J, Farrell M, Fenton M: **Prognostic factors following enucleation of 111 uveal melanomas.** *The British journal of ophthalmology* 1993, **77**(11):688-692.
52. Versluis M, de Lange MJ, van Pelt SI, Ruivenkamp CA, Kroes WG, Cao J, Jager MJ, Luyten GP, van der Velden PA: **Digital PCR validates 8q dosage as prognostic tool in uveal melanoma.** *PloS one* 2015, **10**(3):e0116371.
53. Sipos E, Hegyi K, Treszl A, Steiber Z, Mehes G, Dobos N, Fodor K, Olah G, Szekvolgyi L, Schally AV *et al*: **Concurrence of chromosome 3 and 4 aberrations in human uveal melanoma.** *Oncology reports* 2017, **37**(4):1927-1934.
54. Keilholz U, Goldin-Lang P, Bechrakis NE, Max N, Letsch A, Schmittl A, Scheibenbogen C, Heufelder K, Eggermont A, Thiel E: **Quantitative detection of circulating tumor cells in cutaneous and ocular melanoma and quality assessment by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004, **10**(5):1605-1612.
55. Burnier MN, Jr., McLean IW, Gamel JW: **Immunohistochemical evaluation of uveal melanocytic tumors. Expression of HMB-45, S-100 protein, and neuron-specific enolase.** *Cancer* 1991, **68**(4):809-814.
56. Naseripour M, Jaber R, Sedaghat A, Azma Z, Nojomi M, Falavarjani KG, Nazari H: **Ruthenium-106 brachytherapy for thick uveal melanoma: reappraisal of apex and base dose radiation and dose rate.** *Journal of Contemporary Brachytherapy* 2016, **8**(1):66-73.
57. Brewington BY, Shao YF, Davidorf FH, Cebulla CM: **Brachytherapy for patients with uveal melanoma: historical perspectives and future treatment directions.** *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* 2018, **12**:925-934.
58. Belaïd A, Nasr C, Jmour O, Cherif A, Kochbati L, Bouguila H, Besbes M, Benna F: **Brachytherapy of Uveal Melanomas with Ruthenium-106 Plaques.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP* 2016, **17**(12):5281-5285.
59. Foote RL, Stafford SL, Petersen IA, Pulido JS, Clarke MJ, Schild SE, Garces YI, Olivier KR, Miller RC, Haddock MG *et al*: **The clinical case for proton beam therapy.** *Radiation Oncology (London, England)* 2012, **7**:174.
60. Gündüz K, Karslıoğlu MZ, Köse K: **Primary Transpupillary Thermotherapy of Choroidal Melanocytic Lesions.** *Middle East African Journal of Ophthalmology* 2011, **18**(2):183-188.
61. van Straten D, Mashayekhi V, de Bruijn HS, Oliveira S, Robinson DJ: **Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions.** *Cancers* 2017, **9**(2).
62. Baggetto LG, Gambrelle J, Dayan G, Labialle S, Barakat S, Michaud M, Grange JD, Gayet L: **Major cytogenetic aberrations and typical multidrug resistance phenotype of uveal melanoma: current views and new therapeutic prospects.** *Cancer treatment reviews* 2005, **31**(5):361-379.

