

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**HISZTAMIN ANTAGONISTÁK HATÁSA A HUMÁN
MELANOMA MALIGNUM PROGRESSZIÓJÁRA
SCID EGEREK BEN**

DR. SZINC SÁK NÓRA



**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS– ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ÁLTALÁNOS ORVOSI KAR
BŐR- ÉS NEMIKÓRTANI KLINIKA
DEBRECEN, 2007.**

**HISZTAMIN ANTAGONISTÁK HATÁSA A HUMÁN
MELANOMA MALIGNUM PROGRESSZIÓJÁRA
SCID EGEREK BEN**

DR. SZINC SÁK NÓRA

Témavezető: Dr. Juhász István egyetemi docens

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS– ÉS EGÉ SZSÉG TUDOMÁ NYI CENTRUM
ÁLTALÁN OS ORVOSI KAR
BŐR- ÉS NEMIKÓ RTANI KLINIKA
DEBRECEN, 2007.**

I. BEVEZETÉS

A melanoma malignum gyakoriságának növekedése

A melanoma malignum igen nagy mortalitású tumor, gyakorisága a világon mindenhol folyamatosan emelkedik. A bőr daganatai között magas malignitása és elterjedtsége okán a legjelentősebb, de primeren egyéb szervekben, pl. a retina vagy a lágyagyhártya pigmentjéhez asszociáltan, a felső légutakban, illetve a gasztrointesztinális nyálkahártyán is keletkezhet. Különösen az utóbbi két évtizedben nőtt a betegség előfordulása. A World Health Organization (WHO) 2005-ös adata alapján évente 132.000 melanomás esetet diagnosztizálnak világszerte. A melanoma malignum incidenciája, azaz a 100.000 lakosra jutó új megbetegedés, évente körülbelül 3 %-al növekszik világszerte, becslések szerint az incidencia 15 évenként megduplázódik. Az európai országokat érintő statisztikák szerint 100.000 lakosra 4 -15 melanoma esik. A betegség incidenciája Magyarországon 2005-ös WHO adatok alapján 7/100.000, a betegség okozta halálozás 1.6/100.000. A melanoma incidenciája az Amerikai Egyesült Államokban 24/100.000. Ausztráliában és Dél-Amerikában a melanoma incidenciája sokkal magasabb, meghaladja a 40/100.000-t.

Az általában gyors lefolyású kórkép korán halálozáshoz vezethet. A túlélés növelésének, a prognózis javításának feltétele a korai pontos diagnózis mellett a minél korábbi és minél hatékonyabb kezelés. A sebészi terápia mellett az adjuváns kemo- és immunterápia is lényeges szerephez jut a melanomás betegek kezelésében. Az utóbbi években sok eljárás kipróbálásra került, de standard adjuváns terápia nem alakult ki. Szintén nincs olyan terápiás eljárás, amely profilaktikusan alkalmazva megnövelné a túlélést a közepes és magas rizikójú egyéneknél. A jelenleg leggyakrabban alkalmazott kemoterápiás szerek hatásossága korlátozott, ezért is foglalkoznak sokan a melanoma terápiájában a későbbiekben esetleg felhasználható anyagok, gyógyszerek kutatásával. Nagy mortalitása miatt tehát a tumorkutatás kiemelt területét képezi a melanoma malignum. Számos kutatócsoport tanulmányozza a melanoma sejtek növekedését in vitro, valamint in vivo állatmodellekben, továbbá vizsgálják a terápiában alkalmazható különböző anyagoknak a tumorsejt proliferációra kifejtett hatását.

Súlyos kombinált immunhiányban (SCID) szenvedő egerek

Ismert, hogy a legtöbb tumorsejt immunhiányos rácsálók bőre alá oltva tumornövekedést eredményez. Széles körben elterjedt eljárás az emberi tumorok, így például a melanoma immundeficiens egerekbe történő xenotranszplantációja (Cornil et al. 1989. J.Natl.Cancer Inst. 81:938-944). Kiderült, hogy a humán tumorok az egérben akkor növekszenek az eredeti tumorokhoz hasonlóan, ha azokat orthotopikusan ültetik át, azaz az állatnak abba a szervébe juttatják be, amely emberi szervből eredetileg származnak. Ilyen orthotopikus rácsáló modelleket fejlesztettek ki számos tumor, így gyomor-, vastagbél-, hasnyálmirigy-, vese-, prostata-, tüdőrák kísérletes vizsgálatához. Ezen modellek bebizonyították, hogy a szervspecifikus

Bevezetés

mikrokörnyezet meghatározó szerepet játszik a tumorok növekedésében. A melanoma vonatkozásában az orthotop viszonyokat a bőr felső rétegei, az epidermis és dermis jelenti. Az egér vékony hámja és irhája miatt a humán állapot modellezésére subcutan vagy subdermalis, azaz egészen felszínes subcutan beültetés használható.

A súlyos kombinált immunhiányos szindrómában (severe combined immunodeficiency = SCID) szenvedő egereket 1983-ban Bosma és munkatársai felfedezték fel, akik a C.B-17 egértörzs szérum immunglobulinszint vizsgálatai során ellenanyaghiányos egerekre bukkantak (Bosma et al. 1983. Nature 301:527-530.). A SCID egerek széles körben alkalmazhatók számos különféle sejt és szövet allo- és xenotranszplantációjára, mivel T és B sejtjes immunitásuk egyaránt károsodott, egy autoszóm recesszív módon öröklődő genetikai mutáció révén. Az egerekben az immunglobulinok és T-sejt receptorok képzéséért felelős, úgynevezett variable diversity joint (VDJ) rekombináz enzim defektusa okozza az immunhiányt. A SCID egérmodell jelentősége, hogy olyan in vivo kísérletek végzésére alkalmas, melyek embereken etikai megfontolásból nem végezhetők. A SCID egerek alkalmazásának kiemelt területe különböző tumorok transzplantációja, nyomonkövetése kísérleti körülmények között. Ezen egereket gyakran használják az emberi vérképzőrendszer tumorainak, a humán tüdőrák, retinoblastoma, osteosarcoma, hepatocelluláris carcinoma, laphámrák modellezésére.

