

**A LUTEINIZÁLÓ HORMON-RELEASING HORMON (LH-RH) ANALÓGJAI
HYPOPHYSIS-GONÁD TENGYELYRE ILLETVE TUMORNÖVEKEDÉSRE
KIFEJTETT HATÁSAINAK VIZSGÁLATA**



DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS
KÉSZÍTETTE: DR. KOPPÁN MIKLÓS
PÉCSI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
HUMÁN ANATÓMIA INTÉZETE, PÉCS
PROGRAMVEZETŐ: DR. LÉNÁRD LÁSZLÓ
ALPROGRAMVEZETŐ: DR. SÉTÁLÓ GYÖRGY
TÉMAVEZETŐ: DR. KOVÁCS MAGDOLNA
1998

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	- 3 -
2. LHRH antagonisták alkalmazásának hatása a hypophysis-gonad tengelyre	- 7 -
2.1. Előzmények és célkitűzések	- 7 -
2.2. Anyag és módszer	- 9 -
2.3. Eredmények	- 18 -
2.4. Az eredmények tárgyalása	- 25 -
3. Citotoxikus LHRH analóg hypophysis működésre, illetve LHRH receptort expresszáló karcinóma növekedésére gyakorolt hatása	- 32 -
3.1. Előzmények és célkitűzések	- 32 -
3.2. Anyag és módszer	- 34 -
3.3. Eredmények	- 42 -
3.4. Az eredmények tárgyalása	- 52 -
4. Összefoglalás	- 58 -
5. Új eredmények	- 61 -
6. Köszönetnyilvánítás	- 62 -
7. Hivatkozások	- 63 -
8. Az értekezés témakörében megjelent vagy közlésre elfogadott publikációk jegyzéke	- 69 -
9. Rövidítések jegyzéke	- 71 -

1. Bevezetés

A neuroendokrinológia, mint tudományterület kifejlődésében döntő stimulust jelentett Harris briliáns elmélete a hypophysis elülső lebeny által termelt hormonok szekréciójának hypothalamikus szabályozásáról (1,2). Posztulátuma szerint hypothalamikus neuronok szolgálhatnak bizonyos neurohumorális anyagok termelési helyéül, és ezen anyagok az eminentia medianában a hypophysis portális keringésbe jutva elérhetik a hypophysis elülső lebenyét és szabályozhatják az adenohipophysis hormonelválasztását (1,2). A hypothalamikus hormonok elmúlt évtizedek során történt felfedezése valamint szintetikus analógjaik gyors megjelenése lehetővé tette és teszi számos neuroendokrin folyamat mélyrehatóbb vizsgálatát. Ugyanakkor az egyre hatásosabb analógok által valóra válhat különböző endokrin, reprodukzív illetve daganatos betegségek hatékonyabb kezelése is (3,4).

Az adenohipophysis hormonelválasztását serkentő ún. "releasing" hormonok egyike a luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH), egy decapeptid, melyet először sertés hypothalamusból izoláltak (5,6). Az LHRH-t termelő idegsejtek eminentia medianában található terminálisából az LHRH pulzatilis jelleggel ürül a hypophysis portális keringésbe (7). Ez a pulzáció alapfeltétele a gonadotropinok szekréciójának (8). Az LHRH hatásmechanizmusában a kezdeti lépés a hormon kötődése az adenohipophysis gonadotroph sejteinek LHRH receptoraihoz (9,10). Ez a kötődés az intra- és extracelluláris raktárakból Ca^{++} -ot mobilizál, ezáltal emelve a gonadotroph sejtek Ca^{++} koncentrációját (11,12). A mobilizált Ca^{++} calmodulin fehérjéhez kötődik, utóbbinak jelentős szerepe van a gonadotropin release-ben. A receptorhoz kötődő LHRH egy másik fontos intracelluláris hatása a phospholipase-C enzim aktiválása a sejtmembrán belső felszínéhez kapcsolt G proteinen keresztül. Ennek eredményeként fokozódik a sejten belül a diacylglycerol (DAG) képzése. A mobilizált Ca^{++}

a DAG-al kölcsönhatásban aktiválja a protein kinase C enzimet. A bonyolult biokémiai változások sorozatának végén az aktivált protein kinase C, a Ca^{+} -al aktivált calmodulin fehérjével együtt, felelős a megnövekedett gonadotropin release-ért (13-19).

Az LHRH szerkezetének megállapítása valamint szintetikus úton történő előállítása hamarosan különböző LHRH analógok kifejlesztését célzó törekvéseket indított útjára (20-24).

A klinikai alkalmazás lehetősége több kutatócsoportot is serkentett összesen mintegy 3000 LHRH analóg szintézisére (3,24-27). Az elsődleges cél olyan analógok előállítása volt, melyek:

- 1.) nagyfokú és tartós biológiai aktivitása előnyt jelenthet a klinikai használatban a természetes LHRH-val szemben, 2.) antagonistá hatásuk révén új alapját teremthetik meg a születésszabályozásnak (24). Magát a szintetikus LHRH-t eredményesen használják mint diagnosztikus ágenszt a hypothalamus-hypophysis tengely tesztelésére (3,24,28,29) valamint elterjedten használt ovuláció indukcióra hypothalamikus amenorrhéában szenvedő páciensekben (29). Az LHRH szintetikus analógjainak mindennapi felhasználása a medicinában azonban ennél sokkal szélesebb körű. Számos, a 6-os, 10-es, illetve mindkét pozícióban szubsztituált agonista LHRH analóg jóval aktívabb az eredeti molekulánál és egyben prolongált hatással bír (25-27,29-34). Az agonisták, szuprafiziológiás dózisban, tartósan alkalmazva képesek deszenzitizálni a gonadotroph sejteket LHRH-val szemben, végeredményként csökkentve a szexuál szteroidok szintjét, ezért széles körben használtak különböző kórképek, így pubertas precocx, endometriosis, leiomyoma uteri, benignus prostata hyperplasia kezelésére (3,25,27,29,30). LHRH agonista analógokkal történő tartós kezelés képes hormon dependens rosszindulatú daganatok, így a prosztata, emlő, ovárium és az endometrium egyes karcinómáinak regresszióját előidézni (3,25,29,30,35). Szuperaktív agonisták nagy dózisban adva antifertilitást eredményeznek mind állatokban mind pedig emberben (36-38). Az agonisták további alkalmazási területét jelenti az *in vitro* fertilizáció és embryo transzfer, a gaméta intrafallopian

transzfer és a policisztás ovárium szindróma kezelése (29, 39, 40).

Az agonista analógok mellett hatásos antagonistá LHRH analógokat is sikerült előállítani (41-45). Számos humán vizsgálat bizonyította az LHRH antagonisták klinikai alkalmazhatóságát (46-48). Valószínű, hogy az LHRH antagonisták széles körben elfogadottá válnak olyan kórképek kezelésére, mint pubertas precox vagy endometriosis, illetve fontos terápiás eszközzé válhatnak emlő, ovárium és prosztata karcinómában (25, 30, 35, 49). Az LHRH analógok születésszabályozásban történő alkalmazása azonban a peptidanalógok mindennapos, megbízható és kényelmes alkalmazási módjának hiánya miatt jelenleg nem megoldott. A nazális alkalmazás pontatlan és kényelmetlen, a *per os* alkalmazás pedig hatástalan a peptidek gastrointestinalis lebomlása miatt (29).

Az agonista és antagonistá analógok mellett egy merőben új analóg család született, a citotoxikus LHRH analógoké (25, 50). Ezeknek a hibrid molekuláknak két alapvető alkotórészük van, nevezetesen egy LHRH analóg, amely "szállító" (carrier) funkcióval bír, és egy citotoxikus gyök, amely a tumorelles hatáért felelős. A carrier molekula szerepe a hozzá kapcsolt citotoxikus gyöknek az LHRH receptorokat kifejező daganatsejtekhez való "célzott eljuttatása" (targeting). A targeting-el optimális esetben nagymértékben erősíthető lenne a specifikus antitumor hatás, míg ezzel párhuzamosan jelentősen csökkenne az aspecifikus (általános) toxicitás. Amennyiben a citotoxikus LHRH analógok a további preklinikai és a későbbi klinikai vizsgálatok során bizonyítják alkalmazásukat humán gyógyászati célokra, forradalmian új terápiás lehetőség nyílik az LHRH receptorokkal bíró daganatok, így elsősorban a női és férfi nemzőszervek illetve az emlő egyes daganatainak kezelésére (25, 50).

Az LHRH felfedezése, szerkezetének megállapítása, szintetizálása valamint analógjainak megjelenése nemcsak a gyakorlati medicina fejlődését mozdította elő, hanem ezzel párhuzamosan serkentette azokat az alapkatásokat, melyek hozzájárulnak a reprodukció

fiziológiájának mélyrehatóbb megértéséhez. Munkámat is ezen kettős cél vezérelte: egyrészt vizsgáltam a munkacsoportunk közreműködésével korábban kifejlesztett antagonistá LHRH analógok hatását a hypophysis-gonád rendszerre, különös tekintettel az analógok FSH szekrécióra gyakorolt hatására. Ezen alapkutatás jellegű vizsgálatokkal új adatokat kívántam szolgáztatni az FSH szekréción hypotalamikus szabályozására vonatkozóan. Kísérleteim másik célja egy új citotoxikus LHRH analóg hypophysisre gyakorolt és általános toxikus hatásának, valamint LHRH receptort hordozó daganat növekedésére kifejített gátló hatásának vizsgálata volt. Utóbbi munkámmal az LHRH analógok ezen új csoportjának preklinikai vizsgálataihoz szándékoztam hozzájárulni. Kísérleteimet nagyrészt a Pécsi Orvostudományi Egyetem Humán Anatómia Intézetében, egy kisebb részét pedig az Endocrine, Polypeptide and Cancer Institute, VA Medical Center, Tulane University, School of Medicine-ben (New Orleans, Louisiana, USA) végeztem.

2. LHRH antagonistá analógok alkalmazásának hatása a hypophysis-gonad tengelyre

2.1. Előzmények és célkitűzések

A korai 60-as években McCann és munkatársai illetve Mittler és Meites munkája nyomán ismertté vált hypothalamikus extractumok LH- és FSH-releasing aktivitása, amit Schally és munkatársai is megerősítettek az évtized második felében (51-53). Ezen észleletek alapján verseny indult az elsőségért számos kutatócsoport között az LH- és FSH -releasing factorok izolálásában és szerkezetük feltárásában. Kezdetben általánosan elfogadott volt, hogy az LH és az FSH szekréciónak regulációjáért két külön hypothalamikus factor felelős (53). A sertés hypothalamusból nyert tisztított, toxicitástól mentes LHRH extractumok, majd az LHRH szerkezetének megállapítását követően szintetizált analógok ugyanakkor mind LH, mind pedig FSH felszabadulást eredményeztek különböző állat és humán tesztekben (23, 54-57). Mivel mind a természetes, mind a szintetikus LHRH egyaránt release-elt FSH-t és LH-t, Schally és munkatársai a gonadotropinok szekréciónak felelős egyetlen hypothalamikus releasing hormon létezése mellett foglaltak állást, amely álláspont azóta is széles körben elfogadott (23, 56). Ugyanakkor számos, az LHRH felfedezése óta felhalmozódott kísérleti eredmény féltreérthetetlenül utal az FSH szekréción LHRH-tól mentes komponensének léteire (58-71), míg az LH szekréción szoros LHRH függősége vitán felül bizonyított (72, 73).

Az LH és FSH szekréción eltérő jellege kimutatható mind intakt, mind gonadektomizált állatokban. Az LHRH felszabadulását gátló delta-9-tetrahydrocannabinol normál patkányoknak történő injekciója csökkentette a szérum LH, de nem befolyásolta a szérum FSH koncentrációját (62). Az eminentia medianában található idegterminálisokból LHRH felszabadulást serkentő

endogén galanin elleni passzív immunizáció szignifikánsan csökkentette a proösztroszban megjelenő LH csúcsot patkányban, de hatása nem érintette az FSH csúcsot (63). Ugyanígy, LHRH elleni passzív immunizáció nőstény juhokban a szérum LH koncentráció csökkenéséhez vezetett, míg a szérum FSH koncentráció nem változott (64). Ovariectomizált (OVX) nyulakban anti-LHRH szérum illetve az α -adrenerg receptor blokkoló phentolamin kiirtotta az LH pulzusokat, míg az FSH pulzusok karakterisztikája változatlan maradt (65). Az opiát receptor antagonistá nalozone az eminentia medianaba injektálva az LH szekréció stimulációját eredményezte, ugyanakkor az FSH szekréciót nem fokozta OVX patkányokban (66).

Az FSH-releasing faktor létére utaló fiziológiai adatok között különösen fontosak azok, melyek a faktort tartalmazó idegelemek lokalizációjára engednek következtetni. Elektrokémiai stimulációt illetve léziót alkalmazó kísérletekben az elülső hypothalamikus area (AHA) illetve az AHA-tuberalis pálya kulcsszerepe merült fel az FSH szekréciójának LHRH-tól független kontrolljában (67-70). Ezt erősíti meg az az elegáns *in vivo* kísérletből nyert észlelet, miszerint az AHA-mediobasalis hypothalamus (MBH) komplexnek a preoptikus areától való műtéti szeparációja az LH és FSH ovariális szteroidok által indukált release-ének disszociációját eredményezi (71).

Az utóbbi évtizedben megszületett hatásos LHRH antagonisták alkalmazásával lehetővé vált az endogén LHRH receptor-mediált hatásának felfüggesztése és a gonadotropin szekréció LHRH-tól független komponensének vizsgálata. Kísérleteink során a munkacsoportunk által korábban kifejlesztett LHRH antagonistá analógok alkalmazásával tanulmányoztuk az FSH szekréció LHRH-tól független komponensét. Vizsgáltuk:

(i) egy LHRH antagonistá analóg egyszeri és tartós alkalmazásának hatását a hypophysis gonadotropin-szekréciójára **OVX patkányban**, valamint LHRH antagonistá analógok krónikus alkalmazásának hatását a hypophysis-gonád tengely működésére **intakt patkányokban**,

(ii) a feltételezett FSH-RF jelenlétét **OVX** patkányok eminentia medianájában *in vivo*, LHRH antagonistá kezelés és az eminentia mediana elektrokémiai stimulációjának kombinálásával,

(iii) a feltételezett FSH-RF jelenlétét **OVX** patkányok eminentia medianájában *in vitro*, a hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszerben.

2.2. Anyag és módszer

Kísérleteinket ivarérett nőstény patkányokon (Wistar-R-Amsterdam) végeztük. Az állatok szabályozott megvilágítású (5.00-19.00 óra között fény, 19.00-5.00 óra között sötétség) és hőmérsékletű (25 °C) állatszobákban voltak elhelyezve, élelemhez és vízhez szabadon hozzáfutottak. Az kísérletes munka és az állattartás során követtük az állatkísérletekkel kapcsolatban nemzetközileg elfogadott etikai irányelveket.

2.2.1. Peptidek

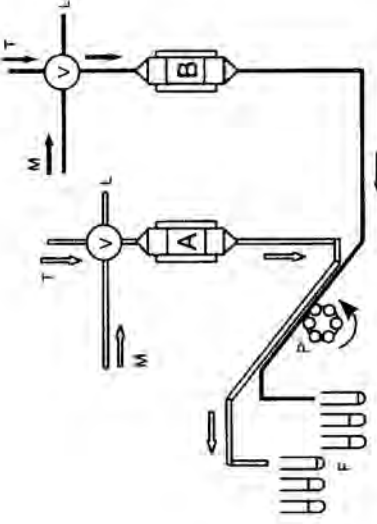
Az LHRH antagonistá analóg (Ac-D-Trp^{1,3}, D-Cpa², D-Lys⁶, D-Ala¹⁰)LHRH (MI-1544) és (Ac-D-Nal¹, D-Phe[pCl²], D-Trp³, D-Cit⁶, D-Ala¹⁰)LHRH (SB-030), valamint az LHRH standard szintetizálása szolid fázisú módszerrel történt (41,42). A peptideket a SOTE Orvosi Kémiai Intézetéből és az Endocrine, Polypeptide and Cancer Institute-ból (Tulane University, New Orleans), kollaborációs partnereinktől kaptuk.

2.2.2. A peptidek LHRH antagonistá aktivitásának in vitro meghatározása

A patkány hypothysis sejt szuperfúziós rendszert (74,75) (1. ábra) használtuk LHRH antagonistá analógjaink LHRH-indukálta gonadotropin release-t gátló aktivitásának tesztelésére.