63. Nathan P, Cohen V, Coupland S, Curtis K, Damato B, Evans J, Fenwick S, Kirkpatrick L, Li O, Marshall E *et al*: **Uveal Melanoma UK National Guidelines**. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 2015, **51**(16):2404-2412.
64. Pereira PR, Odashiro AN, Lim LA, Miyamoto C, Blanco PL, Odashiro M, Maloney S, De Souza DF, Burnier MN, Jr.: **Current and emerging treatment options for uveal melanoma**. *Clinical ophthalmology (Auckland, NZ)* 2013, **7**:1669-1682.
65. Spagnolo F, Grosso M, Picasso V, Tornari E, Pesce M, Queirolo P: **Treatment of metastatic uveal melanoma with intravenous fotemustine**. *Melanoma research* 2013, **23**(3):196-198.
66. Rodriguez-Vidal C, Fernandez-Diaz D, Fernandez-Marta B, Lago-Baameiro N, Pardo M, Silva P, Paniagua L, Blanco-Teijeiro MJ, Piñeiro A, Bande M: **Treatment of Metastatic Uveal Melanoma: Systematic Review**. *Cancers* 2020, **12**(9).
67. Dummer R, Hauschild A, Guggenheim M, Keilholz U, Pentheroudakis G: **Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up**. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 2012, **23** Suppl 7:vii86-91.
68. Karivedu V, Eldessouki I, Taftaf A, Zhu Z, Makramalla A, Karim NA: **Nivolumab and Ipilimumab in the Treatment of Metastatic Uveal Melanoma: A Single-Center Experience**. *Case reports in oncological medicine* 2019, **2019**:3560640.
69. Zimmer L, Vaubel J, Mohr P, Hauschild A, Utikal J, Simon J, Garbe C, Herbst R, Enk A, Kämpgen E *et al*: **Phase II DeCOG-study of ipilimumab in pretreated and treatment-naïve patients with metastatic uveal melanoma**. *PloS one* 2015, **10**(3):e0118564.
70. Ho AL, Musi E, Ambrosini G, Nair JS, Deraje Vasudeva S, de Stanchina E, Schwartz GK: **Impact of combined mTOR and MEK inhibition in uveal melanoma is driven by tumor genotype**. *PloS one* 2012, **7**(7):e40439.
71. Sacco JJ, Nathan PD, Danson S, Lorigan P, Nicholson S, Ottensmeier C, Corrie P, Steven N, Goodman A, Larkin JMG *et al*: **Sunitinib versus dacarbazine as first-line treatment in patients with metastatic uveal melanoma**. *Journal of Clinical Oncology* 2013, **31**(15_suppl):9031-9031.
72. Yang H, Jager MJ, Grossniklaus HE: **Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma**. *Investigative ophthalmology & visual science* 2010, **51**(6):2835-2842.
73. Hussain RN, Heimann H, Damato B: **Neoadjuvant intravitreal ranibizumab treatment in high-risk ocular melanoma patients: a two-stage single-centre phase II single-arm study**. *Melanoma research* 2020, **30**(1):102-106.
74. Francis JH, Kim J, Lin A, Folberg R, Iyer S, Abramson DH: **Growth of Uveal Melanoma following Intravitreal Bevacizumab**. *Ocular oncology and pathology* 2017, **3**(2):117-121.
75. Tarhini AA, Frankel P, Margolin KA, Christensen S, Ruel C, Shipe-Spotloe J, Gandara DR, Chen A, Kirkwood JM: **Aflibercept (VEGF Trap) in inoperable stage III or stage iv melanoma of cutaneous or uveal origin**. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011, **17**(20):6574-6581.
76. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N: **VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism**. *Nature* 2002, **417**(6892):954-958.
77. Tura A, Pawlik VE, Rudolf M, Ernesti JS, Stutzer JN, Grisanti S, Ranjbar M: **Uptake of Ranibizumab but Not Bevacizumab into Uveal Melanoma Cells Correlates**

