

# VASZKULARIZÁCIÓT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK VIZSGÁLATA EMBERI MELANÓMÁBAN

Kiss Judit

Semmelweis Egyetem, Patológiai Tudományok Doktori Iskola, Budapest

Kutatócsoportunk a mikrovaszkuláris denzitás (MVD) és a daganatot infiltráló immunsejtek közötti összefüggést vizsgálta kután melanómában. Freiburg-i kutatómunkám során pedig a hyperforin *in vitro* és *in vivo* daganat- és endotélsejt-ellenes hatásával foglalkoztam. A limfocita-szubpopulációk, makrofágok, dendritikus sejtek és CD34<sup>+</sup> erek denzitását ötvenkét beteg 1 mm-nél vastagabb melanóma-mintáján vizsgáltuk immunhisztokémiai módszerrel. 16 humán- és 7 patkány sejtvonalon, valamint humán dermális mikrovaszkuláris endoteliális sejteken tanulmányoztuk a hyperforin proliferációt gátló hatását. Az intratumorális MVD nem mutatott szignifikáns összefüggést az infiltráló sejtekkel. Peritumorálisan, az egész betegpopulációt vizsgálva, a CD3<sup>+</sup> T-sejteknel találtunk szignifikáns korrelációt a mikrovaszkuláris denzitással. Ez az összefüggés erősebb volt a legnagyobb vastagsági kategóriában (>4,0 mm) valamint a távoli áttétet adó daganatok csoportjában. Ezekben az alcsoportokban hasonló jelenséget tapasztaltunk a CD8<sup>+</sup> T-sejtek vizsgálatakor is. További összefüggést találtunk a 4,0 mm-nél vastagabb melanómáknál a makrofágdenzitással valamint a szervi áttétet adó melanómák esetében a B-sejtek és a dendritikus sejtek sűrűségével. Ugyanakkor az intratumorális MVD és a makrofáginfiltráció szignifikánsan magasabb volt a férfiak csoportjában. A hyperforin gátolta a daganatsejtek proliferációját és apoptózist indukált. A humán dermális mikrovaszkuláris endotélsejtek (HDMEC) proliferációját viszont apoptózis és toxicitás nélkül csökkentette. Továbbá extracelluláris mátrixon a hyperforin megakadályozta a HDMEC sejtek kapillárisképzését. Wistar patkányokban a hyperforin gátolta az emlődaganat (MT-450) növekedését, valamint a tumor vaszkularizációját. Mivel a tumort infiltráló immunsejtek és a vaszkularizáció szimultán változásának klinikai eredményét jelenleg nehéz megjósolni, további klinikopatológiai vizsgálatokra van szükség. A kevés mellékhatással rendelkező hyperforin ígéretes daganatellenes és antiangiogénikus szernek tűnik. Magyar Onkológia 52: 385–389, 2008

Levelezési cím:

Dr. Kiss Judit

2092 Budakeszi

Konth Miklós u. 11.

Telefon: (06-70) 772-5141

E-mail:

kisjudit@freemail.hu

Témavezető:

Dr. Tímár József

**Kulcsszavak:** melanoma malignum, vaszkularizáció, immunsejtek, hyperforin, tumorelleses szer

We analyzed the relationship among microvessel density (MVD) and tumor infiltrating cells in cutaneous malignant melanoma. We also studied the effect of hyperforin on tumor- and endothelial cell growth *in vitro* and *in vivo*. The density of lymphocyte subpopulations, macrophages, dendritic cells and CD34<sup>+</sup> microvessels was determined by immunohistochemistry in primary tumor samples from 52 patients with melanoma thicker than 1 mm. The antiproliferative effect of hyperforin was studied on 16 human- and 7 rat cell lines and on human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC). Intratumoral MVD did not show significant association with infiltration for any of these cell types. In the case of peritumoral reactive cell densities analyzed in the whole patient population, significant correlation was found with CD3<sup>+</sup> T-cell density. This association was stronger in melanomas >4.0 mm and in visceral metastatic tumors. In these subgroups similar phenomenon was observed for CD8<sup>+</sup> cells. We found significant correlation of MVD with CD68<sup>+</sup> macrophage density only in the highest thickness category, and weak associations with B-cell and dendritic cell infiltration in visceral metastatic cases. MVD did not vary significantly in tumors categorized according to thickness, location, ulceration or histological type. However, both intratumoral MVD and macrophage infiltration were significantly higher in male patients compared to females. Hyperforin inhibited tumor cell proliferation and induced apoptosis. *In vitro*, it blocked capillary formation of HDMEC on a complex extracellular matrix. Furthermore, hyperforin reduced proliferation of HDMEC, without displaying toxic effects or inducing apoptosis. In Wistar rats hyperforin inhibited tumor growth and reduced tumor vascularization. Since the net outcome of the enrichment in tumor-infiltrating host cells and in tumor vascularization cannot be easily predicted, further clinicopathological studies are needed on human skin melanoma patients. Hyperforin holds the promise of being an interesting antineoplastic and antiangiogenic agent with low toxicity. Kiss J. Examination of different factors influencing the vascularization of human cutaneous melanoma. Hungarian Oncology 52: 385–389, 2008

**Keywords:** malignant melanoma, vascularization, immune cells, hyperforin, antitumoral agent

## BEVEZETÉS

Bár a kutatási eredmények és a gyakorlati klinikai tapasztalatok alapján a melanómát immunogén tumornak tartjuk, mégis a legagresszívabb daganattípusok közé tartozik, és az előrehaladott melanómás betegek túlélése még ma is igen alacsony. Vajon mi lehet ennek az ellentmondásnak az oka?

A melanómaantigéneket hivatásos antigénprezentáló sejtek, elsősorban dendritikus sejtek dolgozzák fel, és a daganat-közeli nyirokcsomókban T-sejteknek mutatják be az azokból származó peptideket. Az aktivált CD8<sup>+</sup> T-limfociták közvetlenül lépnek kölcsönhatásba a tumorsejtekkel. A CD4<sup>+</sup> T-sejtek citokinek segítségével CD8<sup>+</sup> T-limfocitákat, makrofágokat és eozinofil granulocitákat stimulálnak.

Ez az immunválasz azonban többnyire nem képes megfékezni a daganatok növekedését. Számos mechanizmust leírtak, melyek magyarázatul szolgálhatnak: a melanóma-asszociált antigének vagy az MHC I molekulák expressziójának csökkenése a daganatsejteken; az antigénpeptidek nem elégséges prezentációja; a kostimuláció hiánya; a daganat mikro környezetében termelődött immunszuppresszív citokinek; a tumort infiltráló limfociták apoptózisa; immuntolerancia kialakulása.

Az angiogenezis folyamatát a daganat- és stróma-sejtek által termelt angiogén (pl. VEGF, bFGF, PDGF) és anti-angiogén (pl. angiostatin, endostatin, IFN- $\gamma$ ) növekedési faktorok és citokinek aránya szabályozza. A tumor vaszkularizációjának kialakításában feltehetően szerepet játszik a malignus sejtek és az infiltráló sejtek közötti interakció is. Mivel a tumort infiltráló sejtek többsége a keringésből származik, lehetséges, hogy a peri- és az intratumorális erek denzitása összefügg a melanómát infiltráló sejtekkel. Mivel a strómasejtek számos angiogén faktort termelnek, még inkább elképzelhető ez a feltevés.

Munkacsoportunk megfigyelése szerint a melanóma peritumorális neoangiogenezist indukál, de ezek az erek nem nőnek be a tumorszövetbe, hanem ahogy a daganat növekszik, inkorporálja az erek egy részét a tumor körüli érhalózatból. A tumor mikro környezetében intratumorálisan azonban csupán a kapillárisok egy része marad életképes.

A mikrovaszkuláris denzitás (MVD) és a prognózis összefüggését illetően az irodalmi adatok igen ellentmondásosak. Számos kutatócsoport a rosszabb prognózis előjelének találta a primer kután melanómák erősebb vaszkularizációját. Mások viszont nem találtak összefüggést a fenti két tényező között, sőt voltak, akik a vaszkularizáció pozitív prognosztikus szerepéről számoltak be. Hasonlóan ellentmondásos a primer melanómák nyirokérdenzítésének prognosztikus szerepe is.