A szuperfúziós apparátus csatornáiba szabályosan ciklázáló nőstény patkányok hypophysiséből

származó sejteket helyeztünk a következő



módon: az előzetesen eltiavított hypophysiseket apró darabokra vágtuk majd kollagenázzal (I-es típusú, 0.5%) 50 percig emésztettük. A diszpergált sejteket óvatosan összekevertük 1 ml duzzasztott Sephadex G-10-

1. ábra. Patkány hypophysis sejt szuperfúziós rendszer. A diszpergált hypophysys sejteket Sephadex szemcsékkel alkotott keverék formájában helyeztük a két szuperfúziós csatornába (A és B), A médium (M) folyamatos áramlását perisztaltikus pumpa (P) tartja fenn. Tesztanyagok (T) rendszerbe juttatása 4-utas elforgatható billentyűkön (V) keresztül lehetséges. A mintákat frakció kollektor (F) gyűjti. A fehér és fekete nyílak a médium áramlási irányát jelzik.

el. A sejtek és a Sephadex szemcsék keverékét helyeztük a szuperfúziós készülék két csatornájába (A és B). Egyenletes, stabil alapszekréciós értékek nyerése céljából a sejteket egész éjjel perfundáltuk Medium 199-

el. A frakciók gyűjtése a következő nap reggelén kezdődött. A sejteket 3-9 percig terjedő időtartamban perfundáltuk a peptidekkel, különböző koncentrációkat alkalmazva (1, 5, 10 és 100 ng/ml). Az antagonistá peptidok perfúziója az 1 ng/ml koncentrációjú LHRH perfundálását megelőzően vagy azzal egyidőben történt. A frakciókollektor 1 ml/3 perc sebességgel gyűjtötte a mintákat, melyekből az LH és FSH mennyiségét RIA segítségével határoztuk meg.

2.2.3. LHRH antagonistá analóg (MI-1544) gonadotropin release-re kifejített hatásának vizsgálata O VX patkányban

Ezekben a kísérletekben az MI-1544 egyszeri és krónikus, naponta ismételt alkalmazásának hatását vizsgáltuk.

Hüvelykenettel ellenőrzött, három egymást követő alkalommal szabályos ciklust mutató nőstény patkányokat ovariektomizáltunk éter narkózis alatt (n = 30). Az ovariectomia után három

héttel 6-6 patkányból álló 5 kísérleti csoportot alkottunk, melyek az 1. táblázatban látható kezelésben részesültek.

1. táblázat. OVX patkányok LHRH antagonistá analógokkal (MI-1544) történő egyszeri és krónikus kezelésének sémája.

állatok	csoportok	kezelés (s.c.)	időtartam
XVO	1. (n=6)	10 µg MI-1544	egyszeri
	2. (n=6)	100 µg MI-1544	
	3. (n=6)	oldószer	
	4. (n=6)	10 µg MI-1544, 1/nap × 21 nap	21 nap
	5. (n=6)	oldószer, 1/nap × 21 nap	

A peptideket propylen-glycol és fiziológias sóoldat 4:6 arányú keverékében oldottuk. Az egyszeri kezelésben részesülő állatoknál közvetlenül az injekciót megelőzően, majd 2. 6, 12 és 24 órával azt követően, vérmintákat vettünk a v. jugularisból éter narkózis alatt. A tartós kezelésben részesülő állatoktól a kísérlet 1., 8., 15. és 22-ik napján vettünk vért a fent leírt módon.

2.2.4. LHRH antagonistá analógokkal (MI-1544 illetve SB-030) történő krónikus kezelés hypophys-gonád rendszerre kifejtett hatásának vizsgálata intakt patkányokban

Hüvelykenettel ellenőrzött, három egymást követő alkalommal szabályos ciklust mutató nőstény patkányokból 3 kísérleti csoportot alkottunk (n=3×8), melyek a 2. táblázatban látható kezelésben részesültek. A kezelés ösztirusz napján 12.00 órakor kezdődött és **21 napon keresztül** tartott. A peptideket propylen-glycol és fiziológias sóoldat 4:6 arányú keverékében oldottuk fel.

2. táblázat. Intakt patkányok LHRH antagonistá analógokkal (MI-1544 illetve SB-030) történő krónikus kezelésének sémája.

állatok	csoportok	kezelés (s.c.)	időtartam
INTAKT	1. (n=8)	10 µg MI-1544, 1/nap × 21 nap	21 nap
	2. (n=8)	10 µg SB-030, 1/nap × 21 nap	
	3. (n=8)	oldószer, 1/nap × 21 nap	

Az állatok ciklusát naponta vett hüvelykenettel ellenőriztük. A kezelés végén vért vettünk a v. cava inferiorból éter narkózis alatt.

A fenti *in vivo* kísérleteinkből származó vérmintákat centrifugáltuk, majd a szérumokat -20 °C-on tároltuk az LH és FSH valamint a progeszteron (P) és ösztadiol (E_2) koncentrációjának RIA-val történő meghatározásáig. Az utolsó vérvételeket követően a hypophysiseket eltávolítottuk, súlyukat lemértük, Dulbecco PBS-ben homogenizáltuk, centrifugáltuk, majd a szupernatans LH és FSH tartalmát RIA-val meghatároztuk. Az intakt állatok ováriumait és uterusát a kísérlet végén eltávolítottuk majd súlyukat lemértük.

2.2.5. LHRH antagonistá kezelés és az eminentia mediana elektrokémiai stimulációjának kombinálása OVX patkányokban

Hüvelykenettel ellenőrzött, három egymást követő alkalommal szabályos ciklust mutató nőstény patkányokat ovariektomizáltunk éter narkózis alatt (n=34). A következő nap reggelén az állatokat három csoportba osztottuk és vérmintákat vettünk a vena jugularisból narkózis alatt (ketamin, 2mg/kg i. m.). Közvetlenül a vérvétel után az 1. csoport állatait (n=17) 100 µg/0.25 ml LHRH antagonistával (MI-1544) injektóztuk s.c. Oldószerként propylen-glycol és fiziológiás sóoldat 4:6 arányú keveréke szolgált. Az állatokat 1 óra múlva újraaltattuk, majd elektrokémiai stimulációt (ECS) hajtottunk végre az eminentia medianában. Ehhez koncentrikus bipoláris rozsdamentes acél elektródát süllyesztettünk az eminentia medianába sztereotaxikus

készülék segítségével. A stimulációhoz 100 μ A anodális egyenáramot (DC) engedtünk át az elektródán 1 perc időtartamig, több korábbi tanulmányban közöltekhez hasonlóan (67,76). A 2. és 3. csoport kontrollként szolgált. A 2. csoporthoz tartozó patkányokat (n=9) 0.25 ml oldószerrel injektóztuk s.c., amit 1 óra múlva ECS követett a fent leírt módon. A 3. csoport állatain (n=8) állstimulációt végeztünk a lesüllyesztett elektróda aktiválás nélküli eltávolításával (2. táblázat). Az ECS-t illetve állstimulációt követő 10-ik és 60-ik percben további vérmintákat vettünk a v. jugularisból. A kísérlet menetét a 2. táblázat tartalmazza összefoglalóan.

3. táblázat. Az LHRH antagonistia kezelés (MI-1544) és az eminentia mediana elektrokémiai stimulációja (ECS) kombinálásának gonadotropin szekrécióra gyakorolt hatását tanulmányozó kísérlet menete.

		beavatkozások időrendben (→)						
csoport	1. nap	2. nap (kísérlet napja)						
		1 min	60 min	10 min	50 min			
1. (n=17)	OVX	vér- vétel	MI-1544, 100 μ g/ 0.25 ml, s.c.	→	ECS, 100 μ A 1 percig	vér- vétel	→	vér- vétel
2. (n=9)	OVX	vér- vétel	szolvens, 0.25 ml, s.c.	→	ECS, 100 μ A 1 percig	vér- vétel	→	vér- vétel
3. (n=8)	OVX	vér- vétel	∅	→	Állstimu- láció	vér- vétel	→	vér- vétel

Az 1. csoport állatainál az MI-1544-el történt kezelés A 2. és 3. csoport állatai kontrollként szolgáltak. A beavatkozások sorrendjét nyílak jelölik. A beavatkozások közt eltelt időintervallumok hosszát a nyílak fölötti számok jelzik percekben (min).

A vérmintákat centrifugáltuk majd a szérumokat -20 °C-on tároltuk az LH és FSH koncentrációjának RIA-val történő meghatározásáig. Közvetlenül az utolsó vérminta gyűjtése után az állatokat perfundáltuk a felszálló aortán keresztül. Ehhez először PBS-t majd 4%

paraformaldehid oldatot használtunk (pH 6.6-tól 11-ig), Berod és mtsai által közölttel összhangban (77). A perfundálás után a következő napig postfixálást végeztünk. Ezután az agyakat eltávolítottuk és 30 μ m-es frontális metszeteket készítettünk Lancer vibratómon. A metszetek LHRH-immunoreaktív idegi struktúráit a Sternberger-féle peroxidáz-antiperoxidáz módszerrel festettük meg (78). A specifikus antitestek (a-LHRH-16) nyúlból származtak bovine szérum albuminhoz kapcsolt szintetikus LHRH, mint antigénnel történő immunizálás után.

2.2.6. LHRH antagonista analóg (MI-1544) gonadotropin szekrécióra gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro* a hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszerben

A patkány hypophysis sejt szuperfúziós rendszert (74, 75) módosítottuk annak érdekében, hogy *in vitro* kísérleti körülmények között vizsgálhassuk az eminentia medianaba helyezett ECS közvetlen hatását a gonadotropin szekrécióra. A hypothalamus-hypophysis co-perifúziós rendszerben két szuperfúziós csatorna (A és B) szolgált a mediobasalis hypothalamus darabok és a hypophysis sejtek elhelyezésére (2. ábra).

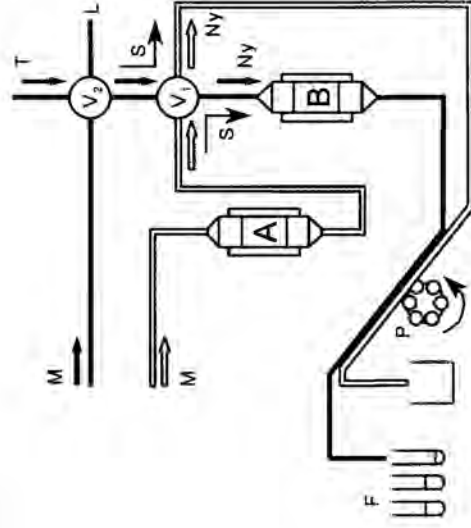
A oszlop: Ivarérett nőstény patkányokat ovariectomizáltunk a kísérlet előtt 24 órával éter narkózis alatt (n=8). A következő nap reggelén dekapitáltuk az állatokat és gyorsan eltávolítottuk az agyakat. Minden egyes agy eltávolítása után azonnal, operációs mikroszkóp alatt, koncentrikus bipoláris rozsdamentes acél elektródát használva, az eminentia medianat elektrokémiaailag stimuláltuk (100 μ A DC, 1 perc időtartam). Stimuláció után a stimulált terület tartalmazó mediobasalis hypothalamusokat (MBH) eltávolítottuk, finom metszéseket ejtve a következő határokkal: rostrálisan: közvetlenül a chiasma opticum mögött; caudalisan: közvetlenül a corpora mamillaria előtt; laterálisan: sulcus hypothalamicus; végül egy körülbelül 1 mm mély horizontális metszéssel szeparáltuk a MBH-t az agy további részétől. A szövetdarabokat 4°C-os Medium 199 szövettenyésztő folyadékban gyűjtöttük, majd az A

oszlopra helyeztük.

B oszlop: A kísérletet megelőző nap délutánján ivarérett nőstény patkányokat dekapitáltunk ($n=6$), és a hypophysiseikből a 2.2.2. pont alatt leírt módon készült sejtpopulációt a B oszlopra helyeztük. Egyenletes, stabil alapszekréció nyerése céljából a sejteket egész éjjel perfundáltuk Medium 199-el. A frakciók gyűjtése a következő nap reggelén kezdődött.

Az A és B oszlop coperifusioja: Az A

oszlop kiáramlási végét a B oszlop beáramlási pólusához kötöttük, és a csatlakozást megszakítottuk egy 4-utas elforgatható szeleppel, mely a folyadékáramlás irányának szabályozására szolgált. A szelep elfordításával az oszlopok párhuzamos vagy soros kapcsolási



2. ábra. A hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszer. A rendszerben két szuperfúziós oszlop (A és B) van összekapcsolva egy 4-utas elforgatható billentyűvel (V_1) megszakított csövön keresztül. Az A oszlop stimulált patkány mediobasalis hypothalamus fragmentumokat tartalmaz. A B oszlop diszpergált patkány hypophysis sejteket tartalmaz. A stimulált hypothalamus darabokat és a hypophysis sejteket Medium 199 (M) perfundálja. Stimulációs periódusok során (S) az A oszlop kimeneti nyílását elhagyó médium a B oszlopba helyezett hypophysis sejteket perfundálja. Különböző tesztanyagok (T) hypophysis sejtekhez juttatása egy második billentyű (V_2) révén lehetséges. Nyugalmi periódusok során (Ny) a médium mindkét oszlopot szeparáltan perfundálja (fehér és fekete nyílak és útvonal). Tesztanyagok a nyugalmi periódusok során kerülnek alkalmazásra. A médium áramlását perisztaltikus pumpa (P) biztosítja. A mintákat frakció kollektor (F) gyűjti. A légtelenítésre fecskendő szolgál (L). A derékszögben megírt nyílak a stimulációs periódusok során fennálló áramlás irányát mutatják.

rendje volt állítható. Párhuzamos beállításnál a rendszeren átáramló médium a két oszlopot egymástól függetlenül perfundálta (nyugalmi periódus). Soros beállításnál az A oszlop kiáramlási végét elhagyó médium, mely előzőleg a stimulált MBH szövetdarabokat perfundálta, átáramolt a B oszlopon és az abba helyezett hypophysis sejteken (stimulációs periódus). Egy második szelep rendszerbe állításával kívülről bevitt peptideknek a hypophysis sejtekhez juttatása

vált lehetővé. Az MBH szövetdaraboknak hypophysis sejtekkel történő első coperifusioja előtt

a médiumot párhuzamosan áramoltattuk át mindkét csatornán. A frakciókat 1ml/10 perc sebességgel gyűjtöttük.

A kísérlet kezdetekor médiumban oldott szintetikus LHRH-t (250 pM) juttatunk a hypophysis sejtekhez 10 percen keresztül, mialatt az **A** oszlopot elhagyó médium elkerülte a **B** oszlopot (párhuzamos kapcsolás, nyugalmi periódus). A kezdeti, exogén LHRH-ra kapott LH és FSH válaszokat használtuk referencia értékként, amihez a későbbi LH és FSH válaszokat viszonyítottuk. Másfél órával később stimulációs és nyugalmi periódusok alternáló sorozatát kezdtük a következő rendben: stimulációs periódus 20 percig; nyugalmi periódus 30 percig. Az első stimulációs periódust követően LHRH antagonistá analógot (MI-1544, 100 nM) juttatunk a **B** oszlopra (hypophysis sejtek). Az antagonistá analóg alkalmazását további stimulációs periódusok követték. Végezetül, 170 perccel az MI-1544 adását követően, ismét szintetikus LHRH-val (250 pM, 10 percig) perfundáltuk a hypophysis sejteket. A gyűjtött frakciókat -20°C -on tároltuk az LH és FSH koncentrációjának RIA-val történő meghatározásáig.

2.2.7. Radioimmunoassay

NIAMD RIA kit-eket használtunk az LH és FSH meghatározásához (LH-S-9 és FSH-I-2 antitest, LH-RP-2 és FSH-RP-2 referencia preparátum, LH-1-6 és FSH-20 hormon jódozáshoz). A szérum progeszteron és az ösztadiol koncentrációjának meghatározása - éteres extrakciót követően - triciált hormonnal (NEN, 4-5 TBq/mmol), RE-37 és RP-126 antitestekkel, Calbiochem kromatográfiás standarddal és DCC szeparációval történt (79).

2.2.8. Statisztikai analízis

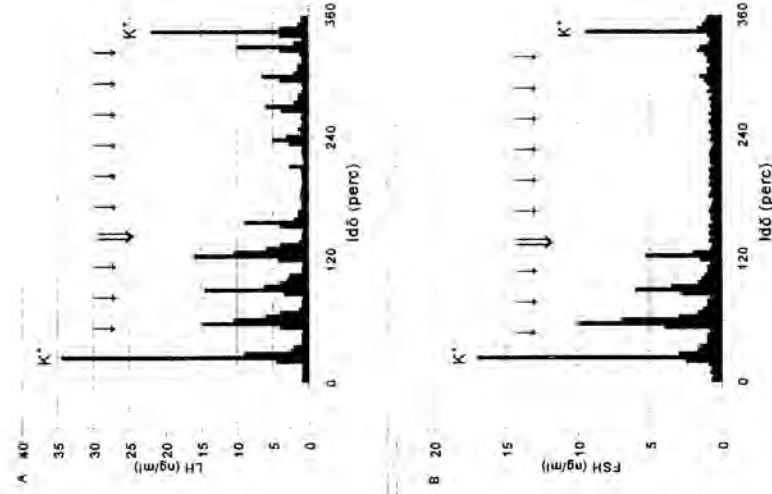
Az *in vivo* kísérleti eredmények analíziséhez ANOVA-t használtunk és az eredményeket átlag \pm SEM formában adtuk meg. Amikor a *p* érték 0.05-nél kisebb volt, analízisünket a

Duncan teszttel egészítettük ki. Az *in vitro* kísérleti eredményeket egy speciális computer programmal értékeltük (75). Segítségével kiszámoltuk a szekretált hormonok superfüziós illetve co-perifúziós görbék alatti net integrál mennyiségét. A hypothalamus-hypophysys coperifúziós rendszerben kapott net integrál LH és FSH válaszokat az első, szintetikus LHRH-ra adott válaszokhoz viszonyítottuk (referencia válasz), és a referencia válasz %-ában fejeztük ki. A coperifúziós kísérleteket háromszor végeztük el és az eredményeket az átlag \pm SEM formában adtuk meg.