- with a Sustained Decline in VEGF-A Levels and Metastatic Activities.** *Cancers* 2019, **11**(6).
78. Jaszai J, Schmidt MHH: **Trends and Challenges in Tumor Anti-Angiogenic Therapies.** *Cells* 2019, **8**(9).
 79. Tabernero J: **The role of VEGF and EGFR inhibition: implications for combining anti-VEGF and anti-EGFR agents.** *Molecular cancer research : MCR* 2007, **5**(3):203-220.
 80. Wilson CM, McPhaul MJ: **A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues.** *Molecular and cellular endocrinology* 1996, **120**(1):51-57.
 81. Gwynn ES, Clark PE: **Bladder cancer.** *Current opinion in oncology* 2006, **18**(3):277-283.
 82. Tanaka MF, Sonpavde G: **Diagnosis and management of urothelial carcinoma of the bladder.** *Postgraduate medicine* 2011, **123**(3):43-55.
 83. Sharma S, Ksheersagar P, Sharma P: **Diagnosis and treatment of bladder cancer.** *American family physician* 2009, **80**(7):717-723.
 84. Song D, Powles T, Shi L, Zhang L, Ingersoll MA, Lu YJ: **Bladder cancer, a unique model to understand cancer immunity and develop immunotherapy approaches.** *The Journal of pathology* 2019, **249**(2):151-165.
 85. Alifrangis C, McGovern U, Freeman A, Powles T, Linch M: **Molecular and histopathology directed therapy for advanced bladder cancer.** *Nature reviews Urology* 2019, **16**(8):465-483.
 86. Boorjian SA, Heemers HV, Frank I, Farmer SA, Schmidt LJ, Sebo TJ, Tindall DJ: **Expression and significance of androgen receptor coactivators in urothelial carcinoma of the bladder.** *Endocrine-related cancer* 2009, **16**(1):123-137.
 87. Kregge JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O: **Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(26):15677-15682.
 88. Rispoli LA, Nett TM: **Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression.** *Animal reproduction science* 2005, **88**(1-2):57-74.
 89. Schally AV, Nagy A: **Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors.** *European journal of endocrinology* 1999, **141**(1):1-14.
 90. Volker P, Grundker C, Schmidt O, Schulz KD, Emons G: **Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in human ovarian and endometrial cancers: frequency, autoregulation, and correlation with direct antiproliferative activity of luteinizing hormone-releasing hormone analogues.** *American journal of obstetrics and gynecology* 2002, **186**(2):171-179.
 91. Krebs LJ, Wang X, Nagy A, Schally AV, Prasad PN, Liebow C: **Bombesin and epidermal growth factor potentiate the effect of cytotoxic LH-RH analog AN-152 in vitro.** *International journal of oncology* 2002, **21**(6):1325-1329.
 92. Liebow C, Lee MT, Kamer AR, Schally AV: **Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone receptor binding by heterologous and autologous receptor-stimulated tyrosine phosphorylation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**(6):2244-2248.
 93. Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonowski A, Varga JL, Halmos G: **Hypothalamic hormones and cancer.** *Frontiers in neuroendocrinology* 2001, **22**(4):248-291.

94. Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ: **Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways.** *Endocrine reviews* 1994, **15**(4):462-499.
95. Ruf F, Fink MY, Sealfon SC: **Structure of the GnRH receptor-stimulated signaling network: insights from genomics.** *Frontiers in neuroendocrinology* 2003, **24**(3):181-199.
96. Kottler ML, Bergametti F, Carrè MC, Morice S, Decoret E, Lagarde JP, Starzec A, Counis R: **Tissue-specific pattern of variant transcripts of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene.** *European journal of endocrinology* 1999, **140**(6):561-569.
97. Fan NC, Peng C, Krisinger J, Leung PC: **The human gonadotropin-releasing hormone receptor gene: complete structure including multiple promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals.** *Molecular and cellular endocrinology* 1995, **107**(2):R1-8.
98. Flanagan CA, Manilall A: **Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Structure and GnRH Binding.** *Frontiers in endocrinology* 2017, **8**:274.
99. White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD: **Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(1):305-309.
100. Chen A, Kaganovsky E, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Okon E, Koch Y: **Two forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) are expressed in human breast tissue and overexpressed in breast cancer: a putative mechanism for the antiproliferative effect of GnRH by down-regulation of acidic ribosomal phosphoproteins P1 and P2.** *Cancer research* 2002, **62**(4):1036-1044.
101. Nagy A, Schally AV, Armatos P, Szepeshazi K, Halmos G, Kovacs M, Zarandi M, Groot K, Miyazaki M, Jungwirth A *et al*: **Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996, **93**(14):7269-7273.
102. Nagy A, Schally AV: **Targeting of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogs to breast, ovarian, endometrial, and prostate cancers.** *Biology of reproduction* 2005, **73**(5):851-859.
103. Schally AV, Nagy A: **New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin.** *Life sciences* 2003, **72**(21):2305-2320.
104. Engel J, Emons G, Pinski J, Schally AV: **AEZS-108 : a targeted cytotoxic analog of LHRH for the treatment of cancers positive for LHRH receptors.** *Expert opinion on investigational drugs* 2012, **21**(6):891-899.
105. Müller I, Niethammer D, Bruchelt G: **Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review).** *International journal of molecular medicine* 1998, **1**(2):491-494.
106. Kemp CJ, Sun S, Gurley KE: **p53 induction and apoptosis in response to radio- and chemotherapy in vivo is tumor-type-dependent.** *Cancer research* 2001, **61**(1):327-332.
107. Liu SV, Tsao-Wei DD, Xiong S, Groshen S, Dorff TB, Quinn DI, Tai YC, Engel J, Hawes D, Schally AV *et al*: **Phase I, dose-escalation study of the targeted cytotoxic LHRH analog AEZS-108 in patients with castration- and taxane-resistant prostate cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014, **20**(24):6277-6283.