SCID egerek alkalmazásával lehetőség nyílt egy in vivo humán orthotopikus melanoma modell kidolgozására (Juhász et al. 1993. Am.J.Pathol. 143:528-537.). A SCID egerek alkalmasabb recipiensek a tumorsejtek növelésére, mint a csupasz (nude) egerek. Nude egerekben a természetes ölő sejtek (NK sejtek) aktivitása számottevő, ezért transzplantáció esetén az immunszuppresszió fokozására az NK sejtek aktivitását csökkentő kezelésre van szükség. A SCID egerekben viszont az NK sejt aktivitás igen alacsony, így tumorkutatásra megfelelőbbek. A DEOEC Bőr- és Nemikórtani klinikán 1994 óta működik SCID laboratórium. Az egér kolónia az Egyesült Államokból, a philadelphiai Wistar Intézetből származik. Az elmúlt évek során laboratóriumunkban a SCID egereket számos tumor modellezésére használtuk. Így humán melanoma szöveteken, melanoma sejteken kívül basaliomát, Kaposi sarcomát, epidermoid carcinoma sejteket, emlő tumorsejteket, cervix carcinoma sejteket, pajzsmirigy tumort, leukémiás sejteket ültettünk SCID egerekbe. Ezen kívül naevus, humán bőr, hajhagyma sikeres transzplantációját végeztük, továbbá tanulmányoztuk a humán transzplantált bőrben ejtett sebzések gyógyulását.

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

A hisztamin szerepe a sejtproliferációban

A melanoma sejtek csakúgy, mint számos más sejt, jelentős mennyiségben

Bevezetés

termelnek hisztamint, és a hisztamin szintéziséért felelős hisztidin dekarboxiláz (HDC) enzimet (Haak-Frendscho et al. 2000. *J.Invest.Dermatol.* 115:345-352.). A hisztamin számos élettani és patológiás hatásért felelős a különböző sejtekben és szövetekben, a szervezet egyik legáltalánosabb szerepű mediátora. Elsősorban hízósejtekben, bazofil granulocitákban termelődik, valamint egyes hisztaminerg neuronokban mutatható ki. A hisztamin allergiás, gyulladásozó reakciókban játszott szerepe már régóta ismert, emellett fontos neurotranszmitter, szerepe van a vér-agy gát fenntartásában, a gyomorsav termelésben. Az utóbbi időben a hisztamin az immunválaszban, a benignus és malignus sejtproliferációban betöltött funkciója került a kutatók érdeklődésének középpontjába. Falus és munkacsoportja számottevően hozzájárult a hisztamin szerepének megértéséhez humán melanomában (Falus 2003. *Acta Biol.Hung.* 54:27-34.).

A hisztamin a hisztidin dekarboxiláz enzim (HDC) jelenlétében, CO₂ felszabadulása mellett, az L-hisztidin dekarboxilálásával keletkezik. A HDC az egyetlen enzim, amely felelős a hisztamin szintéziséért. A hisztamin az extracelluláris térbe kerülve a célsejtek plazmamembránjában található H1, H2 és H3 hisztaminreceptorokhoz kapcsolódik, melyek G-proteinekkel kapcsolódva az extracelluláris jelet sejten belüli jelsorozattá változtatják.

Erősen emelkedett a hisztamin bioszintézis és a hisztamin tartalom különböző humán és kísérletes tumorokban, így rágszövetekben növekvő emlőtumorban, egerekbe transzplantált melanomában, humán gasztrointesztinális adenocarcinomában, krónikus myeloid leukémiában, humán emlőrákban.

A malignus melanoma és a melanoma tumorból származó sejtvonalak a melanocitákkal ellentétben emelkedett mennyiségben tartalmaznak HDC-t. Ezt a megállapítást igazolta Falus és munkacsoportja *in vitro* tanulmányaikban. Western blot és immunhisztokémiai módszerek felhasználásával kimutatták a HDC gén expresszióját és a HDC protein jelenlétét humán melanoma sejtvonalakban (Haak-Frendscho et al. 2000. *J.Invest.Dermatol.* 115:345-352). Bebizonyították, hogy a magas enzimszint következtében a melanomás szövetekben és sejtvonalakban igen magas a hisztamin koncentrációja. Megállapították, hogy a melanoma sejtek külső stimulus nélkül is detektálható mennyiségű hisztamint szabadítanak fel, ami felveti az autonóm hisztamin metabolizmus lehetőségét humán melanomában (Darvas et al., 2003. *Melanoma Res.* 13:239-246.). Kimutatták, hogy nemcsak az exogén hisztamin, hanem a melanoma sejtek által termelődő és felszabaduló, autokrin és parakrin faktorként szereplő hisztamin is befolyásolja a sejtproliferációt és szabályozza a szervezet *in situ* immunválaszát. Melanoma sejtek proliferációjának csökkenését tapasztalták a HDC transzlációt gátló, HDC antiszenz oligonukleotidok alkalmazása mellett (Hegyesi et al. 2001. *J.Invest.Dermatol.* 117:151-153.). Genetikailag módosított, különböző mennyiségű HDC-t termelő, C57BL/6 egérben növekvő egér melanoma sejtek növekedését vizsgálva megállapították, hogy a hisztamintermelés emelkedésével együtt kifejezetten nőtt a tumorok mérete, és nőtt a metasztázisok potenciál is (Pos et al. 2005. *Cancer Res.* 65:4458-4466.). Kimutatták,

Bevezetés

hogy humán melanoma sejtekben az exogén hisztamin egy protoonkogén, az Ets-1 szintézisét stimulálja, és ez a hatás H2 receptorokon keresztül valósul meg (Hegyesi et al. 2005. FEBS Lett. 579:2475-2479.).

A sejtekből a hisztamin nagyrésze endogén úton választódik ki, és ez autokrin vagy parakrin módon befolyásolja a környező sejteket. Ennek következményeit könnyen kimutathatjuk hisztamin antagonisták alkalmazásával, melyek a sejt plazma membránokon elhelyezkedő H2 hisztamin receptorokhoz történő kötődés, valamint a G protein függő intracelluláris jelátadás blokkolása révén működnek. Hasonló lokális blokkoló hatás érhető el, ha a hisztamin de novo bioszintézisét gátoljuk irreverzibilis HDC gátlóval, az α -fluorometil-hisztidinnel (α -FMH). Feltételezhetően a helyileg termelődött hisztamin egy része a sejtben marad. Farmakológiai, biokémiai és hisztológiai adatok igazolták, hogy az intracelluláris hisztamin a mikroszómákban és a magi frakcióban található citokróm P450 sejtalkotóhoz kötődik. Ezt az intracelluláris hisztamin receptorhoz való kötődést hatékonyan gátolhatjuk egy anti-ösztrogén hatóanyaghoz, a tamoxifenhez hasonló, N,N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl-al (DPPE-vel). A hisztamin funkcionális szerepére utal, hogy a HDC-t gátló α -FMH, valamint az intracelluláris kötőhelyet blokkoló DPPE jelentős sejtosztódás gátlást okoz in vitro melanoma sejtekben (Falus et al. 1997. Inflamm. Res. 46:Suppl 1:S51-2.).