2.3. Eredmények

2.3.1. Az LHRH antagonistista analóg MI-1544 és SB-030 hatása az LH és FSH szekrécióra in vitro a patkány hypophysis sejt szuperfúziós rendszerben

Antagonista analógjaink kivédtek mindkét gonadotropinnak a szintetikus LHRH által indukált release-ét. Ugyanakkor különbséget találtunk az LH és az FSH release-ét gátló hatás tartósságában. Az LHRH-indukálta FSH release-t több, mint 3 órára, míg az LH release-t kevesebb, mint 1 órára tudtuk blokkolni 100 ng/ml koncentrációnál mindkét antagonistista esetében (3. ábra). Az antagonisták hatásos koncentrációja függött az alkalmazás LHRH adásához viszonyított idejétől. Amikor az antagonistákat az LHRH-val egyidőben juttattuk a rendszerbe, 10-20-szor nagyobb koncentráció volt szükséges ugyanakkora inhibíció eléréséhez, mint amikor előinkubáltuk a sejteket az antagonistista peptidekkel. Egyidejű adásnál az MI-1544-es analóg 100%-os gátlást okozó



3. ábra. Az MI-1544 jelű LHRH antagonistista alkalmazásának hatása az LH (A) és az FSH (B) release-re patkány hypophysis-sejt szuperfúziós rendszerben. A tesztanyagokkal 3 perces impulzusok formájában perfundáltuk a sejteket. A kísérlet elején és végén K⁺-ot alkalmaztunk (2 mg/ml) a kibocsátható LH és FSH mennyiségének meghatározása céljából (K⁺). A rövid nyílak LHRH (1 ng/ml), a kettős nyíl MI-1544 (100 ng/ml) és LHRH (1 ng/ml) együttes adását jelzi.

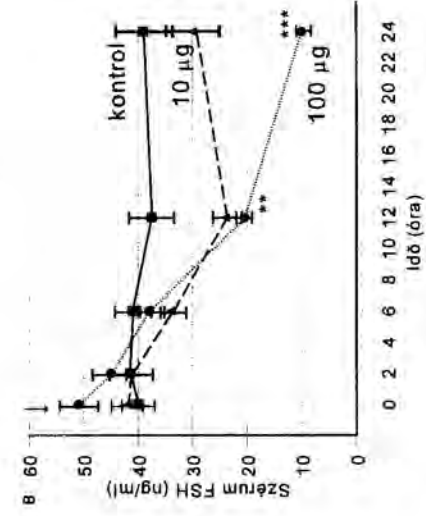
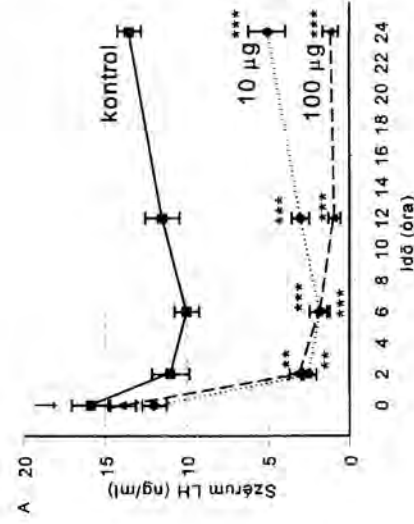
dózis (ED₁₀₀) 20 ng/ml, az SB-030-jelű antagonististáé 50 ng/ml volt. Ugyanez az érték 1 ng/ml (MI-1544) illetve 5 ng/ml (SB-030) volt abban az esetben, amikor az antagonisták rendszerbe juttatása megelőzte az LHRH-ét. Az analógok és szintetikus LHRH moláris aránya 20:1 (MI-

1544) illetve 50:1 (SB-030) volt az előbbi, míg 1:1 (MI-1544) illetve 5:1 (SB-030) volt az utóbbi alkalmazási mód esetén.

2.3.2. LHRH antagonisták történéző kezelés hatása OVX patkányok gonadotropin szekréciójára

2.3.2.1. Egyszeri kezelés hatása a szérumban LH és FSH koncentrációira

10 µg MI-1544 szignifikánsan csökkentette a szérumban LH koncentrációt a kontrollhoz viszonyítva. Az injekció után 2 órával 78% csökkenést ($p < 0.01$), 6 órával 86% csökkenést ($p < 0.001$) és 24 órával is még 64%-os csökkenést ($p < 0.001$) észleltünk. Ugyanez az antagonistista 100 µg-os dózisban adva 94%-kal

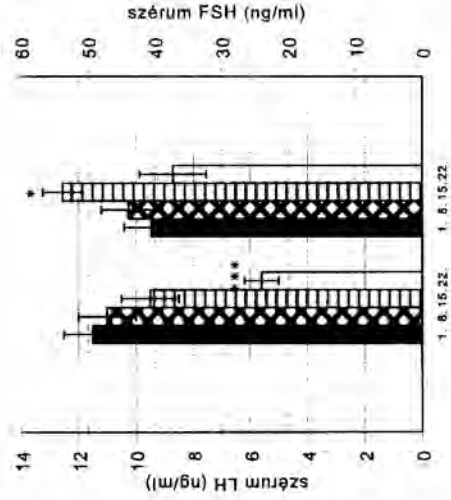


csökkentette a szérumban LH koncentrációt az injekció után 2 órával, és ezen a jelentősen csökkent szinten tartotta több, mint 24 órára (4A ábra). Ugyanakkor a szérumban FSH koncentráció nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest egyetlen mérési időpontban sem 10 µg MI-1544 injekcióját követően, és 43%-kal ($p < 0.01$) illetve 76%-kal ($p < 0.001$) csökkent 12 illetve 24 órával a 100 µg-os dózis injekcióját követően (4B ábra).

4. ábra. 10 µg illetve 100 µg MI-1544 egyszeri injekciójának (nyíl) hatása a szérumban LH (A) illetve FSH (B) koncentrációra ovariektomizált patkányokban (n=3×6). A kontroll állatok az analóg oldószert kapták. Az adatpontok az átlag ± S.E.M.-t reprezentálják. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. kontroll.

2.3.2.2. Krónikus kezelés hatása a szérumban és hypophysis gonadotropin koncentrációra

A napi 10 µg dózisban, 21 napon keresztül adott MI-1544 fokozatosan csökkentette a szérumban LH koncentrációt OVX patkányokban. A kezelés végére 50%-os ($p < 0.001$) csökkenést eredményezett a kiindulási illetve a kontroll szinthez viszonyítva. Ezzel szemben, a szérumban FSH koncentrációban fokozatos



5. ábra. Szérumban LH és FSH koncentráció ovariectomizált patkányokban 21 napon keresztül alkalmazott, 10 µg dózisu LHRH antagonistával (MI-1544) történt kezelés során. Az 1., 8., 15. és 22. napon vett vérmintákból meghatározott értékeket az átlag ± S.E.M. formában adjuk meg. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. kiindulási érték.

képest 21%-kal ($p < 0.05$) emelkedett a harmadik hét végére, míg a hypophysis FSH koncentráció nem változott.

2.3.3. LHRH antagonisták tartós alkalmazásának hatása a hypophysis-gonád rendszerre intakt patkányban

2.3.3.1. Szérumban és hypophysis gonadotropin szintek

A három hetes kezelés végére mindkét antagonistának (napi 10 µg MI-1544 illetve SB-030) a meghatározhatósági határ (0.10 ng/ml) alá csökkentette a szérumban LH koncentrációt. Ezzel párhuzamosan mindkét analoggal történő kezelés szignifikánsan emelte a hypophysis LH koncentrációt: 31%-os ($p < 0.001$) növekedést észleltünk az MI-1544-el, míg 41%-os ($p < 0.001$) emelkedést mértünk az SB-030-al kezelt csoportban. A szérumban FSH koncentráció nem változott szignifikánsan a kontrollhoz képest, míg a hypophysis FSH koncentrációja 38%-

kal ($p < 0.001$) illetve 27%-kal ($p < 0.001$) csökkent az MI-1544-el illetve SB-030-al kezelt csoportokban.

2.3.3.2. Szérum E_2 és P koncentráció

Mindkét analóggal kezelt csoportban jelentősen csökkent a szérum progeszteron koncentráció a kontrollhoz viszonyítva: az MI-1544-el kezelt csoportban 61%-os ($p < 0.001$), az SB-030-al kezelt csoportban 64%-os ($p < 0.01$) csökkenést mértünk. Ugyanakkor a szérum ösztadiol koncentráció nem mutatott szignifikáns változást a kísérlet végére egyik kezelt csoportban sem.

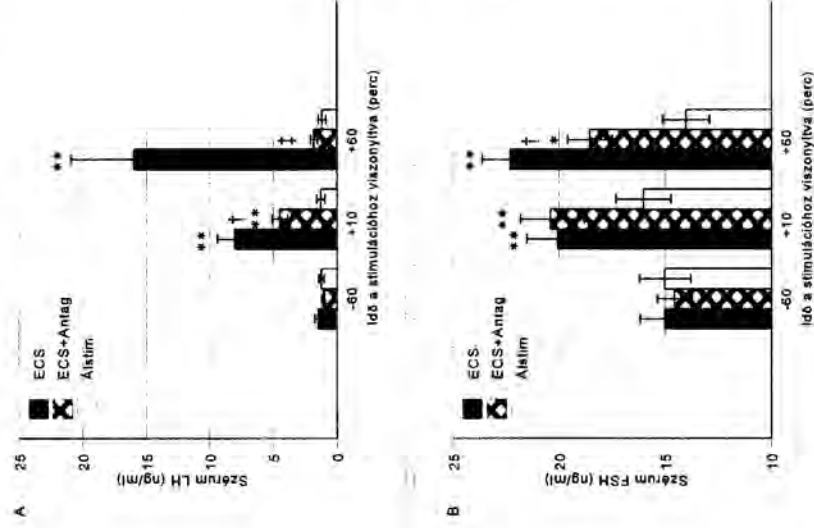
2.3.3.3. Ovarialis ciklus és szervsúlyok

A szabályos ovarialis ciklus mindkét antagonistá analóggal történő kezelés alatt megszakadt. Az első 4-6 napon diösztrusz I-II, majd folyamatos ösztrusz jeleit tapasztaltuk naponta vett hüvelykenetben. Proösztruszt egyetlen esetben sem találtunk a kezelt csoportokban. Az ovárium súlyok 42%-kal ($p < 0.001$) csökkentek az MI-1544-el, illetve 46%-kal ($p < 0.001$) csökkentek az SB-030-al való kezelés során a kontrollhoz viszonyítva. Az uterus súlyok kismértékben emelkedtek (22%, $p < 0.05$) MI-1544-el folytatott, illetve nem változtak SB-030-al való kezelés során. A hypophysis súlyok szintén nem változtak a kezelés alatt a kontrollhoz viszonyítva.

2.3.4. Az MI-1544 LHRH antagonistista analóg hatása az eminentia mediana elektrokémiai stimulációja által indukált gonadotropin release-re **OVX patkányban**

2.3.4.1. Szérum LH és FSH koncentráció

Az eminentia mediana elektrokémiai stimulációja után 10 perccel a szérum LH koncentráció 4.6-szeres ($p < 0.01$), 60 perccel a stimuláció után pedig 10.2-szeres ($p < 0.01$) emelkedését mértük az álstimulált kontrollokhoz viszonyítva. 100 μg MI-1544 egyszeri, a



stimulációt 60 perccel megelőző injekciója 44%-kal ($p < 0.05$) illetve 89%-kal ($p < 0.01$) csökkentette az ECS LH-release-t indukáló hatását a stimuláció utáni 10-ik illetve 60-ik percre, az oldószer-kezelt és stimulált kontrollokhoz viszonyítva. Az álstimuláció nem okozott szignifikáns változást a szérum LH koncentrációban (6A ábra).

Az eminentia mediana elektrokémiai stimulációja 1.35-szoros ($p < 0.01$) illetve 1.50-szoros ($p < 0.01$) szérum FSH szint emelkedést idézett elő 10 illetve 60 perccel az ECS után az

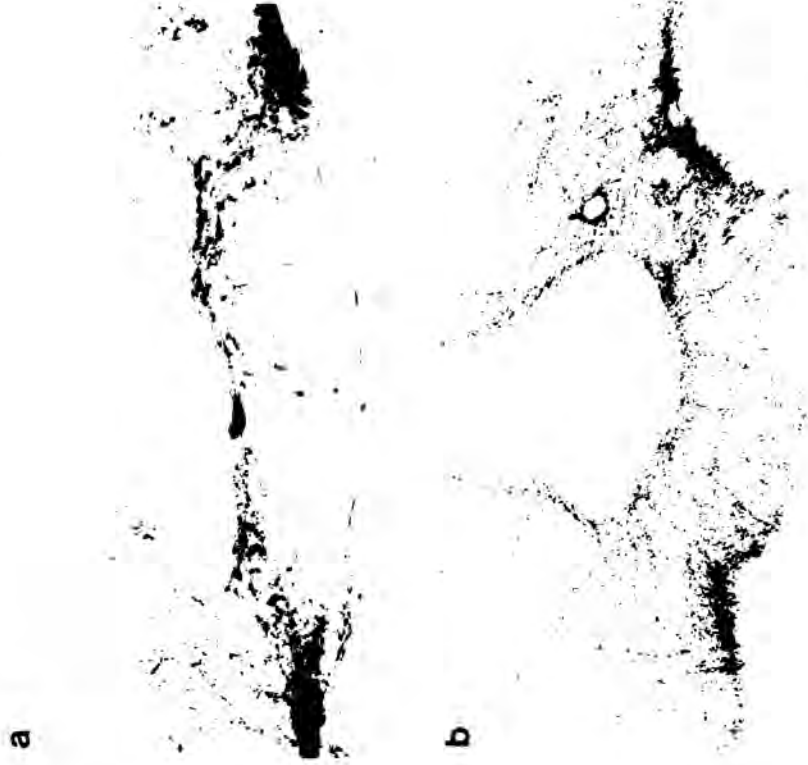
6. ábra. Az eminentia mediana elektrokémiai stimulációja és LHRH antagonistista kezelés kombinációjának hatása a szérum LH (A) és FSH (B) koncentrációra ovariectomizált patkányokban. A stimuláció során 100 μA egyenáramot alkalmaztunk 1 percen keresztül koncentrikus bipoláris elektróda használatával. 1 órával a stimuláció előtt a patkányok 100 μg LHRH antagonistát (MI-1544) kaptak s.c. (ECS+Antag; $n=17$). A kontroll állatokat a stimuláció előtt oldószerrel kezeltük (ECS; $n=9$) illetve álstimulációnak vetettük alá (Álstim; $n=8$). Az oszlopok az átlag \pm S.E.M.-t jelzik. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. álstimulált kontroll; † $p < 0.05$, ‡ $p < 0.01$ vs. oldószer-kezelt és stimulált kontroll.

álstimulált kontrollokhoz viszonyítva. Az ECS-t megelőző, 100 μg MI-1544-el történt kezelés nem csökkentette a szérum FSH koncentráció ECS-indukálta emelkedését a stimulációt követő 10-ik percre, illetve 17%-kal ($p < 0.05$) csökkentette azt a 60-ik percre, az oldószer-kezelt és

stimulált kontrollokhoz képest. Az álstimuláció nem idézett elő szignifikáns változást a szérum FSH koncentrációban (6B ábra).

2.3.4.2. LHRH-immunhisztológia

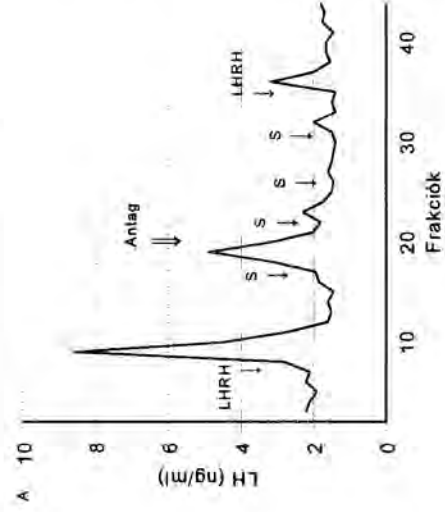
Az ECS-val kezelt állatok agyából származó, LHRH-immunfestésnek alávetett frontális metszetekben nem találtunk LHRH-immunpozitivitást az eminentia mediana stimulált területében, de a stimulált régiótól laterálisan LHRH-immunpozitív idegrostok voltak láthatók. Az álstimulált kontroll állatokból származó metszetekben gazdag LHRH-immunpozitív idegrost-hálózat volt megfigyelhető az eminentia mediana teljes kiterjedésében (7. ábra).