A legtöbb klinikailag kipróbált angiogenezist gátló szer (thalidomid, semaxanib, sorafenib, marimastat, topotecan, Vitaxin) melanómában sajnos nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. Csúpan izolált

végtagperfúzióban adott tumornekrozis-faktorról (TNF) és intratumorálisan adott IL-12-t kódoló plazmid DNS-sel érték el bizonyos eredményt.

A hyperforin egy acilfloroglucinol típusú lipofil vegyület, melyet az orbáncfűből lehet kivonni. A népi gyógyászatban gyakran használják az orbáncfű olajos kivonatát égések és bőrsérülések gyógyítására. Az utóbbi időben enyhe- és közép súlyos depresszió kezelésére is alkalmazzák neurotranszmitter reuptake-inhibitor hatása miatt. A hyperforin természetes antibiotikum, mely hatékonyan gátolja számos gram-pozitív baktérium osztódását, beleértve a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* is. A hyperforin dózisfüggő módon gátolta a fitohemagglutininnal stimulált limfociták proliferációját. Kimutatták, hogy direkt módon gátolja mind a ciklooxygenáz-1 (COX-1), mind pedig az 5-lipoxigenáz (5-LOX) aktivitását. Antibakteriális és gyulladáscsökkentő hatásának köszönhetően enyhe- és közép súlyos atópiás dermatitisz kezelésében jó eredményeket érték el a hyperforin-tartalmú krém alkalmazásakor.

## CÉLKITŰZÉSEK

- Primer bőr melanómát infiltráló sejtek vizsgálata a daganat progressziója szempontjából
- A mikrovaszkuláris denzitás és a tumorinfiltráló sejtek közötti összefüggés vizsgálata primer kután melanómában
- A hyperforin lehetséges antitumorális és angiogenezist gátló hatásainak vizsgálata *in vitro* és *in vivo* modellrendszerekben

## ANYAG ÉS MÓDSZER

*Beteganyag*

52 (a dendritikus sejtek vizsgálatánál 82) primer kután malignus melanómában szenvedő beteg archivált szövettani mintáit vizsgáltuk. A melanómák műtéti eltávolítása 1980 és 2000 között történt a Semmelweis Egyetem Bőr-Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán, valamint az Országos Onkológiai Intézetben. A betegek daganatellenes terápiában nem részesültek a műtét előtt. A tumorvastagság alapján három kategóriába soroltuk a mintákat (1,01–2,0 mm, 2,01–4,0 mm, >4 mm). Az 5 éves követési periódus alatti progresszió szerint nem metasztatizáló, csak nyirokcsomóáttétet adó valamint szervi metasztázist (is) képző csoportokba osztottuk a betegeket.

*Az infiltráló sejtek és az erek kimutatása immunhisztokémiai módszerrel*

A vizsgálathoz formalin-fixált, paraffinba ágyazott kután melanóma-mintákból származó, 3  $\mu$ m-es metszeteket használtunk. A deparaffinált metszeteken mikro hullámos

antigénfeltárást követően az endogén peroxidáz-aktivitást metanolban hígított 3%-os hidrogén-peroxiddal blokkoltuk. A nem specifikus kötőhelyek gátlása 3%-os borjú szérumalbuminnal történt. Negatív kontrollként egér IgG1-et, primer ellenanyagként poliklonális CD3-ellenes, illetve monoklonális CD8-, CD20-, CD34-, CD68-, CD1a- és DC-LAMP-ellenes antitesteket használtunk. Ezt követően a másodlagos ellenanyaggal (biotinilált anti-egér/anti-nyúl), majd pedig sztreptavidin-peroxidázzal inkubáltuk a metszeteket. Az antitest kötődését 3-amino-9-etilkarbazollal tettük láthatóvá, majd hematoxilinnel háttérfestést végeztünk.