108. Emons G, Gorchev G, Sehouli J, Wimberger P, Stahle A, Hanker L, Hilpert F, Sindermann H, Grundker C, Harter P: **Efficacy and safety of AEZS-108 (INN: zoptarelin doxorubicin acetate) an LHRH agonist linked to doxorubicin in women with platinum refractory or resistant ovarian cancer expressing LHRH receptors: a multicenter phase II trial of the ago-study group (AGO GYN 5).** *Gynecologic oncology* 2014, **133**(3):427-432.
109. Emons G, Sindermann H, Engel J, Schally AV, Gründker C: **Luteinizing hormone-releasing hormone receptor-targeted chemotherapy using AN-152.** *Neuroendocrinology* 2009, **90**(1):15-18.
110. Emons G, Kaufmann M, Gorchev G, Tsekova V, Grundker C, Gunthert AR, Hanker LC, Velikova M, Sindermann H, Engel J *et al*: **Dose escalation and pharmacokinetic study of AEZS-108 (AN-152), an LHRH agonist linked to doxorubicin, in women with LHRH receptor-positive tumors.** *Gynecologic oncology* 2010, **119**(3):457-461.
111. Rékási Z, Szöke B, Nagy A, Groot K, Rékási ES, Schally AV: **Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs containing cytotoxic radicals on the function of rat pituitary cells: tests in a long term superfusion system.** *Endocrinology* 1993, **132**(5):1991-2000.
112. Letsch M, Schally AV, Szepeshazi K, Halmos G, Nagy A: **Preclinical evaluation of targeted cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analogue AN-152 in androgen-sensitive and insensitive prostate cancers.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2003, **9**(12):4505-4513.
113. Bahk JY, Kim MO, Park MS, Lee HY, Lee JH, Chung BC, Min SK: **Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in bladder cancer epithelia and GnRH effect on bladder cancer cell proliferation.** *Urologia internationalis* 2008, **80**(4):431-438.
114. Szepeshazi K, Schally AV, Keller G, Block NL, Benten D, Halmos G, Szalontay L, Vidaurre I, Jaszberenyi M, Rick FG: **Receptor-targeted therapy of human experimental urinary bladder cancers with cytotoxic LH-RH analog AN-152 [AEZS- 108].** *Oncotarget* 2012, **3**(7):686-699.
115. Kalirai H, Damato BE, Coupland SE: **Uveal melanoma cell lines contain stem-like cells that self-renew, produce differentiated progeny, and survive chemotherapy.** *Investigative ophthalmology & visual science* 2011, **52**(11):8458-8466.
116. Djirackor L, Shakir D, Kalirai H, Petrovski G, Coupland SE: **Nestin expression in primary and metastatic uveal melanoma - possible biomarker for high-risk uveal melanoma.** *Acta ophthalmologica* 2018, **96**(5):503-509.
117. Schatton T, Frank MH: **Cancer stem cells and human malignant melanoma.** *Pigment cell & melanoma research* 2008, **21**(1):39-55.
118. Dick JE: **Looking ahead in cancer stem cell research.** *Nature biotechnology* 2009, **27**(1):44-46.
119. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y: **Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis.** *Cell research* 2007, **17**(1):3-14.
120. Dai W, Zhou J, Jin B, Pan J: **Class III-specific HDAC inhibitor Tenovin-6 induces apoptosis, suppresses migration and eliminates cancer stem cells in uveal melanoma.** *Scientific reports* 2016, **6**:22622.
121. Valyi-Nagy K, Kormos B, Ali M, Shukla D, Valyi-Nagy T: **Stem cell marker CD271 is expressed by vasculogenic mimicry-forming uveal melanoma cells in three-dimensional cultures.** *Molecular vision* 2012, **18**:588-592.