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

A DPPE erősen kapcsolódik az intracelluláris citokróm P450 sejtalkotóhoz, az intracelluláris hisztamin receptorhoz (iHR), ezáltal antagonizálja az intracelluláris hisztamin hatását, azaz nem H1-, nem H2-, nem H3-receptor antagonistája. A DPPE hatása sok esetben megegyezik az α -FMH hatásával, mindkettő gátolja a májtumorok és a colorectális tumorok in vivo és in vitro proliferációját. Más kutatások szerint azonban a DPPE önmagában serkenti az in vivo tumornövekedést emlőtumoros patkányokban, leukémiás egerekben. Kimutatták, hogy a DPPE csökkenti a B16 melanoma sejtek in vitro növekedését, valamint egerekbe oltott leukémia sejtek proliferációját. Egyes kutatások szerint a DPPE elnyomja a magas HDC szinttel rendelkező krónikus limfoid leukémiás betegekből származó limfociták in vitro proliferációs kapacitását, mások szerint krónikus myeloid leukémiás sejtek növekedését gátolja (Aichberger et al. 2006. Blood 108:3538-3547.). A DPPE csökkenti a metasztatikus kialakulását colon tumoros nude egerekben, valamint húgyhólyag tumoros betegekből. Kemoterápiával kombinálva a DPPE megvédi a szervezetet a citotoxikus hatásoktól prostata- és emlőrákban (Brandes et al. 1998. Breast Cancer Res. Treat. 49:61-68.). A DPPE fokozhatja a metasztatikus emlőtumoros betegek kezelése során alkalmazott doxorubicin hatását.

In vitro kutatások szerint a hisztamin termelődést gátló α -FMH, valamint a kötőhely antagonistája DPPE jelentős sejtosztódás gátlást okoz primer és metasztatikus eredetű melanoma sejtvonalakban (Falus et al. 1997. Inflamm. Res.

46:Suppl 1:S51-2). Klinikai vizsgálatok során megállapították, hogy a DPPE megnövelheti a melanoma kemoterápiájában használt gyógyszerek terápiás hatékonyságát olyan betegekben is, akik korábban nem reagáltak a citosztatikumokra.

A H2 hisztamin receptor antagonistá cimetidin, ranitidin szerepe a tumorproliferációban

Számos kutatócsoport vizsgálta a H2 receptor antagonistá cimetidin és ranitidin tumornövekedésre kifejtett hatását. A H2 hisztamin receptor antagonisták a hisztamin sejt plazma membránokon elhelyezkedő H2 receptorokhoz történő kötődését gátolják, valamint a G protein függő intracelluláris jelátadást blokkolják. Kimutatták, hogy a cimetidin számos különböző típusú tumor növekedését gátolja mind in vitro, mind in vivo állatmodellekben. A cimetidin csökkentette humán gyomorrák tumorsejtek in vitro növekedését, Balb/c és nude egerekbe transzplantált humán colon carcinoma proliferációját gátolta, akadályozta a nude egerekbe oltott emberi gyomorrák sejtek és colorectalis tumorsejtek in vivo növekedését. Más szerzők szerint fokozta a gasztrointesztinális tumorokban szenvedő betegek túlélését. Tüdőcarcinomás egerekben csökkentette a metasztázisok kifejlődését, valamint megnyújtotta az állatok túlélését. Megnövelte immunszupprimált egerekbe ültetett humán bronchus carcinomák térfogat kettőzödési idejét, gátolta a neoplaztikus glia tumor in vitro növekedését. Igazolódott, hogy a nude egerekben kifejlődött humán ovarium carcinoma növekedése kedvezően befolyásolható cimetidinnel. Klinikai vizsgálatok során a cimetidin ovarium tumoros betegek túlélését segítette elő.

A cimetidin hatékonyságát az adoptív kemoterápiában állatmodellek is igazolták. Fokozta a ciklofoszfamid terápia hatását, szignifikánsan megnövelte a leukémiás egerek túlélését, míg a ranitidin nem befolyásolta ezt. Hatékonyan alkalmazták a cimetidint vesetumoros betegek IFN- α -val végzett kombinált kezelése során. Mások metasztatikus vesetumoros és melanomás betegeknek a cimetidint kumarinnal kombináltan adva objektív tumorregressziót találtak.

Egyes kutatások szerint a cimetidinnel ellentétben a ranitidin, egy másik hatásos H2 hisztaminreceptor antagonistá nem gátolta sem a humán colon tumorsejtek proliferációját, sem ezen sejtek in vivo növekedését. Más szerzők kimutatták, hogy a ranitidin a cimetidinhez hasonlóan in vitro csökkentette ugyan a humán gyomorrák sejtek növekedését, de a ranitidin hatása nem volt szignifikáns. H2 agonisták alkalmazása mellett, in vivo Sprague-Dawley patkányokban kifejlődött emlőcarcinomában szignifikáns tumorsejtproliferáció növekedést mutattak ki, amelyet a H2 antagonistá ranitidin csökkentett. Jurkat T limfocita sejtek növekedését nem befolyásolta a ranitidin.

Számos szerző igazolta, hogy a hisztamin stimulált melanoma sejt növekedés gátolható mind cimetidinnel, mind ranitidinnel in vitro (Reynolds et al. 1996. Melanoma Res. 6:95-99.), ugyanúgy, mint ahogyan in vivo, egerekben növekvő

Célkitűzések

melanomában (Hellstrand et al. 1990. J.Immunol. 145:4365-4370.). A cimetidin szignifikánsan csökkentette B16BL6 melanomával transzplantált egerekben a tumornövekedést (Tomita et al. 2005. Inflammopharmacol. 13:281-289.). A cimetidint hatékonyan kipróbálták multiplex melanomában szenvedő lovak kezelésében is. Klinikai II. fázisú vizsgálatokból származó biztató adatok szintén alátámasztották a cimetidin terápia létjogosultságát humán metasztatikus melanoma kezelésében. Melanomás betegek tünetmentes túlélésének jelentős növekedéséről számoltak be, amikor a cimetidint komplex terápiában alkalmazták specifikus allogén melanoma ellenes vakcinával. A cimetidinhez hasonlóan a ranitidin egyaránt aktív immunterápiás ágens lehet a humán melanomás betegek kezelésében (Smith et al. 1987. Arch.Intern.Med. 147:1815-1816.). II. fázisú vizsgálatokban bizonyították, hogy a ranitidin az indometacinnal kombinálva, IL-2 alkalmazása nélkül is, antitumor aktivitást mutatott előrehaladott melanomában (Mertens et al. 1993. Clin.Oncol.R.Coll.Radiol. 5:107-113.). Bizonyították a cimetidin, ranitidin és IL-2 együttes alkalmazásának hatosságát melanomás betegek terápiájában (Evangelista-Dean et al. 2004. Cancer Biother. Radiopharm. 19:754-757.).

II. CÉLKITŰZÉSEK

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

In vitro kísérletek:

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

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

In vivo kísérletek:

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

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

Anyagok és módszerek

összehasonlítni.