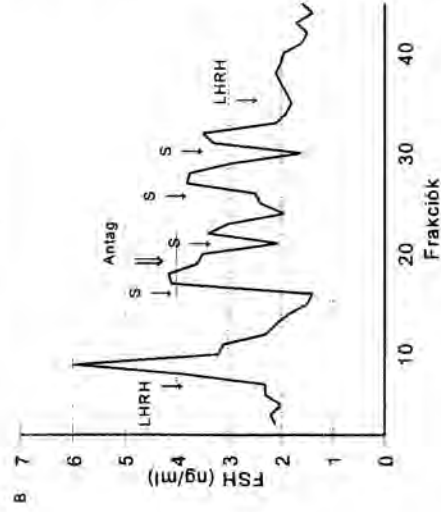
7. ábra. Az eminentia mediana területében elektrokémiailag stimulált (a) illetve álstimulált kontroll (b) patkányok hypothalamusából készült frontális metszet, LHRH-immunfestést követően. Az ECS területében eltűnt az LHRH-immunpozitivitás, ugyanakkor a stimulációtól laterálisan LHRH-immunpozitív idegrostok láthatók (a). A kontroll metszet eminentia medianájában gazdag LHRH-immunpozitív idegrost hálózat figyelhető meg (b).

2.3.5. Gonadotropin release a hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszerben *in vitro*

Az eminentia mediana területében elektrokémiailag stimulált patkány mediobasalis hypothalamusokkal (MBH, A oszlop), illetve patkány hypophysis sejtekkel (B oszlop) folytattunk kísérletet a coperifúziós rendszerben. Coperifúzió során az A oszlopot elhagyó médiummal perfundáltuk a B oszlopra helyezett hypophysis sejteket (stimulációs periódus).



A hypophysis sejteknek a kísérlet kezdetekor 250 pM LHRH-val 10 percig történt perfúziója 27.3 ± 5.12 ng net integrált LH release-t eredményezett (referencia válasz). Minden ezt



követő szignifikáns LH választ a referencia válasz százalékában fejeztünk ki. A hypophysis sejteknek az A oszlopot elhagyó médiummal történt első perfundálása (első stimulációs periódus) 22.1 ± 5.02% LH release-t váltott ki.

Az MI-1544 LHRH antagonistista (100 nM) alkalmazása után egyetlen további stimulációs periódus alkalmával sem tudunk szignifikáns LH választ detektálni. A szintetikus LHRH (250 pM) másodszori adásakor 18.7 ± 5.31% LH választ kaptunk.

8. ábra. Diszpergált hypophysis sejtek LH (A) és FSH (B) kibocsátása a dinamikus hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszerben. A rövid nyílak a hypophysis sejteknek 250 pM LHRH-val való 10 perces (LHRH) vagy az elektrokémiailag stimulált eminentia medianaról lefolyó médiummal történő 20 perces (S) perfúzióját jelzik. A kettős nyíl az MI-1544 jelű LHRH antagonistista (Antag) 100 nM-jának 20 percen keresztül történő alkalmazását jelzi. A frakciókat 10 percenként gyűjtöttük.

alkalmazása után egyetlen további stimulációs periódus alkalmával sem tudunk szignifikáns LH választ detektálni. A szintetikus LHRH (250 pM) másodszori adásakor 18.7 ± 5.31% LH választ kaptunk. A kísérlet elején 250 pM LHRH-nak a B oszlopon 10 percig történő átaramoltatása 20.2 ± 8.30

ng net integrált FSH release-t eredményezett (referencia válasz). Minden ezt követő szignifikáns FSH csúcsot szintén a referencia válasz százalékában fejeztünk ki. A hypophysis sejteknek az A oszlopot elhagyó médiummal történt első perfundálása (első stimulációs periódus) $67.8 \pm 5.5\%$ FSH release-t indukált. Az MI-1544 LHRH antagonistá (100 nM) alkalmazása után a három további stimulációs periódus alatt $30.6 \pm 11.9\%$, $40.7 \pm 4.4\%$ és $21.1 \pm 0.5\%$ FSH release-t észleltünk. A szintetikus LHRH (250 pM) másodszori adása nem eredményezett szignifikáns FSH-választ.

2.4. Az eredmények tárgyalása

Noha az LH és az FSH szekréciójának szabályozásában ugyanazon faktorok (LHRH, ösztradiol, stb.) játszanak szerepet, számos esetben a két gonadotropin elválasztásának egymástól független és eltérő karakterisztikája tapasztalható. Kísérleteinkkel tanulmányozni kívántuk a hypophysis LH és FSH szekrécióját rövid és hosszú ideig tartó endogén LHRH-mentes környezetben, figyelmet fordítva a gonadális befolyás megléte vagy hiánya közti esetleges különbségre is (intakt és OVX állatok). Célunk volt annak vizsgálata is, hogy az eminentia mediana tartalmaz-e olyan, az LHRH-tól eltérő faktort (FSH-RF?), amelyik képes szelektív FSH release-t indukálni mind *in vivo*, mind pedig *in vitro* körülmények között. A megvalósításhoz LHRH antagonistá analógokkal végeztünk egyszeri és tartós kezelést ovariektomizált illetve intakt állatokban, valamint LHRH antagonistá analóggal történő kezelést kombináltunk az eminentia mediana elektrokémiai stimulációjával ovariektomizált állatokban *in vivo*, és az általunk tervezett hypothalamus-hypophysis coperifusios rendszerben *in vitro*.

A patkány hypophysis sejt szuperfúziós rendszerben végzett kísérleteink eredménye

világosan mutatja, hogy az általunk használt LHRH antagonisták hatásosan blokkolják az LHRH-nak mind az LH, mind az FSH release-ét kiváltó hatását. Mivel ebben a rendszerben kizárólag az LHRH illetve az LHRH antagonisták van jelen, és az FSH release-ét *in vivo* stimuláló egyéb ovariális és hypothalamikus hormonok hatása nem érvényesül, az LHRH gyengébb FSH-release-t kiváltó hatását erőteljesebben és tartósabban lehatárolt LHRH antagonistával gátolni, mint az LH-release-t kiváltó hatását (61, 69, 80). Észleletünk, miszerint az LHRH antagonisták *in vitro* gátló aktivitása nagyban függ az alkalmazás módjától (előinkubálás nélküli vagy előinkubálást követő adása LHRH-val együtt) összhangban van korábbi adatokkal (42, 81, 82), és az analógok jóval nagyobb asszociációs mint disszociációs készségével magyarázható (83).

Az LHRH antagonisták MI-1544 egyszeri injekciója OVX patkányoknak az emelkedett szérums LH koncentráció azonnali és jelentős csökkenését eredményezte, míg a szérums FSH koncentráció nem változott az injekció követő első hat órában. A tartós kezelés végén mért szérums és hypophysis LH és FSH koncentrációk is eltérően változtak az endogén LHRH hatásától mentes időszakban. A szérums LH koncentráció csökkent, ugyanakkor a szérums FSH koncentráció nem változott vagy enyhén emelkedett. Ezzel párhuzamosan, a hypophysis LH tartama nőtt (feltehetőleg a csökkent release miatt), de az FSH koncentrációja nem változott (valószínűleg a változatlanul fennmaradt release miatt). Figyelemre méltó, hogy a szérums LH koncentráció nagymértékben csökkentnek találtak az antagonisták egyszeri injekcióját követő 24-ik órában is (egyszeri kezelés OVX patkányokban), de ugyanebben a dózisban, három héten keresztül naponta adva, (tartós kezelés OVX patkányokban) csak a 22-ik napra kaptunk szignifikáns LH-koncentráció csökkenést. Valószínű, hogy a tartós kezelés kapcsán csak az első (néhány) injekció eredményezett nagyfokú gátlást az LH release-ben, a további injekciók kisebb mértékű gátlást okozhattak. Az észlelet háttéréül szolgáló pontos mechanizmus nem ismert, de

lehetséges, hogy az antagonistával szembeni ismételt expozíció az LHRH receptorok "up-regulációjához" vezet. Ez az "up-reguláció" a hypophysis fokozatosan növekvő LH-koncentrációjával együtt vezethet a csökkent gátló hatáshoz. Korábbi tanulmányból is ismert, hogy az MI-1544-es antagonistá antiovlációs hatású már egyszeri 1.5 µg dózisban, de krónikus kísérletben az effektív antiovlációs dózis 5 µg-nak bizonyult (41,84). Ez a magyarázat összhangban áll azon korábbi adattal, miszerint a hypophysis LHRH antagonistákkal szembeni elnyújtott expozíciója nem okozza az LH release-mechanizmus "down-regulációját" (83,85). Az LH koncentráció későbbi jelentős csökkenése valószínűleg a fokozatosan lecsökkent LH szintézis eredménye (endogén LHRH-hatás hiányában). Mivel az ovariectomia mindkét gonadotropin szérum koncentrációjának jelentős emelkedéséhez vezetett, ugyanakor LHRH antagonistával csak az LH release-ét tudtuk gátolni, az FSH-ét nem (illetve csak 70-szeres antiovlációs dózisban, 12 és 24 óránál), olyan, az LHRH-tól eltérő hormon(ok) létezését kell feltételeznünk, mely(ek)en keresztül az ovarialis hormonok FSH-release-re gyakorolt negatív feed-back mechanizmusa - legalábbis részben - megvalósul.

Intakt ovariumokkal rendelkező állatokban, tartós LHRH antagonista kezelést követően, a hypophysis FSH koncentrációjának csökkenését találtuk a szérum FSH koncentrációk változása nélkül. A szérum és hypophysis LH koncentrációk az OVX állatokban nyert eredményekkel egyezően alakultak: a szérumban az LH koncentráció csökkenését, míg a hypophysisben az emelkedését tapasztaltuk. Az LHRH hiánya egyes ovarialis hormonok (inhibin, follistatin) egyidejű jelenlétével elsősorban az FSH szintézisére és nem a release-ére gyakorolt gátló hatást (86,87). Ezen adatok alapján valószínűsíthető, hogy az ovarialis hormonoknak, az LHRH-tól eltérő hormonokon keresztül, elsősorban az FSH szintézisére van negatív visszacsatoló hatásuk.

Mindkét LHRH antagonista analóg eltérő hatást gyakorolt a szérum P és E₂

koncentrációkra: a szérumban P egyharmadára csökkent, míg a szérumban E₂ nem változott szignifikánsan. Ez összhangban van azzal a korábbi észlelettel, miszerint MI-1544-el történő tartós kezelés intakt nőstény állatokban polifolikuláris ováriumok megjelenését eredményezi corpus luteumok nélkül, perzisztens E₂ release-zel és folyamatos ösztrogén ciklusfázissal (84). A kísérletünkben mért változatlan vagy enyhén emelkedett uterus súlyok a változatlan E₂ koncentrációt reprezentálják.

Fentiek összhangban vannak Hall és munkatársai eredményével, akik nem találtak változást a plazma immunoreaktív FSH koncentrációban egészséges nőknél 50-500 µg LHRH antagonistákkal egyszeri injekcióját követően, míg az LH pulzusok frekvenciája és amplitúdója dóziszfüggő módon csökkent (88). Sharpe és munkatársai a szérumban FSH és E₂ koncentrációk emelkedését észlelték a szérumban P koncentráció párhuzamos csökkenésével, LHRH antagonistákkal tartós alkalmazása során patkányban (89).

Az LHRH antagonisták analóg alkalmazását és az eminentia mediana elektrokémiai stimulációját kombináló *in vivo* kísérletünkben, várakozásunknak megfelelően, egy jelentős LH illetve egy mérsékelt, de szignifikáns FSH release-t váltottunk ki ECS-sel. Az antagonistának a stimulációt 60 perccel megelőző injekciója teljesen kivédte az ECS-indukált LH-release-t az ECS utáni 60-ik percre, jelezve, hogy az LH-release-t kizárólag az LHRH indukálta. Ezzel ellenkezőleg, az ECS-indukált FSH release-t csak kismértékben csökkentette az előzetes kezelés MI-1544-el, ami az FSH release LHRH-tól független komponensének szerepére utal. Mivel az LH és FSH szekréciója ugyanazon gonadotroph sejtek által történik, meglehetősen valószínű, hogy az ECS eredményeként kapott FSH release antagonistával nem blokkolható komponense az ECS által portális keringésbe juttatott aspecifikus ágensek eredménye lenne. Amennyiben ilyen aspecifikus ágensek okoznák az FSH release LHRH antagonistával nem blokkolható komponensét, az LH release-nek egy ugyanilyen, LHRH antagonistával nem

blokkolható összetevőjét is detektálnunk kellett volna. Ezen eredményeink összhangban vannak korábbi léziós és stimulációs kísérletek eredményeivel (67,70,71). Hasonlóan az előzőekben tárgyalt, OVX patkányokon végzett kísérleteinkhez, a gonádok előzetes eltávolítása miatt az ovarialis inhibin és aktivin ebben a kísérletben sem befolyásolhatta a hypophysis FSH szekrécióját.

Az OVX állatokon kapott eredményeink összhangban vannak más, szintén gonadektomizált állatokon végzett kísérletek eredményeivel is (65,70,90-93). OVX nyulakban például, egy LHRH ellenes szérum illetve az α adrenerg receptor-blokkoló phentolamin gátolta a pulzatis LH szekréciót de nem befolyásolta az FSH pulzusokat (65). A dorzális elülső hypothalamus kétoldali roncsolása szignifikánsan csökkentette az FSH pulzusok frekvenciáját és amplitúdóját de nem változtatta meg az LH pulzusokat OVX patkányokban (70). A corticotropin releasing factor, ami gátolja az LHRH felszabadulását az eminentia medianában, nem csökkentette a szérum FSH koncentrációt OVX patkányok eminentia medianájába injektálva (90).

Ellentétben a szérum LH koncentráció ECS utáni 60-ik percben kapott értékével, a stimuláció utáni 10-ik percben csak részleges LH release-gátlást mértünk. Ugyanebben az időpontban az antagonistának nem volt hatása a szérum FSH koncentrációra. Az MI-1544 részleges hatása az LH release-re az ECS utáni első mérési időpontnál az antagonistá inekciója után eltelt, viszonylag rövid idővel magyarázható (70 perc az analóg inekciója után), amely idő feltehetőleg nem elég a tökéletes felszívódáshoz és a teljes hatás kifejtéséhez. Mint az az előzőekben tárgyalt eredményeinkből látszik (OVX patkányok LHRH antagonistával történő egyszeri kezelése), 100 μ g MI-1544 teljes gátló effektust mutat 120 perccel az inekciója után, de nincsen adatunk a gátlás mértékéről az inekciót követő 70-ik percben. Mindazonáltal az kizárható, hogy az MI-1544 inekciója teljesen hatástalan az endogén LHRH-indukálta FSH

release-re, mialatt az LH release 44 %-os gátlását eredményezi. Valójában az antagonistának az LHRH-indukálta FSH release-re gyakorolt gátló hatása erőteljesebb és tartósabb, mint az LHRH-indukálta LH release-re kifejtett gátlása, ahogy ezt a szuperfúziós kísérletünk eredménye demonstrálja.

A hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszerben *in vitro*, mind a szintetikus LHRH-val, mind a stimulált MBH-kat elhagyó médium hypophysis-sejtekre irányításával LH és FSH release-t tudtunk kiváltani. Az első *in vitro* kísérletünk és korábbi tanulmányok eredményeivel összhangban az LHRH hatására nagyobb LH, mint FSH release-t kaptunk (61, 69, 80). A szuperfúziós rendszerben az LHRH-indukálta FSH release-t több, mint 3 órára, míg az LH release-t kevesebb, mint 1 órára tudtuk blokkolni 100 nM MI-1544-el. Ennek ellenére a coperifúziós rendszerünkben ugyanez az antagonista, ugyanebben a dózisban (100 nM) a stimulált eminentia medianából kiáramló endogén faktoroknak csak az LH, de nem az FSH release-ét kiváltó hatását tudta kivédeni, az FSH-ét nem. A különbség magyarázatát a coperifúziós rendszerben jelen lévő, nem LHRH receptorokon keresztül ható hypothalamikus faktor(ok) (FSH-RF?) szelektív FSH release-t indukáló hatása adja. Ugyanakkor az MI-1544 rendszerbe juttatása utáni három stimulációs periódus alatt csökkenést tapasztaltunk a kiváltott FSH válaszok nagyságában, feltehetően az FSH release LHRH-indukálta komponensének kiiktatása miatt. A kísérlet végén adott szintetikus LHRH-ra csökkent, de szignifikáns LH választ kaptunk, ugyanakkor nem kaptunk szignifikáns FSH release-t. Ez ismét tükrözi az MI-1544-nek LHRH-indukálta FSH release-re gyakorolt tartósabb gátló hatását az LH release-re kifejtetthez képest, egyben jelzi, hogy a megelőző három FSH választ olyan periódusban nyertük, amikor a hypophysis LHRH receptorait MI-1544-el sikeresen blokkoltuk az FSH release LHRH-indukálta komponensének eliminálása céljából.