122. Thill M, Berna MJ, Grierson R, Reinhart I, Voelkel T, Piechaczek C, Galambos P, Jager MJ, Richard G, Lange C *et al*: **Expression of CD133 and other putative stem cell markers in uveal melanoma.** *Melanoma research* 2011, **21**(5):405-416.
123. Osada T, Sakamoto M, Ino Y, Iwamatsu A, Matsuno Y, Muto T, Hirohashi S: **E-cadherin is involved in the intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology (Baltimore, Md)* 1996, **24**(6):1460-1467.
124. Tomlinson JS, Alpaugh ML, Barsky SH: **An intact overexpressed E-cadherin/alpha,beta-catenin axis characterizes the lymphovascular emboli of inflammatory breast carcinoma.** *Cancer research* 2001, **61**(13):5231-5241.
125. Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT: **Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways.** *Oncogene* 1999, **18**(55):7860-7872.
126. Rao TP, Kühl M: **An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more.** *Circulation research* 2010, **106**(12):1798-1806.
127. Vaughan AE, Halbert CL, Wootton SK, Miller AD: **Lung cancer in mice induced by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is not maintained by rare cancer stem cells, but tumorigenicity does correlate with Wnt pathway activation.** *Molecular cancer research : MCR* 2012, **10**(1):86-95.
128. Pacheco-Pinedo EC, Durham AC, Stewart KM, Goss AM, Lu MM, Demayo FJ, Morrissey EE: **Wnt/ β -catenin signaling accelerates mouse lung tumorigenesis by imposing an embryonic distal progenitor phenotype on lung epithelium.** *The Journal of clinical investigation* 2011, **121**(5):1935-1945.
129. Dijksterhuis JP, Petersen J, Schulte G: **WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3.** *British journal of pharmacology* 2014, **171**(5):1195-1209.
130. Katoh M: **WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review).** *Oncology reports* 2005, **14**(6):1583-1588.
131. Yang DH, Yoon JY, Lee SH, Bryja V, Andersson ER, Arenas E, Kwon YG, Choi KY: **Wnt5a is required for endothelial differentiation of embryonic stem cells and vascularization via pathways involving both Wnt/beta-catenin and protein kinase Calpha.** *Circulation research* 2009, **104**(3):372-379.
132. Goodwin AM, Sullivan KM, D'Amore PA: **Cultured endothelial cells display endogenous activation of the canonical Wnt signaling pathway and express multiple ligands, receptors, and secreted modulators of Wnt signaling.** *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2006, **235**(11):3110-3120.
133. Masckauchán TN, Agalliu D, Vorontchikhina M, Ahn A, Parmalee NL, Li CM, Khoo A, Tycko B, Brown AM, Kitajewski J: **Wnt5a signaling induces proliferation and survival of endothelial cells in vitro and expression of MMP-1 and Tie-2.** *Molecular biology of the cell* 2006, **17**(12):5163-5172.
134. Cheng CW, Yeh JC, Fan TP, Smith SK, Charnock-Jones DS: **Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration.** *Biochemical and biophysical research communications* 2008, **365**(2):285-290.
135. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC: **Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia.** *Cancer research* 2001, **61**(16):6050-6054.
136. Yao L, Sun B, Zhao X, Zhao X, Gu Q, Dong X, Zheng Y, Sun J, Cheng R, Qi H *et al*: **Overexpression of Wnt5a promotes angiogenesis in NSCLC.** *BioMed research international* 2014, **2014**:832562.