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

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

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

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

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Gyógyszerek: A cimetidint és a ranitidint a Tocris Cookson Ltd (London, UK)-tól szereztük be. A DPPE-t az Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Szerves Kémia Intézete (Budapest) szintetizálta számunkra.

Melanoma sejtvonalak: A kísérletek során primer melanoma eredetű HT168 jelű, a májtraktusba alacsony frekvenciával metasztatizáló humán melanoma sejtvonalat használtunk. Előkísérleteink során használtuk még az előző sejtvonalt májmetasztázisaiból izolált HT168-M1 jelű, magas metasztázis potenciájú sejtvonalat.

Melanoma sejtenyésztés: A humán melanoma sejtvonalat 5% CO₂ jelenlétében RPMI 1640 médiumban tenyésztettük, amelyet 10%-os magzati borjú szérummal (FCS) valamint 0.16 g/l gentamycinnel egészítettünk ki. A kultúrát 37°C-on vízzel telített 5% CO₂ / 95% levegő jelenlétében inkubáltuk. A sejteket a szokásos módon három naponta passzáltuk. Kezelés előtt, az utolsó passzázs után 24 órán keresztül a sejteket inkubáltuk 37°C-on 10% FCS tartalmú RPMI 1640-es közegben, 5%-os CO₂-ot tartalmazó, nagy nedvességtartalmú inkubátorban, 4,5x10⁴ sejt/ml sűrűséget megtartva. A médiumot ezután cseréltük és a HT168 sejteket kezeltük DPPE-vel (10⁻⁵-10⁻⁶ M), ranitidinnel (10⁻⁵ M), cimetidinnel (10⁻⁵ M), valamint ezek kombinációival. A kultúrákat 37°C-on, 5% CO₂ jelenlétében 48 órán át inkubáltuk. Inkubáció után a sejteket foszfáttal pufferolt só (PBS) oldatban mostuk, majd további vizsgálatok céljából lizátumot készítettünk.

Protein kivonás és Western blot analízis: A molekulárbiológiai vizsgálatok Dr. Falus András akadémikus egyetemi tanár laboratóriumában a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében, a DEOEC Bőr-és Nemikórtani Klinika és a SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézete között megvalósult kollaboráció keretében jöttek létre. A kitenyésztett sejteket vagy a folyékony nitrogénben gyorsfagyasztott szövetmintákat a protein kivonás céljából lízis pufferban mostuk. A magfrakciót centrifugálással különítettük el, és a

szupernatánst használtuk a HDC expressziójának meghatározásához Western immunoblot módszerrel.

Antitestek: A primer poliklonális antitestet csirkében állították elő, a humán HDC 318-325 (VKDKYKLQ) aminosav szekvenciáját tartalmazó epitópja ellen (Promega, Madison, Wisconsin, USA), kutató csoportunkkal együttműködve.

Natrium dodecil szulfát - poliakrilamid gél elektroforézis (SDS-PAGE) és immunoblot: A művelethez 15 µg fehérjét tettünk mintánként a denaturáló poliakrilamid géltre. A blothoz Hoeffler műszert alkalmaztunk Amersham nitrocellulóz Hybond-C Extra membránon, transzfer pufferban, 100V feszültségen, 200mA áramerősségen 80 percig. 40ng/ml koncentrációban 60 percen át használtuk a primer antitestet (affinitás purifikált antihumán HDC₃₁₈₋₃₂₅ IgY (csirke); Promega, USA). A másodlagos antitestet pedig (torma peroxidáz konjugált anti-csirke IgY (nyúl); Promega, USA) 0.5 µg/ml koncentrációban alkalmaztuk 30 percen át. Immunreaktív csíkokat jelenítettünk meg ECL (Amersham, Anglia) Western blot protokoll alkalmazásával.

MTT assay: A sejtproliferáció tanulmányozására kolorimetriás MTT módszert használtunk, amelyben a vízdékony tetrazólium só (MTT) oldhatatlan lila formazánná alakítottuk át dehidrogenáz enzimek által. A szupernatánsokat kiszelektáltuk és a kicsapódott részt dimetil szulfoxid-ban (DMSO) oldottuk. Az abszorpciót 540 és 620 nm-en olvastuk le. Korábbi kísérletekben igazoltuk, hogy az MTT assay eredményei összhangban vannak a [³H]timidin inkorporációval.

A H2 hisztamin receptorok meghatározása HT168 melanoma sejteken: A H2 receptorkötő kapacitást 3nM-os [³H]tiotidin jelenlétében mértük. A nem specifikus kötődést 5mM hisztamin HCl-al határoztuk meg. A reakciót vákum alatti, Whatman GF/B üvegszál filtereken át történt gyors filtrációval állítottuk le. A filtereken visszamaradt radioaktivitást folyadék szcintilláció számlálással mértük 3 ml OptiPhase HiSafe koktéltban.

A H2 hisztamin receptor mRNS meghatározása reverz transzkripció polimeráz lánreakció révén: A reverz transzkripció kivitelezésére a Pharmacia Ataq Gene Controller féle Perkin Elmer reverz transzkriptázt használtuk. Az RNS mintákkal (1.5 µg) reverz transzkripciót végeztünk 42 °C -on 30 percig, majd 99 °C-on 5 percig. A polimeráz lánreakció (PCR) felerősítésére a reakciós elegy a következőkből állt: 1x-es puffer, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTP, 2.25 U Taq polimeráz, 25 pmol szenz és antiszenz primerek, templatok (10 µl) és végső volumenében 50 µl-re kiegészített desztillált víz. A H2 receptorokra vonatkozó oligonukleotid primerek a következők voltak: a szenz primer: 5'-TCG TGT CCT TGG CTA TCA C, az antiszenz primer: 5'-CCT TGC TGG TCT CGT TCC T. A kapott PCR termékeket szeparáltuk 2%-os, 0.01% etidium bromidot tartalmazó agaróz gélen. A mintákat 100 V-on 45 percig futtattuk. A PCR termék mérete 330 bp volt, összhangban a H2 receptor mRNS-el.

A kísérleti állatok: Az immundeficiens C.B-17 scid/scid egér populáció a Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, Pennsylvania, USA laboratóriumából származik.