A CD34<sup>+</sup> erek számolása során kiválasztottuk a három legsűrűbben erezett területet intratumorálisan és peritumorálisan. Intratumorálisan a daganat teljes területét, peritumorálisan pedig a melanóma-sejtfészkek közvetlen környezetét (szélét és alapját) vizsgáltuk. Öt-öt random módon választott mezőn határoztuk meg a melanómát infiltráló intratumorális, valamint a melanóma körüli peritumorális CD3-, CD8-, CD20-pozitív limfociták, CD1a-pozitív dendritikus sejtek és CD68-pozitív makrofágok számát, majd az 1 mm<sup>2</sup>-re eső sejtsűrűséget kiszámoltuk.

#### Statisztikai analízis

A különböző csoportok sejtdenzitásának statisztikai összehasonlítása Mann-Whitney U-teszttel és Kruskal-Wallis-teszttel történt. A mikrovaszkuláris denzitás és az infiltráló sejtek közötti összefüggést Spearman-féle rangkorrelációs teszttel határoztuk meg. A statisztikai számításokat BMDP Statisztikai Szoftvercsomaggal végeztük.

#### A hyperforin és citotoxikus gyógyszerek

A hyperforint a Hypericum perforatum-ból vonták ki (Flavex, Rehlingen, Németország). A paclitaxel a Tocris cégtől, a camptothecin és a vincristin a Sigmától származott. A citotoxikus gyógyszereket dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel, melyet foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) hígítottunk tovább. A végső koncentrációt a tápoldatban történt hígítással értük el. A maximális DMSO-koncentráció 1% volt.

#### Sejtvonalak

A következő sejtvonalakat használtuk: humán dermális mikrovaszkuláris endotélsejtek (HDMEC), A-431 humán laphámkarzinóma, HT-144, MV3, 1F6, SB1 és SB3 humán melanóma, Jurkat humán akut T-sejtes leukémia, MCF-7 és MDA-MB-468 humán emlő-adenokarcinóma, SK-OV-3 humán ováriumkarzinóma, MAT-Lu és AT-2.1 patkány prosztatakarzinóma, AR42J és ARIP patkány hasnyálmirigy-karcinóma, RG2 patkány glioblasztóma, BDX2 patkány fibroszarkóma, MT-450 patkány emlő-adenokarcinóma.

#### Proliferációs tesztek

Az adherens sejteket tripszin/etilén-diamin-tetraacet-savval (EDTA) gyűjtöttük össze. A sejteket kétszer átmostuk PBS-sel, reszuszpendáltuk a médiumban, majd 96-lyukú mikrotiter lemezekben tenyésztettük tovább (1×10<sup>5</sup> sejt/ml). A hyperforin (2,5–90 µg/ml), ill. a camptothecin, vincristin és paclitaxel (0,0001–1,0 µg/ml) adását követően a sejteket 24 órán át inkubáltuk. Az osztódó sejtek 5-bróm-2'-dezoxiuridin-(BrdU) felvételét kolorimetriás BrdU sejtproliferációs enzim-kapcsolt immunszorbens esszével (ELISA) mértük.

#### Az apoptózis fotometriás meghatározása

A sejteket (1×10<sup>4</sup> sejt/ml) a fent leírt módon hyperforinnal kezeltük 24 órán át. Ezt követően az apoptotikus sejtek arányát ELISA-val (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>, Roche Molecular Biochemicals) határoztuk meg. A teszt a sejtlizátumok citoplazmatikus frakciójában detektálja a mono- és oligonukleoszómákat anti-hiszton és peroxidáz-kapcsolt anti-DNS antitestekkel. A nukleoszómák mennyiségét 405 nm-en fotometriásan határozza meg az immunkomplexek peroxidázaktivitása alapján.

#### In vitro kapillárisképződés vizsgálata

A hyperforin endotélsejtekre gyakorolt hatásának *in vitro* angiogenezis-modellben történő vizsgálatához ECMatrix gélt (Chemicon) használtunk. A gélt egy TILL-Photonics<sup>TM</sup> videomikroszkóp 37°C-ra felfűtött inkubációs kamrájába helyeztük. A médiumban szuszpendált endotélsejteket (2×10<sup>5</sup>) a géltre helyeztük 5 µg/ml hyperforinnal és anélkül. A videomikroszkóppal 10 másodpercenként 12 órán keresztül felvételeket készítettünk.