137. Popovics P, Schally AV, Szalontay L, Block NL, Rick FG: **Targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), AEZS-108 (AN-152), inhibits the growth of DU-145 human castration-resistant prostate cancer in vivo and in vitro through elevating p21 and ROS levels.** *Oncotarget* 2014, **5**(12):4567-4578.
138. Halmos G, Arencibia JM, Schally AV, Davis R, Bostwick DG: **High incidence of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH receptor gene expression in human prostate cancers.** *The Journal of urology* 2000, **163**(2):623-629.
139. Rozsa B, Nadji M, Schally AV, Dezso B, Flasko T, Toth G, Mile M, Block NL, Halmos G: **Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in benign prostatic hyperplasia (BPH) as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist cetrorelix.** *The Prostate* 2011, **71**(5):445-452.
140. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G: **LH-RH receptors in human colorectal cancers: unexpected molecular targets for experimental therapy.** *International journal of oncology* 2007, **30**(6):1485-1492.
141. Schally AV, Szepeshazi K, Nagy A, Comaru-Schally AM, Halmos G: **New approaches to therapy of cancers of the stomach, colon and pancreas based on peptide analogs.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2004, **61**(9):1042-1068.

12. Fűggelék



Nyilvántartási szám: DEENK/75/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Molnár-Fodor Klára
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10044184

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Szabó, Z., Dezső, B., **Molnár-Fodor, K.**, Szegedi, K., Flaskó, T., Szabó, E., Oláh, G., Sipos, É., Dobos, N., Gardi, J., Schally, A. V., Halmos, G.: Expression of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) and Type-I LHRH Receptor in Transitional Cell Carcinoma Type of Human Bladder Cancer.
Molecules. 26 (5), 1-14, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules26051253>
IF: 3.267 (2019)
2. **Molnár-Fodor, K.**, Sipos, É., Dobos, N., Nagy, J., Steiber, Z., Méhes, G., Dull, K., Székvölgyi, L., Schally, A. V., Halmos, G.: Correlation between the Expression of Angiogenic Factors and Stem Cell Markers in Human Uveal Melanoma.
Life (Basel). 10 (12), 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life10120310>
IF: 2.991 (2019)
3. **Molnár-Fodor, K.**, Dobos, N., Schally, A. V., Steiber, Z., Oláh, G., Sipos, É., Székvölgyi, L., Halmos, G.: The targeted LHRH analog AEZS-108 alters expression of genes related to angiogenesis and development of metastasis in uveal melanoma.
Oncotarget. 11 (2), 175-187, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.27431>

További közlemények

4. Sipos, É., Dobos, N., Rózsa, D., **Molnár-Fodor, K.**, Oláh, G., Szabó, Z., Székvölgyi, L., Schally, A. V., Halmos, G.: Characterization of Luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH-I) receptor type I as a potential molecular target in OCM-1 and OCM-3 human uveal melanoma cell lines.
OncoTargets Ther. 11, 933-941, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/OTT.S148174>
IF: 3.046