Anyagok és módszerek

A tipikus SCID tulajdonságokat a szérum IgM mérésével ellenőriztük. 6-8 hetes egereket használtunk. Előkísérleteink során az állatokat (összesen 24 egeret) 5×10^6 M1 illetve HT168 melanoma sejttel oltottuk 200 μ l PBS volumenben, subdermalisan a hasfal bőrébe. További kísérleteink során HT168 melanoma sejteket használtunk. Összesen 81 egérrel végeztük a kísérleteket (összesen 36 kontroll, összesen 45 kezelt egér). Az egereket 7-12 fős csoportokba osztottuk, mely csoportok az oltást követő naptól a következő anyagokat kapták az ivóvizükben, a dózist állandó szinten tartva: (i) DPPE (4mg/kg/nap/egér), (ii) DPPE (4mg/kg/nap/egér) cimetidinnel (50mg/kg/nap/egér) kombinálva, (iii) DPPE (4mg/kg/nap/egér) ranitidinnel (50mg/kg/nap/egér) kombinálva, (iv) cimetidin (50mg/kg/nap/egér), (v) ranitidin (50mg/kg/nap/egér). Az egyes kezelt csoportoknak saját kontroll csoportjuk volt, melyek az oltást követően tiszta vizet kaptak.

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

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

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

IV. EREDMÉNYEK

In vitro kísérletek

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

Hisztamin antagonistáknak a HT168 és M1 humán melanoma sejt vonal in vitro proliferációjára kifejtett hatását vizsgáltuk. A proliferációt az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerinti MTT assay segítségével mértük.

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

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

A H2 receptor mRNS jelenlétének és aktivitásának vizsgálata melanoma sejtekben

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

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

In vivo kísérletek

HT168 és M1 melanoma sejtek in vivo növekedésének nyomonkövetése SCID egerekben

Vizsgáltuk a HT168 és M1 sejtek okozta in vivo tumornövekedést SCID egerekben. A HT168 sejtekkel oltott egerek 75%-ában, az M1 sejtekkel oltott egerek

Eredmények

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

A SCID egerekbe oltott humán HT168 melanoma sejtek növekedését az anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint követtük nyomon.

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

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

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

Míg a cimetidin, önmagában adva a 3. héttől növelte a tumorvolumet, addig DPPE-vel kombinálva a tumortömeg fejlődése nagymértékben csökkent a kontroll csoporthoz képest.

A HT168 melanoma sejtekkel oltott SCID egerekkel végzett különböző kezelések során kapott átlagos tumortérfogatókat az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint kaptuk meg. Az eredmények igazolják a cimetidin és DPPE kombinált kezelés hatásosságát. A tumorsejtek oltását követő 3. héttől a cimetidin-DPPE kombinációt kapott csoportban a tumorok növekedése kisebb mértékű volt a kontroll csoporthoz viszonyítva, a 4. héttől ezen egerekben szignifikánsan csökkent a tumornövekedés a kontroll csoporthoz képest (t-teszt, $P < 0.05$). Ezen csoportban a tumortérfogatok szignifikánsan kisebbnek bizonyultak a kontroll csoporthoz képest a teljes vizsgálati időtartamot figyelembe véve, ANOVA, illetve Holm-Sidak tesztet használva.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Eredmények

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

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

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

A különböző antihisztamin ágensekkel kezelt SCID egerek túlélését nyomonkövetve, az előzőekkel összehangban levő eredményt kaptunk, azaz a cimetidin és DPPE-vel kombináltan kezelt egerek túlélése meghaladta a kontroll és más kezelt csoportok túlélését. A különbség statisztikailag nem volt szignifikáns a kontroll csoporthoz képest Logrank tesztet alkalmazva. Eredményeinket úgy kaptuk, hogy meghatároztuk az adott csoportba tartozó élő egerek (azaz az adott ágenssel kezelt, vagy kontroll csoportba tartozó egerek) arányát az azonos csoportbeli kiindulási egérszámhoz viszonyítva.

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

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

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

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

A kifejlődött tumorer szöveti szerkezetének, immunreaktivitásának, a tumort infiltráló sejteknek a vizsgálata

Szöveti analízis igazolta a humán melanoma kifejlődését SCID egerekben, valamint a metasztatikus hiányát. A HT168-al oltott, majd cimetidin és DPPE-vel együttesen kezelt egerek szöveti mintáinak hisztológiai feldolgoása és immunreaktivitás vizsgálata azt mutatta, hogy ez a kombinált kezelés megnöveli az IFN- γ -t termelő eger makrofágok infiltrációját, a csak HT168-al oltott kontroll állatokban kifejlődött tumorokhoz képest. Hasonló tendenciát láttunk, de kevesebb sejt infiltrálta a tumort, amikor a természetes öltő sejteket (NK) vizsgáltuk.

V. MEGBESZÉLÉS

Autonóm hisztamin metabolizmus melanomában

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

A malignus melanoma sejtek és melanomás szövetek (úgy a primer, mint a metasztatikus) a melanocitákkal ellentétben emelkedett mennyiségben tartalmaznak HDC-t. A magas enzimszint következtében a melanomás szövetekben és sejtvonalakban igen magas a hisztamin koncentrációja. Ez is alátámasztja a hisztamin kiemelt szerepét a melanoma sejtek proliferációjában. A HDC transzlációt gátló, HDC specifikus antiszensz oligonukleotidok alkalmazása mellett Falus és munkacsoportja melanoma sejtek proliferációjának csökkenését tapasztalta (Hegyesi et al. 2001. *J.Invest.Dermatol.* 117:151-153.). Genetikailag módosított, különböző mennyiségű HDC-t termelő eger melanoma sejtek in vivo növekedését vizsgálva megállapították, hogy a hisztamintermelés emelkedésével együtt kifejezetten nőtt a tumorok mérete, és nőtt a metasztatikus potenciál is (Pos et al. 2005. *Cancer Res.* 65:4458-4466.). Kimutatták, hogy humán melanoma sejtekben az exogén adott hisztamin egy protoonkogén szintézisét stimulálja, és ez a hatás H2 receptorokon keresztül valósul meg.

A melanoma sejtek egyaránt képesek a hisztamin felszabadítására, valamint környezetükből történő felvételére. Mivel a melanoma sejtek enzimatikusan aktív HDC proteint expresszálnak, képesek endogén módon hisztamin szintetizálására. Az endogén termelődött hisztamin autokrin növekedési faktorként szabályozza a proliferációt korai stádiumú melanomában, míg a hízósejtek vagy más környező sejtek által termelt hisztamin a betegség előrehaladott, metasztatikus fázisában a

növekedés parakrin szabályozásában játszik szerepet (Lázár-Molnár et al. 2001. *Inflamm.Res.* 50 S102-103.). A termelődött hisztamin az extracelluláris térbe kerülve a célsejtek plazmamembránjában található H1, H2 és H3 hisztamin receptorokhoz kapcsolódik.

A hisztaminnak hisztamin receptorokon keresztül megvalósuló direkt hatása melanómában

A H1 és H2 hisztamin receptorok nemcsak az exogén, más sejtek által termelt, hanem a melanoma sejtek által szintetizált és felszabadított hisztamint is képesek megkötni. A melanoma sejtek közötti különbség, amely a hisztamin termelő és lebontó kapacitásukban jelentkezik, magyarázza az egyes melanoma sejt típusok különböző érzékenységet az exogén hisztaminra (Darvas et al. 2003. *Melanoma Res.* 13:239-246.).