#### VEGF meghatározása a sejtkultúra felülúszójában

Az MT-450 sejteket (1×10<sup>5</sup>/mL) 24 órán át hyperforinnal inkubáltuk. A felülúszók VEGF-koncentrációját ELISA-val határoztuk meg (human VEGF Quantikine ELISA, R&D Systems, Wiesbaden, Németország).

## EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

#### A makrofág-, T- és dendritikus sejtes infiltráció változása a klinikai paraméterekkel

Vizsgálataink szerint az intratumorális és peritumorális makrofágdenzitás a 2 mm-nél vastagabb tumorok csoportjában szignifikánsan magasabb volt, mint a vékonyabbakban. Ez megerősíti két másik

munkacsoport megfigyelését is, akik ugyancsak sűrűbb makrofáginfiltrációt találtak a vastagabb melanómákban. Az intratumorális makrofágok sűrűsége magasabb volt a férfiak körében. Erre magyarázatul szolgálhat, hogy az ösztrogén számos szövettípusban gátolja az MCP-1-expressziót és a makrofáginfiltrációt. A lokalizáció, a szövettani típus (SSM vs. NM), az ulceráció és a prognózis nem volt szignifikáns hatással a daganatok makrofáginfiltrációjára.

Az intratumorális és peritumorális T-sejtes infiltrációt nem befolyásolta a daganatvastagság, a lokalizáció, a szövettani típus és a betegek neme. Az ulcerált daganatok azonban intratumorálisan alacsonyabb CD3<sup>+</sup> T-limfocita-sűrűséget, peritumorálisan pedig (statisztikailag nem szignifikáns mértékben) kisebb CD8<sup>+</sup> T-sejtdenzitást mutattak. Az intratumorális és peritumorális CD3<sup>+</sup> T-sejtek denzitása alacsonyabb volt a szervi metasztázist adó melanómák csoportjában, mint az áttétet nem képezőkében (határérték-szignifikancia,  $p=0,0903$  ill.  $p=0,0659$ ). Hasonló összefüggést találtunk a peritumorális CD8<sup>+</sup> T-sejtek esetében is (határérték-szignifikancia,  $p=0,0947$ ).

A CD1a<sup>+</sup> és DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek prognosztikus jelentőségével is foglalkoztunk. A peritumorális és intratumorális CD1a<sup>+</sup> dendritikus sejtek valamint a peritumorális DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtek denzitása inverz korrelációt mutatott a melanómák vastagságával. A szervi metasztázist adó melanómákra alacsonyabb peritumorális dendritikus sejt-denitáció volt jellemző. A sűrű DC-LAMP<sup>+</sup> érett dendritikus sejtes infiltráció hosszabb túléléssel járt együtt; ennek pozitív prognosztikus jelentőségét egy-és többváltozós analízissel is alátámasztottuk.

#### *A primer melanóma érdenzitása*

Vizsgálatunk eredménye szerint, a peritumorális kisérdenzitás a melanómavastagsággal párhuzamosan emelkedő tendenciát mutatott, a legsűrűbb intratumorális vaszkularizációt az intermedier vastagságú (2,01–4,0 mm) melanómák csoportjában találtuk. A makrofáginfiltrációhoz hasonlóan, a férfiak csoportjában az intratumorális kisérdenzitás szignifikánsan magasabb volt ( $p=0,0303$ ). Ugyanakkor az intratumorális és peritumorális MVD nem függött össze a metasztázisképzéssel. A melanómák lokalizációja, ulceráltsága és szövettani típusa (SSM vs. NM) sem befolyásolta a vaszkularizációt.

#### *A mikrovaszkuláris denzitás és az immunsejtes infiltrátum kapcsolata*

Az infiltráló sejtek és a mikrovaszkuláris denzitás közötti összefüggést az egész betegpopulációban, valamint a tumorvastagság és a metasztázisképzés szempontjából kialakított csoportokban is vizsgáltuk. Az

intratumorális infiltráció nem mutatott szignifikáns korrelációt a kisérsűrűséggel egyik fenti klinikai csoportban sem.