Az ECS-val indukált LH és FSH release antagonista kezelésre történő eltérő változását

látszólag magyarázhatnánk azzal, hogy a szekréciónban tapasztalt különbséget nem az eltérő releasing faktorok befolyása, hanem a két gonadotropin szekréciónak időbeni lefutásában, illetve a két gonadotropin fél-életidejében tapasztalt különbség okozza (67, 94). Ez ellen két fontos tény szól. Az első az, hogy következtetéseink levonásakor nem az kezdeti FSH értékeket hasonlítottuk a stimuláció utáni értékekhez, hanem az antagonistával kezelt állatokban, különböző időpontokban kapott hormon koncentrációkat hasonlítottuk az antagonistával nem kezelt illetve álstimulált állatokban ugyanazon időpontokban mért koncentrációkhoz. Mivel az antagonistával kezelt illetve nem kezelt állatokban az LH és FSH szekréciónak karakterisztikája illetve fél-életidejük azonosnak feltételezhető, az ebből fakadó különbség nem járulhatott hozzá a két gonadotropin ECS-val indukált eltérő release-éhez antagonistista kezelést követően. A második ellenérv pedig a coperifúziós rendszerben kapott eredmény, ahol a rendszer *in vitro* természete miatt a két gonadotropin szekréción és eliminációs kinetikájának *in vivo* tapasztalt különbségével nem kell számolnunk.

Kísérleteink megerősítik az FSH szekréción LHRH-tól független komponensének létezésével kapcsolatos számos korábbi adatot, és egyben bizonyítják, hogy kiváltható olyan faktor(ok) ürülése az eminentia mediana-ból (FSH-RF), mely képes szelektív FSH release-t indukálni a hypophysis LHRH receptorainak antagonistával történő blokkolásakor is. Noha egy új, biztató eredmény szerint lehetséges, hogy sikerült identifikálni a hosszú ideje keresett FSH-RF-et (95), ezen adat verifikálása és a faktor termelődési helyének végleges megállapítása még további vizsgálatokat igényel.

3. Cítotoxikus LHRH analóg hypophysis működésre, illetve LHRH receptort expresszálo karcinóma növekedésére gyakorolt hatása

3.1. Előzmények és célkitűzések

Az LHRH analógok jelenlegi onkológiai célú felhasználása az analógok hypophysis-gonád tengely működésének szuppresszióját előidéző endokrin hatásán alapul (selective medical hypophysectomy)(4). Az elmúlt évek során azonban az LHRH analógok egyes tumorokra kifejtett direkt növekedésgátló tulajdonsága is ismertté vált (4,25,30,35). Ez a közvetlen antiproliferatív hatás feltehetőleg LHRH receptorokon keresztül érvényesül (25,50). Az LHRH receptorok bizonyos daganatok sejteiben történő kifejeződéséről egyre több kísérletes bizonyíték lát napvilágot, és az ezen sejtekben feltehetőleg növekedési faktorként funkcionáló LHRH lokális termelődéséről is jelentek meg adatok (50). Specifikus LHRH receptorokat sikerült kimutatni sebészileg eltávolított humán prosztata karcinóma mintákban, valamint az LNCaP és DU-145-jelű humán prosztata karcinóma sejtvonalakon (96,97). Számos humán emlőkarcinóma sejtvonal, valamint egy nagyszabású tanulmányban 500 emlőtumor biopsziás anyagából 260 minta (52%) bizonyult pozitívnak LHRH kötőhelyek tekintetében (98-100). Mind kis-, mind pedig nagy-affinitású LHRH receptorok jelenléte igazolást nyert humán ovárium karcinómákban és az EFO-21 illetve EFO-27-jelű karcinóma sejtvonalakon (35,101). Nagy affinitású LHRH kötőhelyeket írtak le humán endometrium karcinómában illetve a HEC-1A és Ishikawa endometrium karcinóma sejtvonalakon is (35,102). Az LHRH receptorok tumorsejteken való megjelenése alapjául szolgálhat új daganatterápiás módszerek kifejlesztésének, melyektől az ezen daganatoknál jelenleg elérhető kezelési eredmények javulását remélhetjük. Az egyik ilyen megoldatlan terápiás probléma az előrehaladott prosztata karcinóma kezelése, ahol az általában

tapasztalt kezdeti jó válasz ellenére a hormonterápia csak átmeneti remissziót eredményez, ugyanakkor a jelenleg használt kemoterapeutikumok nem hatékonyak és alkalmazásuk magas toxicitással jár (50,103,104). A prosztata karcinómájához hasonlóan, konvencionális kemoterápiával csak változó fokú klinikai javulás érhető el az emlő, ovárium és endometrium daganatai esetében is, jelentős non-szelektív toxikus hatással társulva (4,25,30,35,105,106). A citosztatikumok tumorsejtekhez történő célzott eljuttatása (targeting) nagyban csökkenthetné az általános toxicitást, ugyanakkor jelentősen fokozhatná a tumornövekedés gátlását (25,50).

A citotoxikus peptidanalógok mint célzott daganatellenes ágensek tervezése egyes peptidreceptorok (LHRH, somatostatin) tumorsejteken való jelenlétének felismerése után indult meg. Ezek az antitumor szerek egy citotoxikus gyök és egy olyan szállító molekula (carrier) kémiai konjugálásával nyerhető hybrid molekulák, amelyekre a daganatsejtek membránjában specifikus kötési helyek találhatóak (25). Ezen citotoxikus konjugátumok vagy (a) internalizációt követően, vagy (b) - a citotoxikus komponens biológiai tulajdonságától függően - akár a sejtbé való bejutás nélkül is, a sejtészínen fejthetnek ki hatásukat (50,107-110). Mivel a specifikus, nagy-affinitású LHRH kötőhelyeknek a prosztata, emlő, endometrium valamint az ovárium karcinómákban való előfordulása gyakori (prosztata karcinómák közel 86%-ában, emlőkarcinómák 52%-ában illetve endometrium és ovarium karcinómák hozzávetőleg 80%-ában), ezen malignómák kezelésében az LHRH analógok kemoterápiás ágenseket "célba szállító" molekulákként történő felhasználása kézenfekvőnek tűnik (25,50,97,101,102,111).

Az alábbiakban leírt kísérleteket egy új generációs citotoxikus LHRH analóggal (AN-207) végeztük. Az analóg citotoxikus komponense egy doxorubicin származék (2-pyrrolinodoxorubicin, AN-201), amely *in vitro* 500-1000-szer aktívabb, mint a doxorubicin (112). A konjugátumban (AN-207) a citotoxikus gyök kovalensen kötött a carrier [D-Lys⁶]LHRH-hoz. Az így kapott hybridben mindkét komponens megtartotta eredeti, azaz a gyök

(AN-201) a citosztatikus illetve a [D-Lys⁶]LHRH az endokrin tulajdonságát (113). Figyelembe véve a cytotoxikus konjugátum LHRH receptor-specifikus toxicitását, a tumorelleses hatás mellett nem közömbös annak ismerete sem, hogy milyen mértékű károsodást okoz a cytotoxikus LHRH analóggal végzett kezelés az LHRH receptorokat legnagyobb koncentrációban tartalmazó hypophysis működésében. Ezért kísérleteink során különböző állapotmodelleken tanulmányoztuk az AN-207 jelű analógnak mind a toxikus, mind pedig a tumornövekedést gátló hatását. Az analóg:

- (i) toxikus hatását a hypophysis működésére normál patkányban, a
- (ii) tumornövekedést gátló és általános toxikus hatását pedig humán prosztata karcinóma xenograftokat hordozó meztelen egerekben vizsgáltuk.

3.2. Anyag és módszer

Az AN-207-jelű analóg hypophysis működésre gyakorolt hatását ivarérett nőstény patkányokon (Sprague-Dawley) vizsgáltuk *in vivo* és a patkány hypophysis sejt szuperfúziós rendszerben *in vitro*. Ugyanezen analóg tumornövekedésre kifejtett hatásának *in vivo* vizsgálatához meztelen egereket (Ncr nu/nu) használtunk. Az állatok szabályozott megvilágítású (5.00-19.00 óra között fény, 19.00-5.00 óra között sötétség) és hőmérsékletű (25 °C a patkányok illetve 28 °C a meztelen egerek számára) állatszubákban voltak elhelyezve, élelemhez és vízhez szabadon hozzájutottak. Az kísérletes munka és az állattartás során követtük az állatkísérletekkel kapcsolatban nemzetközileg elfogadott etikai irányelveket.

3.2.1. Peptidok

A citotoxikus gyökként szolgáló 2-pyrrrolinodoxorubicin (AN-201), a carrier-ként szolgáló LHRH analóg [D-Lys⁶]LHRH, illetve az AN-201 és [D-Lys⁶]LHRH konjugálásából származó citotoxikus LHRH analóg (AN-207) szintézise és karakterizálása az Endocrine, Polypeptide and Cancer Institute-ban (VA Medical Center, Tulane University, School of Medicine, New Orleans, LA, USA) történt (112,113). A kísérletek során használt LHRH és growth hormon-releasing hormon (GHRH)-(1-29)NH₂ szintézise ugyancsak ebben a laboratóriumban történt, míg a TSH release tesztjéhez kereskedelmiileg forgalomban lévő thyrotroph hormon-releasing hormon-t (TRH) használtunk (Takeda, Osaka).

3.2.2. Citotoxikus LHRH analóg (AN-207) valamint az analóg cytotoxikus komponense (AN-201) hypophysis működésre gyakorolt hatásának vizsgálata **in vivo**

A kísérletek során különböző időpontokban vizsgáltuk a hypophysis működését citotoxikus LHRH analóggal illetve komponenseivel (cytotoxikus gyök és carrier molekula) történt kezelést követően. Első kísérletünkben 10-10 patkányból álló 4 állatcsoportot kezeltünk a 4. táblázatban megadott módon.

4. táblázat. AN-207-el és AN-201-el végzett terápia hypophysis működésre gyakorolt hatását vizsgáló kísérlet kezelési sémája.

csoport	kezelés (egyszeri i.v. injekció)
1. (n=10)	cytotoxikus LHRH analóg (AN-207), 150 nmol/kg
2. (n=10)	cytotoxikus gyök (AN-201), 75 nmol/kg
3. (n=10)	[D-Lys ⁶]LHRH (carrier), 150 nmol/kg
4. (n=10)	0.9% NaCl oldat (kontroll)

Előkísérletekben a konjugátum és a citotoxikus gyök fenti dózisa a patkány által tolerált

maximum dózisnak bizonyultak. Az oldatokat a v. jugularisba injektáltuk methoxyflurane (Metofane, Pittman More, Mundelein. IL) anesztézia alatt. A ciklust naponta vett hüvelykenet segítségével ellenőriztük, a testsúlyokat hetente mértük. Egy, illetve 3 héttel az injekciót követően, csoportonként két-két patkány hypophysist az *in vitro* kísérletekben használtuk fel (lásd később). Kettő, 4 és 6 héttel a kezelés után, a hypophysis különböző releasing hormonokkal szembeni, receptor-függő válaszkészségét teszteltük *in vivo*, 1 μ g LHRH, 1 μ g GHRH illetve 1 μ g TRH csoportonként 6-6 patkányba történő i.v. injekciójával. Methoxyflurane altatásban vér vettünk (1 ml) az injekciót közvetlenül megelőzően (0 perc), valamint 5, 60 és 180 perccel azt követően a v. jugularisból. A leszívott vért azonos mennyiségű fiziológiás NaCl oldat keringésbe juttatásával pótoltuk. Centrifugálást követően a szérumokat -20°C -on tároltuk az LH, GH és TSH RIA-val történő meghatározásáig. A kezelést követő hetedik héten a patkányokat dekapitáltuk, a hypophysiseket eltávolítottuk, homogenizáltuk és 0.1 N HCl-al fehérje-extrakciót végeztünk. A homogenizátumokat centrifugáltuk és a szupernatánst -20°C -on tároltuk az LH, GH és TSH RIA-val történő meghatározásáig. A protein tartalmat Bradford módszerével határoztuk meg (114), és a hypophysis hormon koncentrációit $\mu\text{g}/\text{mg}$ fehérje formában fejeztük ki.

Az első kísérlet eredményei alapján terveztük második kísérletünket, amelyben a hypophysis hormontartalmát azon időpontban szándékoztuk vizsgálni, amikor a kezelést követő legalacsonyabb testsúlyok alapján a legnagyobb fokú diszfunkciót vártuk és kaptuk (1 héttel a kezelés után). A kísérlet célja annak megállapítása volt, hogy a stimulált trophormon-szekrécióban bekövetkezett változások mögött eltérő vagy normál hormonprodukción áll. Ebben a második kísérletben 5-5 patkányból álló 4 csoportot alkottunk, amelyek a fentivel egyező kezelésben részesültek. Egy hét után dekapitáltuk az állatokat és a hypophysisek fehérje, LH, GH és TSH koncentrációját az első kísérletben leírttal egyező módon meghatároztuk.

3.2.2. Citotoxikus LHRH analóg (AN-207) valamint az analóg cytotoxikus komponense (AN-201) hypophysis működésre gyakorolt hatásának vizsgálata in vitro

Ezekhez a kísérletekhez az *in vivo* kísérletben kezelt patkányok hypophysiszeit használtuk a hypophysis sejt szuperfúziós rendszerben (74,75). Feltételezve, hogy a legnagyobb mértékű hypophysis diszfunkció a testsúly, mint toxicitási mutató legnagyobb mértékű csökkenésével egyidőben jelentkezik, az AN-207 illetve AN-201 injekciója után egy héttel, a 2-2 legalacsonyabb testsúlyú és ovariális ciklust nem mutató patkányt dekapitáltuk és hypophysisét eltávolítottuk. Kontrollként [D-Lys⁶]LHRH-val kezelt két patkány hypophysisét szolgált. Az AN-207 illetve AN-201 injekciója után 3 héttel, amikor a testsúlyok részlegesen normalizálódtak, a kísérletet megismételtük 2-2 patkány hypophysisével. Az eltávolított hypophysisekből a 2.2.2. pont alatt leírt módon készítettük el a sejteket tartalmazó oszlopokat. A frakciógyűjtés a következő nap reggelén kezdődött. A kísérlet elején és végén membrán-depolarizáló K⁺-al aspecifikus stimulációt alkalmaztunk (50 nM KCl) a sejtekből aspecifikusan release-elhető hormonok mennyiségének megállapítása és referencia csúcs nyérése céljából. Ezután 3 perces pulzusokban 1 nM majd 10 nM LHRH-val stimuláltuk a sejteket, 30 perc nyugalmi periódussal elválasztva a két stimulációt. Egy órával később 1 nM majd 10 nM GHRH-val, illetve ezt 60 perccel követően 1 nM majd 10 nM TRH-val stimuláltunk. A szuperfúzió során három perces frakciókat gyűjtöttünk (1 ml). A kísérlet végén a sejtek fehérjetartalmát 0.1 N HCl-al extraháltuk (reziduális hormon) és az extraktumok valamint a szuperfúziós minták LH, GH és TSH koncentrációját RIA-val határoztuk meg.

3.2.3. Citotoxikus LHRH analóg AN-207 tumornövekedést gátló hatásának vizsgálata in vivo

A kísérleteket PC-82 androgén dependens humán prosztata karcinóma xenograftokat hordozó meztelen egereken hajtottuk végre. A PC-82 humán prosztata karcinóma vonalat

Hoehn és munkatársi fejlesztették ki (115). Ez a tumorvonal egy lassan növő, androgén-dependens adenokarcinóma, ami prosztata specifikus antigént (PSA) szekretál (116). A PC-82 vonal korábbról ismert, mint LHRH receptorokat kifejező daganat, és mint a klinikai prosztata karcinómát legjobban reprezentáló kísérleti modell (117). A meztelen egerek széles körben használtak a kísérletes onkológiában, mivel mutáció miatti csökkent immunitásuk révén alkalmasak humán daganatok *in vivo* növesztésére. A tumor egerekbe történő transzplantációjához fenolpiros-mentes Matrigel-t felhasználva (Collaborative Research, Bedford, MA) tumorszövetet tartalmazó szuszpenziót készítettünk, egy korábban leírt módszer alapján (117). Ennek a szuszpenziónak 200 µl-ét, ami 20 mg eredeti tumorszövetet tartalmazott, injektáltuk az állatok hátbőre alá.