Az endogén módon termelődött hisztamin hatása a melanoma sejt növekedés szabályozására attól függ, hogy H1 vagy H2 receptorok vannak-e túlsúlyban a célsejtek felszínén. Az aktuális receptor aránytól függően, a hisztamin a melanoma sejtekben a H1 hisztamin receptorokon át csökkenti a sejtproliferációt, míg a H2 receptorokon át elősegíti a növekedést (Falus et al. 2001. *Trends Immunol.* 22:648-652.). H2 receptor antagonistá jelenlétében a hisztamin elnyomja a melanoma sejtek növekedését, egyrészt H1 receptorokon át, másrészt azáltal, hogy a H2 receptorokhoz nem marad szabad hozzáférés.

Falus és munkacsoportja HDC deficiens egerekkel folytatott vizsgálataik során azt tapasztalták, hogy a hisztamin tartós hiánya ezen egerek számos szövetében a H2 receptorok szövetspecifikus down regulációját okozza. Exogén adott hisztamin megszünteti ezt a változást a H2 receptor expresszióban. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a H2 receptor expresszió a hisztamin kontrollja alatt áll egerekben (Fitzsimons et al. 2001. *FEBS Lett.* 508:245-248.).

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

A DPPE, cimetidin, ranitidin szerepe a tumorproliferációban

A tamoxifen származék DPPE korábban leírt antihisztamin hatása azon alapszik, hogy a DPPE befolyásolja a hisztamin citokróm P450 molekulákhoz való kötődését (Brandes et al. 1991. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 179:1297-1304.). A DPPE hatása a legtöbb esetben összhangban van a HDC gátló α -FMH hatásával, amely a hisztamin de novo termelődésének blokkolásával gátolja a májtumorok és a colorectalis carcinomák mind in vivo mind in vitro proliferációját. Ugyanakkor más források szerint a DPPE önmagában stimulálja az in vivo tumornövekedést

emlőtumoros patkányokban és leukémiás egerekben. Úgy találták, hogy a DPPE gátolja a limfoid leukémiás betegek magas HDC tartalmú limfocitáinak *in vitro* növekedését. Megállapították, hogy a DPPE a krónikus myeloid leukémiás sejtek növekedését gátolja. Emlőrákban és prosztatarákban a DPPE kemoterápiával alkalmazva megvédi a szervezetet a citotoxikus hatásoktól. Falus és munkacsoportja szerint a DPPE jelentős sejtosztódás gátlást okoz melanoma sejtekben (Falus et al. 1997. *Inflamm.Res.* 46:Suppl 1:S51-52.). Kombináltan alkalmazva a DPPE a cimetidin hatásosságát fokozza. Ennek a hatásnak a mechanizmusa még nem ismert.

A cimetidin számos tumor növekedését gátolja, mind *in vitro* mind *in vivo*. Gátolja a neoplasztikus glia tumor *in vitro* növekedését. Csökkenti immunszupprimált egerekbe ültetett humán bronchus carcinoma, nude egerekbe oltott humán ovarium carcinoma növekedését. A cimetidin szignifikánsan csökkentette melanomával transzplantált egerekben a tumornövekedést (Tomita et al. 2005. *Inflammopharmacol.* 13:281-289.). Klinikai II. fázisú vizsgálatok igazolták a cimetidin terápia létjogosultságát melanomás betegek esetében (Evangelista-Dean et al. 2004. *Cancer Biother.Radiopharm.* 19:754-757.).

A cimetidinnel ellentétben a ranitidin, egy másik hatásos hisztamin H2 antagonistá nem gátolja sem a humán colon tumorsejtek proliferációját, sem ezen sejtek *in vivo* növekedését (Lawson et al. 1996. *Br.J.Cancer* 73:872-876.).

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

Antihisztaminok hatása a melanoma sejtek *in vitro* és *in vivo* növekedésére

In vitro kísérletek során igazoltuk, hogy a melanoma sejtek H2 receptorokat expresszálnak, ezt korábbi eredmények is alátámasztják (Haak-Frendscho 2000. *J.Invest.Dermatol.* 115:345-352.). Megállapítottuk, hogy a hisztamin receptorok blokkolása cimetidinnel és DPPE-vel kombináltan végzett kezelés során gátolja a melanoma *in vitro* növekedését, mind HT168, mind M1 sejtek esetében. Ezzel összhangban vannak *in vivo* eredményeink, melyek azt mutatják, hogy a H2 hisztamin receptor blokkoló cimetidin kombináltan alkalmazva az intracelluláris P450 sejtalkotórész egyik ligandjával, a DPPE-vel, hatékonyan csökkenti a SCID egérbe transzplantált HT168 humán melanoma *in vivo* növekedését. Az átlagos tumortérfogat mellett, a melanoma tumorsejtekből a tumorok kifejlődésének potenciálja is alacsonyabb volt a DPPE-t és cimetidint együttesen kapott egerek esetében. A DPPE és cimetidin kombinált kezelés növeli továbbá az immundeficiens egerek túlélését, habár nincsen nyilvánvaló korreláció a tumor növekedés/méret és az állatok túlélése között.

A ranitidin önmagában adva, a cimetidin és DPPE kombinációhoz képest

kevésbé csökkenti a SCID egerekbe oltott HT168 melanoma sejtek növekedését.

In vivo kísérleteink során megállapítottuk, hogy a HT 168 melanoma sejtek alacsonyabb tumornövekedési potenciált mutatnak, mint az M1 sejtek, amint ezt korábbi adatok is alátámasztják (Ladányi et al. 1990. Int.J.Cancer 46:456-461.). A HT 168 sejtekkel oltott egerek hosszabb túlélése miatt használtuk ezen sejtvonalat további kísérleteink során.

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

Immunhisztokémiai vizsgálataink szerint a cimetidin és DPPE-vel végzett kombinált kezelés során tapasztalt sejtproliferáció csökkenés összefügg az INF- γ -t termelő eger makrofágok masszív tumor infiltrációjával és kisebb mértékben az NK sejtek felhalmozódásával a tumoros szövetekben. Az INF- γ megemelkedett koncentrációja pedig a sejtproliferáció gátlásával jár, a természetes ölü sejtek direkt stimulációja révén (Takeda et al. 2001. Cell Immunol. 214:194-200.).

