

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH) receptoron
alapuló új célzott daganatterápia lehetősége a humán
uvealis melanomában**

Dr. Oláh Gábor

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	4
3. Irodalmi áttekintés	7
Az UM.....	7
Az UM epidemiológiája	7
Az UM rizikófaktorai	8
Az UM felismerése és diagnosztizálása	8
Az UM prognózisa	9
Adjuváns kezelések	13
Az UM molekuláris háttere és annak további lehetséges terápiás vonatkozásai	14
A daganatterápia során kialakuló rezisztenciák, ezek közül az antraciklin rezisztencia.....	15
LHRH-R	17
3. Célkitűzés	21
4. Anyagok és módszerek.....	22
Szövetminták	22
Szövetminták RNS izolálása, reverz transzkripciója és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciója (RT-PCR)	22
Sejtvonalak RNS izolálása, reverz transzkripciója és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciója (RT-PCR)	23
Doxorubicin rezisztens OCM3 sejtvonal fejlesztése.....	25
Immuncitokémia.....	26
Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálatok	27
5. Eredmények	28
Az UM szövetminták 1-es típusú LHRH-R expressziója	28
mRNS vizsgálatok PCR módszerrel	28
Receptor fehérje vizsgálatok IHC segítségével.....	30
Ligand kötési vizsgálatok.....	31
Az LHRH ligand mRNS expressziója humán UM esetén	32
DOX rezisztens humán UM sejtvonal létrehozása.....	32
Az OCM3 és OCM3 _{DOX320} sejtvonalak LHRH-R expressziójának exonspecifikus vizsgálata	33
Sejt proliferációs vizsgálat	34
A DOX és AN-152 sejtszintű felvételének és eloszlásának vizsgálata OCM3 és OCM3 _{DOX320} esetén konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével	35
6. Megbeszélés.....	37
7. Abstract	43
8. Összefoglaló.....	44

9. Irodalomjegyzék.....	45
10. Tárgyszavak:.....	56
11. Köszönetnyilvánítás	57
13. Függelék: a megjelent publikációk és kéziratok gyűjteménye.....	64

1. Rövidítések jegyzéke

BCRP: emlődaganat rezisztencia fehérje (breast cancer resistance protein)

BSA: marha szérum albumin (bovine serum albumin)

DE KK: Debreceni Egyetem Klinikai Központ

DOX: doxorubicin

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)

FBS: borjú szérum albumin (fetal bovine serum)

FITC: fluoreszcein izotiocianát (fluorescein isothiocyanate)

FSH: follikulus stimuláló hormon (folliculus stimulating hormone)

GHRH: növekedési hormon felszabadító hormon (growth hormone releasing hormone)

GPCR: rodopszin-szerű G-fehérje kapcsolt receptor (rhodopsin-like G-protein-coupled receptor)

HRP: tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)

IHC: immunhisztokémia (immunohistochemistry)

LH: luteinizáló hormon (luteinizing hormone)

LHRH/GnRH: luteinizáló hormon-felszabadító hormon (luteinizing hormone-releasing hormone vagy gonadotropin releasing hormone)

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

MnSOD: mangán-tartalmú szuperoxid dizmutáz (manganese superoxide dismutase)

RT-PCR: reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (reverse transcription polymerase chain reaction)

PBS: foszfát puffer szalina (phosphate buffered saline)

SOD: szuperoxid dizmutáz (superoxid dismutase)

UM: uveális melanoma (uveal melanoma)

2. Bevezetés

Az American Cancer Society becslése alapján 2016 januárjában, csak az Amerikai Egyesült Államokban (USA) 15,5 millió polgár élt, akit korábban valamilyen daganattal diagnosztizáltak. Óvatos becslések alapján 2026 januárjára ezt a számot 20 millióra teszik. Európa a világ népességének 9%-át teszi ki, viszont a világ daganatos betegeinek 25%-a európai. Így 2018-ra 3,91 millió új daganatos megbetegedést jósolnak Európában és 1,93 millió halálesetet a daganatok következtében. Külön említést érdemel, hogy a magyar lakosság számos rosszindulatú daganatok esetén európai összehasonlításban a statisztikák legrosszabb helyét foglalja el. Európában a leggyakoribb daganatos megbetegedések 2018-ban a női emlő karcinóma (523000 eset), ezt követi a kolorektális rák (500000 eset), a tüdő rák (470000) és a prosztata karcinóma (450000 eset) (5). Azonban ez a lista, ha a daganatok által okozott haláleseteket nézzük, egészen más sorrendet mutat. A daganatok által okozott halálesetek 2018-as európai statisztikájának vezetője a tüdődaganat (388000 halálozás), ezt követi a colorectalis daganat (243000 halálozás), emlő daganat (138000 halálozás) és hasnyálmirigy daganat (128000 halálozás) (5). Ezek az elborzasztó statisztikák jelentik a hajtóerőt a világszerte jelentős anyagi és szellemi potenciált megmozgató daganatkutatásokhoz. Ugyan a korai diagnózisnak és a hatékony terápiáknak köszönhetően a daganatos betegek túlélése folyamatosan nő, de ez a növekedés daganattípusokra vonatkoztatva koránt sem kiegyensúlyozott (4). Míg a leggyakoribb daganattípusok esetén (emlő, vastagbél, prosztata), mind terápiás, mind korai diagnosztika területén számos kutatás és gyógyszerfejlesztés zajlik, addig a ritka daganatok esetén meglehetősen kevés információ áll rendelkezésünkre a daganatok molekuláris hátterével kapcsolatban.

Leginkább ez a jelenség okolható azért, hogy az uvealis melanoma (UM) esetén a betegek várható túlélése az elmúlt évtizedekben gyakorlatilag semmit sem javult. Az UM az igen ritka daganatos megbetegedések közé tartozik, Európában mindössze hét új megbetegedés jut 1 millió főre. Azonban az UM a leggyakoribb nem bőr eredetű melanoma típus és a szem leggyakoribb primer intraokuláris daganatos megbetegedése felnőtt korban. Világszerte az új UM megbetegedések számát 7095 esetre becsülik évente (6). Mivel meglehetősen kevés ismeretanyag áll rendelkezésre az UM kialakulásának, áttétképzésének molekuláris hátteréről, így az új hatékony szisztémás kezelési lehetőségek is váratnak magukra. A primer daganat kezelése leggyakrabban a szem műtéti eltávolításából vagy helyi sugárkezelésből áll. Áttétes UM esetén hatékony kezelési módszer jelenleg nem ismert. A kezelő orvosok sok esetben

próbálkoznak az áttétes cutan melanoma esetén használt kemoterápiával, de ezek az UM és cutan melanoma közötti jelentős patofiziológiai különbségek miatt hatástalanok, sőt a kezelés következtében kialakuló mellékhatások meglehetősen előnytelenek a beteg számára. A nem megfelelően kiválasztott citotoxikus kezelés a kemorezisztencia gyors kialakulásához vezet. Ezért is égetően fontos olyan új, hatékony gyógyszermolekulák kifejlesztése, amelyek a különböző daganattípusok sajátosságait figyelembe véve képesek célzott módon gyorsan és hatékonyan gátat szabni a daganat növekedésének és terjedésének. Kísérletes munkánk során az UM lehetséges célzott terápiás lehetőségeit vizsgáltuk meg. A különböző peptid hormonok (pl.: GHRH, szomatosztatin, LHRH) és azok receptorainak célzott, terápiás felhasználása több évtizede számos kutatás tárgyát képezi (7, 8). A korábbi eredményeink alapján a daganatok eddig többnyire tisztázatlan okból expresszálhatják az említett peptid hormonokat és azok receptorait. A receptor fehérje tumor sejten stabil és megfelelő szintű jelenléte lehetőséget adhat, olyan hormon analógok szintézisére, amelyekhez akár hasítható módon citotoxikus molekula kapcsolása is lehetségessé válik. Ezek a mesterséges hormon analógok alkalmasak lehetnek arra, hogy specifikusan a tumorban és annak receptor pozitív áttéteiben halmozódjanak, jelentős mértékben csökkentve a citotoxikum terápiás dózist, csökkentve ezzel a rezisztencia és a mellékhatások kialakulásának esélyét, valamint a peptidkonjugátumként sok esetben pozitívan megváltoztatva annak szervezetből történő eliminációját is. Az értekezés tárgyát képező munka elvégzését megelőzően, a következő kérdések foglalkoztattak minket. Vajon ez a viszonylag ritka és agresszív daganattípus a cutan melanomához hasonlóan magas százalékban expresszálja-e az LHRH receptort és annak ligandját? Ha igen, van-e összefüggés a receptor/ligand expresszió és a tumor sajátosságai között? A rendelkezésünkre álló citotoxikus LHRH analógok tesztelésére *in vitro* UM modell alkalmazását terveztük. Másrészt komoly kérdés a gyakorló onkológusok részéről, hogy vajon egy új, célzott citotoxikum alkalmazása során, a daganatok vajon milyen gyorsan válnak rezisztenssé a kezelésre? Ezen kívül a hagyományos citotoxikum elleni rezisztencia vajon azonos-e, az azt tartalmazó célzott párjával szembeni rezisztenciával? A vizsgálat elvégzését az is indokolta, hogy nemcsak az UM lehetséges célzott terápiás lehetőségét tudjuk eredményeinkkel támogatni, de egy jól működő modell beállítása daganattípustól függetlenül is számos új és általánosan is jól használható ismeretet nyújthat a peptid hormon alapú célzott terápiák fejlesztéséhez. Külön említést érdemel az a szerencsés körülmény, hogy az UM ritka előfordulása miatt a daganatos szövetminták begyűjtése korántsem egyszerű feladat, azonban a Debreceni Egyetem Klinikai Központja (DE KK) kiemelkedően alkalmas hely az UM vizsgálatára mivel, az országban a betegek túlnyomó többsége itt kerül ellátásra. A DE KK

Szemklinika és Tanszékünk példás együttműködésének köszönhetően néhány év alatt sikerült azt a releváns tumor szövet mintaszámot elérni, amivel megkezdhattuk az LHRH receptor státusz egyedülálló meghatározását.

3. Irodalmi áttekintés

Az UM

Az UM a szem malignus melanomája, az *uvea* bármely részében található melanociták daganatos átalakulásával fejlődhet ki. Leggyakrabban a chorioideában alakul ki (90%), de előfordul a ciliáris testben (6%) és az íriszben (4%) is (9, 10). A szervezetben hematogén úton terjed, és leggyakrabban a májba, tüdőbe és a csontokba ad áttétet (9).

Az UM epidemiológiája

A melanomák mindössze 5% érinti a szemet, így a cutan melanoma után a szem a leggyakoribb előfordulási helye. A szemészeti melanomák 85%-a az uvealis traktusban alakul ki. A conjunctiva melanoma kialakulása igen ritka. Az uvealis és a conjunctivalis melanoma klinikai és hisztopatológiai tulajdonságai nagyban eltérnek (11). Az UM számos molekuláris markerben mutat hasonlóságot a központi idegrendszer melanocita eredetű daganataival, míg a conjunctiva melanomák ilyen szempontból sokkal inkább a cutan melanomára hasonlítanak (12, 13).

A betegség átlagosan a betegek 60. életévében jelenik meg, de a UM-ban szenvedő betegek kor szerinti megoszlása igen változatos, 6 és 100 éves kor között bármilyen életkorban előfordulhat (8). Viszont jellemzően a leírt esetek mindössze 1%-ban fordult elő 18 év alatt (11).

Ismert, hogy a betegség a férfiak körében gyakrabban fordul elő. A UM betegek 97,8%-a a kaukázusi populációba tartozik (6). A betegség rasszok közötti megoszlása a következő, az amerikai populációban 5 megbetegedés jut 1 millió főre. Ha a nem spanyol származású kaukázusi populációt nézzük az Amerikai Egyesült Államokban, akkor 6,02-re emelkedik az 1 millió főre jutó megbetegedések száma, míg az afroamerikaiak esetén 0,31, ázsiaiak esetén csak 0,39 eset jut 1 millió főre. Európában jól megfigyelhető a betegség gyakoriságának fokozódása a szélességi körök növekedésével, így 2 eset/ millió fő Olaszország és Spanyolország esetén, Közép-Európában 6 eset/ millió fő, míg Norvégiában és Dániában 8 eset/ millió főre emelkedik a népesség érintettsége (14, 15). Viszont a már kialakult betegség prognózisában nincs különbség az etnikai csoportok között (1). Az UM esetek számában enyhe emelkedés figyelhető meg, ami betudható a születéskor várható élettartam növekedésének. Orsósejtes tumor szövettani típusba tartozó UM-ról általánosan elmondható, hogy szignifikánsan korábban (60 éves kor) kerül diagnosztizálásra a betegség, mint az epitheloid (65 éves kor) vagy a kevert

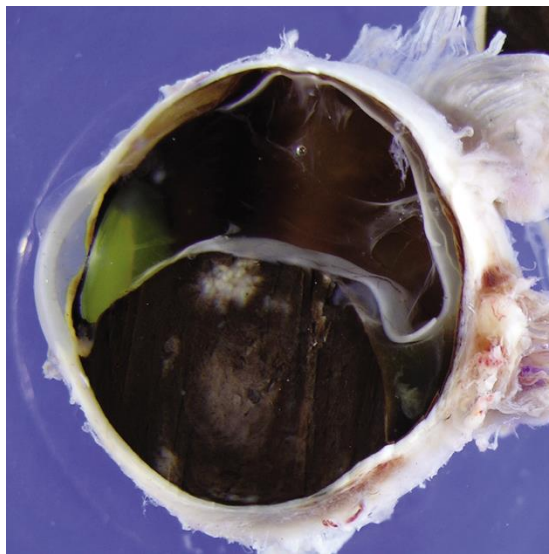
sejtes (64 éves kor) tumorok esetén. UM betegek esetén megfigyelték a cutan melanoma prevalenciájának növekedését is (16).

Az UM rizikófaktorai

Az UM kialakulása szempontjából számos rizikófaktorral kell számolnunk, mint a világos szem- és bőrszín, nehezen barnuló bőrtípus, az oculo(dermalis) melanocytosis, a displasiás naevus szindróma és a BAP1 mutációja (17-20). Érdekes módon az UM betegeknek 11%-al magasabb kockázatuk van arra, hogy egy másik daganatos betegség kialakulását is elszenvedik, mint például bőr melanoma és a vesesejtes karcinóma, ennek a hátterében is a BAP1 mutáció állhat (15, 19). Az UV expozíció szerepe elméletben nem kizárható, de az UM kialakulásában jelenleg még nem bizonyított (21).

Az UM felismerése és diagnosztizálása

Az UM korai felismerését nagyban megnehezíti az, hogy nincsenek specifikus tünetei, valamint nagyon gyakran a primer tumor tünetmentes (az esetek 30%-ban) (1. ábra). Ha mégis jelentkeznek tünetek, akkor jellemzően homályos látás (esetek 37,8%-a), fényérzékenység (fotofóbia) 8,6%, úszkáló homályok (7%), látótérkiesés (6,1%), látható tumor (3,1%), fájdalom (2,4%) és végül a torzult látás (2,2%) (22).



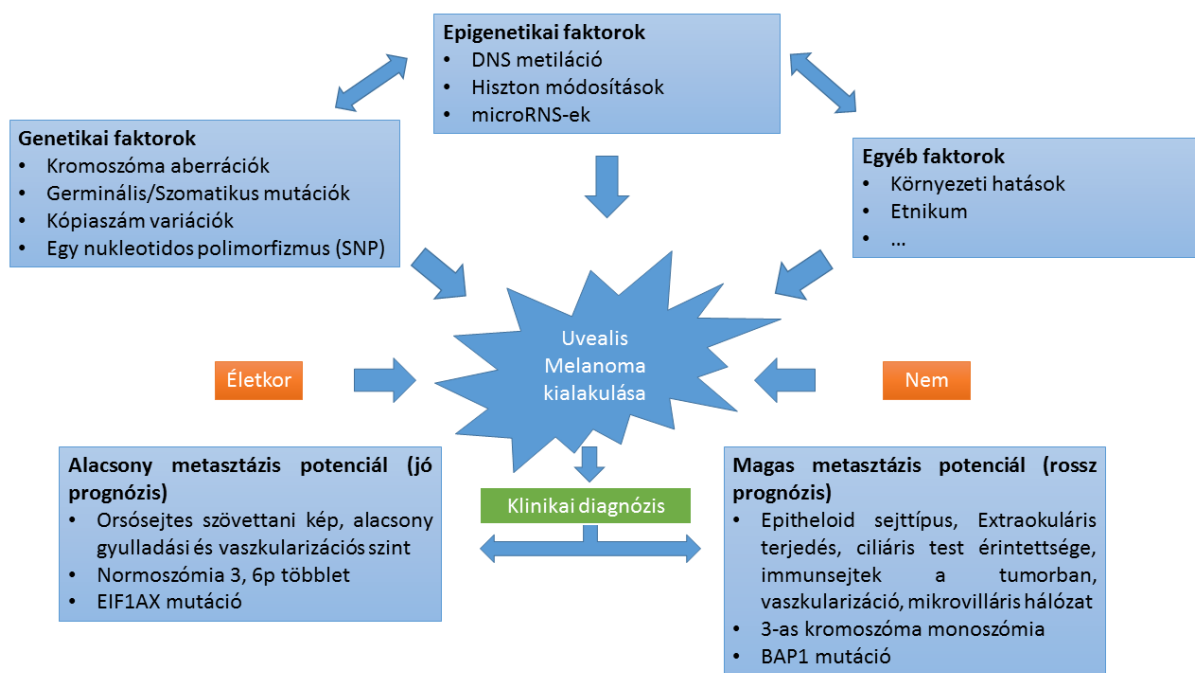
1. ábra Nagyméretű pigmentált chorioidea és ciliáris test melanoma (3)

Az UM és egy nevus (anyajegy) megkülönböztetése egymástól sok esetben nem egyszerű, az elkülönítés fontosságát jelzi, hogy 8000 anyajegyből mindössze egy alakul át jellemzően UM-vá (15). A COMS (Collaborative Ocular Melanoma Study) alapján az UM klinikai félrediaosztizálása csak 0,48%-ban jellemző, ez azt sugallja, hogy a jelenlegi szigorú kritériumok alapján az UM jól elkülöníthető az egyéb nem malignus elváltozásoktól (23). Ezeket alapvetően nem invazív vizsgáló módszerekkel végzik. Közöttük leginkább említést érdemelnek a patológiás elváltozás fizikai paraméterei, így: a prominenciája nagyobb, mint 2 mm, a retina mögötti folyadékgyülem, a beteg panaszai, narancs pigment megjelenése és kevesebb, mint 3 mm távolság a látóidegfőtől (papilla). Valamint az ultrahangos képen látható udvar vagy annak hiánya a képlet körül (24). További eljárások segíthetik a diagnózist vagy a betegség kimenetelének pontosabb megítélését, mint például a vékony tűs aspirációs biopszia, a fluorescens angiográfia. Az UM terápiája szempontjából a legnagyobb problémát az jelenti, hogy vizsgálatok szerint a mikrometasztázisok a legtöbb esetben a diagnózist megelőző években már kialakulnak. Ezért is lenne fontos, olyan nem invazív vizsgálmódszerek fejlesztése, mint a „folyadék biopszia” (Liquid biopsy), amely a vérben keringő daganatsejtek kimutatására lenne alkalmas (25, 26).