Az összes vastagsági kategóriát együtt vizsgálva szignifikáns összefüggést találtunk a peritumorális MVD és a peritumorális CD3<sup>+</sup> T-sejtek száma között. A korreláció kifejezettebb volt a 4,0 mm-nél vastagabb és a szervi metasztázist képző melanómák csoportjában. A szervi áttétes csoportot megvizsgálva azonban azt az eredményt kaptuk, hogy csupán a 4 mm-nél vastagabb tumorok alcsoportjában észlelhető szignifikáns korreláció.

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a daganatvastagsággal párhuzamosan emelkedő peritumorális érdenzitás egyre több T-sejt extravazációját teszi lehetővé a melanóma területén. Ezek a T-sejtek részt vehetnek a tumorelles immunválaszban, ugyanakkor angiogén citokinek termelésével elősegíthetik a melanóma vaszkularizációját.

A 4 mm-nél vastagabb melanómák kategóriájában a mikrovaszkuláris denzitás korrelált a makrofágok sűrűségével. Gyenge összefüggést találtunk továbbá a B-sejtes- és a dendritikus sejtes infiltrációval a szervi áttétes csoportban. Ezzel szemben a vékonyabb (1,01–2,0 mm) és az áttétet nem képző melanómák esetében nem találtunk összefüggést az érdenzitás és ezen infiltráló sejtek között.

#### *A hyperforin melanómaellenes és angiogenezist gátló hatása*

Kutatómunkám másik célja a hyperforin endotélsejt (HDMEC) és daganat- (elsősorban melanóma) ellenes hatásának vizsgálata volt. Mivel a melanómasejtek kemoterapeutikumokkal és apoptózissal szembeni rezisztenciája igen magas, az újabb támadáspontú szerek kifejlesztése kiemelten fontos.

A hyperforin – a fibroszarkóma-sejtvonal kivételével – hatékonyan gátolta 10 humán- és 7 patkány daganatsejtvonal proliferációját. A melanómasejtek osztódását – a többi sejtvonalhoz képest – közepesen gátolta.

Mivel a citotoxikus gyógyszerek többsége a tumorsejtek apoptózisát eredményezi, megvizsgáltuk, hogy a hyperforin képes-e apoptózist indukálni a célsejtekben. A hyperforinnal kezelt sejtekben dóziszfüggően alakultak ki apoptotikus oligonukleosómák.

Mivel a melanómasejtek ciklooxigenáz-1-et és -2-t expresszálnak, valamint a kísérletes és epidemiológiai adatok a nem szteroid gyulladáscsökkentők melanómaellenes hatásáról számolnak be, a hyperforin COX-1- és 5-LOX-gátló hatása mindenképpen figyelmet érdemel. Elképzelhető, hogy ez a tulajdonság is hozzájárul a melanómasejtek proliferációjának gátlásához.

Az angiogenezisre gyakorolt hatást *in vitro* humán dermális mikrovaszkuláris endotélsejteken (HDMEC) vizsgáltuk. A hyperforin dóziszfüggő módon gátolta a HDMEC sejtek proliferációját citotoxicitás és apoptózis indukciója nélkül. Az endotélsejtek tubulusképzését

bazálmembrán-fehéjékből álló mátrixgélén vizsgálva az endotélsejt-táploldathoz adott 5 µg/ml hyperforin gátló hatását tapasztaltuk. A mikroszkópos felvételeken látható, hogy a hyperforin a HDMEC sejtek morfológiáját, intercelluláris adhézióját és motilitását nem változtatta meg.

Irodalmi adatok utalnak a COX-1- és 5-LOX-inhibitorok angiogenezist gátló hatására, így lehetséges, hogy a hyperforin a ciklooxigenáz és a lipoxigenáz gátlásával csökkenti a tumor vaszkularizációját.

Megvizsgáltuk, vajon a hyperforin angiogenezist gátló képessége összefüggésben áll-e a daganatok VEGF-szekréciónak gátlásával. MT-450 emlőkarcinóma-sejteket *in vitro* hyperforinnal inkubáltuk, és mértük a sejtek VEGF-szekréciónak. A hyperforin dóziszfüggő módon gátolta az MT-450 sejtek VEGF-termelését. Elképzelhető, hogy a VEGF szekréciónak csökkenése részben a hyperforin citosztatikus hatásának tulajdonítható. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a hyperforin amellett, hogy közvetlenül gátolja az endotélsejtek osztódását és kapillárisképzését, a daganatok VEGF-szekréciónak csökkentésével közvetve is akadályozza az angiogenezist.