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

Az IFN- γ megemelkedett mennyisége a sejtproliferáció gátlását eredményezi melanomában

Eredményeink szerint mind a ranitidin önmagában adva, mind a cimetidin DPPE-vel kombináltan alkalmazva csökkenti a tumornövekedést egerekben in vivo, bár különböző intenzitással. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a ranitidin kevésbé csökkenti a SCID egerbe oltott melanoma növekedését. Ezt az adatot magyarázhatják Falus munkacsoportjának azok az eredményei is, miszerint a ranitidinnel ellentétben a cimetidin jelentősen megnöveli a humán limfociták IFN- γ produkcióját egy lehetséges hisztamin-független útvonalon, valószínűleg citokrom P450 sejtalkotórész által. Ugyanakkor az IFN- γ megemelkedett koncentrációja a sejtproliferáció gátlását eredményezi a természetes ölü sejtek direkt stimulációja által. Az NK sejtek és az IFN- γ megnövelik az immunválaszt, amely csökkenti a tumornövekedést. Mindez indokolhatja azt is, miért volt a cimetidin hatékony, a ranitidin viszont kevésbé a HT168 humán melanoma sejtekkel végzett kísérleteink során. Egyesek szerint a megemelkedett hisztamin szint mellett, hogy elősegíti a tumorsejtek proliferációját, immunszuppresszív hatással is rendelkezik, amely elősegíti a tumorsejtek növekedését, azáltal, hogy kikapcsolja a természetes ölü sejtek aktivitását. A cimetidin csökkentheti a sejtproliferációt az NK sejtekre kifejtett hisztamin mediált gátló hatás felfüggesztése révén (Evangalista-Dean et al. 2004. Cancer Biother.Radiopharm.19:754-757.). A DPPE kombináltan adva a cimetidinnel, annak hatásosságát növeli, ennek a hatásnak a mechanizmusa azonban még nem ismert.

Megbeszélés

A humán rekombináns IFN- γ és IFN- α hatékonyan használt anyag a malignus betegségek immunterápiájában, beleértve a magas rizikójú melanómát is. Ezen citokinek hasznát több *in vitro* és *in vivo* kísérleti és klinikai terápiás adat alátámasztja, bár antitumor aktivitásuk pontos mechanizmusa még nem ismert. Az interferonok mint növekedés gátló faktorok játszanak szerepet, és a proliferációs génekre hatva számos sejt terminális differenciálódását indukálják. Ezen citokinek potenciális immunszabályozó hatásához tartozik az a képességük, hogy növelik a tumor antigén prezentációt az MHC I és II molekulák felszíni expressziójának fokozása által. Az interferonok továbbá hatékony aktivátorai az NK sejtek antitumor tevékenységének.

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

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

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

Egyesek szerint a cimetidin melanomás betegekben gátolhatja a sejtproliferációt NK sejtek stimulálása révén (Flodgren et al. 1985. *Cancer Immunol.Immunother.* 19:28-34.). Továbbá a cimetidin és a ranitidin is jelentősen csökkenti egerekbe oltott melanoma növekedését NK sejtek aktivitásának fokozása által (Hellstrand et al. 1990. *J.Immunol.* 145:4365-4370.).

Más szerzők egyéb mechanizmust tartottak fontosnak a hisztamin antagonisták hatásmechanizmusában:

Egyesek szerint a cimetidin, és a ranitidin is gátolja a szuppresszor T limfociták aktivitását. Más kutatások szerint a cimetidin fokozza az IFN- α tumorelleses hatását metasztatikus melanomás betegekben, a szuppresszor T sejtek gátlása által. Mások azt állítják, hogy a cimetidin és a ranitidin fokozhatja a helper T sejtek IL-2 termelését.

Egyes kutatások szerint a TNF- α gén expresszióját és szintézisét a hisztamin csökkenti H2 receptorok által; a H2 receptor antagonisták pedig a hisztamin által csökkentett TNF- α szintézist növelik meg (Vannier et al. 1991. *J.Exp.Med.* 174:281-284.).

Duda Ernő és munkacsoportjával korábban folytatott munkánk során megállapítottuk, hogy membránkötött TNF- α prekursor formáját termelő humán cervix carcinoma (HeLa) sejtekkel transzplantált SCID egerekben a tumornövekedés szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest (Nagy T et al. 2003. *Cancer Lett.* 196:49-56.). A TNF- α transzformált sejtekkel tenyésztett makrofágok megnövekedett fagocitózist és citokin termelést mutattak; jelezve, hogy az aktivált makrofágok a tumorelleses válasz mediátorai lehetnek.

Falus és munkatársai az utóbbi időben kifejlesztett HDC deficiens egerekben igazolták, hogy ezen állatok magas TNF- α szinttel rendelkeznek. A HDC deficiens egerekben a hisztamin a H2 receptorokon keresztül gátolja a tumorelleses hatású citokinek, így az IFN- γ vagy a TNF- α produkcióját a tumoros szövetekben (Ohtsu et al. 2001.FEBS Lett. 502:53-57.). Ez is mutatja az antihisztaminok IFN- γ , TNF- α mennyiséget fokozó hatásának jelentőségét a tumoros sejtproliferáció csökkentésében. Továbbá felveti a hisztamin antagonisták TNF rendszeren keresztüli hatásmechanizmusát.

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

Mivel a SCID egerek sérült T sejt rendszerrel bírnak, az antihisztaminoknak a melanoma sejtekre kifejtett direkt gátló hatása mellett, mely H2 receptorokon keresztül valósul meg, az egyik lehetséges magyarázat az eredményeinkre, hogy a cimetidin és a DPPE helyileg aktiválhatja az IFN- γ -t termelő egér makrofágokat (és az NK sejteket), és ezen sejtek megváltoztatják a HT168 sejtek általi tumorképződést. Ezt az összetett kölcsönhatást tovább bonyolítja, hogy az IFN- γ elnyomja a HDC mRNS és protein expressziót humán HT168 melanoma sejtekben *in vitro* (Heninger et al. 2000..Inflamm.Res. 49:393-397.), habár munkánk során a HDC *in vitro* és *in vivo* expresszióját összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy a hisztamin antagonisták nem befolyásolták jelentősen a HDC expressziót, amely alacsonyabb volt *in vitro*, mint *in vivo* körülmények között.

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

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

Falus és munkacsoportjának megállapítása szerint valószínű, hogy létezik egy egymást gátló kölcsönhatás melanomában az endogén hisztamin és a lokális immunrendszer sejtjei között (Horváth et al. 2000. Inflamm.Res. 49:27-28.). Az IFN- γ -tól eltérően, legalábbis az előrehaladott stádiumú melanomában, stimuláló kölcsönhatás mutatkozik az interleukin-6 (IL-6) és a hisztamin között. A primer melanoma sejtekben az IL-6 gátolja a sejtnövekedést, míg metasztatizáló melanomában elősegíti a proliferációt. A hisztamin által indukálható interleukin-6 úgy tűnik, hogy szerepet játszik a késői stádiumú melanomában mint egy autokrin

támogató faktor, és ez arra utal, hogy egy igen összetett rendszer működik közre a melanoma növekedés in situ szabályozásában (Lázár-Molnár et al. 2002. Eur.J.Clin.Invest. 32:743-749.).