Az UM prognózisa

A primer tumor sikeres sebészi vagy radioterápiája ellenére, az érintett betegek 50%-ában később távoli áttét alakul ki (27). A betegek teljes túlélése 5 évet követően 69%, 15 év után 55% és 25 évet követően 51%. Metasztázis esetén jellemzően hematogén úton terjed és mivel jelenleg nincs hatékony szisztémás terápia az áttétek kezelésére (28), ezért az elmúlt 40 évben az áttétes UM-ás betegek túlélése nem változott jelentősen. Metasztázis felismerésétől számított átlagos túlélés 12 hónap (2. ábra). Májmetasztázis esetén 4-6 hónap az átlagos túlélés, az 1 éves túlélés mindössze 10-15%. Más metasztázisok esetén 19-28 hónapra tehető az átlagos túlélés (29, 30). Jelenleg kizárólag a korai diagnózis (mely megelőzi az áttétképzést) jelenthetne javulást a beteg túlélésében. A metasztázisképzés rizikóját jelenleg elsősorban a klinikai faktorok alapján tudjuk megítélni. Így fokozott áttétképzési hajlamot jelent a tumor nagy mérete (2. ábra), ciliáris testben való elhelyezkedése, a szemén kívüli terjedése (mivel így a nyirokrendszeren keresztüli terjedés is lehetséges) (31). A prognózis szempontjából a szövettani típus is említést érdemel, nagyobb metasztázis hajlamot jelent, ha epitheloid sejtes a tumor, mikrovilláris hálózatot képez, mitotikusan aktív és lymphocita infiltráció figyelhető meg. Az UM esetén is jellemzőek kromoszóma elváltozások, ezek közül néhányat

összefüggésbe hozták a betegség prognózisával. A leggyakrabban vizsgált kromoszóma abnormalitás a nyolcas kromoszóma hosszú karjának átrendeződése (8q), és a hármas kromoszóma veszteség, mindkettő rossz prognózissal társul. A 8q kópiaszám eltérései a UM esetek 79%-ában fordul elő, viszont azokban az esetekben ahol a 8q normál kópiaszámban fordul elő, az 5 éves túlélés 93%-ot ér el (32). Miközben 1 extra 8q nyereség 67%-ra, további kópiák megjelenése pedig 29%-ra csökkenti az 5 éves túlélést. A 8q átrendeződéssel gyakran jelentkezik együtt a hármas kromoszóma monoszómiája, ami a betegek 65%-ában fordul elő és előfordulása esetén a betegek 5 éves túlélése mindössze 37%. Normál hármas kromoszóma esetén ez 90% (32-34). További citogenetikai eltérések is összefüggésbe hozhatóak a távoli áttétképzéssel, mint a 8q, 6q, 1p vesztesége, viszont a 6p nyereség pozitív prognózissal társul (35, 36). Ezen citogenetikai faktorok tesztelésére elérhetőek tesztek, valamint olyan génexpressziós panelek, melyek sokkal pontosabban jósolják meg a beteg prognózisát, mint a hagyományos tumor átmérőn alapuló módszer (2. ábra) (37, 38).

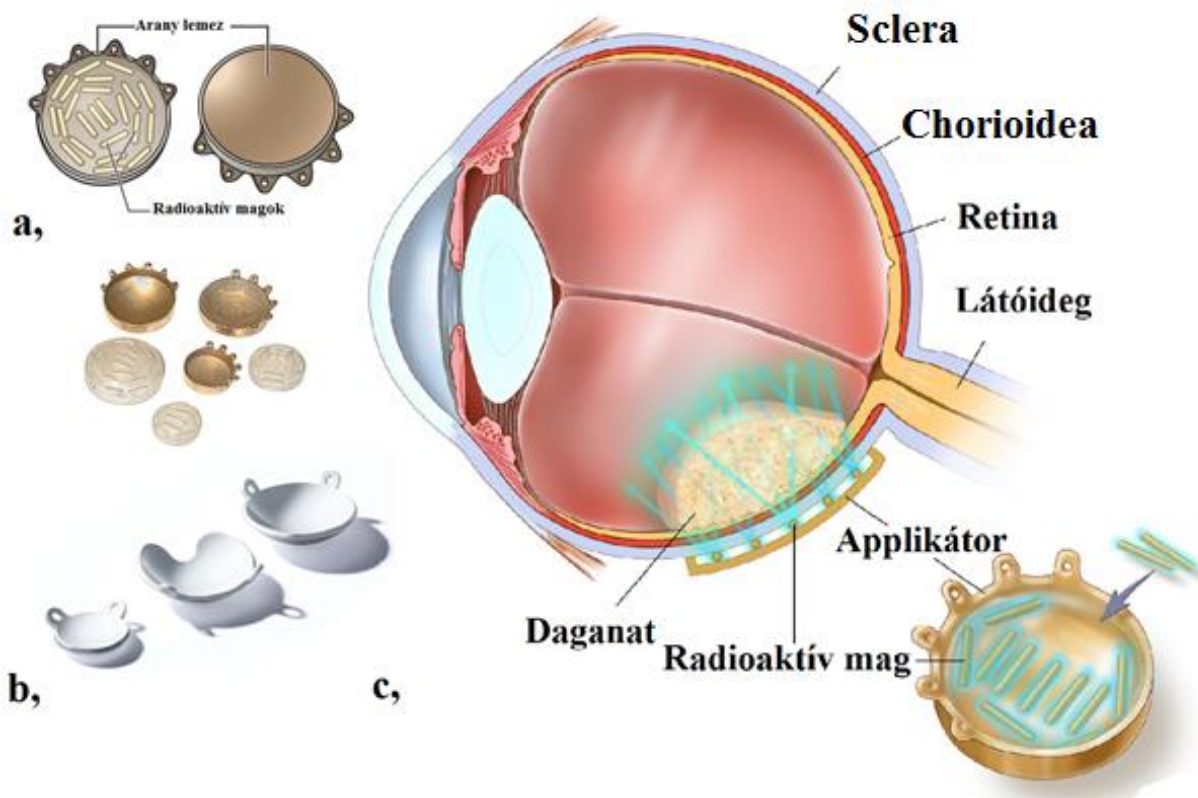


2. ábra Az uveális melanoma (UM) kialakulásához vezető fő tényezők összefoglalása. A betegség kialakulása szempontjából számos genetikai és epigenetikai faktor játszik szerepet, valamint számolni kell egyéb környezeti és etnikai tényezőkkel is. Alapvető befolyásoló tényezők az életkor és a nem. A kialakult betegség klinikai diagnózisát követően a szövettani kép, citogenetikai és génexpressziós sajátosságok alapján nagy pontossággal jósolható a betegség prognózisa. (1)

Az UM terápiai lehetőségei

A primer UM terápiáját alapvetően két részre oszthatjuk, szem megőrző kezelésekre és enukleációra (szem eltávolítása). Sajnos a szem megőrző eljárások sem feltétlenül jelentik azt, hogy az érintett szem látó szem marad, másrészt számos súlyos szövődménnyel számolhatunk a kezelés következményeként. A szem megőrző terápiai között a sugárkezelést, valamint a sebészi és lézer beavatkozásokat érdemes megemlíteni.

A leginkább elterjedt szem megőrző kezelés a plakk brachyterápia (3. ábra), mely során egy elnyelő lemezre helyezett sugárforrás kerül felvarrásra episcleralisan a szem felszínére, a tumor elhelyezkedésének megfelelően.



3. ábra Plakk brachyterápia: a, az eszköz sematikus rajza, ahol látható, hogy az eszközben több sugárzó anyagot tartalmazó mag található, az eszköz hátlapja képes a sugárzás teljes árnyékolására, így az orbita irányába nem terjed a sugárzás. A b, panelen látható az eszköz képe, különböző méretben és alakkal érhető el az eszköz, hogy a tumor a lehető legnagyobb sugárdózist kapja az egészséges szövetek megkímélése mellett. A c, panel az applikátor episcleralis elhelyezkedését mutatja, az ábrán is látható, hogy ilyen módon csak a 6 mm-nél kisebb prominenciájú és a 16 mm alatti húrátmérő esetén kezelhető hatékonyan a tumor. <https://www.cancer.gov/types/eye/patient/intraocular-melanoma-treatment-pdq> Átdolgozva

A megfelelő dózisu sugárzás leadását követően, újabb műtéttel lehet az eszközt eltávolítani, hatékonysága megfelelő tumorméret esetén az enukleációval (23). Magyarországon ilyen kezelésre leginkább a β sugárzó $^{106}\text{Ruténium}$ izotóp érhető el. Mivel a $^{106}\text{Ruténium}$ β sugárzó, így alapvetően kis rétegvastagságú szövetek kezelésére alkalmas, így a tumor húrátmérője nem lehet nagyobb, mint 15 mm, prominenciája pedig 6 mm alatti kell, hogy legyen. Gyakran kerül felhasználásra a $^{125}\text{Jód}$ izotóp, ami γ sugárzó anyag, így lehetővé teszi a mélyebb szöveti penetrációt. A plakk brachyterápiát nem javasolják, ha a tumor extraoculárisan is terjed, nagy a bazális átmérője, ha a szem vak és fájdalmas (39). A kezelés gyakran jár szövődeményekkel, mint a sugárzás okozta retinopátia (45%-67%), cataracta (44%), neovasculáris glaukóma (28,3%) és makula ödéma (24,5%) (40, 41).

A közepes és nagy tumorok esetén töltött részecske terápia (hélium ion terápia) is hatékonyan alkalmazható, bár használata széles körben még nem elterjedt (42). Kedvező eredményeket mutat még a proton sugár terápia (43).

Az UM gyakran alkalmazott kezelése az enukleáció. Leginkább korábbi látásvesztés, kiterjedt intraokuláris terjedés, kerületi tumor invázió, valamint nagy tumor átmérő esetén kerül alkalmazásra (41). Néhány alternatív szem megőrző eljárás is ismert, mint a transz-retinalis endorezekció és a transz-scleralis rezekció. Ezek alkalmazása azonban nem terjedt el széles körben, mivel megnövelheti a daganatos sejtek szóródását és a daganatok kiújulásának is nagyobb a valószínűsége, a plakk brachyterápiával összehasonlítva. Előnyük a brachyterápiával szemben, hogy nagy tumorméret esetén is alkalmazható és a látás kevésbé károsodik alkalmazása során (41).

Lézer fotokoaguláció és transzpupilláris hő terápia (transpupillary thermal therapy (TTT)) során lehetőség van arra, hogy nagy mennyiségű energiát fókuszáljunk a tumorra és ezzel roncsoljuk annak érhálózatát és csökkentjük a kiújulás valószínűségét. Fotodinamikus terápia esetén (Photodynamic therapy (PDT)) a korábban beinjektált fényérzékeny anyagot aktiváljuk és a belőle felszabaduló szabadgyökökkel roncsoljuk a tumort. A TTT a brachyterápiából visszamaradt chorioideális daganatok adjuváns kezelésére is alkalmas. Egyes vizsgálatok viszont arra az eredményre jutottak, hogy a TTT nem csökkentette az UM szóródásának esélyét, viszont hozzájárul a látásromláshoz (44-46).

Jelenleg ugyan nem érhető el célzott terápia a primer UM esetén, de néhány reménykeltő klinikai vizsgálat folyamatban van. Különösen indokolt lenne hatékony szisztémás terápia kifejlesztése, mivel a jelenleg elérhető helyi kezelések igen súlyos szövődeményekkel járnak. Ilyen klinikai I-es fázisban (NCT02771340) járó molekula, az ICON-1, ami a VII faktor strukturális analógja, a szöveti faktor (tissue factor) ligandja. Ez általánosan overexpresszált

UM esetén és hozzájárul a tumor növekedéséhez, trombus kialakulásához, érképződéshez és az áttétek képződéséhez (47). Az ICON-1 kötődve a szöveti faktort overexpresszáló sejtekhez, olyan szignalizációs kaszkádot indít el, ami az immunsejtek számára megkönnyíti a patológiás szövetek felismerését, miközben az egészséges szövetek sértetlenek maradnak.

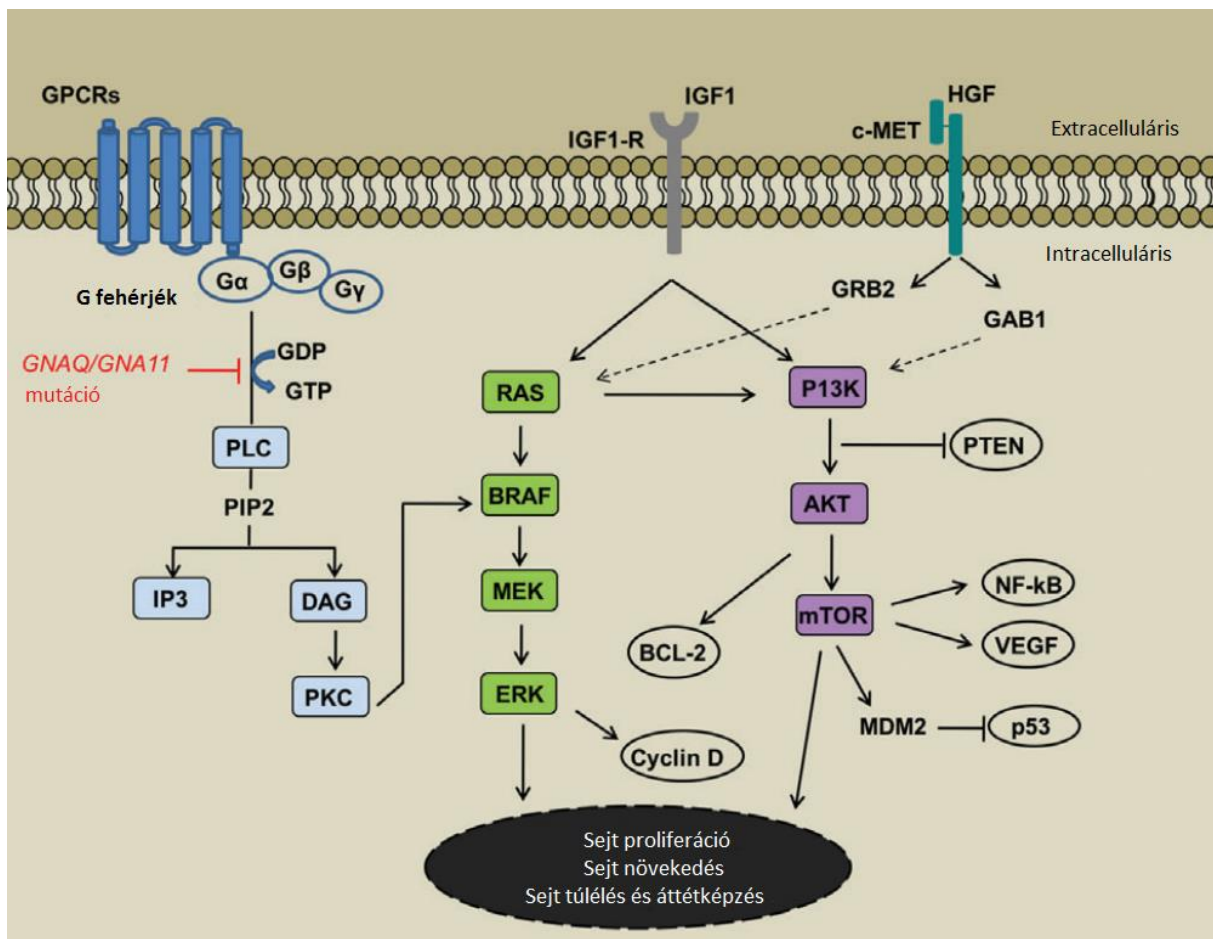
A preklinikai vizsgálatok (NCT03052127) fázisában járó AU-011 egy víruszerű részecske, ami szelektíven képes megkötni a daganatos sejteket. A részecske összeköthető infravörös érzékeny molekulákkal, amelyek lézer aktiváció esetén képesek elpusztítani a daganatos sejteket. Az AU-011 a heparinszulfát-szerű proteoglikánokat képes kötni, ami jellemzően a tumorokban sérült epithéliumban fordul elő (48).

Adjuváns kezelések

Az UM sok esetben a diagnózis felállításakor már adott távoli mikrometasztázist. Ezért az olyan kezelési lehetőség is fontos lenne, amely a metasztázisok növekedését képes gátolni, esetleg eradikálja azokat. Sok esetben az onkológusok megkísérik a cutan melanoma kezelésében használatos szerek (pl.: dacarbazin, alkilálószer) alkalmazását UM esetén, de a tumorok különbözőségéből adódóan ezek a kísérletek nem javítanak a beteg túlélésén. Így jelenleg nem ismert olyan adjuváns kezelés, ami javítaná a betegek állapotát (49, 50). Egérmodellben sikerült igazolni a tirozin-kináz gátló crizotinib esetén az új metasztázisok kialakulásának gátlását (51). Jelenleg klinikai kettős fázisban van a crizotinib kipróbálása (NCT02223819). A sunitinib (egy multitargetált tirozin-kináz inhibitor), klinikai kettős fázisban van a kipróbálása a valproe savval (hiszton deacetiláz gátló) együtt alkalmazva (NCT02068586). Mivel a hiszton deacetiláz gátlók a sejtek differenciálódását segítik elő, így erősíthetik a tirozin kináz gátlók hatását (52).

Az UM molekuláris háttere és annak további lehetséges terápiás vonatkozásai

UM-ban specifikus tumor szupresszor vagy onkogén még nem került leírásra. A cutan melanomara jellemző TP53, BRAF, RAS, CDKN2, PTEN faktorok, amelyek könnyen aktiválják a RAS-ERK útvonalat, csak ritkán fordulnak elő UM esetén. Többek között ezért is, a cutan melanoma esetén alkalmazott gyógyszerek nem, vagy csak kevésbé hatékonyak UM esetén (36, 53). A GNAQ onkogén korai mutációja ugyan ismert, ami a protein kináz C (PKC) mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) útvonalakat aktiválja (54). UM esetén a PI3K/AKT7/mTOR útvonalak (melyek a sejtciklus szempontjából fontos útvonalak) bizonyítottan módosultak (55, 56). UM sejtvonalakban leírt a PI3k/Akt útvonal aktivációja, ami a sejtek migrációjának felerősödéséhez vezet c-Met és a hepatocita növekedési faktoron (HGF) keresztül (57).



4. ábra Az uveális melanoma (UM) pathofiziológiája. Leginkább a MAPK, PI3K/AKT7/mTOR és IGF1R útvonalakat érdemes említeni. Az aktivált mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) a UM esetében hiányzó BRAF vagy NRAS mutációk esetén is aktiválódik, mutatva ezzel az átfedést a PI3K/AKT útvonallal. Az aktiválódott cKIT képes a szignalizáció továbbterjedését segíteni (pl.: MAPK útvonalon keresztül). Az IGF-1 szintén képes a MAPK és a PI3K/AKT7/mTOR útvonalak befolyásolására (2).

Továbbá a PTEN alacsony citoplazmatikus expressziója igazolt UM esetén, ami a PI3K/Akt szignalizációs út gátlásának megszűnéséhez vezet, ez szintén csökkenti az UM betegek túlélését (58). Mind a MAPK és a PI3K/AKT7/mTOR útvonalak, az inzulinszerű növekedési faktort (IGFs) befolyásolják, aminek a fő receptora az IGF-1. Az IGF-1 elsősorban a májban termelődik, ami az elsődleges helye az UM metasztázisainak. Ezért is feltételezik az IGF-1-R, KIT és c-MET kulcsfontosságú szerepét az UM kialakulásában. (59-61). A G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) a Hippo-YAP/TAZ útvonalon keresztüli szignalizációjukkal is összefüggésbe hozható az UM kialakulásával (2, 62, 63). Ezeket az ismereteket vázlatosan a 4. ábra foglalja össze.

A daganatterápia során kialakuló rezisztenciák, ezek közül az antraciklin rezisztencia

Az elmúlt 40 évben az antraciklinek számos szolid és vérképzőszervi malignitás első vonalbeli terápiáját képezik. Az antraciklin antibiotikumok pontos hatásmechanizmusa jelenleg sem teljesen tisztázott, citotoxikus hatásukért több párhuzamosan zajló folyamat felel. Hatásukat alapvetően a DNS kettős szálába való interkalációjuk okozza. Mivel az antraciklinek képesek nagy affinitással beférkőzni a DNS kettős szála közé, ezért a DNS topoisoméráz II hatását befolyásolva, ATP függő módon képesek a DNS felhasítását elérni (64). Az újabb antraciklinek a topoisoméráz I mediálta DNS hasítást is képesek kis mértékben fokozni. Sejtpusztító hatásuk kifejtésében fontos szerepet játszik, hogy reaktív oxigén gyökök (ROS) képződését indukálják. A ROS keletkezése sejtkárosítást okoz a lipidek peroxidációján és DNS károsodásán keresztül (65, 66). Így az antioxidáns molekulák, mint néhány vitamin, a glutation és antioxidáns enzimek képesek gátolni az antraciklinek szabadgyök képző hatását. A legfontosabb antioxidáns enzimek a szuperoxid dizmutáz, kataláz és a glutation peroxidáz. A DNS károsodás a sejtekben számos tumorelleses folyamat elindulását segíti elő, mint a tumorszupresszor p53 indukálását, a tumornövekedés lelassulását és az apoptózist (67, 68). Az antraciklinekkel szembeni rezisztencia sok szempontból még nem kellő alaposággal ismert. A rezisztencia kialakulásáért leginkább a módosult membrán transzport és aktív efflux pumpa folyamatok tehetőek felelőssé, mint az ABC transzporter szupercsalád, a P-glikoprotein és a multidrog rezisztenciához köthető fehérjék (multidrug resistance-associated protein, MRP). Antraciklinek esetén mindegyik hatékonyan képes a sejtekből eltávolítani citosztatikumot (69-71). Az MDR1 (multidrug resistance protein) receptor túlzott kifejeződése emlődaganatok esetén egyértelműen összefüggésbe hozható a betegek rosszabb prognózisával (72).