Első kísérletünkben a citotoxikus LHRH konjugátnak (AN-207) illetve a konjugátban citotoxikus gyökként jelenlévő doxorubicin-származéknak (AN-201) a PC-82 tumor növekedésére gyakorolt, valamint toxikus hatását vizsgáltuk, a második kísérletünkben pedig az AN-207 komponenseinek (citotoxikus gyök AN-201 és [D-Lys⁶]LHRH) fizikai összekeverésével nyert oldat, valamint önmagában a [D-Lys⁶]LHRH egyszeri i. v. injekciójának tumornövekedésre kifejtett hatását hasonlítottuk össze.

5. táblázat. Az AN-207-el, AN-201-el, D[Lys⁶]LHRH-val és az AN-201 és [D-Lys⁶]LHRH konjugátlan keverékével végzett kezelések antiproliferatív hatását és toxicitását vizsgáló kísérletek sémája

kísérlet	csoport	kezelés (egyszeri i. v. injekció)
első	1. (n=8)	cytotoxikus LHRH analóg (AN-207), 200 nmol/kg
	2. (n=8)	cytotoxikus gyök (AN-201), 200 nmol/kg
	3. (n=8)	5.5 % mannitol oldat (kontroll)
második	1. (n=9)	AN-201 és [D-Lys ⁶]LHRH konjugátlan keveréke, 200-200 nmol/kg
	2. (n=9)	[D-Lys ⁶]LHRH (carrier), 200 nmol/kg
	3. (n=9)	0.9% NaCl oldat (kontroll)

A 4 hónap alatt hozzávetőleg 150 mm³ volument elért tumorokat hordozó egereket 3-3 csoportba osztottuk és az 5. táblázatban leírt kezeléseket alkalmaztuk.

Az i.v. injekciókat a v. jugularisba adtuk methoxyflurane (Metofane, Pittman-Moore, Mundelein, IL) anesztézia alatt. A konjugát ezen dózisa meztelen egereken végzett előkísérletekben jelentősebb toxicitástól mentesnek bizonyult.

Az AN-207 és AN-201 oldására 5.5%-os mannitol oldatot használtunk. Közvetlenül az injekció előtt és azt követően hetente Unopette mikrokollekciós kittel (Becton-Dickinson, New Jersey, NJ) vért vettünk az egerek farokvénájából, és a teljes fehérvérsejtszámot (WBC) illetve vérlemezke számot Neubauer típusú hemacytometerrel meghatároztuk. A tumorok méretét hetente mértük microcaliperrel, és a tumorvolumen a

$$\text{hosszúság} \times \text{szélesség} \times \text{vastagság} \times 0.5236$$

formulával számoltuk ki. Az egerek testsúlyát szintén hetente mértük. A toxicitást a WBC, a vérlemezkeszám és a testsúly változása valamint a mortalitás alapján határoztuk meg. Nyolc (1. kísérlet) illetve hat héttel (2. kísérlet) a kezelést követően methoxyflurane anesztézia alatt vért vettünk a v. cava inferiorból, majd az egereket dekapitáltuk. A véreket centrifugáltuk és a szérumokat -20°C-on tároltuk a szérum LH és humán PSA RIA-val történő meghatározásáig. A tumorok térfogatát és súlyát lemértük, minden tumorból mintát vettünk és azokat -80°C-on tároltuk az LHRH receptorok jelenlétének ligand kompetíciós assay-vel történő vizsgálatáig. A tumorprolifерáció sebességére utaló tumor megkétszereződési időt (tumor doubling time, TDT) a következő formulával számoltuk ki:

$$\frac{\text{kísérleti napok száma}}{\log(\text{végleges tumorvolumen}) - \log(\text{kezdeti tumor volumen})}$$

A tumorsúlyok alapján meghatároztunk egy másik, a tumornövekedésre utaló adatot is, az ún. tumorterhet (tumor burden) a következő számítással:

$$\frac{\text{mg tumorsúly}}{\text{g testsúly}}$$

3.2.4. Receptor assay

Az LHRH receptorok PC-82 tumormembránokban való jelenlétét ligand kompetíciós assay-vel (118) vizsgáltuk az első kísérlet kontroll tumorjából vett mintákban. A LIGAND-PC számítógépes programot használtuk a kötés típusa, a disszociációs konstans (K_d) és a maximális kötési kapacitás (B_{max}) meghatározásához (119).

3.2.5. Radioimmunoassay

A patkányból származó minták LH, GH és TSH koncentrációjának meghatározásához a National Hormone and Pituitary Program (NHPP, Rockville, MD) a következő anyagokat biztosította: patkány GH-RP-2/AFP-3190B referencia preparátum, patkány GH-I-6/AFP-5676B hormon és patkány GH-RIA-5/AFP-411S antitest a GH; patkány LH-RP-3/AFP-718713 referencia preparátum, patkány LH-I-9/AFP-10250C hormon és patkány LH-S-11/AFP-697071 P antitest az LH; valamint patkány TSH-RP-3/AFP-5512B referencia preparátum, patkány TSH-I-9/AFP-11542B hormon és patkány TSH-RIA 6/AFP-329691 Rb antitest a TSH koncentráció méréséhez.

Az egér szérum LH koncentráció méréséhez a National Hormone and Pituitary Program (NHPP, Rockville, MD) következő anyagait használtuk: patkány LH-RP-3/AFP-718713 referencia preparátum, patkány LH-I-9/AFP-10250C hormon és anti-patkány LH-RIA S-10/AFP C697071P antitest.

Az egér szérum humán PSA koncentrációjának meghatározásához kereskedelmiileg beszerezhető immunoradiometriás assay készletet használtunk (Diagnostic System Laboratories, Webster, TX). Az interassay és intraassay eltérés kevesebb mint 15% és 10% volt az LH, illetve 10.2% és 5.2% volt a PSA-ra nézve.

3.2.6. Statisztikai analízis

Eredményeinket ANOVA-val értékeltük és az $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában adtuk meg. Amikor a p érték kisebb volt 0.05-nél, az analízist Duncan teszttel egészítettük ki. A szuperfúziós kísérleti eredményeket egy speciális computer programmal értékeltük (75). Segítségével kiszámoltuk a szekretált hormonok szuperfúziós görbék alatti net integrál mennyiségét és az a kontroll %-ában fejeztük ki.

3.3. Eredmények

3.3.1. Citotoxikus LHRH analóg (AN-207) és az analóg citotoxikus komponensének (AN-201) hatása a testsúlyra és az ovariális ciklusra

3.3.1.1. Testsúlyok alakulása

Egy héttel a kezelést követően, a citotoxikus konjugát AN-207 150 nmol/kg dózisa 15%-kal ($p < 0.01$) csökkentette az állatok testsúlyát az oldószerrel illetve [D-Lys⁶]LHRH-val kezelt kontrollokhoz viszonyítva. Ezt követően az állatok testsúlya fokozatosan gyarapodott, és a 2., 3., 4. és 5. héten a relatív testsúlyvesztés 14%, 13%, 9% és 8% volt ($p < 0.05$). A 6. és 7. hét végére nem volt szignifikáns eltérés ebben a csoportban a kontrollokhoz viszonyítva. A citotoxikus gyök AN-201, 75 nmol/kg dózisban alkalmazva, 8%, 11% illetve 12% ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.01$) testsúlycsökkenést eredményezett 1, 2, és 3 héttel az injekciót követően, a fiziológiás sóoldattal illetve [D-Lys⁶]LHRH-val kezelt kontrollokhoz viszonyítva. A 4. héttől nem találtunk szignifikáns eltérést ezen csoport és a kontroll állatok testsúlya között. Az AN-207-el illetve AN-201-el kezelt csoportok testsúlyai között egyetlen időpontban sem találtunk szignifikáns különbséget. Hasonlóan, a fiziológiás sóoldattal illetve [D-Lys⁶]LHRH-val injektált két kontroll csoport testsúlyai sem tértek el egymástól a kísérlet folyamán.

3.3.1.2. Ovariális ciklus

AN-207 egyszeri i.v. injekciója után 8 patkány hüvelykenete 3-5 napig diösztruszt mutatott. Ezekben az állatokban az ösztrusz ciklus a 4-6. napon visszatért és szabályos maradt a kísérlet végéig. Két patkányban az ösztrusz fázis nem jelentkezett a kezelés utáni 7. napig, amikor az *in vitro* kísérlet számára dekapitáltuk őket. A citotoxikus gyök AN-201 egyszeri i.v. injekciója 3 patkány ciklusát nem változtatta meg és 5 patkányban csak az első ciklust zavarta meg, ami az 5-7. napon normalizálódott és szabályos maradt a kísérlet végéig. Két patkánynál nem tért

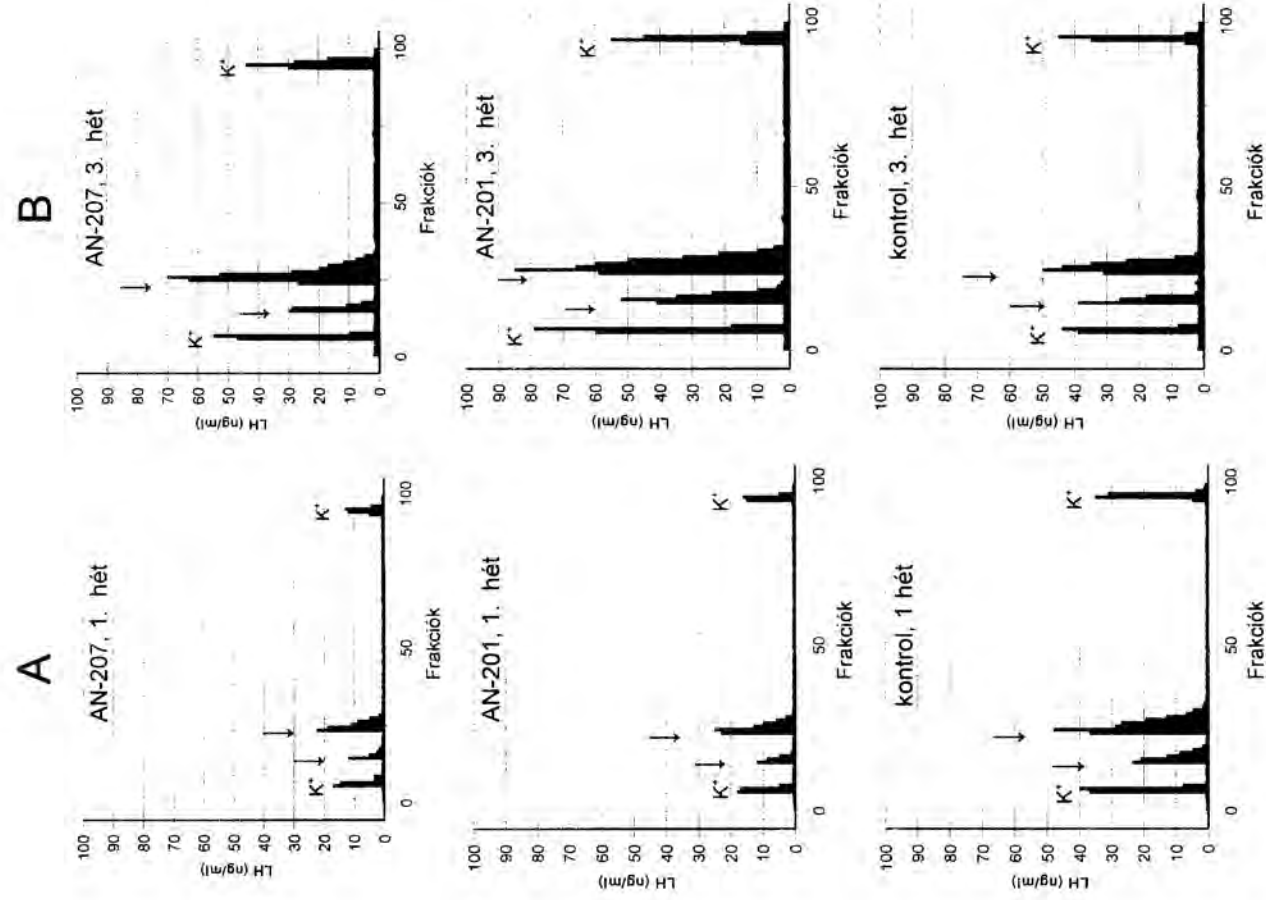
vissza az ösztroosz fázis a kísérlet 7. napjáig, amikor dekapitáltuk őket és hypophysiseiket az *in vitro* kísérletben használtuk fel. A [D-Lys⁶]LHRH-val kezelt patkányok hüvelykenete 3-4 napig szintén diösztruzst mutatott, majd valamennyi állatban normalizálódott a 4-5. napon. A fiziológiás NaCl oldat nem volt hatással a patkányok ösztroosz ciklusára.

3.3.2. *Specifikus receptor-mediált és aspecifikus stimulusokra adott LH, GH és TSH válaszok in vitro, a kezelést követő 1. és 3. héten*

Az *in vivo* kezelés után **1 héttel** a legalacsonyabb testsúlyt mutató patkányok, illetve a kezelés után **3 héttel** (a testsúlyok részleges normalizálódásakor) a kísérleti csoportokból véletlenszerűen kiválasztott patkányok hypophysiseinek működését vizsgáltuk a hypophysis sejt szuperfúziós rendszerben in vitro.

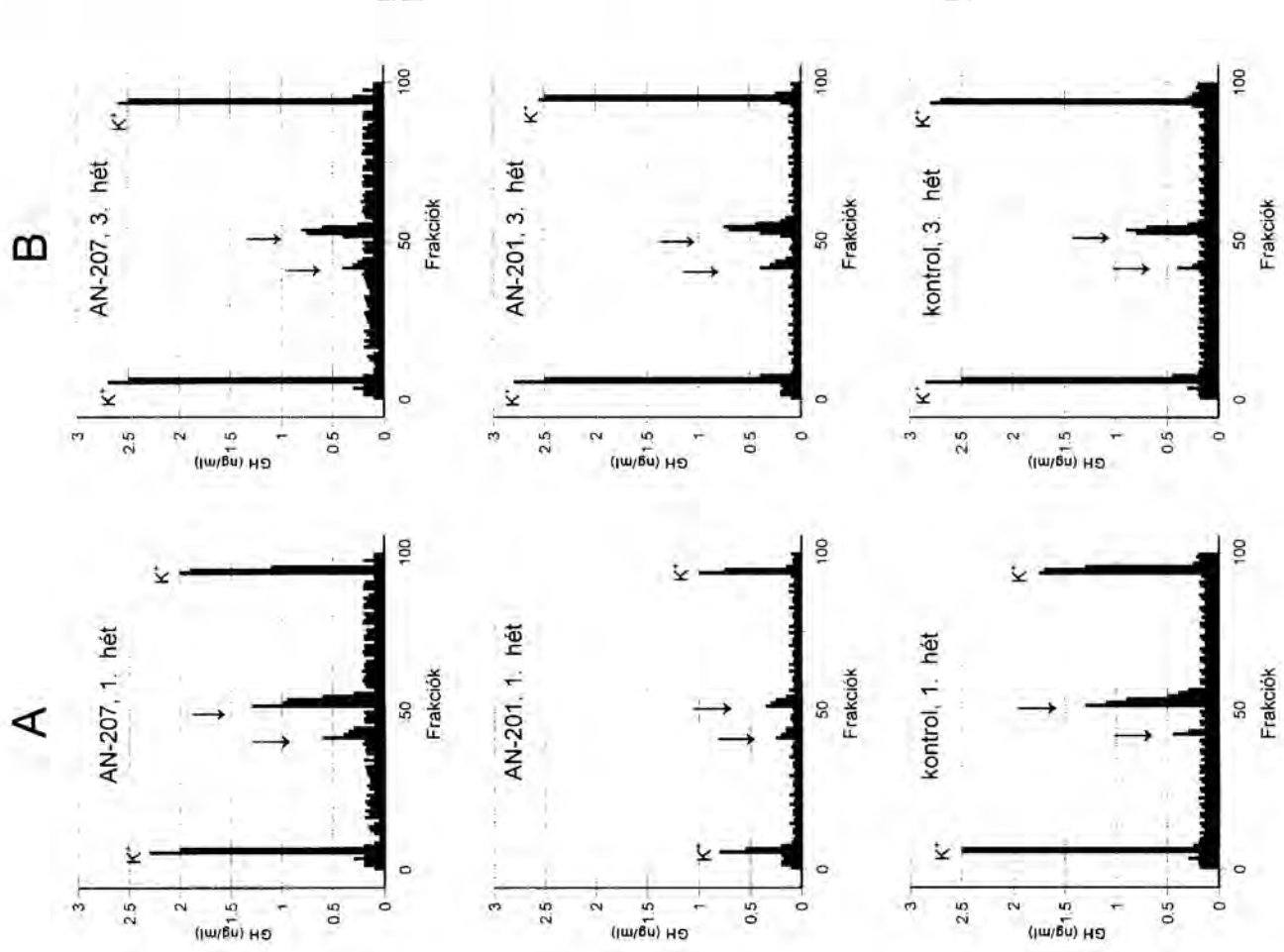
LH release. **Egy héttel** az AN-207 (150 nmol/kg) i. v. injekciója után a hypophysisek 1 nM és 10 nM LHRH-ra adott összesített net integrált LH release-e 63%-al csökkent a kontrollhoz képest. Az AN-201-el (75 nmol/kg) történő kezelés 57%-al csökkentette az LHRH stimulusra adott LH release-t. A nem specifikus membrán depolarizáló KCl-ra kapott LH válaszok 52%-kal csökkentek az AN-207, illetve 53%-kal az AN-201 injekcióját követően (10A ábra). A gonadotroph sejtek reziduális LH tartamát az AN-207-el való kezelés 27%-kal, míg az AN-201 injekciója 29%-kal csökkentette a kontrollhoz képest. A kísérlet **harmadik hetére** a receptor-mediált LH válasz 26%-al nőtt az AN-207-el, illetve 97%-al emelkedett az AN-201-el való kezelés után a kontrollhoz viszonyítva. Ebben az időpontban a KCl-al indukált aspecifikus LH válaszok 21%-kal (AN-207) valamint 55%-al (AN-201) nőttek (10B ábra). Az AN-207-el való kezelés után a gonadotroph sejtek reziduális LH tartama nem tért el a kontrolltól, míg az AN-201-el történt kezelés után 13%-os csökkenést mértünk.