5. 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
6. 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
7. Sipos, É., Dull, K., Treszl, A., Steiber, Z., Méhes, G., Dobos, N., **Molnár-Fodor, K.**, Oláh, G., Székvölgyi, L., Schally, A. V., Halmos, G.: Concurrence of chromosome 3 and 4 aberrations in human uveal melanoma.
Oncol. Rep. 37, 1927-1934, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/or.2017.5496>
IF: 2.976
8. **Molnár-Fodor, K.**: Az AN-152 (AEZS-108) célzott daganatterápiás készítmény hatásmechanizmusának vizsgálata.
In: "A mi tendenciáink..." Szakkollégiumi Tanulmányok, 2. : Hatvani István Szakkollégium Debreceni Egyetem Tudományegyetemi Karok. Szerk.: Dorogi Zoltán, Uri Dénes Mihály, Debreceni Egyetem Tudományegyetemi Karok Hatvani István Szakkollégiuma, Debrecen, 161-168, 2013, 2063-6059
9. Treszl, A., Steiber, Z., Schally, A. V., Block, N. L., Dezső, B., Oláh, G., Rózsa, B., **Molnár-Fodor, K.**, Buglyó, A., Gardi, J., Berta, A., Halmos, G.: Substantial expression of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) receptor type I in human uveal melanoma.
Oncotarget. 4 (10), 1721-1728, 2013.
IF: 6.627

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 25,499

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,258

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

Debrecen, 2021.03.01.



publikált absztraktok:

Klára Fodor, Nikoletta Dobos, János Nagy, Gábor Méhes, Gábor Halmos: Correlations between the expression of angiogenic factors and stem cell markers in human uveal melanoma. 4th National Conference of Young Biotechnologists (FIBOK, Medical Biotechnology Section, 12 November 2020, online conference, Poszter díj: 1. helyezés

Klára Fodor, Éva Sipos, Nikoletta Dobos, János Nagy, Zita Steiber³, Andrea Okos, Andrea Treszl †, Gábor Méhes, Gábor Halmos: The investigation of cancer stem cells in human uveal melanoma. BBBB Gyógyszerésztudományi Nemzetközi Konferencia 2017. október 05., Acta Pharmaceutica 7th BBBB Edition

Klára Fodor, Éva Sipos, Nikoletta Dobos, János Nagy, Zita Steiber³, Andrea Okos, Andrea Treszl †, Gábor Méhes, Gábor Halmos: The investigation of cancer stem cells in human uveal melanoma.: Magyar Onkológusok XXXII. Konferenciája 2017. Nov. 16-18. Magyar Onkológia 61, évf, 1. Szuppl.

Fodor Klára, Treszl Andrea, Steiber Zita, Halmos Gábor: A doxorubicin és a célzott daganatterápiára fejlesztés alatt álló, doxorubicinnel konjugált LHRH-analóg AN-152 (AEZS-108) hatásmechanizmusának összehasonlítása humán uvealis melanoma sejtekben., 2015. november, Magyar Onkológia, 59. évf., 1. Szupplementum, 16. oldal

Fodor K, Steiber Z, Halmos G, Treszl A: Van-e jelentősége a sorrendiségnek a célzott terápiás angiogenezis gátló készítmények és a citosztatikumok együttes alkalmazása esetén?, 2014. november, Klinikai Onkológia, 1. évfolyam, 1. különszám, 43. oldal

Fodor K, Treszl A, Steiber Z, Schally AV, Halmos G: The mechanism of action of targeted cytotoxic LHRH analog AN-152 (AEZS-108) in human uveal melanoma cells poszter absztrakt. International Journal of Molecular Medicine, Volume 32, Supplement 1, 2013, page S43. ISSN 1107-3756, eISSN 1791-244X, The 18th world congress on advances in oncology and 16th International symposium on molecular medicine, Görögország, 2013. Október 10-12. Poszter prezentáció

Treszl Andrea, Fodor Klára, Steiber Zita, Szántó János, Halmos Gábor: „A célzott daganatterápiára kifejlesztett citotoxikus LHRH analóg AN-152 (AEZS-108) hatásmechanizmusának vizsgálata uvealis melanoma sejteken” poszter absztrakt. Orvostovábbképző szemle, 2012. novemberi különszám, 67. oldal, P139.