A „major vault protein”, először tüdőben leírt rezisztenciához kapcsolható fehérje (Lung resistance-associated protein, LRP), amit a sejtek citoplazmájában és a magmembránon találhatunk meg elsősorban. A „vault” fehérjék szerkezeti szempontból nagyméretű ribonukleo fehérjék, jellemzően az eukarióta sejtekben fordulnak elő. Az alakjuk a sejtmag póruskomplexének központi elemére emlékeztet. Fiziológias szerepe jelenleg még nem tisztázott (73). Működésük során képesek megváltoztatni a gyógyszer eloszlását a sejten belül, így a sejtmagban jelentősen csökkenteni képesek a gyógyszer koncentrációt, míg a citoplazmába változatlan marad a gyógyszer szint (74, 75). Túlzott kifejeződésüket leírták már colon carcinomában is, ahol a doxorubicin (DOX) lokalizációját képesek megváltoztatni. Ezt olyan módon befolyásolják, hogy a sejtmagból a citoplazmában transzlokálják a DOX elhelyezkedését, így biztosítva a daganatos sejtek túlélését (76, 77). A LRP számos daganat kemorezisztenciájáért tehető felelőssé, bizonyítottan ovarium carcinomában és akut mieloid leukémiában is beigazolódott a betegek rossz prognózisával való összefüggése (74, 75).

Az ABC transzporterek családjába tartozó emlő carcinoma rezisztencia fehérje (BCRP, breast cancer resistance protein) az emlődaganaton kívül szintén számos daganattípusban kerül túlzott expresszióra. A BCRP szubsztrátjai az antraciklinek is, így jelentősen hozzájárulhatnak a rezisztencia kialakulásához (78).

Az antraciklinekkel szembeni rezisztencia másik lehetséges formája a reaktív oxigén gyök szintetáz indukciója során keletkező szabadgyökök semlegesítése. A szuperoxid dizmutáz, a mangán-tartalmú enzim (MnSOD) és a glutation transzferáz P1 indukciója mind összefüggésbe hozható az antraciklinek okozta oxidatív stresszel szembeni fokozott ellenálló képességgel (79-81).

A DOX rezisztencia szempontjából fontos megemlíteni azoknak a tumor szupresszor géneknek a státuszát, amelyek kulcsfontosságú szerepet játszanak az apoptózis folyamatában. Ilyen tumorszupresszor például a p53, melynek funkció kiesése képes rontani a DOX hatékonyságát (82-84). A topoizomeráz II kifejeződésének és aktivitásának változása is képes befolyásolni a DOX iránti érzékenységet és leírták, hogy a NF κ B transzkripciós faktor aktivációjának csökkentése is DOX rezisztencia kialakulásához vezethet (85-89).

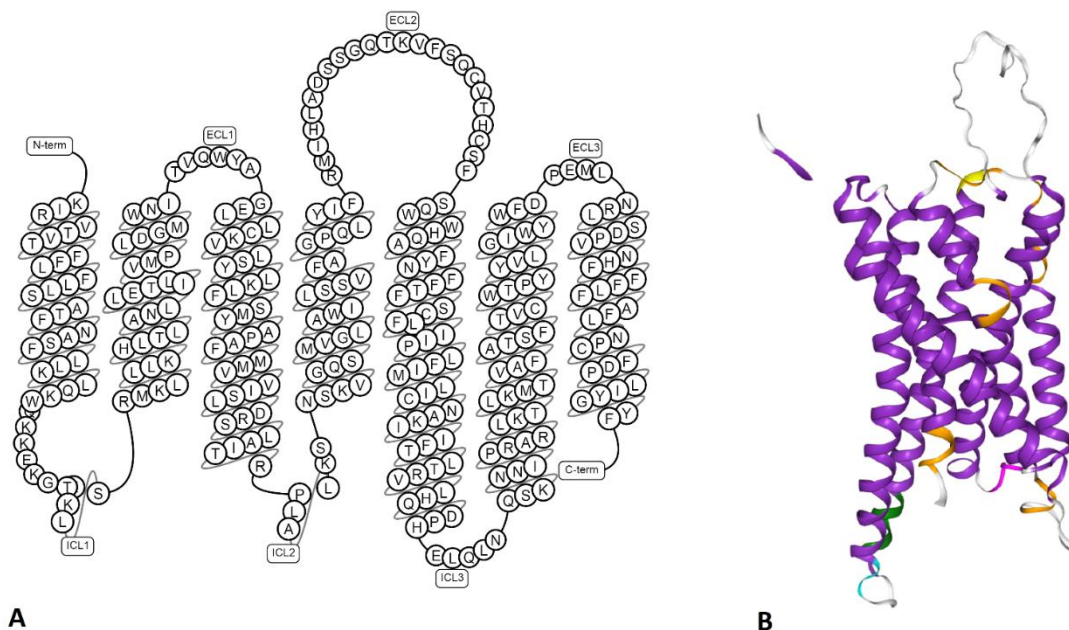
LHRH és receptora

LHRH

Az emlősök reprodukciójában alapvető jelentőségű az hypothalamus- hypophysis- gonadok közötti folyamatos interakció. A hypothalamus pulzáló módon választja ki az LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone vagy más néven GnRH gonadotropine releasing hormone)-t, ami egy deka-peptid (pGlu1-His2-Trp3-Ser4-Tyr5-Gly6-Leu7-Arg8-Pro9-Gly10NH₂), alapvetően az ivarsejtképzést és a szteroidok szintézisét szabályozza. A neuroszekréció által kiválasztott LHRH nagy affinitással képes kötődni a hypophysis gonadotrop sejtjeihez, amelyek ennek hatására a luteinizáló hormont (LH) és a folliculus stimuláló hormont (FSH) termelik. Így az LHRH és a LHRH receptor (LHRH-R) központi szerepet játszik a reprodukcióval kapcsolatos folyamatokban, az LHRH-R expressziója, sejtfelszíni sűrűsége és szerkezete alapvetően képes ezeket meghatározni az LH és FSH termelésen keresztül (90).

LHRH-R

Az LHRH-R GPCR (rhodopsin-like G-protein-coupled receptor) családjába tartozó hét transzmembrán doménnel rendelkező G-fehérje kapcsolt membrán receptor. A humán LHRH-R citoplazmatikus C-terminális farki része hiányzik, ezt a receptor altípust I-es típusú (emlősökre jellemző) LHRH-R-nek, míg a farkkal rendelkezőt II-es típusú LHRH-R-nek nevezzük (91, 92). Az I-es típusú LHRH-R 328 aminosavból áll (93). A receptort kódoló gén a 4-es kromoszómán helyezkedik el, a gén kódoló régiója 3 exonra oszlik el, amit 2 nagy intron választ el egymástól (94, 95). Az LHRH-R-nak 3 transzkript variánsból átíródó fehérje izoformája ismert, az sb1 jelöli a teljes hosszúságú receptort (328 aminosav), az sb2 esetén a kettes exon részben eltűnik (248 aminosav), az sb3 esetén a teljes kettes exon hiányzik (177 aminosav) (93). A nem teljes hosszúságú LHRH-R funkciója egészséges és daganatos szövetekben még teljesen nem tisztázott. A teljes hosszúságú LHRH-R aminosav sorrendjét és 3D szerkezetét az 5. ábra mutatja be.



5. ábra A human LHRH-R szerkezete. *A Az LHRH-R szerkezete kigyódiagrammon, B háromdimenziós ábrázolása. A human LHRH-R a 7 transzmembrán doménnel rendelkező G fehérje kapcsolt peptid kötéseére alkalmas receptorfehérje. Az I-es típusú emlősökre jellemző receptor citoplazmatikus c-terminális farki része hiányzik. Grafika forrása: http://www.gpcrdb.org/protein/gnrhr_human/*

LHRH-R expresszió daganatokban

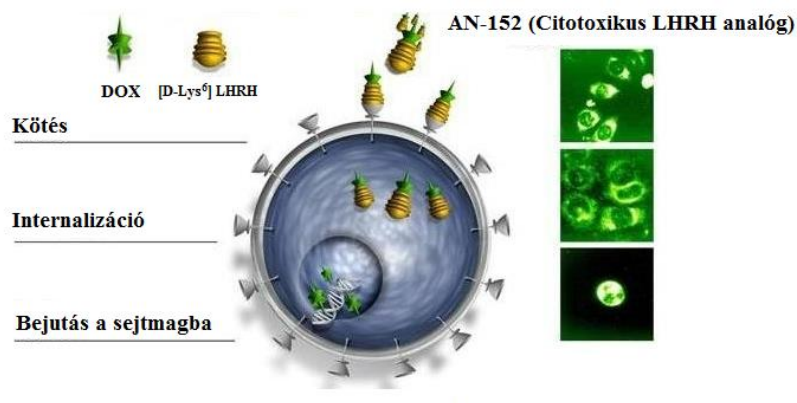
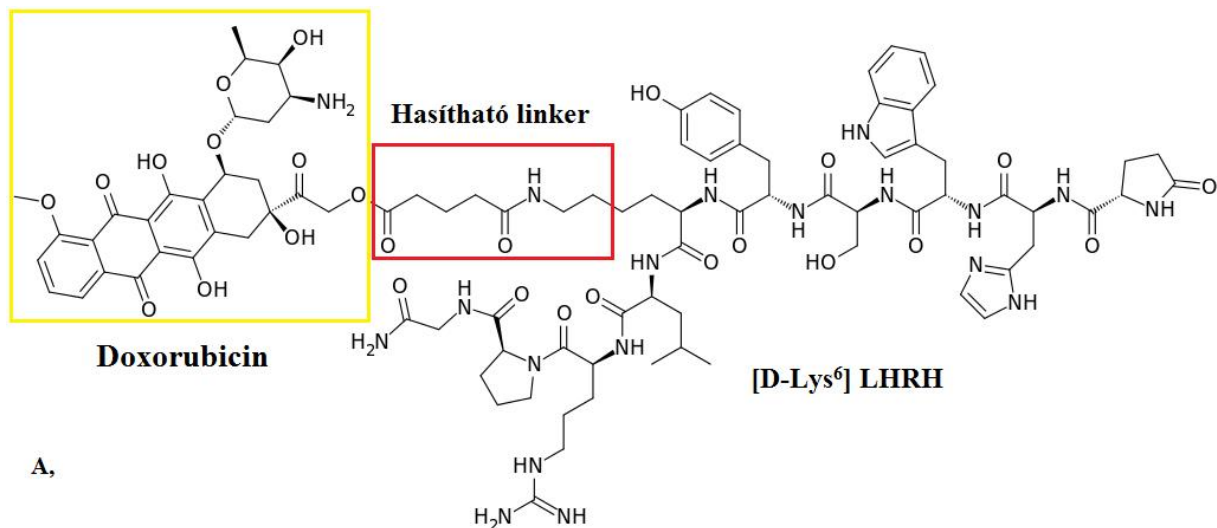
Az LHRH-R expressziója az egészséges emberi szervezetben meglehetősen limitált és leginkább nem osztódó sejteken fejeződik ki (elsősorban az agyalapi mirigyben és a reprodukcióért felelős szervekben). Ugyanakkor számos reproduktív hormon függő daganatban, mint endometrium, ovarium, prosztata és emlő daganatokban is leírták expresszióját (96, 97).

Az LHRH analógok önmagukban is képesek lehetnek a daganatok növekedésének befolyásolására, mivel közvetlenül valamint az FSH, LH és a szteroid hormonok hatásain keresztül is képesek lehetnek befolyásolni a reproduktív, hormon függő daganatok osztódását. Így az LHRH analógok használata elfogadott ösztrogén dependens emlődaganatokban és androgén dependens prosztata karcinómában. De expresszióját kimutatták számos nem hormon függő daganatban is, mint vese, szájüregi, központi idegrendszeri, cutan melanómában, máj, vastagbél és hasnyálmirigy daganatokban (98-105).

Vizsgálatok alapján az LHRH-R expressziója összefüggésben van a humán EGFR (epidermal growth factor receptor) aktivációjával. Ez LHRH-R szerepe feltételezhetően autokrin/parakrin útvonalakon hat a daganatok esetén (106, 107).

Citotoxikus LHRH analógok

A nyolcvanas évek közepén, mikor felfedezték az emlődaganatok LHRH-R expresszióját Andrew V. Schally kutatócsoportja szintetizálta az első citotoxikus LHRH analógokat (108). Számos analóg került kifejlesztésre, ezek közül vannak agonista vagy antagonistá LHRH analóg alapúak, melyekhez citotoxikus molekulaként antimetabolit (methotrexat), DNS alkilálószer (cisplatin), nehézfém ion (Cu(II), Ni(II)) vagy DNS interkalátor (DOX) került kapcsolásra kovalens kötéssel (108, 109).



6. ábra Az AN-152 szerkezete és internalizációjának mechanizmusa. A: Az AN-152 egy doxorubicin (DOX) molekulát tartalmaz egy hasítható észter kötéssel összekötve egy [D-Lys⁶] LHRH peptiddel. B: Az AN-152 képes szelektíven kötődni az LHRH-R-hoz ezt követően internalizálódik és a citoplazmában a hordozóról szabadra váló DOX a sejtmagban képes halmozódni <https://www.cantechletter.com/wp-content/uploads/2012/12/AEZS-108.jpg> alapján Átdolgozva.

A [D-Lys⁶] LHRH peptid egy LHRH agonista hordozó molekula, amely módosításra került az epszilon aminosavon egy D-lizin⁶ oldallánccal, ami nem változtatta meg az LHRH receptor kötési tulajdonságait viszont lehetővé teszi a citotoxikum kapcsolását (110). Az AN-152 esetén a [D-Lys⁶] LHRH peptidhez egy 14-O-hemiglutarát összekötő segítségével egy DOX molekula került kapcsolásra (111). Fejlesztésre került olyan szuperaktív analóg, amelyben a [D-Lys⁶] LHRH a DOX-nál jóval toxikusabb 2-pyrrolino-DOX-nel lett összekapcsolva (AN-207), ezek különösen hatékonyak lehetnek alacsony LHRH receptor expresszió esetén is (111).

Az AN-152 (AEZS-108, zoptarelin doxorubicin) számos klinikai vizsgálatban vett részt, leginkább terápia rezisztens endometrium (NCT01767155), emlő (NCT01698281), prosztata, petefészek (NCT00569257), urotheliális (NCT01234519) daganatok indikációjában, ezek mindegyike befejezett vagy megszakított stádiumban van, és egyik esetben sem történt meg a betegek receptorstátuszának meghatározása (a vizsgálatok megszakítását többek között a fejlesztő cég finansziális lehetőségei, limitációi okozták).

Eddigi eredmények alapján ugyan az AN-152 nem hoz áttörő eredményt, de in vitro és in vivo is hatékonyabbnak bizonyult a hanyományos DOX kezelésnél LHRH-R expresszió esetén, amellet hogy az AN-152 jóval kevésbé toxikus, mint a DOX. Átmeneti mellékhatásként elsősorban az enyhe vérképzőszervi mellékhatásokat kell megemlíteni, viszont kardiotoxikus mellékhatást nem tapasztaltak (112, 113).

3. Célkitűzés

Korábbi irodalmi adatok alapján az uveális melanoma (UM) luteinizáló hormon-felszabadító hormon receptor (LHRH-R) és luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH) expressziója és lehetséges célzott terápiás alkalmazási lehetőségei nem voltak ismertek. Így PhD értekezésem céljából a következő célokat tűztük ki:

- Az enukleáció során eltávolított humán primer UM daganatos szövetminták LHRH-R és LHRH expressziójának megállapítását mRNA és fehérje szinten.
- A betegek életkorának, nemének, daganat szövettani típusának, megelőző kezelésének esetleges összefüggését a LHRH-R és LHRH expressziójával.
- A műtéti szövetminták LHRH ligandkötési tulajdonságainak meghatározását.
- Olyan doxorubicin (DOX) rezisztens *in vitro* modell létrehozását, amely alkalmas a célzott terápiára fejlesztett citotoxikus LHRH analóg (AN-152) sejtszintű hatásainak vizsgálatára.
- A létrehozott DOX rezisztens sejtvonal LHRH-R exonspecifikus expressziójának vizsgálatát mRNA és fehérje szinten.
- A létrehozott DOX rezisztens és szenzitív humán UM sejtvonalakon az AN-152 felvételének nyomon követését 24 órán keresztül.
- A létrehozott DOX rezisztens és szenzitív humán UM sejtvonalakon az AN-152 sejtproliferációra gyakorolt hatásának vizsgálatát különböző kezelési koncentrációk mellett.

4. Anyagok és módszerek

Szövetminták

A humán UM szövetminták a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Szemklinikájáról származtak. A 39 szövetminta a műtét időpontjában 30-84 év közötti betegektől származott. A kontrollként használt egészséges agyalapi mirigy elülső lebeny mintákat a Debreceni Egyetem Pathológia Intézetében gyűjtöttük. A sebészi eltávolítást követően a szövetminta egy részét használtuk fel, amit azonnal folyékony nitrogénben szállítottunk az intézetünkbe ahol -70°C -on tároltuk a további felhasználásig. Az összes szövetminta esetén a diagnózis hisztopatológiai vizsgálatokkal is meg lett erősítve. A mintagyűjtést megelőzően a Debreceni Egyetem etikai bizottsága engedélyezte a mintagyűjtést és azok felhasználását a vizsgálatainkhoz. A betegek minden esetben megfelelő tájékoztatást kaptak és beleegyeztek a mintagyűjtésbe és azok vizsgálatába.

Szövetminták RNS izolálása, reverz transzkripciója és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciója (RT-PCR)

A teljes RNS mennyiség a felhasználási utasítások szerint az AllPrep DNA/RNA/protein Mini kit (Qiagen, Germany) segítségével került izolálásra. Minden mintából 250 ng RNS került átírásra a QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Germany) segítségével 20 μl végtérfogatban. Két saját tervezésű primer párt használtunk a vizsgálat ezen részében I-es típusú LHRH-R detektálására (szensz: $5'$ -GGTGGCATCAAGCATTAT- $3'$, antiszensz: $5'$ -ACATAGTAGGGAGTCCAGCAGACA- $3'$), és az LHRH ligand meghatározására (szensz: $5'$ -GGCCTTATTCTACTGACTTGG- $3'$, antiszensz: $5'$ -TCTTCTGCCAGTTTCCTCT- $3'$). A RNS integritásának ellenőrzésére a β aktin háztartási gén expressziója került felhasználásra (szensz: $5'$ -GGCATCCTCACCTGAAGTA- $3'$, antiszensz $5'$ -GGGGTGTGTAAGGTCTCAA- $3'$). Minden egyes PCR reakció során 1 μl cDNS került amplifikálásra 25 μl -es végtérfogatban ami 1,5 mM MgCl_2 -ot tartalmazott, 1x PCR puffert (Fermentas GmbH, Germany) 0,3 nM minden egyes dezoxinukleotidból (Promega, USA), és 1 egység TrueStart HotStart DNS polymerázt (Fermentas, USA) és 0,25 μM -t minden primerből. A PCR ciklus során 3 perc 95°C -on történő denaturálást követően 40 cikluson keresztül a következő lépések zajlottak: 95°C 45 másodperc, 59°C 30 másodperc, 72°C 1,5 perc, majd a ciklusokat követően 72°C 10 perc inkubálással fejeztük be a reakciót. Minden mintából 10 μl cDNS került

felhasználásra a 1,5%-os agaróz gélelektroforézishez, amit GelRed (Biotium, USA) DNS festékkel tettünk láthatóvá UV fényben az AlphaDigidoc gél dokumentációs rendszer (Alpha Innotech, USA) segítségével.

Sejtvonalak RNS izolálása, reverz transzkripciója és reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakciója (RT-PCR)

A teljes RNS TRI Reagenssel (Molecular Reserch Center, USA) került izolálásra. 30 mg humán hypophysis (ami pozitív kontrollként került felhasználásra) vagy 10^7 OCM3 és OCM3_{DOX320} került inkubálásra 500 µl TRI Reagenssel 5 percen keresztül szobahőmérsékleten, ezután 100 µl kloroformmal kevertük össze alaposan. Ezt követően 12000 g-n 15 percig választottuk el a nem elegyedő fázisokat egymástól 4°C-on. A felső fázist új steril gyűjtőcsőbe tettük és 250 µl izopropil alkohollal 15 percig inkubáltuk és 12000 g-n 10 percig centrifugáltuk 4 °C-on míg RNS pelletet kaptunk. A pelletet kétszer mostuk 500 µl 75%-os alkohollal, majd teljes száradását követően 40 µl RNáz mentes vízben oldottuk fel.