A hisztamin kétarcú hatása melanomában, az antihisztaminok kettős támadáspontja

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

A H1 és H2 receptorok száma és elérhetősége, valamint lokális egyensúlyuk fontos tényezők, melyek meghatározzák, hogy a hisztamin elősegíti vagy elnyomja a melanoma növekedését. A hisztamin a receptor típusától függően kétféleképpen hathat, vagy növeli, vagy csökkenti a melanoma növekedését. A különböző antihisztaminok eltolhatják ezt a helyi egyensúlyt, és ezzel befolyásolják a hisztamin hatékonyságát a melanoma növekedésére. Ez a tény a melanoma kezelésében a hisztamin receptor antagonistáknak egy lehetséges új szerepet adhat.

A hisztamin másik célpontja a lokális bevándorló immunsejtek, melyekre hatva befolyásolja az immunválaszt, többek között azáltal, hogy Th2 eltolódást okoz, amely elősegíti a tumor túlélését. Újabban leírták, hogy a Th1 válaszok elsősorban a H1 receptorokon, míg a Th2 válaszok a H2 receptorokon dominálnak (Jutel et al. 2001. Nature 413:420-425.).

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

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

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

A hisztamin jelentős mennyiségű előfordulása melanoma sejtekben és szövetekben további vizsgálatokra ösztönöz a már meglévő és speciálisan

Összefoglalás

megtervezett új antihisztaminok terápiás hatékonyságát illetően. A kutatások új irányvonalát mutatja az utóbbi időben hozzáférhető HDC deficiens rágcső modell, amely további lehetőséget teremt, hogy tanulmányozzuk a humán medicinában használt antihisztaminok hisztamin receptor függő és független hatását.

Munkánk gyakorlati jelentősége

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

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

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

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Eredményeinket összefoglalva az alábbiakat kaptuk :

1. Mind HT168, mind M1 melanoma sejtek esetén, *in vitro*, a cimetidin a tamoxifen származék N-dietil-2-[4-(fenilmetil)fenoxi]-etanamin-HCl-al (DPPE-vel) kombinálva szignifikánsan csökkentette a tumorsejtek proliferációját. A ranitidin pedig önmagában mérsékeltbb csökkenést eredményezett.
2. HT168 sejtekben igazoltuk a H2 receptor mRNS jelenlétét, kimutattuk az ezen sejteken levő H2 receptorok aktivitását.
3. *In vivo* kísérleteink során az átlagos tumortérfogat nagyobb, az *in vivo* tumornövekedés gyorsabb volt az M1 sejtekkel oltott egerek esetén, mint a HT168 sejtekkel oltott egereknél.
4. Vizsgálataink szerint a H2 receptor antagonistá cimetidin a DPPE-vel kombinálva, *in vivo* nagymértékben csökkenti a HT168 melanoma

Közlemények

növekedését SCID egerekben.

5. Az antihisztamin ágenseknek a melanoma tumorok kialakulására kifejtett hatását vizsgálva azt találtuk, hogy a tumornövekedési potenciál is alacsonyabb volt a DPPE-t és cimetidint együttesen kapott egerek esetében a kontrollhoz és a többi kezelt csoporthoz képest.

6. A cimetidinnel és DPPE-vel kombináltan kezelt egerek túlélése szignifikánsan meghaladta a kontroll és a többi kezelt csoport túlélését.

7. Western blot analízis alapján a HT168 sejtek HDC expressziója nagyobb mértékű volt in vivo körülmények között, mint in vitro tenyésztett sejtek esetében, a különböző in vivo kezelések azonban nem befolyásolták a HDC fehérje mennyiségét a szöveti kivonatokban.

8. A cimetidin és DPPE-vel együttesen kezelt egerekben kifejlődött tumorok szövettani feldolgozása és az immunreaktivitás vizsgálata igazolta, hogy ez a kezelés megnöveli az IFN- γ -t termelő egér makrofágok infiltrációját, és kisebb mértékben a természetes ölü sejtek (NK sejtek) felhalmozódását a kezelt állatokban növekvő tumorokban, szemben a kontroll csoporttal.

VIII. KÖZLEMÉNYEK:

Az értekezésben felhasznált közlemények:

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

IF: 1,773

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

IF: 1,017

Egyéb közlemények:

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

IF: 2,614

2. Márián T, Szabó G, Goda K, Nagy H, **Szincsák N**, Juhász I, Galuska L, Balkay L, Míkecz P, Trón L, Krasznai Z. In vivo and in vitro multitracer analyses of P-

glycoprotein expression-related multidrug resistance. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2003 Aug; 30(8):1147-1154.

IF: 3,324

Megjelent absztraktok:

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

Előadások, absztraktok:

1997. április, *Fiatal Bőrgyógyászok XIV. Fóruma, I. Magyar Trichológiai Szimpózium, Kecskemét*

Szincsák N, Simics E, Hunyadi J, Juhász I. Az emberi haj kísérletes vizsgálatára alkalmas transzplantációs állatmodell. (Előadás)

1997. szeptember, *Dermatológiai Weekend, Debrecen*

Szincsák N, Juhász I, Márián T, Hunyadi J. Pozitron Emissziós Tomográfia alkalmazása egér kísérletekben. (Előadás)

1998.március, *DE OEC Ph.D. és TDK Tudományos Diáktalálkozó, Debrecen*

Szincsák N. Pozitron Emissziós Tomográfia alkalmazása egér kísérletekben. (Előadás)

1998. április, *Fiatal Bőrgyógyászok XV. Fóruma, Kecskemét*

Közlemények

Szincsák N, Győry I, Nagy T, Kusz E, Falus A, Hunyadi J, Juhász I, Duda E. Tumorok citokin génterápiája állat modellekben. (Előadás)
1999. április, I. Congress of the Hungarian Society for Dermatological Research, Szeged

Duda E, Nagy T, **Szincsák N**, Juhász I, Jánossy T, Hunyadi J. Decreased tumorigenicity of TNF producing melanoma and other tumors in healthy and immunodeficient mice. (Előadás)
2001. május, European Histamine Research Society XXX. Annual Meeting, Finnország

Szincsák N, Hegyesi H, Juhász I, Martin G, Kovács P, Rivera E, Hunyadi J, Falus A. Prevention of tumor growth by combination of cimetidine/DPPE in scid mice xenografted with human melanoma cells. (Előadás)
2001. december, A Magyar Dermatológiai Társulat Nagygyűlése, Budapest

Szincsák N, Márián T, Bálint K, Nagy H, Balkay L, Galuska L, Trón L, Krasznai Z, Juhász I. A multidrog rezisztencia in vivo kimutatása ^{18}F FDG és $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MIBI párhuzamos használatával SCID egerekben. (Poszter)