Brunyánszki A, Szántó M, Fodor K, Sandt C, P Dumas, Bai P: Investigation of protein acetylation and poly(ADP-ribosyl)ation by synchrotron FTIR microspectroscopy., August 2011., *Biokémia*, XXXV. évf. 3. 22. 28-31

konferencia előadások:

Fodor Klára, Dobos Nikoletta, Nagy János, Dull Kata, Méhes Gábor, Schally V. Andrew, Halmos Gábor: A daganat őssejtek és a vaszkularizációs faktorok expressziója közötti összefüggések vizsgálata humán uvealis melanoma szövetmintákon. Magyar Klinikai Farmakológusok XVIII. Továbbképző napok, 2020. december 03-05., online konferencia

Klára Fodor, Nikoletta Dobos, Andrew V. Schally, Zita Steiber, Gábor Halmos: The targeted LHRH analog AEZS-108 alters expression of genes related to angiogenesis and development of metastasis in uveal melanoma. 4th National Conference of Young Biotechnologists (FIBOK, Medical Biotechnology Section, 12 November 2020, online conference

Fodor Klára, Dobos Nikoletta, Steiber Zita, Andrew V. Schally, Halmos Gábor: Célzott daganatterápiás készítmények hatása az angiogenezisben részt vevő gének expressziójára humán uvealis melanoma sejtvonalon. Magyar Klinikai Farmakológusok XVII. Továbbképző napok, 2019. december 05-07.

Fodor Klára, Dobos Nikoletta, Steiber Zita, Andrew V. Schally, Halmos Gábor: Célzott daganatterápiás készítmények hatása az angiogenezisben részt vevő gének expressziójára humán uvealis melanoma sejtvonalon. GINOP-2.3.2-15-2016-00043 Szív- és Érkutatási Kiválóságközpont (IRONHEART) Tudományos ülése, Debrecen, 2019.november 07.

Fodor Klára, Dobos Nikoletta, Hegyi Katalin, Steiber Zita, Sipos Éva, Tóth Anita, Okos Andrea, Treszl Andrea, Halmos Gábor: A daganat őssejtek és a vaszkularizációs faktorok expressziója közötti összefüggések vizsgálata humán uvealis melanoma szövetmintákon. Magyar Klinikai Farmakológusok XVIII. Továbbképző napok, Debrecen, 2016.december 8-10.

Fodor Klára, Treszl Andrea, Steiber Zita, Halmos Gábor: A célzott daganatterápiára kifejlesztett citotoxikus LHRH analóg AN-152 (AEZS-108) hatásmechanizmusának vizsgálata humán uvealis melanoma sejteken. VII. Magyar Sejtanalitikai Konferencia, Budapest, 2015. szeptember 3-5. Poszter bemutató, 1. helyezett poszterdíj.

Fodor K, Treszl A, Steiber Z, Schally AV, Halmos G: The mechanism of action of targeted cytotoxic LHRH analog AN-152 (AEZS-108) in human uveal melanoma cells poszter

absztrakt. International Journal of Molecular Medicine, Volume 32, Supplement 1, 2013, page S43. ISSN 1107-3756, eISSN 1791-244X, The 18th world congress on advances in oncology and 16th International symposium on molecular medicine, Görögország, 2013.Október10-12.

Poszter prezentáció

egyetemi jegyzetek:

Dr. Halmos Gábor: Válogatott fejezetek a gyógyszerészi bioanalitikából, V. fejezet: PCR. Egyetemi jegyzet magyar nyelven. 2015. 01. 31.

Dr. Halmos Gábor: Selected chapters of pharmaceutical bioanalytical methods, V. chapter: PCR. Egyetemi jegyzet angol nyelven. 2015. 01. 31.