Minden mintából 500 ng RNS került átírásra Tetro cDNS Synthesis kit (Bioline, USA) segítségével 20 µl végtér fogatban. A következő primerpárokat használtuk az LHRH-R exonspecifikus PCR meghatározásához: LHRH-R-1: szensz 5'-GCT TGA AGC TCT GTC CTG GG-3'; antiszensz, 5'-CAG GCT GAT CAC CAC CAT CAT-3'; LHRH-R-2: szensz 5'-AGT CCA ATG GTA TGC TGG AGA-3'; antiszensz 5'-ACC CGT GTC AGG GTG AAG AT-3'; és LHRH-R-3: szensz 5'-TCA TGC TGA TCT GCA ATG CAA-3'; antiszensz 5'-AAT TGA GGC TCT GAA GAC TGA GT-3'(114). A PCR reakció során 1 µl cDNS került átírásra 25 µl végtér fogatban, ami 12,5 µl MyTaq HS Mix (Bioline, USA), 9 µl vizet és 0,25µM primert tartalmazott. A PCR reakció során 1 perc 95 °C-os denaturálást követően 40 cikluson keresztül 95 °C 15 perc, 60 °C 30 másodperc és 72 °C 10 másodperc periódusok ismétlődtek, ezt követően 2 perc 72 °C-os inkubálással állítottuk le a reakciót. Az PCR termék meghatározása a korábbival azonos módon történt.

Membránpreparátum és radioligand kötési vizsgálat

A kiolvasztott minták megtisztítása után 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7,4) homogenizáljuk, proteáz inhibitorok (0,25 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid, 0,4% Aprotinin és 2 µg/ml pepstatin A) jelenlétében jégen. A homogenizátum 500 G-n 10 percig

4 °C-on homogenizáltuk és ezt követően reszuszpendáltuk friss pufferben. A végső pelletet reszuszpendáltuk homogenizáló pufferben és -80 °C-on tároltuk a vizsgálatig. A preparátum fehérje koncentrációját Bradford vizsgálat segítségével határoztuk meg Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, USA) segítségével. A radio jóddal jelzett [D-Trp⁶]LHRH chloramie-T módszer segítségével készült és a tisztítását fordított fázisú HPLC segítségével végeztük. Ligand kompetíciós assay alapja a [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH radioligand specifikus kötődése a membrán frakcióhoz. 50-160 µg fehérje tartalmú membrán homogenizátumok duplikátumokban vagy triplikátumokban kerültek inkubálásra 60-80000 cpm [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH és növekvő koncentrációjú (10⁻¹²-10⁻⁶ M) nem radioaktív peptiddel, mint kompetítorral 150 µl össztérfogatú kötési pufferben. Az inkubáció végén, szilanizált polipropilén mikrocentrifugacsőben (Sigma-Aldrich GmbH, Germany) 125 µl preparátumot transzferáltunk 1 ml jéghideg kötési puffer tetejére, ami 1,5% marha szérum albumint tartalmazott (BSA). A csöveket ezt követően 12000 g-n 3 percig 4 °C-on centrifugáltuk, ezt követően a felülúszót eltávolítottuk és a kialakult pellet aktivitása került mérésre gamma számláló segítségével (Micromedic System, USA). 20-250 µg/cső fehérje koncentráció tartományt határoztunk meg előzetesen kísérletes úton, ami a lehető legkisebb mennyiség, ami még specifikus kötéshez minimálisan szükséges. Munkánk során 40-180 µg membránfehérje koncentráció volt szükséges a 150 µl inkubációs térfogatban a megfelelő eredmény eléréséhez. A LIGAND-PC számítógépes görbe illesztési program segítségével határoztuk meg a receptor kötés típusát, a disszociációs konstans (K_d) és a maximális kötési kapacitás (B_{max}) értékeit Scatchard szerint ábrázolva (115-117). A radioligand kötési vizsgálatok témavezetőm Prof. Dr. Halmos Gábor segítségével készültek.

Immunhisztokémia (IHC)

Formalinban fixált paraffinba ágyazott enukleációból származó szövetminták kerültek immunfestésre. Az antigén feltárást (pH 6,0) és endogén peroxidáz blokkolást követően a 3 µm vastagságú metszetek kerültek inkubálásra az elsődleges LHRH-R antitesttel (NCL-GnRHR A9E4; Novocastra Laboratories Ltd., UK) szobahőmérsékleten 1 órán keresztül. Háromszori 5 perces foszfát puffer (PBS, pH 7,4) mosást követően a metszetek a másodlagos antitesttel (anti-mouse IgG (Fab-2 kapcsolt tormaperoxidáz (HRP)) kerültek inkubálásra a gyártó utasításai szerint EnVision+ HRP detection kit-el, amiben az aminoethyl-carbasol (AEC; red; Vector Labs, UK) szolgált a peroxidáz szubsztrátjaként. A piros

kromogén szubsztrát megfelelően kontrasztos képet adott a melaninban gazdag minták barna háttere és a pozitív IHC elkülönítéséhez. Az immunhisztokémia eredmények Prof. Dr. Dezső Balázs segítségével készültek.

Statisztikai elemzés

A változók standard statisztikai elemzéssel kerültek leírásra. A feltétlen változók közötti összefüggések Fisher's teszt segítségével, míg a folyamatos változók és a bináris eredmények között a logisztikus regressziót amit hibahatásban (OR) és 95% fiducia intervallumban (CI) fejeztünk ki.

Sejtvonalak és sejtenyésztés

Az OCM3 humán UM sejtvonalat a Debreceni Egyetem Biofizika Intézete biztosította számunkra. A monolayerben növekvő OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtek RPMI-1640 sejtenyésztő tápfolyadékban nőttek (Biosera, USA) 10v/v% hőinaktivált fetal bovine serum (Biosera, USA) és 100 U/ml és 100 µg/ml penicillin-sztreptomycin (Biological Industries, Izrael) jelenlétében. A sejtek 25, 75 vagy 150 cm²-es letapadó, szűrős kupakkal ellátott flaskában nőttek (SPL, Korea). A sejteket standard körülmények között tartottuk 95 % páratartalom, 5 % CO₂ mellett 37 °C-on.

Doxorubicin rezisztens OCM3 sejtvonal fejlesztése

A rezisztencia kialakításához doxorubicin 2 mg/ml-es injekció (TEVA, Izrael) került felhasználásra. Az OCM3 sejteket egyre növekvő koncentrációjú DOX jelenlétében tettük rezisztenssé. Kezdetben 10 nM DOX jelenlétében vártuk meg, míg a sejtek 90% konfluenciát érnek el, ha ez megtörtént, akkor dupláztuk a dózist egészen addig, míg 320 nM-os DOX koncentráció mellett is stabilan nőttek a sejtek. A rezisztenssé vált sejtvonalat OCM3_{DOX320}-nak neveztük el. Minden kísérlet előtt a sejteket legalább 2 napig tartottuk DOX mentes médiumban (118).

Immuncitokémia

Az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejteket fedőlemezen növesztettük 12 well plate-en (SPL, Korea). A sejtek konfluens növekedését követően PBS mosást követően 4% paraformaldehiddel fixáltuk 30 percig 4 °C-on. Három PBS mosást követően a sejteket 0,1% Triton-X-100-PBS oldattal permeabilizáltuk 10 percig, három mosást követően 10% BSA oldattal 1 órán keresztül blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket. Egy éjszakán keresztül inkubáltuk a mintákat 4 °C-on anti-LHRH-R (GnRHR FL-328, Santa Cruz, USA) elsődleges antitesttel. Ezt követően 1 órán keresztül FITC (fluorescein isothiocyanát) jelzett goat anti-rabbit (sc-2012, Santa Cruz, USA) másodlagos antitesttel inkubáltuk. Autofluoreszcencia kontrollként azonos procedúrával kerültek a minták kezelésre, de semmilyen antitesttel nem lettek kezelve, míg a negatív kontroll esetén csak az elsődleges antitest maradt ki a jelölésből mutatva a másodlagos antitest esetleges aspecifikus kötődésének mértékét. Háromszori PBS mosást követően ProLong® Diamond AntifadeMountant with DAPI (Molecular probes, USA) segítségével fedtük a mintákat. A fluoreszcens képeket Olympus IX71 kamera segítségével készítettük (Olympus Corporation; Tokyo, Japan).

Sejt életképességi vizsgálatok és statisztikai elemzés

A DOX és AN-152 OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtek életképességre gyakorolt hatását Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma-Aldrich, USA) segítségével vizsgáltuk standard MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) protokoll szerint. A wellenként 10^4 sejtet tenyésztettünk 96 well plate-en (SPL, Korea) a kihelyezést követően 24 órával 40 nM, 320 nM, 1 μ M, 2,5 μ M és 5 μ M DOX és AN-152 100 μ l ösztérfogatban a megfelelő kezelések szerint. Ezt követően 72 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk a sejteket. A kísérleteket hat párhuzamos méréssel végeztük és ezeket négy alkalommal ismételtük. A kezelést követően eltávolítottuk a tápfolyadékot a sejtekről és háromszori PBS mosást követően 100 μ l 0,5 mg/ml koncentrációjú MTT jelenlétében 37 °C-on 2 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. Ezt követően az MTT oldatot 100 μ l szolubilizáló oldattal helyettesítettük (izopropil alkohol-HCl), egy óras szobahőn történő fénytől védett inkubálás után az oldat optikai tulajdonságait 570 nm-en FLUOstart optima plate reader (BGM Labtech, Németország) segítségével regisztráltuk. A kezeléshez használt AN-152 vegyületet Andrew V. Schally laboratóriuma szintetizálta és bocsátotta

rendelkezésünkre kísérleteinkhez. Az eredményeket statisztikailag a GraphPad Prism 7. segítségével elemeztük 1-way ANOVA után Tukey's teszttel hasonlítottuk össze a csoportokat.

Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálatok

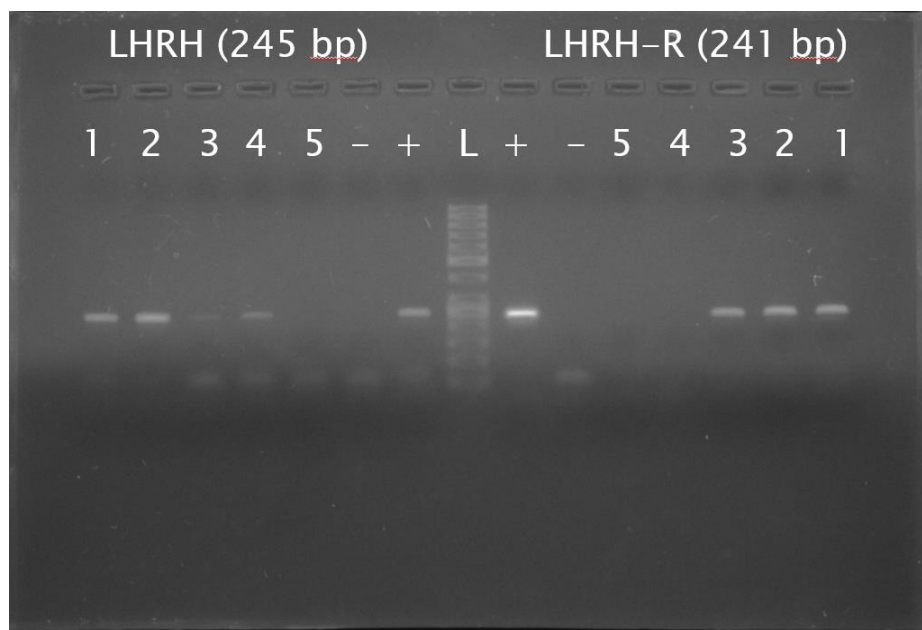
10^4 OCM3 és OCM3_{DOX320} került kiültetésre 1 μ -Slide 8 well ibiTreat mikroszkóp kamrában (Ibidi, Németország). Huszonnégy órával később a sejteket 5 μ M DOX vagy AN-152 kezelésben részesültek 0,5, 1, 6 és 24 óra időintervallumban. A mikroszkópos vizsgálatokat megelőzően a sejteket háromszor mostuk PBS segítségével. A konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálatok Olympus FluoView 1000 mikroszkóppal (Olympus, Japán) végeztük. A DOX és az AN-152 autofluoreszcenciáját 543 nm hullámhosszúságon mértük argon ion lézer gerjesztése segítségével. A DOX fluoreszcens emisszióját 603 nm-es hullámhosszúságon detektáltuk. A felvételeket szekvenciális módban készítettük megelőzve a csatornák közötti zavarást, a képek 1 μ m vastagságú optikai szeletnek felelnek meg 512x512 pixel felbontással 60x UPLSAPO olaj immerziós objektív (NA 1,35) segítségével.

5. Eredmények

Az UM szövetminták 1-es típusú LHRH-R expressziója

mRNS vizsgálatok PCR módszerrel

Az UM szövetminták közül 11 epitheloid, 21 orsósejtes és 7 kevert sejttípusba tartozott. A tumorok vastagsága 6-12,9 mm, míg bazális átmérője 9-19 mm között változott az ultrahangos meghatározás alapján. Ha a tumor vastagsága meghaladta a 8 mm-t és/vagy a legnagyobb átmérője 13 mm-nél több volt, akkor a szem enukleációra került mindenféle előzetes kezelés nélkül. A szemet akkor is eltávolították, amikor ugyan a tumor az előző kritériumoknál kisebbnek bizonyult, de annak ellenére is határozottan növekedett, hogy korábban transzpupilláris hőterápia és/vagy ¹⁰⁶Ruténium plakk brachyterápia került alkalmazásra. A szövetminták vizsgálata során olyan primert terveztünk, amely az LHRH-R splice variánsok közül specifikusan csak a teljes hosszúságú receptor mRNS sokszorosítására alkalmas, viszont a csonka receptorok esetén nem ad jelet. Az általunk tervezett LHRH-R primerpár a 2-es és 3-as exonon átívelő módon képes átírni a PCR terméket, így ezáltal éppen az ismert, nem teljes hosszúságú receptor variánsok hiányzó szakaszai kerülnek átírásra. Az 1-es típusú LHRH-R-ról átíró PCR termék várt hossza 241 bp volt. Az általunk vizsgált szövetminták 46%-a bizonyult LHRH-R pozitívnak (7. ábra, 1. táblázat).



7. ábra: Az *LHRH* (bal oldal) és az *LHRH-R* (jobb oldal)mRNS szintű expressziója azonos mintákban. L: 50 bp DNS létra (Fermentas), +: pozitív kontrol (humán agyalapi mirigy), -: no templát kontrol, 1-5: reprezentatív humán UM szövetminták.

1. táblázat: Klinikopatológiai adatok és az RT-PCR eredményei a vizsgált 39 enukleált UM szövetmintában

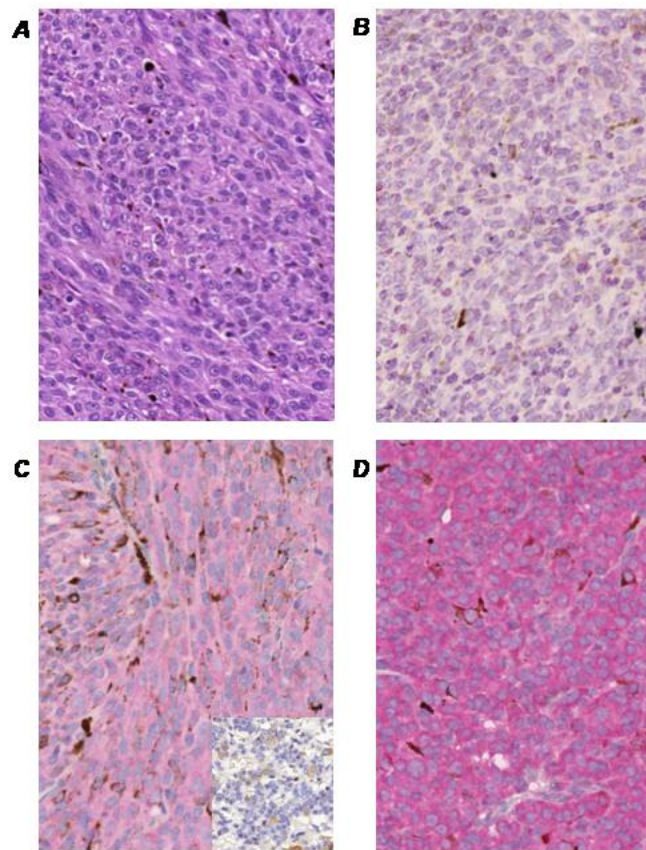
Beteg száma	Életkor a műtétkor	Nem	Histology	Megelőző kezelés	Szem	LHRH-R	LHRH ligand
1.	64	F	Orsósejtes	-	B	+	+
2.	39	F	Epitheloid	Brachytherápia	J	+	-
3.	70	F	Orsósejtes-B	-	J	-	+
4.	80	N	Epitheloid	-	J	+	-
5.	47	F	Epitheloid	-	B	-	-
6.	65	F	Orsósejtes-B	-	J	+	-
7.	76	F	Orsósejtes-B	-	J	+	+
8.	75	N	Orsósejtes-A	-	B	-	+
9.	84	N	Orsósejtes	Brachytherápia	B	+	+
10.	39	F	Kevert	-	J	-	+
11.	35	F	Orsósejtes	-	B	-	-
12.	30	N	Orsósejtes-A	-	B	+	+
13.	44	N	Orsósejtes-B	-	B	-	+
14.	68	N	Orsósejtes	-	B	-	+
15.	76	F	Orsósejtes	-	J	+	+
16.	79	N	Kevert	-	B	-	+
17.	79	N	Epitheloid	-	J	+	+
18.	67	F	Epitheloid	Brachytherápia, TTT	B	+	+
19.	60	F	Epitheloid	Brachytherápia (3x)	J	+	+
20.	51	F	Orsósejtes-B	-	B	-	+
21.	66	F	Epitheloid	-	J	+	+
22.	72	N	Epitheloid	-	B	-	+
23.	76	F	Orsósejtes	-	B	+	+
24.	55	F	Orsósejtes-B	-	B	-	+
25.	54	F	Epitheloid	-	J	-	+
26.	75	N	Orsósejtes-B	-	B	+	+
27.	64	N	Epitheloid	-	J	-	+
28.	61	F	Orsósejtes-B	-	B	-	+
29.	50	N	Orsósejtes	-	J	+	-
30.	76	F	Kevert	-	B	+	+
31.	38	F	Spindle-B	-	J	-	+
32.	79	N	Kevert	-	J	-	-
33.	53	F	Epitheloid	-	J	-	+
34.	52	F	Kevert	-	B	-	+
35.	45	F	Kevert	-	R	+	-
36.	70	F	Orsósejtes-A	-	J	+	-
37.	43	F	Orsósejtes	-	B	-	-
38.	53	F	Kevert	-	B	-	-
39.	51	F	Orsósejtes-A	Brachytherápia (3x)	B	-	-

B: bal, J: jobb, TTT: transzpupilláris hőterápia

Az epitheloid szövettani típusba tartozó UM minták esetén 11 mintából 6 esetben (55%) volt a receptor pozitív, míg az orsósejtes melanoma 21 mintából 10 esetben (48%) bizonyult LHRH-R pozitívnak. A kevert szövettani típusba tartozó minták (amelyek mind a két sejtípust tartalmazta közel azonos arányban) 7 mintából 2 minta (29%) fejezte ki az LHRH-R-t (1. táblázat).

Receptor fehérje vizsgálatok IHC segítségével

A teljes hosszúságú LHRH-R jelenléte immunhisztokémia segítségével is meg lett erősítve, ezek az eredmények jól egybevágtak a RT-PCR eredményekkel (8. ábra).



8. ábra: LHRH-R fehérje expressziója enukleált reprezentatív humán UM szövetminták esetén immunoperoxidáz festéssel. A, Melanin termelő orsó és epitheloid kevert sejtés metszet hematoxilin-eozin festése. B, LHRH-R mRNS negatív minta, nem mutatott detektálható LHRH-R fehérje expressziót immunhisztokémiával sem. C, Közepes intenzitással LHRH-R expressziót mutató tumorminta (inzerit: a festés specificitását mutató negatív minta). D, Intenzív festődést mutató tumorminta (a tumorsejtek közel 100%-a intenzív festődést mutat a sejtek citoplazmájában, ami egybevág az mRNS expresszióval). Minden kép esetén 40x nagyítást használtunk. A B-D képeken immunoperoxidáz festés látható és hematoxilin magfestés.

Az RT-PCR által pozitívnak talált UM minták többsége az immunhisztokémiai vizsgálatok során szintén pozitivitást mutatott az LHRH-R-ra, ami piros granulomok formájában jelent meg a metszeteken.

Ligand kötési vizsgálatok

A specifikus LHRH kötőhelyek jelenlétét és azok [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH kötésének jellemzőjét ligand kompetíciós vizsgálat segítségével vizsgáltuk a humán UM szövetmintákon. A vizsgált 10 szövetmintából 7 mutatott LHRH kötő képességet (2. táblázat).