A hyperforin citosztatikus és anti-angiogenetikus hatásával ideális daganatellenes szernek mutatkozik, mely mindenképpen további kutatásokat érdemel. Melanómaellenes hatása is igen biztató, mivel a melanómasejtek apoptózisrezisztenciáját leküzdve képes ezekben a sejtekben is apoptózist indukálni. A hyperforin angiogenezist gátló hatása is előnyös lehet a melanóma kezelésében, bár az eddig kipróbált vaszkularizációt gátló szerek nem voltak hatékonyak a klinikai vizsgálatok szerint. Kiemelném, hogy a hyperforint antidepresszánsként évek óta széles körben használják minimális toxicitással. Legfontosabb mellékhatása, hogy a máj citokróom P-450-rendszerét aktiválja, mely számos gyógyszerrel és citosztatikummal interakciót okozhat. Mivel az orbáncfű Európában, Észak-Amerikában, Ázsiában és Észak-Afrikában nagy mennyiségben megtalálható, a hyperforin előállításának nincsen akadálya.

## KÖVETKEZTETÉSEK

Az a megfigyelésünk, hogy a CD68<sup>+</sup> makrofágok intra- és peritumorális denzitása szignifikánsan magasabb volt a 2 mm-nél vastagabb melanómákban, arra utal, hogy ezen sejteknek tumorprogressziót elősegítő szerepük lehet. Ebből a szempontból különösen érdekes, hogy férfiakban volt kimutatható a legnagyobb makrofáginfiltráció.

Az érett (DC-LAMP<sup>+</sup>) dendritikus sejtek erős infiltrációja kedvező prognózis markerének tűnik a bőr melanómájában.

Csak peritumorálisan és elsősorban a vastag és áttétes daganatok esetében találtunk összefüggést a melanómák mikroérhálózata és az infiltráló sejtek (T-, B-, dendritikus sejt és makrofág) denzitása között. Ezen adatok is arra utalhatnak, hogy melanómában elsősorban peritumorálisan történik neoangiogenezis.

A hyperforin hatékonyan gátolta a melanómasejtek és a humán dermális mikrovaszkuláris endotélsejtek proliferációját, amely megfigyelések további klinikai fejlesztések alapját képezhetik.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Prof. Dr. Tímár Józsefnek, Dr. Ladányi Andreának és Dr. Christoph Schemppnek, hogy PhD-munkám során megfelelő támogatást nyújtottak kutatásaimhoz. Ugyanakkor hálával tartozom Dr. Somlai Beátának, Dr. Gilde Katalinnak, Dr. Fejős Zsuzsannának és Dr. Bánfalvi Teodórának a beteganyaggal kapcsolatos információk rendelkezésemre bocsátásáért valamint onkodermatológiai tapasztalataik átadásáért. Köszönöm Gaudi Istvánnak a statisztikai elemzésben nyújtott segítségét. Az immunhisztokémiai eljárás megtanításában valamint a melanómaminták lemetszésében nagyon sokat segített Rázsóné Tamási Anna, Piurkó Violetta, Gregor Viktória, Parragné Derecskei Katalin és Sinkáné Ibolya. Freiburg munkámban sok támogatást nyújtott Birgit Haarhaus valamint a labor többi dolgozója.

## SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP, Simon JC. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 21:1242–1250, 2002
2. Kiss J, Schempp CM, Kirkin V, Averbeck M, Simon-Haarhaus B, Kremer B, Termeer CC, Sleeman J, Simon JC. Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor. *Planta Med* 71:999–1004, 2005
3. Ladányi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejős Z, Mohos A, Gaudi I, Tímár J. Density of DC-LAMP<sup>+</sup> mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother* 56:1459–1469, 2007
4. Kiss J, Tímár J, Somlai B, Gilde K, Fejős Z, Gaudi I, Ladányi A. Association of microvessel density with infiltrating cells in human cutaneous melanoma. *Pathol Oncol Res* 13: 21–31, 2007