GH release. 150 nmol/kg AN-207 i. v. injekciója után **1 héttel** a GHRH-indukálta GH



10. ábra. LH release a szuperfúziós rendszerben AN-207-el, AN-201-el illetve oldószerrel (kontroll) kezelt patkányok hypophysiséből a kezelés után 1 (A) illetve 3 (B) héttel. A kísérlet elején és végén 50 mM KCl-al aspecifikus stimulust alkalmaztunk (K⁺). Az első illetve második nyíl 1 nM illetve 10 nM LHRH adását jelzi.

release 11%-al csökkent, és nem volt változás az aspecifikus GH release-ben illetve a somatotroph sejtek reziduális GH tartamában a kontrollhoz viszonyítva. Ugyanakkor a 75 nmol/kg AN-201-el történő kezelés a receptor-mediált GH release-t 79%-kal, a K⁺-indukálta



11. ábra. GH release a szuperfúziós rendszerben AN-207-el, AN-201-el illetve oldószerrel (kontroll) kezelt patkányok hypophysiséből a kezelés után 1 (A) illetve 3 (B) héttel. A kísérlet elején és végén 50 mM KCl-al aspecifikus stimulust alkalmaztunk (K⁺). Az első illetve második nyíl 1 nM illetve 10 nM GHRH adását jelzi.

aspecifikusGH választ 69%-kal, a somatotroph sejtek reziduális GH tartamát pedig 51%-kal csökkentette (11A ábra). **Három héttel** a kezelést követően, mindkét csoportban, a GH válaszok valamint a sejtek reziduális GH tartalma kevesebb mint 10%-kal tért el a kontrolltól

(11B ábra).

TSH release. A hypophysis sejtek specifikus (TRH) és aspecifikus (K^+) stimulusokra adott TSH válaszai a specifikus (GHRH) és aspecifikus (K^+) stimulusokra adott GH válaszokhoz hasonló képet mutattak, ezért erről külön ábrát nem közlök. A 150 nmol/kg AN-207-el történt i.v.kezelés után **1 héttel** a thyreotroph sejtek TRH-ra adott specifikus TSH válasza 12%-kal, a K^+ -indukálta aspecifikus TSH válasz pedig 11%-al csökkent a kontrollhoz viszonyítva. A sejtek reziduális TSH tartalma nem változott szignifikánsan. Ugyanakkor a 75 nmol/kg dózisu AN-201 injekcióját követően a receptor-mediált TSH válasz 67%-kal, az aspecifikus TSH válasz pedig 59%-kal csökkent. A kísérlet végére a sejtek reziduális TSH tartalma szintén 59%-kal csökkent a kontrollhoz képest. **Három héttel** a kezelés után, mindkét kezelt csoportban, a specifikus és aspecifikus TSH válaszok valamint a sejtek reziduális TSH tartalma kevesebb mint 10%-al tért el a kontrolltól.

3.3.3. Specifikus receptor-mediált stimulusokra adott LH, GH és TSH válaszok *in vivo*, a kezelést követő 2., 4. és 6. héten

Szérum LH. **Két héttel** a kezelés után a releasing hormon stimulusok alkalmazása előtt mért bazális szérum LH koncentrációkban nem volt különbség a kísérleti csoportok között. Az 1 μ g LHRH injekcióját követő 5-ik percben kapott LH válaszok szintén nem különböztek, míg a 60-ik percnél 13%-os ($p < 0.05$) csökkenést találtunk az AN-201-el kezelt csoportban, a kontroll csoportokhoz viszonyítva. Az LHRH stimulust követő 180. percre az LH koncentrációk minden állatban visszatértek a bazális értékre. A bazális szérum LH koncentráció **négy** illetve **6 héttel** a citotoxikus vegyületekkel való kezelés után sem mutatott szignifikáns eltérést egyik kezelt csoportban sem, és az LHRH által stimulált LH szekréció is azonos volt mind a négy kísérleti csoportban.

Szérum GH és TSH. A bazális GH és TSH szekréció, valamint a GHRH-val indukált GH és a TRH-val indukált TSH release egyik csoportban sem tért el szignifikánsan a kontrollokhoz képest a kezelés után **2, 4 és 6 héttel**.

3.3.4. A hypophysisek LH, GH és TSH koncentrációja a kezelést követő 1. és 7. héten

Az LH, GH és TSH hypophysisekben mért koncentrációja nem mutatott szignifikáns különbséget a négy kísérleti csoport (AN-207, AN-201, [D-Lys⁶]LHRH és fiziológiás NaCl) között **1 illetve 7 héttel** a kezelést követően (6. táblázat).

6. táblázat. Az LH, GH és TSH hypophysisekben mért koncentrációja AN-207-el, AN-201-el valamint [D-

Lys⁶]LHRH-val (kontroll) történt kezelés után 1 illetve 7 héttel.

csoporth	Hypophysis hormon koncentrációk (µg/mg)			TSH	1 héttel a kezelés után	7 héttel a kezelés után
	LH	GH	TSH			
AN-207	17.8±3.35	141±15.0	4.71±0.75			
AN-201	16.3±2.62	128±16.8	4.43±0.57			
[D-Lys ⁶]LHRH	17.9±1.31	119±13.6	4.02±0.38			
AN-207	15.6±1.62	113±9.96	3.69±0.35			
AN-201	15.9±1.00	124±9.83	4.28±0.37			
[D-Lys ⁶]LHRH	17.0±2.10	110±7.37	4.08±0.33			

Az adatok az átlag±S.E.M.-et mutatják.

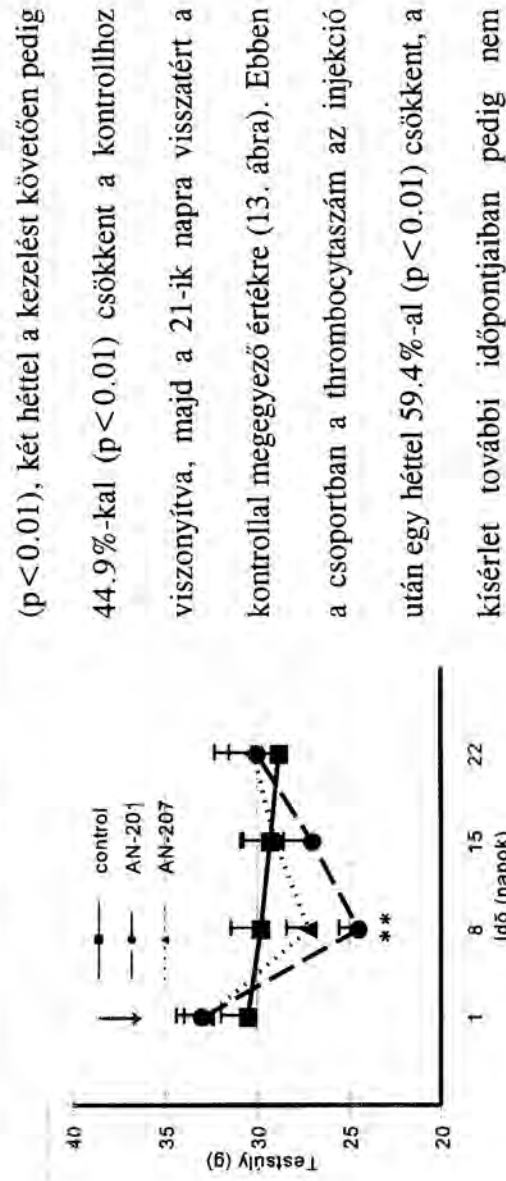
3.3.5. Cítotoxikus LHRH analóg AN-207, illetve komponenseinek tumornövekedést gátló és toxikus hatása **in vivo**, PC-82 humán prosztata karcinómát hordozó mezelen egerekben

3.3.5.1. Toxicitás

Cítotoxikus LHRH analóg AN-207 és citotoxikus gyök AN-201 hatása (1. kísérlet). A 200 nmol/kg dózisu AN-207 egyszeri i.v. injekciójával kezelt csoport testtölye nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól a 8 hetes kísérlet egyetlen mérési időpontjában sem (12. ábra, 7.

táblázat). A citotoxikus gyök AN-201 200 nmol/kg dózísú egyszeri i.v. injekciója 15.9%-os ($p < 0.01$) testsúlycsökkenést okozott a kezelés után 1 héttel a kontrollhoz viszonyítva (12. ábra, 7. táblázat).

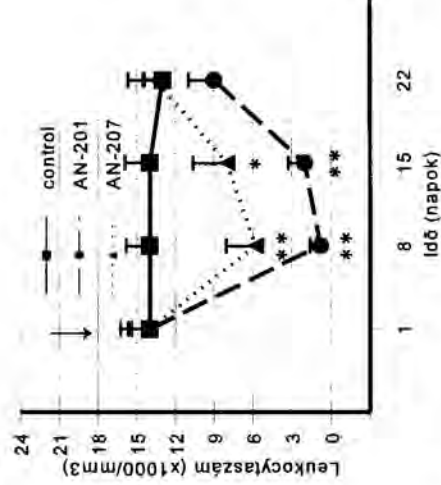
Egy héttel az AN-207 jelű konjugáttal végzett kezelés után a fehérvérsejtszám 64,6%-al



12. ábra. A PC-82 humán prosztata karcinóma s.c. xenografijait hordozó mezelen egerek testsúlyának változása az AN-207 citotoxikus LHRH analóg (200 nmol/kg) illetve az AN-201 citotoxikus gyök (200 nmol/kg) egyszeri i.v. injekcióját követően (nyíl). A kontroll egerek oldószert kaptak. Az adatok csoportátlagokat \pm S.E.M.-t jelölnek. ** $p < 0.01$ vs. kontroll

($p < 0.01$), két héttel a kezelést követően pedig 44.9%-kal ($p < 0.01$) csökkent a kontrollhoz viszonyítva, majd a 21-ik napra visszatért a kontrollal megegyező értékre (13. ábra). Ebben a csoportban a thrombocytaszám az injekció után egy héttel 59.4%-al ($p < 0.01$) csökkent, a kísérlet további időpontjaiban pedig nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól. Az AN-201-el kezelt csoportban 1, 2 illetve 3 héttel az injekció után a fehérvérsejtszám 94.3%-os ($p < 0.01$), 85.0%-os ($p < 0.01$) és 26.7%-os ($p < 0.05$) csökkenést mutatott a kontrollhoz képest (13. ábra). A thrombocytaszám 61.7%-al ($p < 0.01$) és 66.0%-kal ($p < 0.01$) csökkent az AN-201 egyszeri injekciója után 1 illetve 2 héttel.

Toxicitás következtében 1 egér pusztult el 8-ból a konjugáttal (AN-207) kezelt csoportban a kísérlet 10-ik napján. A citotoxikus gyökkel (AN-201) kezelt 8 egérből



13. ábra. A citotoxikus LHRH analóg AN-207 (200 nmol/kg) illetve citotoxikus gyök AN-201 (200 nmol/kg) egyszeri i.v. injekciójának (nyíl) hatása a teljes fehérvérsejtszámra PC-82 tumort hordozó mezelen egerekben. A kontroll egerek oldószert kaptak. Az adatok csoportátlagokat \pm S.E.M.-t jelölnek. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. kontroll.

tizenhárom napon belül 3 puszult el toxicitás miatt, jelentős testsúlyvesztést követően.

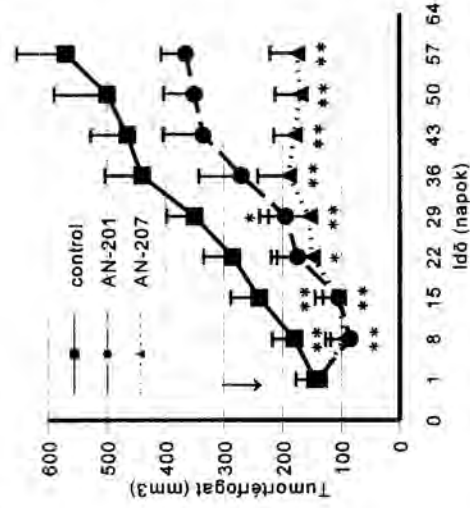
A [D-Lys⁶]LHRH illetve az AN-201 és [D-Lys⁶]LHRH konjugátalan keverékének hatása (2. kísérlet). A 200 nmol/kg dózisu [D-Lys⁶]LHRH egyszeri i.v. injekciója nem volt toxikus az egerekre. Ebben a csoportban a kísérlet során nem találtunk szignifikáns eltérést a testsúlyokban a kontrollhoz képest (7. táblázat). A [D-Lys⁶]LHRH és AN-201 konjugátalan keveréke (200-200 nmol/kg) 20.2%-al ($p < 0.01$) csökkentette a testsúlyt egy héttel az injekció után, a

kontrollhoz viszonyítva. A kísérlet további részében a testsúly ezen csoportban sem tért el szignifikánsan a kontroll értéktől (7. táblázat). Toxicitás miatt 3 egér pusztult el 9-ből az injekciót követő 14 napon belül.

3.3.5.2. Antiproliferatív aktivitás, szérum PSA és LH koncentrációk

AN-207 és AN-201 hatása (1. kísérlet). A 200

14. ábra. AN-207 citotoxikus LHRH analóg (200 nmol/kg) és AN-201 citotoxikus gyök (200 nmol/kg) egyszeri i.v. injekciójának hatása a tumornövekedésre PC-82 humán prosztata karcinóma s.c. xenograftjait hordozó meztelen egerekben. A kezelés időpontját nyíl jelzi. Az adatok csoportilagok \pm S.E.M.-t jelölnek. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. kontroll



kontrollhoz viszonyítva. A tumortérfogat a kísérlet további 7 hetében is jelentős és szignifikáns redukciót mutatott ebben a csoportban (14. ábra). A nyolcadik hét végén, amikor a kísérletet befejeztük, az AN-207-el kezelt csoportban 67.8%-os ($p < 0.01$) tumorvolumen, 70.4%-os ($p < 0.01$) tumorsúly-, és 70.7%-os ($p < 0.01$) tumorteher-csökkenést észleltünk a kontroll csoporthoz képest. A konjugátallal való kezelés a tumor megkésztereződési időt (TDT) 106.0%-kal ($p < 0.01$) növelte (7. táblázat). A kísérlet végén az AN-207-el kezelt csoportban a szérum PSA koncentráció 36.5%-kal ($p < 0.01$) csökkent, míg a szérum LH koncentráció nem tért el

szignifikánsan az oldószerrel kezelt csoporttól (8. táblázat).

A 200 nmol/kg dózísú citotoxikus gyök AN-201 egyszeri i. v. injekciója csak a kísérlet első 4 hetében eredményezett szignifikáns antiproliferatív hatást, a 4-ik hét végére 42.0%-os ($p < 0.05$) tumorvolumen-redukciót valósítva meg (14. ábra). A kísérlet második felében a tumornövekedés ebben a csoportban felgyorsult, és az 5. héttől a kontroll és kezelt csoportok közötti különbségek statisztikailag már nem bizonyultak szignifikánsnak (14. ábra, 7. táblázat). Az AN-201-el injektált egerekben a kísérlet végén mért szérums PSA és LH koncentrációk sem tértek el szignifikánsan a kontroll értéktől (8. táblázat).

7. táblázat. Az AN-207, AN-201, [D-Lys⁶]LHRH (carrier) és az AN-201 és a carrier konjugátlan keverékének (keverék) tumornövekedést gátló hatása PC-82 humán prosztata karcinóma xenograftokat hordozó mezelen egerekben.