2. táblázat: mRNS expresszió és LHRH-R ligand kötési tulajdonságai 10 humán UM szövetminta esetén

Beteg száma	LHRH-R mRNA	B _{max} (fmol/mg fehérje)	K _d (nM)
4.	+	294,6	1,35
6.	+	398,7	1,37
9.	+	264,7	3,73
11.	-	-	-
12.	+	495,7	6,03
15.	+	251,5	4,81
20.	-	-	-
24.	-	-	-
30.	+	511,6	6,36
35.	+	474,7	2,18

A leszorítási vizsgálat alkalmazásával a radiojelzett [D-Trp⁶]LHRH, a jelzetlen analóggal történő leszorítása során az eredmények azt mutatták, hogy jó illesztéssel, egy kötőhelyes modell áll fenn, ami a nagy affinitású LHRH-R-ok jelenlétét jelzi a nyers humán UM szövetmintákból származó membránpreparátumokban. A számítógépes nemlineáris görbeillesztés és a Scatchard plot analízis kötési adatai a 7 pozitív tumor minta esetén azt jelezték, hogy az egyedi kötőhelyek disszociációs konstansának középértéke (K_d) 3,69 nM (1,35-től 6,36 nM-os tartományban), míg a maximális kötési kapacitás (B_{max}) középértéke 384,5 fmol/mg membrán fehérje (251,5-től 511,6 fmol/mg fehérje tartományban). A receptor ligand kötés biokémiai paramétereinek meghatározása alapvető a specifikus ligandkötés azonosítására. Ezek alapján a [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH kötése reverzibilis, időfüggő és hőmérséklet

függő volt, valamint lineárisan változott a humán UM minták fehérje koncentrációjával. Az LHRH receptoriális kötés specificitását a kompetitív ligand kötési kísérletek igazolták, több hasonló és eltérő struktúrájú peptid felhasználásával.

A vizsgált mintákon az eredmények alapján az LHRH-R mRNS expressziója és a ligand kötési vizsgálat pozitivitása teljes mértékben egybevágtott. Három a tíz mintából nem mutatta az 1-es típusú LHRH-R mRNS expresszióját és a ligand kötést sem, míg a receptor mRNS expresszióra pozitív minták specifikusan képesek voltak a jelzett ligand kötésére. A receptor expresszió, ligandkötés és a klinikopatológiai adatok között nem találtunk szignifikáns korrelációt.

Az LHRH ligand mRNS expressziója humán UM esetén

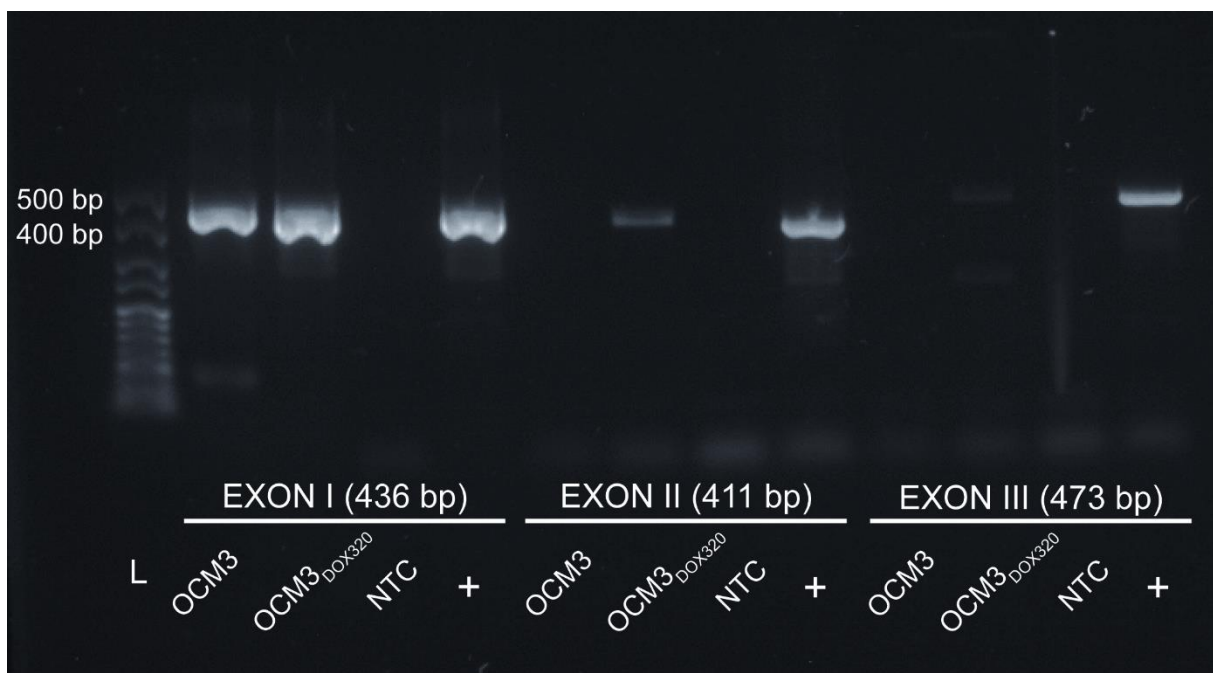
A LHRH-R expresszió túl vizsgáltuk a LHRH ligand kifejeződését a mintáinkban. A UM minták többsége 39 mintából 27 esetben (69%) mutatott LHRH ligand pozitivitást. A PCR termék várt hossza 245 bp volt (7. ábra), ezt az epitheloid minták esetén 11 mintából 8 (73%), az orsósejtes minták esetén 21 mintából 15 (71%), a kevert sejtes minták esetén a 7 mintából 4 esetben (57%) fejeződött ki (1. táblázat). Tizenkét olyan tumor volt (31%), ahol a receptor és a ligand is kifejeződött, 6 esetben csak az LRHR-R, míg 15 mintánál csak az LHRH ligand került expresszióra. A statisztikai elemzés eredményeként kimutatható volt az összefüggés a beteg kora és az LHRH-R mRNS és ligand együttes expressziója között ($p=0,0407$): 10 év életkor növekedés 87%-os esélynövekedést jelentett az együttes expresszióra (OR=1,867, 95% CI 1,027-től 3,393-ig). Másrészt nem volt összefüggés az LHRH ligand és LHRH-R mRNS expresszió a tumor típus és a klinikai paraméterek között. Az UM betegek klinikopatológiai tulajdonságai és a mRNS szintű eredmények az 1. táblázatban kerülnek összefoglalásra.

DOX rezisztens humán UM sejtvonal létrehozása

Az OCM3 humán UM sejtvonal DOX rezisztens verziójának fejlesztése során lépésenként emeltük a DOX koncentrációját a tápfolyadékban mindaddig, amíg elértük a 320 nM melletti stabil sejtproliferációt. A kialakított DOX rezisztens OCM3_{DOX320} sejtek, hasonló morfológiát és osztódó képességet mutattak, mint a vad típusú sejtek. Az OCM3_{DOX320} sejtek zavartalanul képesek voltak osztódni 320 nM DOX jelenlétében és ezt a képességüket számos fagyasztás után is megőrizték.

Az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtvonalak LHRH-R expressziójának exonspecifikus vizsgálata

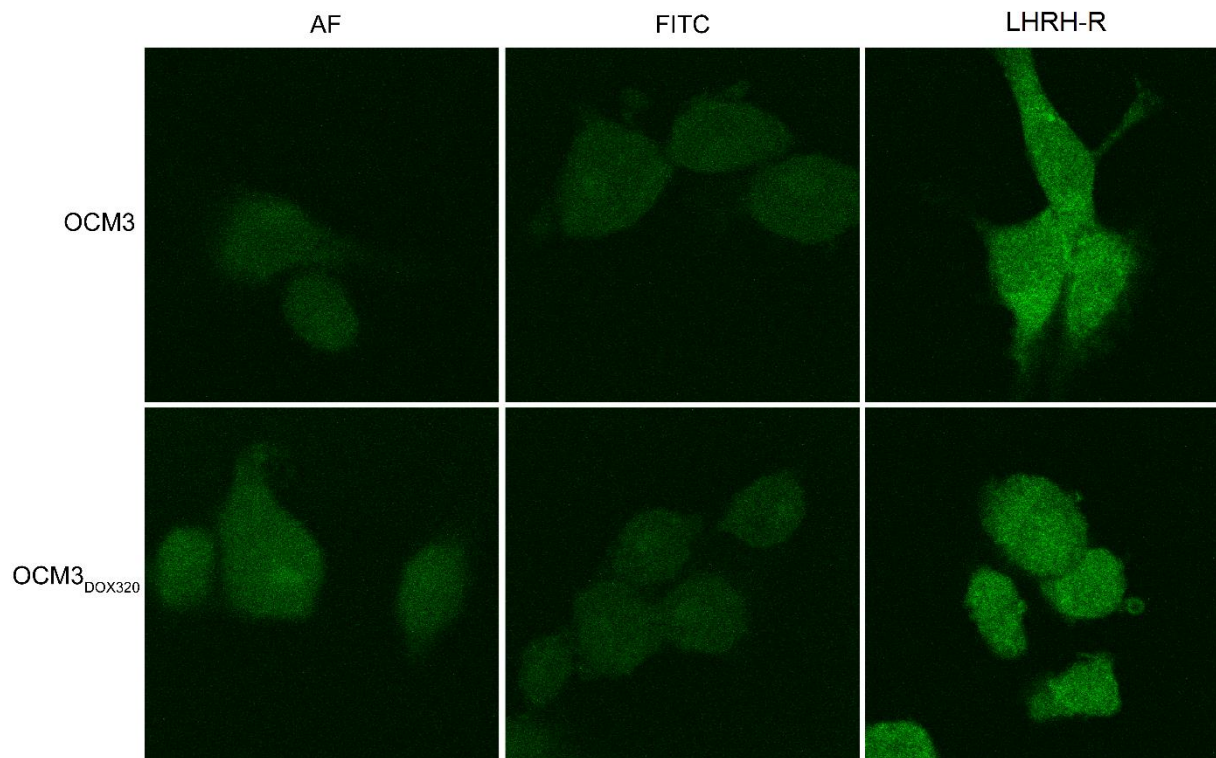
Az LHRH-R expressziójának vizsgálata céljából olyan primerek kerültek felhasználásra (118), amelyek alkalmasak voltak az LHRH-R egyes exonjainak különálló vizsgálatára és azok teljes hosszában történő átírására. A várt PCR termék hossza az LHRH-R I-es exonra 436 bp, az LHRH-R II-es exonra 411 bp, az LHRH-R III-as exonra 473 bp volt (9. ábra). Így az RT-PCR során lehetőségünk adódott a teljes hosszúságú és az alternatívan expresszáldó receptor mRNS-ek elkülönítésére.



9. ábra: Az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtvonalak LHRH-R mRNS RT-PCR vizsgálata. A humán UM sejtvonalak LHRH-R expresszióját a gén három exonjára külön-külön specifikus három primerpárral vizsgáltuk meg. Az eredmények alapján mindkét vizsgált sejtvonalban az LHRH-R gén I-es exonja fejeződik ki nagy intenzitással, míg a DOX rezisztens OCM3_{DOX320} sejtvonalban a II és III exon nagyon gyengén expresszáldott. L: 25-500 bp létra, NTC: no templát kontroll, +: Pozitív kontroll humán agyalapi mirigy.

Az eredményeink alapján mind a két sejtvonal főként az LHRH-R I-es exonját expresszálda, viszont a II-es és III exon csak nagyon alacsony intenzitással került expresszióra az OCM3_{DOX320} sejtvonal esetén. A csonka mRNS fehérje szintű jelenlétét immuncitokémiai vizsgálattal ellenőriztük mindkét sejtvonalon. Az LHRH-R izoforma fehérje szintű

expressziójának jelenléte az OCM3 és OCM3_{DOX320} esetén is sikerült igazolni. Az LHRH-R fehérje izoforma elsősorban a citoplazmában és a sejtmembránon volt megfigyelhető (10. ábra).

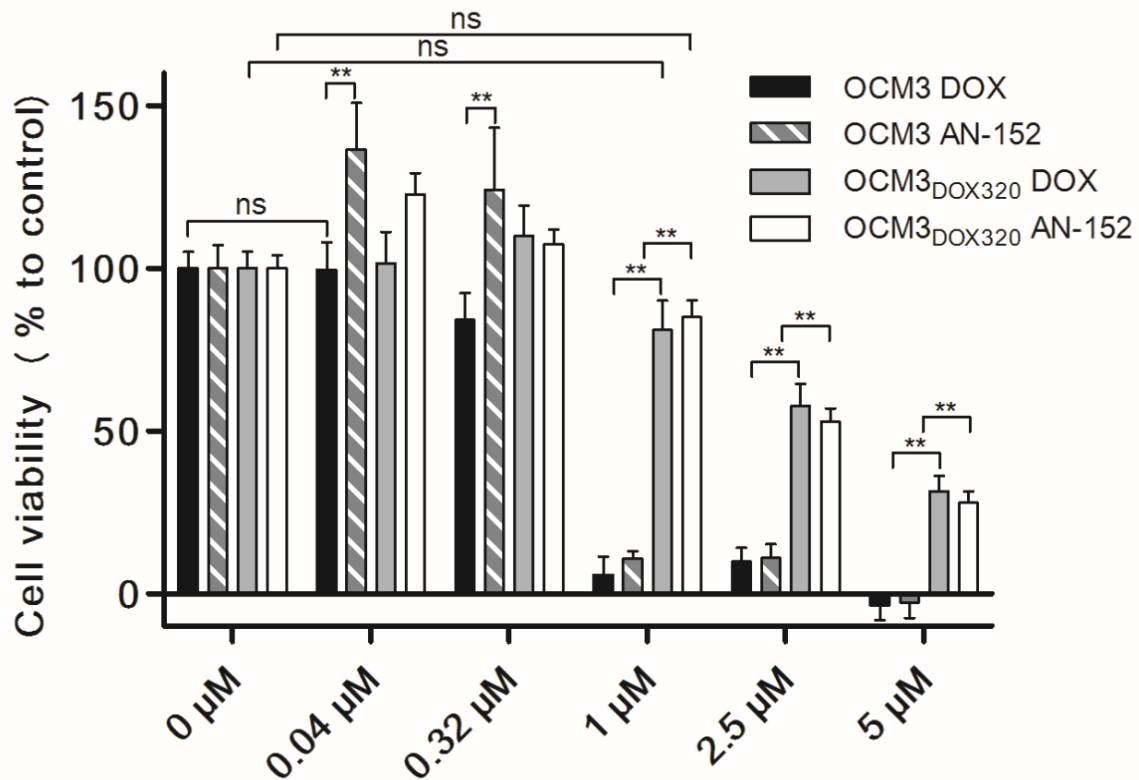


10. ábra: Az LHRH-R fehérje izoforma expressziója OCM3 és OCM3_{DOX320} sejteken immuncitokémiás vizsgálattal. Az ábrán jól látható, hogy mindkét sejtvonal esetén az LHRH-R splice variáns mRNA expresszió ellenére immuncitokémiával kimutatható mennyiségű receptor izoform fehérje kifejeződése fedezhető fel. AF: kezeletlen autofluoreszcencia kontroll, FITC: negatív kontroll, a másodlagos antitest aspecifikus kötődés mértékének meghatározására, LHRH receptor: az LHRH-R specifikus elsődleges antitest kötése FITC jelzett másodlagos antitesttel.

Sejt proliferációs vizsgálat

Az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtek életképességét 72 órás kezelést követően MTT assay segítségével követtük nyomon, különböző koncentrációjú (40 nM, 320 nM, 1 μ M, 2,5 μ M, és 5 μ M) DOX és AN-152 kezelés mellett. Az OCM3_{DOX320} sejteken még 1 μ M DOX jelenlétében sem tapasztaltunk szignifikáns sejt pusztulást a kezeletlen kontrolhoz viszonyítva. Mivel az OCM3 sejtek szignifikáns mértékben pusztultak 1 μ M DOX kezelés hatására, így az MTT vizsgálat eredménye is megerősítette az OCM3_{DOX320} sejtek DOX rezisztenciáját. Az AN-152 alacsonyabb koncentrációk mellett (40 nM, 320 nM) a sejtproliferációt szignifikáns mértékben volt képes növelni, összehasonlítva az ekvimoláris dózisú DOX kezeléssel, aminek nem volt hatása a sejtek életképességére. Ugyanakkor a magasabb koncentrációjú AN-152 kezelés

hatékonyan képes gátolni a sejtosztódást mindkét sejtvonal esetén. A nagyobb koncentrációjú DOX és AN-152 kezelés esetén (1-5 μM) az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtvonalak között nem mutatkozott szignifikáns különbség (11. ábra).

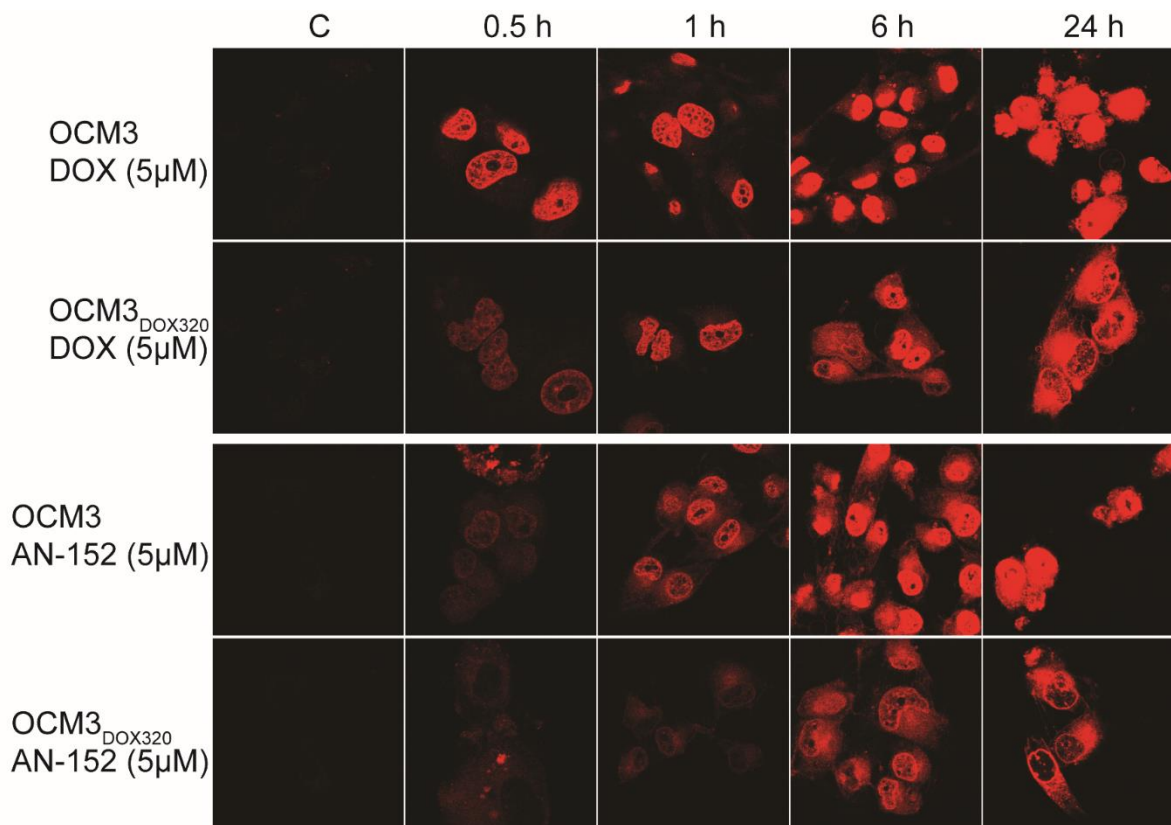


11. ábra: Az OCM3 és OCM3_{DOX320} UM sejtvonalak proliferációja különböző koncentrációjú DOX és AN-152 kezelést követően. A sejtek 72 órán keresztül kerültek kezelésre DOX és AN-152 jelenlétében 40 nM, 320 nM, 1 μM , 2,5 μM , 5 μM koncentrációkban. Az eredmények alapján a 40 nM és 320 nM esetén az AN-152 szignifikánsan növelte az OCM3 sejtek osztódását, 1-5 μM tartományban az DOX és az AN-152 hatása között nem volt tapasztalható szignifikáns különbség. Az általunk fejlesztett sejtvonal 1 μM DOX jelenlétében mutatott szignifikáns sejtproliferáció változást a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. Az oszlopokon jelzett + SEM értékek a kontroll csoport százalékában értendők. Az eredmények 1-way ANOVA után Tukey's test segítségével lettek összehasonlítva (** $p < 0,0001$) ($N=6$).

A DOX és AN-152 sejtszintű felvételének és eloszlásának vizsgálata OCM3 és OCM3_{DOX320} esetén konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével

A DOX expozíció hatására az OCM3 humán UM sejtvonal esetén a DOX-hez köthető fluoreszcencia homogén eloszlását tapasztalhattuk elsősorban a sejtmagban, minden egyes vizsgált időszegmensben. Ezzel összehasonlítva az AN-152-vel kezelt sejtek magasabb jelintenzitást mutattak a citoplazmában, valamint a mag és sejtmembránon, igazolva ezzel a membrán mediált felvételét. Ezzel szemben az OCM3_{DOX320} sejtvonal esetén a fluoreszcens jel

csak lassan kumulálódott a sejtmagban 0,5-1 óra időintervallumban. A fluoreszcens szignál 6 és 24 órás időperiódusban azonban leginkább a citoplazmában helyezkedett el és csak jelentősen kisebb intenzitással a sejtmagban. Összehasonlítva az OCM3_{DOX320} sejtek esetén az AN-152 esetén egyik időpillanatban sem volt tapasztalható jel halmozódás a sejtmagban. Ugyanakkor erősebb fluoreszcens szignál volt tapasztalható a citoplazmában és citoplazmatikus granulomokban, mutatva az AN-152 membránhoz kötődő felvételét 0,5 és 1 órás kezelés esetén. Az eredményeink alapján mind a DOX érzékeny és DOX rezisztens sejtek sikeresen képesek halmozni az AN-152-t, de a DOX rezisztens OCM3_{DOX320} sejtek esetén a DOX jel a 24 órás kezelést követően jelentősen csökken a sejtmagban (12. ábra).



12. ábra: A DOX és AN-152 sejtszintű megoszlása az OCM3 és OCM3_{DOX320} UM sejtvonalakban. Az első oszlop C jelzéssel az azonos mikroszkóp beállítások mellett mutatja a kezeltlen sejtek autofluoreszcenciáját. A további oszlopok esetén 5 μ M DOX vagy AN-152 kezelés történt 0,5, 1, 6, és 24 órán keresztül. A fixálást és mosást követően a felvételek a DOX autofluoreszcenciájából adódó jel detektálásával történt. Az eredmények alapján megfigyelhető volt az AN-152 elnyújtott receptor mediált felvétele. A rezisztens UM sejtvonal esetén megfigyelhető volt a vad típusú sejtekhez viszonyítva a DOX szignál alacsonyabb mértékben való halmozódása. C: a nem kezelt sejtek autofluoreszcencia kontrollja.

6. Megbeszélés

A lehangoló statisztikai adatok alapján az UM betegek 45%-a vesztí életét a metasztázisok következtében, annak ellenére, hogy sokszor még azelőtt kerül felismerésre és kezelésre a primer betegség, hogy bármilyen klinikai jele lenne a daganatos sejtek disszeminációjának (119). Ez arra enged következtetni, hogy a betegség igen korai fázisában jelen vannak olyan mikrometasztázisok amelyek már rejtve, évekkal a klinikailag leírható makrometasztázisok előtt jelen vannak a szervezetben (25). A kicsi és közepes méretű UM-ák esetén, jelenleg a leginkább hatásosnak talált kezelési módszer a különböző radioterápiák alkalmazása, annak ellenére, hogy jelenleg nem tisztázott ezek a kezeléseket milyen hatással vannak a betegek túlélésére (120). Az UM szisztémás kezelésének lehetősége jelenleg nem megoldott. Szisztémás adjuváns terápiát leginkább azokban az esetekben alkalmaznak, amikor nagy esély mutatkozik a metasztázis kialakulására vagy esetleg már ki is alakult, azonban a terápiás válaszkészség nagyon alacsony a klasszikus kemoterápiára (120). Annak ellenére, hogy a primer UM diagnosztikájában és terápiájában volt fejlődés az elmúlt évtizedekben, mégis a metasztázisok okozta halálozás tekintetében nem történt számottevő előrelépés (121, 122). Ezért is kiemelkedően fontos új terápiás lehetőségek felderítése. Az LHRH receptor, mint lehetséges új molekuláris target jelenlétét, már számos ráktípus esetében leírták és érdekes módon nem csak a reprodukív szervekhez köthető daganatokban és sejtvonalakban (101, 103, 115, 123, 124). Az is igazoltnak tűnik, hogy a daganatos sejteken kifejeződésre kerülő LHRH-R eltérő szignalizációs utakon fejti ki hatását, mint a hypophysisben található receptorok esetén (125, 126). Ezek alapján a tumorokban található LHRH-R leginkább a mitogén szignállal, a növekedési faktor receptorokon és az ahhoz kapcsolódó onkogéneken keresztül fejti ki hatását, a tirozin kinázok aktivitásán keresztül (126, 127). Az elmúlt években igazolták a cutan melanoma LHRH-R expresszióját is, valamint azt, hogy a bőr melanoma sejtek citotoxikus LHRH analóggal történő kezelése során szignifikáns sejtproliferáció gátlás érhető el (121, 124). Az UM és a bőr melanoma embriológiai szempontból azonos eredetű, így érthető, hogy néhány genetikai tulajdonságukban hasonlóak egymáshoz, ezért is vizsgáltuk az UM esetén is az LHRH-R expresszióját. A célzott daganatterápia egy igen modern terápiás megközelítés, mivel az ezzel a szemlélettel készült gyógyszer-molekulák nagy specificitással képesek a daganatos sejtekbe juttatni a kiválasztott citosztatikus molekulát, így a nagyobb hatékonyság mellett kisebb toxikus hatással számolhatunk (108, 128). Ismert a daganatok, intrinzik vagy szerzett rezisztenciája is az alkalmazott daganatterápiával szemben, ami hatalmas kihívások elé állítja a

gyakorló szakembereket. Azonban számos esetben a molekulárisan célzott terápia alkalmazása esetén a nagyobb szelektivitás következtében képesek lehetünk a rezisztencia kialakulása előtt elpusztítani a daganatos sejteket. Az áttétes UM terápiájában a DOX rezisztencia nem jellemző a betegek igen rövid túlélése miatt, ugyanakkor a DOX alkalmazása más szerekkel kombinációban leginkább csak próbálkozás, mintsem evidenciákon alapuló hatékony terápia (129, 130). Viszont a korábban alkalmazott citotoxikus terápia jelentős mértékben képes lehet befolyásolni a későbbi célzott citotoxikus terápiákat is a rezisztencia esetleges indukálása révén. Vizsgálataink során elsőként ezért is tűztük ki célul a humán UM szövetminták LHRH-R és LHRH ligand expressziójának vizsgálatát RT-PCR, radioligand kompetíciós vizsgálat és immunhisztokémia segítségével. Miután meghatároztuk az UM szövetminták LHRH-R expressziójának alapvető sajátosságait, egy olyan kísérletes modell felállításán dolgoztunk, amely *in vitro* körülmények között segít tanulmányozni UM immortalizált sejtvonalakon a DOX érzékeny illetve DOX rezisztens sejtek esetén a DOX és az AN-152 kezelés hatására bekövetkező sejtproliferáció változást. Mivel DOX rezisztens UM sejtvonal nem áll rendelkezésre, így saját fejlesztést követően állítottunk elő és teszteltünk „vad” és DOX rezisztens sejtvonalat. Ezen sejtvonalak LHRH-R expresszióját exon specifikus primerekkel mRNS szinten, ezt követően pedig immuncitokémia segítségével fehérje szinten is bizonyítottuk. A kísérleti modell sejtvonalakon a DOX és AN-152 felvételét és eloszlását konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal követtük nyomon. Az UM szövetminták vizsgálata során olyan primerpár használata mellett döntöttünk, amely az ismert LHRH-R variánsok közül csak a teljes hosszúságú receptor esetén ad jelet. Ezen döntésünket az indokolta, hogy szövetminták esetén csak a teljes hosszúságú LHRH-R mRNS esetén lehettünk biztosak a funkcióképes receptor jelenlétében, ugyan a legtöbb publikációban csupán LHRH-R I-es exonjára specifikus primerek kerültek felhasználásra. Az immunhisztokémia során használt monoklonális elsődleges antitest pedig az 1-29 aminosavig képes felismerni az LHRH-R-t. A vizsgálataink alapján az UM szövetminták 47%-a expresszálta a teljes hosszúságú LHRH-R-t. A ligand kompetíciós vizsgálatok során 10 darab humán UM szövetmintából készítettünk membránpreparátumot és vizsgáltuk a [¹²⁵I][D-Trp⁶]LHRH kötési sajátosságait. Az UM minták 70%-a mutatott specifikus kötést a jelzett ligand iránt, a K_d középértéke 3,69 nM míg a B_{max}-é 384,5 fmol/mg membrán fehérje volt. Fontos megemlíteni, hogy az összes ligand kötési vizsgálattal pozitív minta esetén a receptor kifejeződését gén szinten is sikerült minden esetben igazolni. A receptor fehérje jelenlétét szintén sikerült a vizsgált mintákon immunhisztokémia segítségével is megerősíteni. Ahhoz, hogy jobban megismerjük az LHRH-R és splice variánsainak szerepét az UM célzott terápiájában, DOX érzékeny és rezisztens sejteken

vizsgáltuk a DOX és az AN-152 felvételét. Korábban az LHRH-R splice variánsok szerepét nem vizsgálták UM esetén. Ezért munkánk során az OCM3 és az általunk fejlesztett OCM3_{DOX320} humán UM sejtvonalon mRNS szinten igazoltuk receptor splice variánsok jelenlétét. Az ezekről átíródó izoform fehérjék jelenlétét immuncitokémia segítségével került leírásra. Az AN-152 hatásának alaposabb megértése érdekében az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtvonalakon vizsgáltuk a DOX és AN-152 sejtproliferációra gyakorolt hatását és azok sejten belüli eloszlását. A DOX és AN-152 hatására az MTT vizsgálat alapján a mikromólos koncentráció tartományban szignifikánsan csökkent az OCM3 és OCM3_{DOX320} sejtvonalak életképessége. A DOX rezisztens UM sejtvonal esetén a DOX és az AN-152 hasonlóan befolyásolta a sejtosztódást. Ugyanakkor az *in vivo* eredmények esetén jelentős különbségek is várhatóak (131). A jelenlegi vizsgálat alapján 40 nM-os koncentrációban az AN-152 növelte a sejtproliferációt összehasonlítva az ekvimoláris DOX kezeléssel. A OCM3_{DOX320} sejtvonal által szerzett rezisztencia a DOX és az AN-152 hatékonyságát is képes volt csökkenteni. Az alacsony kezelési koncentrációk mellett valószínűleg az AN-152 hormonális tulajdonsága kerül előtérbe, amivel fokozni volt képes a sejtek osztódó képességét. Ugyanakkor azonos koncentrációban a DOX-nek nem mutatkozott citotoxikus hatása. Ez a jelenség leginkább az LHRH-R izoform fehérjén keresztüli sejtosztódást fokozó szignalizációval magyarázható. Az AN-152 erős receptor kötési tulajdonságai révén lehetséges a nanomoláris koncentrációk esetén is a receptoron keresztüli szignalizáció aktiválása, ugyanakkor ebben a koncentrációban a DOX hatástalan, mint citotoxikus szer. Ez a jelenség jól mutatja a szuperaktív citotoxikus LHRH analógok jelentőségét, mint amilyen az AN-207, amelyeknek már nanomólos koncentrációban is jelentős citotoxikus hatásuk van. Az AN-207 szerkezeti szempontból azonos az AN-152-vel de az AN-207 esetén a 2-pyrrolino-DOX felel a citotoxikus hatásért a DOX helyett, ami így még DOX rezisztens daganatok esetekben is képes kifejteni antineoplasztikus hatást (140). A 2-pyrrolino-DOX 500-1000x hatékonyabb, mint a DOX, és nincs a két molekula között keresztrezisztencia (111, 116). A jelenlegi adatok alapján a kialakuló DOX rezisztencia jelentősen képes csökkenteni az AN-152 hatékonyságát is. A konfokális lézer pásztázó mikroszkópos vizsgálatok alapján látható volt az AN-152 lassabb receptor mediált felvétele, összehasonlítva a DOX gyors passzív diffúzióval történő felvételével. Az OCM3_{DOX320} sejtvonal szerzett rezisztenciája mögött olyan aktív mechanizmusok állhatnak (pl.: LRP), amelyek segítenek a DOX sejten belüli lokalizációjának megváltoztatására, így elkerülve a DOX sejtmagban történő halmozódását (77, 132). Azonban a felvételeink alapján ezek a folyamatok nem befolyásolták az AN-152 felvételét. Az OCM3_{DOX320} sejtekben DOX kezelés esetén jól megfigyelhető volt a sejtmagok DOX szignáljának gyengülése, különösen a 24 órás

kezelést követő felvételeken. Az AN-152 fokozatos felvételének köszönhetően a rezisztens sejtek esetén az AN-152 kezelés hatására egyik időpillanatban sem volt tapasztalható DOX halmozódás a sejtmagokban. Viszont határozottabb fluoreszcens szignál halmozódás volt megfigyelhető a citoplazmában és a citoplazmában kialakuló granulomokban (0,5 és 1 órás felvételek), ami elsősorban az AN-152 membrán kapcsolt felvételével magyarázható. Az AN-152, [D-Lys⁶] LHRH hordozó peptidre és DOX-ra való hasadásának a féléletideje humán szérumban megközelítőleg 2 óra (133). A vizsgálataink alapján az AN-152 felezési ideje hasonló érték lehet, mivel a 6 és 24 órás fluoreszcens képek hasonlóak voltak, függetlenül a DOX vagy AN-152 kezeléstől. Ez leginkább abból adódhat, hogy a kezelés 6. órájában az AN-152 molekulák többségéből a DOX szabaddá vált. Az eredményeink alapján a DOX érzékeny és rezisztens sejtek is sikeresen halmozzák a célzott terápiás szert, azonban a DOX az LHRH hordozójáról való lehasadása után a 24 órás kezelést követő fluoreszcens kép alapján a DOX nem jut be nagy mennyiségben a rezisztens sejtek sejtmagjába. A gyorsan terápia rezisztenssé váló sejtek jelentőségét nem lehet elhanyagolni a daganatok kezelésében. A citotoxikus terápiával szemben kialakuló rezisztencia és a gyakori áttétképzés sok esetben lehetetlenné teszi számos daganat sikeres kezelését. UM esetén a betegek felében kialakul metasztázis, függetlenül a primer daganat sikeres sebészi vagy radioterápiájától. Ugyanakkor jelenleg nincs olyan szisztémás terápiás lehetőség, ami képes lenne javítani az UM betegek túlélését (134). UM esetén az LHRH-R magas expressziója azt sugallja, hogy ez a rák típus alkalmas célpontja lehet a célzott citotoxikus LHRH alapú terápiáknak, például az AN-152 alkalmazásával. Az AN-152 ezidáig több klinikai vizsgálat alá esett, ahol előnyös antiproliferatív tulajdonsága igazolódott, akár terápia rezisztens tumorok esetén is (133, 134). Többek között az általunk is használt LHRH peptid hordozóból és a hozzá kapcsolt citotoxikus molekulából álló konjugátumok hatékonyabbnak és kevésbé toxikusnak bizonyultak a konvencionális szisztémás terápiáknál (133, 134). Használatuk során leginkább jelentkező mellékhatás a mieloszupresszió, ami leginkább a citotoxikus molekula hordozóról történő aspecifikus lehasadásával magyarázható (133, 134).

Vizsgálataink alapján az LHRH ligand és a LHRH-R gyakori együttes expressziója (31%) valamilyen LHRH alapú autokrin/parakrin szabályozási útvonal meglétét feltételezi UM esetén. Ezt erősíti meg az a megfigyelésünk is, hogy a sejtleletképeségi vizsgálatok során az AN-152 nanomólos koncentrációjú alkalmazásával a sejtosztódás fokozódását tapasztaltuk. Számos sejt proliferációval és motilitással kapcsolatos szabályozó fehérje hozható összefüggésbe az LHRH ligand és az LHRH-R rendszerével, feltételezve ezzel ennek a hormonális útvonalnak a fontosságát a metasztázisok képzésében (135). Munkánk során elsőként igazoltuk az LHRH és

receptorának expresszióját humán UM szövetminták esetén. Az UM esetén az LHRH és receptorainak általunk talált magas expressziója és annak szerepe jelenleg még nem teljesen tisztázott. Továbbá először írtuk le olyan splice variáns LHRH-R jelenlétét humán UM sejtvonal esetén, amiben a teljes III-as exon hiányzik. Sikeresen felállítottunk egy olyan *in vitro* kísérletes modellt, ami egyszerre alkalmas a csonka LHRH receptor fehérjén keresztüli célzott terápia megvalósítására és tanulmányozására, valamint az általunk kialakított DOX rezisztencia esetén a citotoxikus LHRH analóg AN-152, sejten belüli eloszlásának vizsgálatára. Az LHRH splice variánsok és fehérje izoformák patológiai és terápiás szerepe jelenleg még nem kellően tisztázott. Emellett egyelőre csak korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésre a fehérje izoformákon keresztüli célzott terápia lehetőségéről. Eredményeink felvetik az LHRH-R izoformák, mint daganatterápiás molekuláris célpontok alkalmazását az olyan molekulák számára, mint az AN-152. Véleményünk szerint ez a célzott terápiás modell mindenképp előnyös, és továbbgondolásra érdemes területnek bizonyul. Vizsgálatunk fontos tanulsága az is, hogy a célzott terápiát megelőző esetleges DOX kezelés jelentős mértékben képes rontani az AN-152 hatékonyságát UM esetén. Ugyan az AN-152 vizsgálataink alapján halmozódni tud a DOX rezisztens sejtekben is (ami bizonyos esetekben a rezisztencia teljes kikerülésével is járhat (117)) a LHRH hordozóról lehasadó DOX már hatástalanításra kerül a rezisztencia által. Az LHRH-R terápiás célpontként történő felhasználása esetén a receptor mediált felvétel és az AN-152 elhúzódo hasítása kevésbé provokálja új, a citotoxikus szerrel szembeni rezisztencia kialakulását (136). A kialakuló rezisztencia ugyanis a gyakorlatban a meghíúsult antraciklin terápia legfőbb oka (136).

A jelenlegi nem kellőképpen specifikus terápiákkal szemben, munkánk eredményei segíthetnek olyan új és specifikus molekuláris célpontok azonosításában az UM esetén, amelyek alkalmasak lehetnek egy modern, hatékony célzott kezelés kialakítására nem csak az AN-152, hanem más hasonló citotoxikus LHRH analóg segítségével is. Az ilyen terápiák hatással lehetnek az UM elszórt metasztázisaira is. Új lehetséges molekuláris célpontként nem csak a teljes hosszúságú LHRH-R-t, hanem annak általunk leírt és vizsgált variánsait is felhasználhatjuk a jövőben.

Értekezésben elért új eredmények röviden:

- Elsőként írtuk le, hogy a teljes hosszúságú LHRH-R-I a szövetminták 46%-ban expresszáldott, míg az LHRH a szövetminták 69%-ban
- A receptort fehérje szintű jelenlétét is igazoltuk
- Sikeresen kialakítottunk egy DOX rezisztens UM *in vitro* sejtes modellt

- A in vitro sejtes modellen mRNS és fehérje szinten leírtuk egy új LHRH splice variáns/izofoma jelenlétét
- Igazoltuk az újonnan leírt LHRH-R izofoma alkalmasságát az AN-152 felvételére
- Leírtuk a DOX és AN-152 sejtproliferációra gyakorolt hatását DOX érzékeny és rezisztens sejteken

7. Abstract

In the past decades, the average survival of patients has not changed in the case of uveal melanoma (UM). The average survival of metastatic patients with UM is less than one year, and despite the treatment of the primary tumor, metastases develop in more than half of the patients. The drawbacks of bad statistics are the rapid dissemination of the tumor cells but resistance to chemotherapy also plays a major role. Cytotoxic LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone) analogs can be effectively used for targeting sexual hormone-dependent malignancies like endometrial, ovarian and prostatic cancers but the application of these analogs in hormone-independent cancers such as human uveal melanoma (UM) is not examined yet.

The aims of the current study were to investigate the expression of LHRH receptor and ligand in human UM tissues, as a potential novel therapeutic target. We also established a new in vitro model to study the cellular uptake and efficacy of cytotoxic LHRH analog AN-152 (AEZS-108, zoletarelin doxorubicin) in a doxorubicin-resistant UM cell line.

The expression of LHRH receptor and LHRH ligand was tested in 39 human UM specimens by RT-PCR with specific primer set for full length LHRH receptor. Radio ligand binding characteristics of LHRH receptors were studied in tumor membranes of ten UM specimen. The presence of LHRH receptor protein has been confirmed by immunohistochemistry. We established a new doxorubicin (DOX) resistant UM cell line by stepwise administration of DOX to OCM3 human UM cells. The LHRH receptor expression of DOX sensitive (OCM3) and DOX resistant (OCM3_{DOX320}) UM cell lines was determined by exon specific RT-PCR and the immunocytochemistry. Cellular uptake and intracellular distribution of DOX and AN-152 were imaged with confocal laser scanning microscopy. Comparative cytotoxic activity of DOX and AN-152 were tested on both cell line by MTT assay

High percentage (46%) of UM specimens expressed the mRNS of full length type 1 LHRH receptor and 69% of samples were positive to LHRH ligand expression. 70% of the tissue samples showed high ligand binding affinity to LHRH receptors. Immunohistochemistry also confirmed the presence of LHRH receptors. We were able to establish a new DOX resistant UM cell line. Our study demonstrated the expression of LHRH receptor splice variants and protein isoforms in OCM3 and OCM3_{DOX320} cell lines. The cellular uptake of AN-152 was confirmed by fluorescent microscopy. Based on the MTT assay AN-152 effectively inhibited cell proliferation in both cell line in dose dependent manner.

Our results demonstrated that LHRH receptors and its isoforms can be potential molecular targets for an effective targeted therapy of UM and its metastases.

8. Összefoglaló

Az elmúlt évtizedekben az uveális melanomás (UM) betegek átlagos túlélése az alkalmazott terápiák ellenére semmit sem változott. Metasztázis esetén a betegek átlagos túlélése nem éri el az egy évet sem, ráadásul a primer tumor kezelésétől függetlenül az esetek több mint felében kialakul áttét. A borzasztó statisztikák háttérében leginkább az UM sejtek szervezeten belüli gyors szóródása és a hagyományos kemoterápiára való érzéketlensége állhat. Az LHRH (luteinizáló hormone-releasing hormone) citotoxikus peptid analógjai számos esetben hatékonyan bizonyultak nemi hormon függő daganatokban, mint az endometrium, petefészek és prosztata daganatok, de a nemi hormonoktól nem függő daganatok esetén (mint a humán UM) ismereteink meglehetősen korlátosak.

Vizsgálataink célja az volt, hogy kiderítsük a célzott terápiára alkalmas LHRH receptor és ligand kifejeződését humán UM esetén, valamint egy olyan modell felállítása, amely alkalmas a DOX-nal konjugált citotoxikus LHRH analóg (AN-152, AEZS-108, zotarelin doxorubicin) sejtszintű felvételének vizsgálatára doxorubicin (DOX) rezisztens esetben is.

39 humán uveális melanoma szövetminta esetén került meghatározásra a teljes hosszúságú LHRH receptor és az LHRH ligand expressziója RT-PCR segítségével. Radioligand kötési vizsgálattal határoztuk meg 10 minta esetében a specifikus ligandkötés tulajdonságait. Az LHRH receptor fehérje a szövetminták esetén immunhisztokémia segítségével is igazolásra került. A DOX rezisztens UM sejtes modell kialakításához lépésenként növekvő DOX koncentráció mellett növesztettünk OCM3 humán UM sejteket. A DOX érzékeny (OCM3) és rezisztens (OCM3_{DOX320}) sejtek LHRH receptor expresszióját exononként RT-PCR segítségével, míg fehérje szinten immuncitokémiával vizsgáltuk. A sejtekben a DOX és AN-152 felvételét konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal tettük láthatóvá. MTT vizsgálat segítségével hasonlítottuk össze a DOX és AN-152 sejtproliferációra gyakorolt hatását mindkét sejtvonalon.

Az 1-es típusú LHRH receptor magas százalékban (46%) kifejeződik az általunk vizsgált szövetminták esetén, míg a LHRH ligand a minták 69%-ban mutatott expressziót. Tízből 7 esetben a minták erős ligand kötési affinitást mutattak a ligandkompetíciós vizsgálatokban. Az immunhisztokémia szintén megerősítette a LHRH receptor jelenlétét a szövetminták esetén. Sikeresen kialakítottunk egy stabilan osztódó DOX rezisztens humán UM sejtvonalat. A vizsgálataink alapján az OCM3 és az OCM3_{DOX320} sejtvonalak is kifejeznek LHRH receptor splice variánst és sikeresen igazoltuk az AN-152 LHRH receptor izoformáin keresztüli felvételét a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokkal. Az AN-152 hatékonyan képes volt dózisfüggő módon gátolni a sejtproliferációt mindkét sejtvonalban.

Eredményeink alapján az LHRH receptor és annak izoformái alkalmas molekuláris célpontjai lehetnek egy modern, hatékony, célzott terápiának UM és annak metastázisai esetén.

9. Irodalomjegyzék

1. Shields CL, Kaliki S, Cohen MN, Shields PW, Furuta M, Shields JA. Prognosis of uveal melanoma based on race in 8100 patients: The 2015 Doyne Lecture. *Eye (Lond)* 2015;29:1027-1035.
2. Sharma A, Stei MM, Frohlich H, Holz FG, Loeffler KU, Herwig-Carl MC. Genetic and epigenetic insights into uveal melanoma. 2018;93:952-961.
3. Laver NV, McLaughlin ME, Duker JS. Ocular melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134:1778-1784.
4. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, Stein KD, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:271-289.
5. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, Gavin A, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer* 2018;103:356-387.
6. Singh AD, Topham A. Incidence of uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* 2003;110:956-961.
7. 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. *Curr Drug Deliv* 2011;8:11-25.
8. Scott JF GM. *Noncutaneous Melanoma* Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Mar. 2018.
9. Scheffler AC, Kim RS. Recent advancements in the management of retinoblastoma and uveal melanoma. *F1000Res* 2018;7.
10. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Mashayekhi A, Shields JA. Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. *Retina* 2012;32:1363-1372.
11. Amaro A, Gangemi R, Piaggio F, Angelini G, Barisione G, Ferrini S, Pfeffer U. The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2017;36:109-140.
12. Kusters-Vandeveldel HV, Kusters B, van Engen-van Grunsven AC, Groenen PJ, Wesseling P, Blokx WA. Primary melanocytic tumors of the central nervous system: a review with focus on molecular aspects. *Brain Pathol* 2015;25:209-226.
13. Griewank KG, Westekemper H, Murali R, Mach M, Schilling B, Wiesner T, Schimming T, et al. Conjunctival melanomas harbor BRAF and NRAS mutations and copy number changes similar to cutaneous and mucosal melanomas. *Clin Cancer Res* 2013;19:3143-3152.
14. Yu GP, Hu DN, McCormick SA. Latitude and incidence of ocular melanoma. *Photochem Photobiol* 2006;82:1621-1626.

15. Krantz BA, Dave N, Komatsubara KM, Marr BP, Carvajal RD. Uveal melanoma: epidemiology, etiology, and treatment of primary disease. *Clin Ophthalmol* 2017;11:279-289.
16. Andreoli MT, Mieler WF, Leiderman YI. Epidemiological trends in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2015;99:1550-1553.
17. Shields CL, Kaliki S, Livesey M, Walker B, Garoon R, Bucci M, Feinstein E, et al. Association of ocular and oculodermal melanocytosis with the rate of uveal melanoma metastasis: analysis of 7872 consecutive eyes. *JAMA Ophthalmol* 2013;131:993-1003.
18. Weis E, Shah CP, Lajous M, Shields JA, Shields CL. The association of cutaneous and iris nevi with uveal melanoma: a meta-analysis. *Ophthalmology* 2009;116:536-543.e532.
19. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, Council ML, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 2010;330:1410-1413.
20. Gallagher RP, Elwood JM, Rootman J, Spinelli JJ, Hill GB, Threlfall WJ, Birdsell JM. Risk factors for ocular melanoma: Western Canada Melanoma Study. *J Natl Cancer Inst* 1985;74:775-778.
21. Shah CP, Weis E, Lajous M, Shields JA, Shields CL. Intermittent and chronic ultraviolet light exposure and uveal melanoma: a meta-analysis. *Ophthalmology* 2005;112:1599-1607.
22. Damato EM, Damato BE. Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients. *Ophthalmology* 2012;119:1582-1589.
23. Accuracy of diagnosis of choroidal melanomas in the Collaborative Ocular Melanoma Study. COMS report no. 1. *Arch Ophthalmol* 1990;108:1268-1273.
24. Shields CL, Furuta M, Berman EL, Zahler JD, Hoberman DM, Dinh DH, Mashayekhi A, et al. Choroidal nevus transformation into melanoma: analysis of 2514 consecutive cases. *Arch Ophthalmol* 2009;127:981-987.
25. Eskelin S, Pyrhonen S, Summanen P, Hahka-Kemppinen M, Kivela T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology* 2000;107:1443-1449.
26. Singh AD. Uveal melanoma: implications of tumor doubling time. *Ophthalmology* 2001;108:829-831.
27. Rietschel P, Panageas KS, Hanlon C, Patel A, Abramson DH, Chapman PB. Variates of survival in metastatic uveal melanoma. *J Clin Oncol* 2005;23:8076-8080.
28. Augsburger JJ, Correa ZM, Shaikh AH. Effectiveness of treatments for metastatic uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 2009;148:119-127.
29. Eskelin S, Pyrhonen S, Hahka-Kemppinen M, Tuomaala S, Kivela T. A prognostic model and staging for metastatic uveal melanoma. *Cancer* 2003;97:465-475.

30. Singh AD, Borden EC. Metastatic uveal melanoma. *Ophthalmol Clin North Am* 2005;18:143-150, ix.
31. Diener-West M, Hawkins BS, Markowitz JA, Schachat AP. A review of mortality from choroidal melanoma. II. A meta-analysis of 5-year mortality rates following enucleation, 1966 through 1988. *Arch Ophthalmol* 1992;110:245-250.
32. Versluis M, de Lange MJ, van Pelt SI, Ruivenkamp CA, Kroes WG, Cao J, Jager MJ, et al. Digital PCR validates 8q dosage as prognostic tool in uveal melanoma. *PLoS One* 2015;10:e0116371.
33. Sipos E, Hegyi K, Treszl A, Steiber Z, Mehes G, Dobos N, Fodor K, et al. Concurrence of chromosome 3 and 4 aberrations in human uveal melanoma. *Oncol Rep* 2017;37:1927-1934.
34. Sipos E, Dobos N, Rozsa D, Fodor K, Olah G, Szabo Z, Szekvolgyi L, et al. 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. *Onco Targets Ther* 2018;11:933-941.
35. Ewens KG, Kanetsky PA, Richards-Yutz J, Al-Dahmash S, De Luca MC, Bianciotto CG, Shields CL, et al. Genomic profile of 320 uveal melanoma cases: chromosome 8p-loss and metastatic outcome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:5721-5729.
36. Triozzi PL, Eng C, Singh AD. Targeted therapy for uveal melanoma. *Cancer Treat Rev* 2008;34:247-258.
37. Onken MD, Worley LA, Char DH, Augsburger JJ, Correa ZM, Nudleman E, Aaberg TM, Jr., et al. Collaborative Ocular Oncology Group report number 1: prospective validation of a multi-gene prognostic assay in uveal melanoma. *Ophthalmology* 2012;119:1596-1603.
38. Field MG, Decatur CL, Kurtenbach S, Gezgin G, van der Velden PA, Jager MJ, Kozak KN, et al. PRAME as an Independent Biomarker for Metastasis in Uveal Melanoma. *Clin Cancer Res* 2016;22:1234-1242.
39. The American Brachytherapy Society consensus guidelines for plaque brachytherapy of uveal melanoma and retinoblastoma. *Brachytherapy* 2014;13:1-14.
40. Caminal JM, Padron-Perez N, Arias L, Masuet-Aumatell C, Gutierrez C, Piulats JM, Pera J, et al. Transscleral resection without hypotensive anaesthesia vs iodine-125 plaque brachytherapy in the treatment of choroidal melanoma. *Eye (Lond)* 2016;30:833-842.
41. Bechrakis NE, Bornfeld N, Zoller I, Foerster MH. Iodine 125 plaque brachytherapy versus transscleral tumor resection in the treatment of large uveal melanomas. *Ophthalmology* 2002;109:1855-1861.
42. Mishra KK, Quivey JM, Daftari IK, Weinberg V, Cole TB, Patel K, Castro JR, et al. Long-term Results of the UCSF-LBNL Randomized Trial: Charged Particle With Helium Ion Versus Iodine-125 Plaque Therapy for Choroidal and Ciliary Body Melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015;92:376-383.

43. Bensoussan E, Thariat J, Maschi C, Delas J, Schouver ED, Herault J, Baillif S, et al. Outcomes After Proton Beam Therapy for Large Choroidal Melanomas in 492 Patients. *Am J Ophthalmol* 2016;165:78-87.
44. Tarmann L, Wackernagel W, Avian A, Mayer C, Schneider M, Winkler P, Langmann G. Ruthenium-106 plaque brachytherapy for uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2015;99:1644-1649.
45. Badiyan SN, Rao RC, Apicelli AJ, Acharya S, Verma V, Garsa AA, DeWees T, et al. Outcomes of iodine-125 plaque brachytherapy for uveal melanoma with intraoperative ultrasonography and supplemental transpupillary thermotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2014;88:801-805.
46. Saakian SV, Val'skii VV, Semenova EA, Amirian AG. [Transpupillary thermotherapy in the treatment of recurrent and residual choroidal melanomas: preliminary results]. *Vestn Oftalmol* 2009;125:11-15.
47. Walker TM, Van Ginkel PR, Gee RL, Ahmadi H, Subramanian L, Ksander BR, Meisner LF, et al. Expression of angiogenic factors Cyr61 and tissue factor in uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1719-1725.
48. Kines RC, Cerio RJ, Roberts JN, Thompson CD, de Los Pinos E, Lowy DR, Schiller JT. Human papillomavirus capsids preferentially bind and infect tumor cells. *Int J Cancer* 2016;138:901-911.
49. Torres V, Triozzi P, Eng C, Tubbs R, Schoenfield L, Crabb JW, Sauntharajah Y, et al. Circulating tumor cells in uveal melanoma. *Future Oncol* 2011;7:101-109.
50. Desjardins L DT, Levy C. Etude randomisée de chimiothérapie adjuvante par le dactinone dans le mélanome choroïdien [Randomized study of adjuvant chemotherapy with dacarbazine in choroidal melanoma] *Ophthalmologie* 1998;12:168-173. .
51. Surriga O, Rajasekhar VK, Ambrosini G, Dogan Y, Huang R, Schwartz GK. Crizotinib, a c-Met inhibitor, prevents metastasis in a metastatic uveal melanoma model. *Mol Cancer Ther* 2013;12:2817-2826.
52. Landreville S, Agapova OA, Matatall KA, Kneass ZT, Onken MD, Lee RS, Bowcock AM, et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* 2012;18:408-416.
53. Field MG, Harbour JW. Recent developments in prognostic and predictive testing in uveal melanoma. *Curr Opin Ophthalmol* 2014;25:234-239.
54. Chen X, Wu Q, Tan L, Porter D, Jager MJ, Emery C, Bastian BC. Combined PKC and MEK inhibition in uveal melanoma with GNAQ and GNA11 mutations. *Oncogene* 2014;33:4724-4734.
55. Saraiva VS, Caissie AL, Segal L, Edelstein C, Burnier MN, Jr. Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2005;15:245-250.

56. Populo H, Soares P, Rocha AS, Silva P, Lopes JM. Evaluation of the mTOR pathway in ocular (uvea and conjunctiva) melanoma. *Melanoma Res* 2010;20:107-117.
57. Ye M, Hu D, Tu L, Zhou X, Lu F, Wen B, Wu W, et al. Involvement of PI3K/Akt signaling pathway in hepatocyte growth factor-induced migration of uveal melanoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:497-504.
58. Abdel-Rahman MH, Yang Y, Zhou XP, Craig EL, Davidorf FH, Eng C. High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma. *J Clin Oncol* 2006;24:288-295.
59. Topcu-Yilmaz P, Kiratli H, Saglam A, Soylemezoglu F, Hascelik G. Correlation of clinicopathological parameters with HGF, c-Met, EGFR, and IGF-1R expression in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2010;20:126-132.
60. Economou MA, All-Ericsson C, Bykov V, Girnita L, Bartolazzi A, Larsson O, Seregard S. Receptors for the liver synthesized growth factors IGF-1 and HGF/SF in uveal melanoma: intercorrelation and prognostic implications. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4372-4375.
61. Economou MA, Andersson S, Vasilcanu D, All-Ericsson C, Menu E, Girnita A, Girnita L, et al. Oral picropodophyllin (PPP) is well tolerated in vivo and inhibits IGF-1R expression and growth of uveal melanoma. *Acta Ophthalmol* 2008;86 Thesis 4:35-41.
62. Yu FX, Luo J, Mo JS, Liu G, Kim YC, Meng Z, Zhao L, et al. Mutant Gq/11 promote uveal melanoma tumorigenesis by activating YAP. *Cancer Cell* 2014;25:822-830.
63. Feng X, Degese MS, Iglesias-Bartolome R, Vaque JP, Molinolo AA, Rodrigues M, Zaidi MR, et al. Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell* 2014;25:831-845.
64. Wang H, Mao Y, Zhou N, Hu T, Hsieh TS, Liu LF. Atp-bound topoisomerase ii as a target for antitumor drugs. *J Biol Chem* 2001;276:15990-15995.
65. Minotti G, Licata S, Saponiero A, Menna P, Calafiore AM, Di Giammarco G, Liberi G, et al. Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite. *Chem Res Toxicol* 2000;13:1336-1341.
66. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* 1996;21:83-86.
67. Muller I, Niethammer D, Bruchelt G. Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity (Review). *Int J Mol Med* 1998;1:491-494.
68. Kemp CJ, Sun S, Gurley KE. p53 induction and apoptosis in response to radio- and chemotherapy in vivo is tumor-type-dependent. *Cancer Res* 2001;61:327-332.

69. Lehne G. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Curr Drug Targets* 2000;1:85-99.
70. Renes J, de Vries EG, Jansen PL, Muller M. The (patho)physiological functions of the MRP family. *Drug Resist Updat* 2000;3:289-302.
71. Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 1983;221:1285-1288.
72. Burger H, Foekens JA, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Wiemer EA, Stoter G, et al. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res* 2003;9:827-836.
73. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58.
74. Dalton WS, Scheper RJ. Lung resistance-related protein: determining its role in multidrug resistance. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1604-1605.
75. Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, Wiemer EA, Scheper RJ. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr Opin Oncol* 2000;12:550-556.
76. Kitazono M, Sumizawa T, Takebayashi Y, Chen ZS, Furukawa T, Nagayama S, Tani A, et al. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1647-1653.
77. Kitazono M, Okumura H, Ikeda R, Sumizawa T, Furukawa T, Nagayama S, Seto K, et al. Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma SW-620 cells. *Int J Cancer* 2001;91:126-131.
78. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15665-15670.
79. Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Colavitti R, Palazzotti B, Borrello S, Galeotti T. Deregulated manganese superoxide dismutase expression and resistance to oxidative injury in p53-deficient cells. *Cancer Res* 2000;60:4654-4660.
80. Sgambato A, Camerini A, Pani G, Cangiano R, Faraglia B, Bianchino G, De Bari B, et al. Increased expression of cyclin E is associated with an increased resistance to doxorubicin in rat fibroblasts. *Br J Cancer* 2003;88:1956-1962.
81. Harbottle A, Daly AK, Atherton K, Campbell FC. Role of glutathione S-transferase P1, P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 1 in acquired doxorubicin resistance. *Int J Cancer* 2001;92:777-783.

82. Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, et al. Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nat Med* 1996;2:811-814.
83. Vikhanskaya F, D'Incalci M, Broggin M. Decreased cytotoxic effects of doxorubicin in a human ovarian cancer-cell line expressing wild-type p53 and WAF1/CIP1 genes. *Int J Cancer* 1995;61:397-401.
84. Hochhauser D, Valkov NI, Gump JL, Wei I, O'Hare C, Hartley J, Fan J, et al. Effects of wild-type p53 expression on the quantity and activity of topoisomerase IIalpha and beta in various human cancer cell lines. *J Cell Biochem* 1999;75:245-257.
85. Gieseler F, Bauer E, Nuessler V, Clark M, Valsamas S. Molecular effects of topoisomerase II inhibitors in AML cell lines: correlation of apoptosis with topoisomerase II activity but not with DNA damage. *Leukemia* 1999;13:1859-1863.
86. Lage H, Helmbach H, Dietel M, Schadendorf D. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance. *Br J Cancer* 2000;82:488-491.
87. Ramachandran C, Samy TS, Huang XL, Yuan ZK, Krishan A. Doxorubicin-induced DNA breaks, topoisomerase II activity and gene expression in human melanoma cells. *Biochem Pharmacol* 1993;45:1367-1371.
88. Eijdem EW, de Haas M, Timmerman AJ, Van der Schans GP, Kamst E, de Nooij J, Astaldi Ricotti GC, et al. Reduced topoisomerase II activity in multidrug-resistant human non-small cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 1995;71:40-47.
89. Salvatore C, Camarda G, Maggi CA, Goso C, Manzini S, Binaschi M. NF-kappaB activation contributes to anthracycline resistance pathway in human ovarian carcinoma cell line A2780. *Int J Oncol* 2005;27:799-806.
90. Rispoli LA, Nett TM. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. *Anim Reprod Sci* 2005;88:57-74.
91. Williams BL, Akazome Y, Oka Y, Eisthen HL. Dynamic evolution of the GnRH receptor gene family in vertebrates. *BMC Evol Biol* 2014;14:215.
92. Flanagan CA, Manilall A. Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptor Structure and GnRH Binding. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017;8:274.
93. Kottler ML, Bergametti F, Carre MC, Morice S, Decoret E, Lagarde JP, Starzec A, et al. Tissue-specific pattern of variant transcripts of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 1999;140:561-569.
94. 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. *Mol Cell Endocrinol* 1995;107:R1-8.

95. Kakar SS. Molecular structure of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Eur J Endocrinol* 1997;137:183-192.
96. Engel JB, Tinneberg HR, Rick FG, Berkes E, Schally AV. Targeting of Peptide Cytotoxins to LHRH Receptors For Treatment of Cancer. *Curr Drug Targets* 2016;17:488-494.
97. Schally AV, Comaru-Schally AM, Nagy A, Kovacs M, Szepeshazi K, Plonowski A, Varga JL, et al. Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:248-291.
98. 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 Oncol* 2002;38:657-663.
99. 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. *J Urol* 1992;148:1568-1570.
100. van Groeninghen JC, Kiesel L, Winkler D, Zwirner M. Effects of luteinising-hormone-releasing hormone on nervous-system tumours. *Lancet* 1998;352:372-373.
101. Moretti RM, Montagnani Marelli M, Van Groeninghen JC, Limonta P. Locally expressed LHRH receptors mediate the oncostatic and antimetastatic activity of LHRH agonists on melanoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3791-3797.
102. Pati D, Habibi HR. Inhibition of human hepatocarcinoma cell proliferation by mammalian and fish gonadotropin-releasing hormones. *Endocrinology* 1995;136:75-84.
103. Fekete M, Zalatnai A, Comaru-Schally AM, Schally AV. Membrane receptors for peptides in experimental and human pancreatic cancers. *Pancreas* 1989;4:521-528.
104. Friess H, Buchler M, Kiesel L, Kruger M, Beger HG. LH-RH receptors in the human pancreas. Basis for antihormonal treatment in ductal carcinoma of the pancreas. *Int J Pancreatol* 1991;10:151-159.
105. Ben-Yehudah A, Lorberboum-Galski H. Targeted cancer therapy with gonadotropin-releasing hormone chimeric proteins. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004;4:151-161.
106. Liebow C, Lee MT, Kamer AR, Schally AV. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone receptor binding by heterologous and autologous receptor-stimulated tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:2244-2248.
107. 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. *Int J Oncol* 2002;21:1325-1329.
108. Schally AV, Nagy A. Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol* 1999;141:1-14.
109. Nagy A SA. Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH): a new approach to targeted chemotherapy. *Drugs Future* 2002;27:359-370.

110. Janaky T, Juhasz A, Bajusz S, Csernus V, Srkalovic G, Bokser L, Milovanovic S, et al. Analogues of luteinizing hormone-releasing hormone containing cytotoxic groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:972-976.
111. Nagy A, Schally AV, Armatas P, Szepeshazi K, Halmos G, Kovacs M, Zarandi M, et al. Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7269-7273.
112. Emons G, Gorchev G, Harter P, Wimberger P, Stahle A, Hanker L, Hilpert F, et al. Efficacy and safety of AEZS-108 (LHRH agonist linked to doxorubicin) in women with advanced or recurrent endometrial cancer expressing LHRH receptors: a multicenter phase 2 trial (AGO-GYN5). *Int J Gynecol Cancer* 2014;24:260-265.
113. 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 Opin Investig Drugs* 2012;21:891-899.
114. Grundker C, Volker P, Emons G. Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha(I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 2001;142:2369-2380.
115. Szepeshazi K, Schally AV, Halmos G. LH-RH receptors in human colorectal cancers: unexpected molecular targets for experimental therapy. *Int J Oncol* 2007;30:1485-1492.
116. Halmos G, Nagy A, Lamharzi N, Schally AV. Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone bind with high affinity to human breast cancers. *Cancer Lett* 1999;136:129-136.
117. Bajo AM, Schally AV, Halmos G, Nagy A. Targeted doxorubicin-containing luteinizing hormone-releasing hormone analogue AN-152 inhibits the growth of doxorubicin-resistant MX-1 human breast cancers. *Clin Cancer Res* 2003;9:3742-3748.
118. AbuHammad S, Zihlif M. Gene expression alterations in doxorubicin resistant MCF7 breast cancer cell line. *Genomics* 2013;101:213-220.
119. Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010;23:41-56.
120. Bedikian AY. Metastatic uveal melanoma therapy: current options. *Int Ophthalmol Clin* 2006;46:151-166.
121. Harbour JW. Molecular prognostic testing and individualized patient care in uveal melanoma. *Am J Ophthalmol* 2009;148:823-829.e821.
122. Singh AD, Topham A. Survival rates with uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* 2003;110:962-965.

123. Keller G, Schally AV, Gaiser T, Nagy A, Baker B, Halmos G, Engel JB. Receptors for luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) expressed in human non-Hodgkin's lymphomas can be targeted for therapy with the cytotoxic LHRH analogue AN-207. *Eur J Cancer* 2005;41:2196-2202.
124. Keller G, Schally AV, Gaiser T, Nagy A, Baker B, Westphal G, Halmos G, et al. Human malignant melanomas express receptors for luteinizing hormone releasing hormone allowing targeted therapy with cytotoxic luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Cancer Res* 2005;65:5857-5863.
125. Moretti RM, Marelli MM, Dondi D, Poletti A, Martini L, Motta M, Limonta P. Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with the stimulatory actions of epidermal growth factor in human prostatic cancer cell lines, LNCaP and DU 145. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3930-3937.
126. Emons G, Ortmann O, Schulz KD, Schally AV. Growth-inhibitory actions of analogues of Luteinizing Hormone Releasing Hormone on tumor cells. *Trends Endocrinol Metab* 1997;8:355-362.
127. Emons G, Sindermann H, Engel J, Schally AV, Grundker C. Luteinizing hormone-releasing hormone receptor-targeted chemotherapy using AN-152. *Neuroendocrinology* 2009;90:15-18.
128. Schally AV. [New approaches to treatment of various cancers based on cytotoxic analogs of LHRH, somatostatin and bombesin]. *An R Acad Nac Med (Madr)* 2004;121:493-500.
129. Brasiuniene B, Sokolovas V, Brasiunas V, Barakauskiene A, Strupas K. Combined treatment of uveal melanoma liver metastases. *Eur J Med Res* 2011;16:71-75.
130. Dayani PN, Gould JE, Brown DB, Sharma KV, Linette GP, Harbour JW. Hepatic metastasis from uveal melanoma: angiographic pattern predictive of survival after hepatic arterial chemoembolization. *Arch Ophthalmol* 2009;127:628-632.
131. Grundker C, Volker P, Griesinger F, Ramaswamy A, Nagy A, Schally AV, Emons G. Antitumor effects of the cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone analog AN-152 on human endometrial and ovarian cancers xenografted into nude mice. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:528-537.
132. Nielsen D, Maare C, Skovsgaard T. Cellular resistance to anthracyclines. *Gen Pharmacol* 1996;27:251-255.
133. Nagy A, Plonowski A, Schally AV. Stability of cytotoxic luteinizing hormone-releasing hormone conjugate (AN-152) containing doxorubicin 14-O-hemiglutarate in mouse and human serum in vitro: implications for the design of preclinical studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:829-834.
134. Schally AV HG. Targeting to Peptide Receptors. In: Kratz Felix, Senter Peter, Steinhagen Henning. . *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy*. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.

135. Aguilar-Rojas A, Huerta-Reyes M. Human gonadotropin-releasing hormone receptor-activated cellular functions and signaling pathways in extra-pituitary tissues and cancer cells (Review). *Oncol Rep* 2009;22:981-990.

136. Gunthert AR, Grundker C, Bongertz T, Schlott T, Nagy A, Schally AV, Emons G. Internalization of cytotoxic analog AN-152 of luteinizing hormone-releasing hormone induces apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cell lines independent of multidrug resistance-1 (MDR-1) system. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1164-1172.

10. Tárgyszavak:

Humán uveális melanoma, human uveal melanoma

Célzott daganatterápia, targeted cancer therapy

Zoptarelin doxorubicin

Doxorubicin rezisztencia, doxorubicin resistance

Luteinizáló hormon-releasing hormon, luteinizing hormone-releasing hormone

LHRH

GnRH

Célzott citotixikus LHRH analóg, Targeted cytotoxic LHRH analóg

11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani, Prof. Dr. Halmos Gábornak a témavezetésért, lelkesítésért. Emberi támogatása, türelme, precíz munkavégzése és jókedve példaértékű számomra. Különös hálával tartozom Dr. Treszl Andreának, aki idő közben tragikusan fiatalon hunyt el, a számos megtanított kísérletes módszerért, szakmai konzultációért és baráti támogatásért. Köszönöm a közlemények minden társszerzőjének és minden közvetlen és közvetett munkatársamnak a segítséget.

Szeretném megköszönni szüleimnek, testvéremnek, hogy mindvégig támogattak és bátorítottak a munkám elvégzésében. Kitüntetett hálával tartozom feleségemnek, aki sokat segített az elkészült munka szakmai lektorálásában valamint. hogy minden nehézségben mellettem állt.

A munka elvégzését támogatták:

- A tanulmány alapjául szolgáló kutatást az Emberi Erőforrás Minisztériuma által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program támogatta, a Debreceni Egyetem Biotechnológia tématerületi programja keretében (20428-3/2018/FEKUTSTRAT)
- Az értekezés elkészülését támogatta EFOP 3.6.1-16-2016-00022
- Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-18-3-IV-DE372)
- GINOP-2.3.2-15-2016-00043 Szív és érkutatási kiválóságközpont (IRONHEART)
- Richter Gedeon Talentum Alapítvány
- OTKA K81596 "Rosszindulatú daganatokban expresszáldó luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok mint új molekuláris célpontok a pozitron emissziós tomográfia számára" 2010-2014.
- TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 „A felsőoktatás minőségének javítása a kutatás-fejlesztés-innováció-oktatás fejlesztésén keresztül a Debreceni Egyetemen”
- TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 számú Molekuláris Onkológia projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.
- TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 számú Kutató Egyetemi projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

12. Publikációs lista



Nyilvántartási szám: DEENK/352/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Oláh Gábor
Neptun kód: H3HZI3
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10044594

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Oláh, G.**, Dobos, N., Vámosi, G., Szabó, Z., Sipos, É., 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: 3.466 (2017)
2. Treszl, A., Steiber, Z., Schally, A. V., Block, N. L., Dezső, B., **Oláh, G.**, Rózsa, B., 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





További közlemények

3. Sipos, É., Dobos, N., Rózsa, D., 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: 2.656 (2017)
4. Harda, K. M., Szabó, Z., Szabó, E. K., **Oláh, G.**, 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: 3.098 (2017)
5. Sipos, É., Hegyi, K., Treszl, A., Steiber, Z., Méhes, G., Dobos, N., 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
6. **Oláh, G.**, Steiber, Z., Halmos, G.: Iránytű műkönyvekhez: gyógyszerészeknek.
Gyógyszerészet. 57 (2), 77-80, 2013.
7. **Oláh, G.**, Steiber, Z., Halmos, G.: Mi folyik a műkönyvekkel?
Gyógyszerészet. 56 (11), 663-666, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 18,823

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,093**

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



További közlemények:

- 1, Oláh G.: Vásárlói igények, patikai lehetőségek Felmerülő kihívások és lehetséges megoldásuk. Gyógyszertár, XVIII 1. szám (2019. 01.)
- 2, Szabó E., Szabó Zs., Szegedi K., Oláh G., Sággy T., Tóth F., Flaskó T., Kalács K. I., Halmos G.:A shikonin humán vesedaganat sejtvonalakra kifejtett apoptotikus hatása, Klinikai Onkológia, V 3. különszám (2018. 11.)
- 3, Oláh G.: Néhány gondola mit, arról mit tehetünk daganatos betegeinkért a gyógyszertárban. Gyógyszertár, XVII 7-8. szám (2018. 08.)
- 4, Oláh G., Magisztrális gyógyszerkészítés –legyen puszkapor a küzdelemhez, ne homok a gépezetben, Gyógyszertár, XVI 4. szám (2017. 04.)
- 5, Dr. Oláh Gábor: Ördög a részletekben- a száraz szem gyógyszerészeti gondozásának aktualitásai, Gyógyszertár, XV. 2. szám (2016. 02.)
- 6, Szabó Zs., Szegedi K., Flaskó T., Gombos K., Oláh G., Harda K., Halmos G., Onkogén jellegű miR-ek expressziójának vizsgálata világossejtes vesekarcinómában, MUT 19. kongresszusa Siófok (2014. 09.)
- 7, Oláh G., Treszl A., Vámosi Gy., Steiber Z., Halmos G., Uvealis melanomában expresszáldó Luteinizáló Hormon-Releasing Hormon (LHRH) receptorokon alapuló célzott daganatterápia lehetősége citotoxikus LHRH analóggal, Gyógyszerészetsupplementum 48:(Suppl. I.) pp. S52 (2014. 4.)
- 8, Oláh G., Halmos G., A száraz szem gyógyszerészeti gondozása- megéri? 48:(Suppl. I.) pp. S133 (2014. 4.)
- 9, Oláh G, Kerekes I, Törjéki Cs Amerikából jöttem.... GYÓGYSZERTÁR 12:(4) pp. 19-21. (2013. 12.)
- 10, Rózsa D, Oláh G, Kertész I, Trencsényi Gy, Márián T, Treszl A, Mező G, Halmos G Luteinizáló hormon felszabadító hormon receptorához kötődő PET-radiotracer fejlesztése és karakterizálása a tumordiagnosztika számára. MAGYAR ONKOLOGIA 57:(1 szupplementum) pp. 76 (2013. 11.)
- 11, Treszl A., Fodor F., A. V. Schally, Steiber Z., Oláh G., Halmos G. The mechanism of action of targeted cytotoxic LHRH analog AN-152 (AEZS-108) in human uveal melanoma cells. International Journal of Molecular Medicine 32: (1 supplement) pp 43 (2013. 10.)
- 12, Oláh G, Steiber Z, Halmos G Száraz szem sillabusz. GYÓGYSZERTÁR 12:(4) pp. 13-14. (2013. 04.)
- 13, Oláh G, Steiber Z, Halmos G Iránytű műkönyvekhez GYÓGYSZERÉSZET 57:(2) pp. 77-80. (2013. 02.)
- 14, Oláh Gábor, Steiber Zita, Halmos Gábor Mi folyik a műkönyvekkel?! GYÓGYSZERÉSZET 56:(11) pp. 663-666. (2012.11.)

15, Oláh Gábor, Treszl Andrea, Steiber Zita, Rózsa Bernadett, Dezső Balázs, Rózsa Dávid, Halmos Gábor: Luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH) receptoron alapuló célzott terápiás lehetőség humán uveális melanomában, Orvostovábbképző Szemle 2012. November, különszám, 66, (2012)

16, Zita Steiber, Andrea Treszl, Gabor Olah, Armin Buglyo, Bernadett Rozsa, Andras Berta and Gabor Halmos: Expression of Receptors for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Human Uveal Melanomas, Invest Ophthalmol Vis Sci, April 22, 52:6021, (2011)

17, Treszl A, Steiber Z, Oláh G, Rózsa B, Schally AV, Halmos G: LUTEINIZING HORMONE-RELEASING HORMONE RECEPTORS (LHRH) IN HUMAN UVEAL MELANOMA AS POTENTIAL MOLECULAR TARGETS FOR CANCER THERAPY, Abstract #100 pp:51 10th International Symposium on GnRH Salzburg, Austria, (2011)
Kongresszusi poszterek:

Kongresszusi előadások:

1, Gyomorégés és reflux gyógyszeres terápia menedzsmentje, Farmakoterápia aktualitásai Miskolc (2016)

2, A tumor diagnosztika és célzott terápia megvalósítási lehetőségei új molekulári targeteken keresztül, "A molekuláris biológiától a nukleáris medicináig", Debrecen (2015. 11.)

3, Doxorubicin (DOX) rezisztens uveális melanoma Luteinizáló HormonReleasing Hormon receptor (LHRH-R) alapú célzott terápiájának vizsgálata, MAGYAR KLINIKAI FARMAKOLÓGUSOK XIX. TOVÁBBKÉPZŐ NAPOK, Debrecen (2017. 12.)

4, Gyomorégés és reflux gyógyszerészi gondozása, Gyógyszerésztudományok Fóruma Pécs (2016)

5, A tumor diagnosztika és célzott terápia megvalósítási lehetőségei új molekuláris targeteken keresztül, A „Biotechnológia a Debreceni Egyetemen” 2. szimpózium (2015. 11.)

6, A száraz szem gyógyszeres terápia menedzsmentje, MOSZ Gyógyszerészek XXV. országos kongresszusa Siófok (2015)

7, ÚJ MOLEKULÁRIS CÉLPONTOK A DAGANATTERÁPIÁBAN, Fórum az oktató gyógyszerészeknek, Szeged (2015. 04.)

8, A száraz szem gyógyszerészi gondozása, Gyógyszerésztudományok Fóruma Pécs (2015)

9, Amerikai tapasztalatok 1 év távlatából, MOSZ Gyógyszerészek XXIV. országos kongresszusa Siófok (2014)

10, Oláh G., Treszl A., Vámosi Gy., Steiber Z., Halmos G., Uveális melanomában expresszáldó Luteinizáló Hormon-Releasing Hormon (LHRH) receptorokon alapuló célzott daganatterápia lehetősége citotoxikus LHRH analóggal, 15. CPH Budapest (2014)

11, A száraz szem gyógyszerészi gondozása- megéri? I díjazott versenyelőadás, Cholnoky László Szakkollégium Nyitónap Pécs (2014)

12, Gyógyszerészek XXIII. Országos Kongresszusa, Ifjúsági Fórum, Beszámoló a Tennessee Egyetem eltöltött gyakorlatról. Siófok (2013)

13, XLVIII. Rozsnyay Mátyás Emlékverseny, Mit kezdünk a magival?! II. Díjazott versenyelőadás Miskolc (2013)

14, Gyógyszerészek XXII. Országos Kongresszusa, Ifjúsági Fórum, Iránytű műkönnyekhez II. Díjazott versenyelőadás Siófok (2012)

15, XLVII. Rozsnyay Mátyás Emlékverseny, Mi folyik a műkönnyekkel?! II. Díjazott versenyelőadás Debrecen (2012)

16, LHRH receptorokon alapuló új célzott daganatterápia lehetősége humán uveális melanómában, farmakológia szekció III. helyezés (TDK pályamunka) Debrecen (2010)

Egyetemi jegyzetek:

1, Gabor Halmos: Pharmaceutical Care Practical Study Notes, Possible ways of pharmaceutical care in ophthalmology and other topics, Egyetemi jegyzet rész angol nyelven 2015. 01. 31.

2, Dr. Halmos Gábor: Válogatott fejezetek a gyógyszerészi bioanalitikából, Biológiai minták kezelése (gyűjtése, tárolása és homogenizálása) bioanalitikai felhasználásra fejezet, Egyetemi jegyzet rész magyar nyelven 2015. 01. 31.

3, Gabor Halmos: Selected chapters of pharmaceutical bioanalytical methods, Biological sample handling (storage and homogenization) for bioanalytical use, Egyetemi jegyzet rész angol nyelven 2015. 01. 31.

4, Dr. Halmos Gábor: Gyógyszerészi gondozási példák, Szemészeti és egyéb gyógyszerészi gondozási lehetőségek, Egyetemi jegyzet rész magyar nyelven 2015. 01. 31

13. Függelék: a megjelent publikációk és kéziratok gyűjteménye