X	csoport	tumor volumen (mm ³)		testisúly (g)	tumorsúly (i.s.) (mg)	tumortéher (mg/g i.s.)	TDT (nap)
		kezdeti	záró				
1. kísérlet							
	AN-207	128.2 ± 19.5	177.5 ± 47.5**	26.4 ± 1.84	134.3 ± 46.8**	4.93 ± 1.99**	68.0 ± 11.7**
	AN-201	126.0 ± 17.2	361.4 ± 39.9	28.8 ± 0.57	289.7 ± 22.6	10.5 ± 2.90	43.4 ± 5.16
	kontroll	137.5 ± 16.4	549.1 ± 99.0	26.8 ± 0.86	453.5 ± 80.7	16.8 ± 2.90	33.0 ± 3.73
2. kísérlet							
	carrier	224.8 ± 27.1	532.1 ± 84.0	26.8 ± 2.29	396.0 ± 112.5	15.1 ± 4.56	36.4 ± 2.55
	keverék	237.4 ± 30.1	614.7 ± 237.7	23.9 ± 1.35	500.0 ± 147.9	15.6 ± 4.05	35.5 ± 4.90
	kontroll	255.3 ± 25.5	726.8 ± 200.4	25.9 ± 0.91	586.2 ± 142.4	17.3 ± 5.64	34.0 ± 8.42

A kontroll állatok mindkét kísérletben az AN-207 és AN-201 oldószerét kapták. Az adatok a

csoporthalag \pm S.E.M. -t jelzik. ** $p < 0.01$ vs. kontroll. A testsúly oszlopban a kísérlet végén mért értékek láthatók. TDT tumor megkétszereződési idő.

A [D-Lys⁶]LHRH illetve az AN-201 és [D-Lys⁶]LHRH konjugátalan keverékének hatása (2. kísérlet). A 200 nmol/kg dózisu [D-Lys⁶]LHRH egyszeri i. v. injekciója nem okozott tumorvolumen-csökkenést a kísérlet során, illetve nem csökkentette a tumorsúlyt, a számított TDT értéket és a szérums PSA illetve LH koncentrációt a kísérlet végére a kontrollhoz képest (7. és 8. táblázat). A peptid és a citotoxikus gyök konjugátalan keveréke (200-200 nmol/kg dózisban) szintén nem okozott szignifikáns különbséget a tumornövekedésben egyetlen mérési időpontban sem és nem csökkentette a szérums PSA és LH koncentrációkat a kísérlet végére a kontrollhoz viszonyítva (7. és 8. táblázat).

3.3.5.3. Az LHRH receptor-assay eredménye

Az első kísérlet kontroll csoportjából származó PC-82 tumorminták membránjában a receptor-assay nagy affinitású LHRH receptorok jelenlétét igazolta. Az LHRH receptorok átlagos disszociációs konstansa 7.63 ± 0.82 nM, a maximális kötési kapacitása pedig 495.9 ± 5.26 fmol/mg membrán protein volt.

8. táblázat. Az AN-207 illetve AN-201, valamint a [D-Lys⁶]LHRH (carrier) és az AN-201 és a carrier konjugátalan keverékének (keverék) hatása a kísérlet végén mért szérums LH és PSA koncentrációra PC-82 humán prosztata karcinóma xenograftot hordozó meztelen egerekben.

	csoport	LH (ng/ml)	PSA (ng/ml)
1. kísérlet	AN-207	0.20 ± 0.03	$71.1 \pm 18.8^{**}$
	AN-201	0.18 ± 0.11	119.9 ± 8.69
	kontroll	0.24 ± 0.05	112.1 ± 4.86
2. kísérlet	carrier	0.20 ± 0.05	118.8 ± 2.20
	keverék	0.20 ± 0.08	127.9 ± 6.53
	kontroll	0.18 ± 0.03	125.0 ± 8.08

A kontroll állatok mindkét kísérletben az AN-207 és AN-201 oldószerét kapták. Az adatok a csoportátlag \pm S.E.M.-t jelzik. ** $p < 0.01$ vs. kontroll.

3.4. Az eredmények tárgyalása

A célzott citotoxikus LHRH analógok abban a reményben állnak fejlesztés alatt, hogy az antineopláziás ágenseknek az LHRH receptorokat hordozó daganatokhoz való eljuttatása révén fokozottabb és szelektív antiproliferatív aktivitást képesek kifejteni kisebb általános toxicitás mellett, mint a citotoxikus gyök (50,113). A kívánt hatás eléréséhez az egyes daganatok nagy affinitású LHRH kötőhelyei és a citotoxikus LHRH molekulák peptid része között létrejövő kötés szükséges. A kísérleteink során alkalmazott citotoxikus LHRH analógra (AN-207) mind az LHRH receptorhoz való eredeti nagy kötési affinitás, mind pedig a nagyfokú citotoxikus aktivitás jellemző (113). A molekulában a citosztatikus aktivitást egy doxorubicin-származék, a 2 pyrrolinodoxorubicin (AN-201) hordozza, amely a doxorubicinnál mintegy 500-1000-szer aktívabb (112,113). A doxorubicin, ami egy antineoplasztikus hatású anthracyclin származék, a sejtek DNS-ébe történő interkaláció révén gátolja a sejtszaporodást (120,121). Első támadáspontja azonban a sejt felszíne (109,110). Mivel a hypophysis gonadotroph sejtei nagy affinitású LHRH receptorokat hordoznak, a citotoxikus LHRH analógok hypophysisre gyakorolt hatásának felmérése nagy jelentőséggel bír. A hypophysis sejteinek viszonylag hosszú életciklusa miatt a doxorubicin vagy származékának károsító hatását inkább lemérhetjük a funkció sérülésén, mint a sejtszaporodás csökkenésén.

Jelen kísérleteinkből nyert eredményeink azt mutatják, hogy a citotoxikus LHRH konjugát AN-207 a hypophysis gonadotroph sejtfunkció szelektív károsodását okozza 1 héttel a kezelést követően, a receptor-medialt LH release-t 63%-kal csökkentve, míg a GH és a TSH

release csak 11-12%-kal csökkent. A károsító hatás szelektív jellegét a nem receptor-mediált hormon release változása is jelzi (a K^+ indukálta LH válasz 52%-kal, míg a GH és TSH válaszok csak 4-11 %-kal csökkentek). Ezen eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a gonadotroph sejtek diszfunkciója a sejtmembrán-mediált szignál mechanizmusok károsodásán alapult. Ezt támasztja alá az a korábbi észlelet, miszerint a doxorubicin, amelynek származéka az AN-201 citotoxikus gyök, a sejthe való bejutás nélkül, a sejtfelszínen hatva képes interakcióba lépni a sejtmembránnal, ezáltal megváltoztatva annak működését (109, 110).

A citotoxikus LHRH molekulával ellentétben, az AN-201 citotoxikus gyök nem-szelektív károsodást idézett elő a hypophysisben, amit a gonadotroph, somatotroph és tyrotroph sejtek funkciójának (LH-, GH- és TSH-release) hasonló mértékű csökkenése jelzett mind a receptor-mediált, mind pedig az aspecifikus hormon release esetében. Mivel a kezelés után 1 héttel, amikor az állatokon a toxicitás jelei a legnagyobb mértékben mutakoztak, nem találtunk csökkenést a hypophysis trophormon-koncentrációiban sem a konjugáttal, sem a citotoxikus gyökkel kezelt csoportban, valószínű, hogy az *in vitro* kísérletben a hypophysis sejtek reziduális hormon tartamában mért csökkenést nem a hormonszintézisben bekövetkezett elégtelenség, hanem a sérült sejtmembránnal bíró sejteknek az előkészítés során való elvesztése okozta (kollagenázos emésztés, mechanikus diszpergálás). Fontos megjegyezni, hogy ezekre a szuperfúziós kísérletekre a legnagyobb toxicitást mutató (legalacsonyabb testsúlyú) állatokat használtuk, így feltehetőleg a citotoxikus szerek által a kísérlet során okozott maximális sejtfunkció-károsodást tudtuk észlelni.

Az AN-207 és AN-201 hypophysisre gyakorolt hatásának vizsgálata során az is kiderült, hogy a hypophysis funkciókban a citotoxikus szerek által okozott károsodás reverzibilis, és az AN-201 citotoxikus gyök toxikusabb, mint az AN-207 citotoxikus konjugát. Annak ellenére, hogy a konjugát moláris dózisa kétszerese volt a gyökének, nem volt szignifikáns különbség

a testhelyzetekben a két kezelt csoport között. Egy héttel a kezeléseket követően, a kétszeres moláris dózisban (150 nmol/kg) adott citotoxikus konjugát által a hypophysis funkciókban okozott károsodás messze elmaradt a citotoxikus gyök (75 nmol/kg) okozta károsodástól: a receptor mediált és az aspecifikus (KCl) hormon release-ben illetve a sejtek reziduális hormon tartományban tapasztalt csökkenések átlaga a AN-207 esetében 19.5%, az AN-201 esetében viszont 58.1% volt. Két héttel a kezelést követően a receptor mediált LH release az AN-207-el injektált állatokban teljesen visszatért a normál szintre. Ugyanebben az időpontban a konjugát dózisének 50%-kal kisebb dózisének AN-201-el kezelt csoportban még mindig tapasztalható volt egy enyhe csökkenés az LHRH-ra adott LH válaszban. Három hétnél már mindkét csoportban növekedett LH szekretoros készséget találtunk *in vitro*. Hasonló megfigyelést tettek emberben is, miszerint az LHRH-val indukált LH válasz jelentősen nőtt citotoxikus szerekkel végzett kemoterápiát követően (122).

A PC-82 humán prosztata karcinómát hordozó egereken végzett kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy az AN-207 jelű citotoxikus LHRH analóg egyszeri i.v. injekciója az LHRH receptorokat hordozó daganat tartós és szignifikáns növekedésgátlásat képes előidézni kisfokú toxicitás mellett. Ugyanakkor az AN-207-es konjugát citotoxikus komponenseként szolgáló AN-201 jelű gyök önmagában, ugyanabban a moláris mennyiségben adva nem okoz tartós és jelentős antitumor effektust, viszont jóval toxikusabb. A meztelen egereken végzett első kísérletünkben, amikor AN-207-el és AN-201-el kezeltük az egereket, az AN-207-es csoportban a kiindulási tumorvolumennek csak egy nagyon kicsiny részét, 13.8%-os növekedését tapasztaltuk a nyolc hét alatt, míg az AN-201-el kezelt csoportban 290%-kal, a kontroll csoportban 400%-kal nőtt a tumortérfogat a kiindulási értékhez képest. Az AN-207-el kezelt csoportban a kísérlet végén mért szérumban LH koncentráció nem tért el a kontrolltól, kizárva a lehetőséget egy, az antiproliferatív hatásban szereplő hormonális mechanizmusnak. Ezen felül, a változatlan szérumban

LH koncentráció azt is mutatja, hogy a citotoxikus LHRH analóg egyszeri i.v. injekciója nem okozza a gonadotroph sejtek permanens károsodását, amely lelet összhangban áll a fenti patkánykísérletekben nyert toxicitási adatainkkal. A szérums PSA koncentráció, amely adat közvetetten a tumorprogresszióra enged következtetni, szintén szignifikánsan csökkent az AN-207-el végzett terápiát követően, de nem csökkent a citotoxikus gyökkel való kezelés után. Fontos megjegyezni, hogy az AN-207-el történt terápia elhúzódó antitumor effektusa csak kisebb fokú és rövid ideig tartó toxicitással jársult, amit a nem szignifikáns testsúlyesés és az alacsony mortalitás is mutat. Az ugyanabban a moláris mennyiségben alkalmazott AN-201 viszont szignifikáns testsúlycsökkenést okozott, és ebben a csoportban a teljes fehérvérsejtszám és thrombocytaszám nagyfokú szuppressziója tartósabbnak bizonyult, ami a nagyobb mortalitást is magyarázza. Érdeemes megjegyezni, hogy a patkánykísérletben 150 nmol/kg dózisban adott AN-207 szignifikáns testsúlycsökkenést okozott, míg az egérikísérletben a 200 nmol/kg dózis jelentősebb toxicitástól mentesnek bizonyult. Ez egyrészt a két species ellenállóképesége közötti különbséggel magyarázható. Emellett az AN-207 állatonként adott eltérő abszolút mennyisége is fontos: a hozzávetőleg 200 g testsúlyú patkányok egyenként körülbelül 30 nmol, míg a 20 g-os egerek nagyjából 4 nmol AN-207-et kaptak. A két species citotoxikus szerekkel szembeni eltérő ellenállóképesége és a testsúlyuk közötti nagyságrendi különbség között nyilván nem lehet lineáris összefüggést találni. Ezt támasztja alá az a korábbi megfigyelésünk, miszerint az alkalmazott dózis még az adott speciesen belül sem emelhető a testsúly növekedésének arányában egy bizonyos szint fölé jelentős toxicitás kialakulása nélkül. Az AN-207-es konjugátnak az AN-201-es gyökhöz képesti erőteljesebb antiproliferatív hatása és a hozzá társuló lényegesen kisebb toxicitás valószínűleg az AN-207-es analóg PC-82 tumorsejtekhez való jóval szelektívebb eljuttatásának tulajdonítható. Ezt az elképzelést nagyban alátámasztja a nagy affinitású LHRH kötőhelyek PC-82 tumorsejteken való jelenléte (117),

amely adatot a kontroll állatokból származó tumormintákon végzett receptor assay-vel sikerült megerősítenünk.

A második kísérletben a [D-Lys⁶]LHRH carrier analógot teszteltük önmagában, valamint a citotoxikus gyökkel alkotott konjugátalan keverék formájában adva. A 200 nmol/kg dózisban adott [D-Lys⁶]LHRH, ami állatonként 6-9 μg peptidnek felel meg, hatástalan volt a tumornövekedésre valamint a kísérlet végén mért szérum LH és PSA koncentrációra. Ez összhangban van azzal a korábbi, meztelen egereken nyert adattal, miszerint a mikrokapszulák formájában jóval magasabb, 25 $\mu\text{g}/\text{nap}/\text{állat}$ dózisban adott [D-Trp⁶]LHRH csak 35 napos terápia után csökkentette szignifikánsan a PC-82 androgén-dependens tumor növekedését (117). A carrier analóg egyszeri 6-9 $\mu\text{g}/\text{állat}$ dózisa nyilvánvalóan túl kicsi volt bármilyen jelentős endokrin és/vagy onkológiai hatás eléréséhez.

A carrier és a citotoxikus gyök konjugátalan keveréke nem gátolta a tumornövekedést egyetlen mérési időpontban sem. A toxicitással összefüggő testsúlycsökkenés és mortalitás hasonló mértékű volt, mint az első kísérlet AN-201-el kezelt csoportjában. A szignifikáns antitumor hatás teljes hiánya, ellentétben az első kísérlet AN-201-el kezelt csoportjában az első 4 hét során tapasztalttal, a második kísérletben észlelt gyorsabb tumornövekedéssel van összefüggésben. Az első kísérlet AN-201-el kezelt csoportjában az első 4 hét alatt észlelt szignifikáns tumortérfogat-csökkenés valószínűleg a citotoxikus gyök által okozott jelentős és elhúzódó toxicitás következménye. A második kísérletben ugyanakkor, a hasonló mértékű toxicitás ellenére, valószínűleg az agresszívebb tumorproliferációnak köszönhetően (237.4 \pm 30.1 mm³ kiindulási értékről 6 hét alatt 614.7 \pm 237.7 mm³-re nőtt az átlag tumorumolymen) az általános toxicitás antiproliferatív hatása már nem volt elégséges a szignifikáns tumorumolymen-csökkenés előidézéséhez. A specifikus antitumor hatás hiánya miatt ezért az ebben a csoportban mért átlagos tumortérfogat nem tért el a kontrolltól.

Fenti adatok - egy korábbi eredménnyel összhangban - azt valószínűsítik, hogy az AN-207 konjugált citotoxikus LHRH analóg fokozott antiproliferatív aktivitása és csökkent toxicitása nem pusztán a komponensek véráramban való egyidejű jelenlétének (lásd konjugátlan keverék), hanem az AN-207 konjugát LHRH receptor-pozitív daganatsejtekhez való szelektív eljutásának a következménye (123).

Eredményeink azt mutatják, hogy az AN-207 citotoxikus LHRH analóg nagy szelektivitást mutat az LHRH receptorokat hordozó sejtek iránt, és kevésbé toxikus más sejtekre, míg a konjugát citotoxikus komponenseként szolgáló AN-201 nem-szelektíven károsítja a recipiens szervezet sejteit. Vizsgálatainkból kiderült, hogy az AN-207 citotoxikus LHRH analóg hypophysisre gyakorolt toxikus hatása kismértékű és reverzibilis. Fenti adatok alapján remélhető, hogy a konjugált citotoxikus LHRH analógok hatékonyak lehetnek egyes szervek, így a prosztata, emlő, uterus illetve ovárium LHRH receptor-pozitív daganatainak kezelésében.

4. Összefoglalás

Kísérleteink során a következő eredményeket kaptuk:

1. Az általunk használt LHRH antagonistá analógok (MI-1544 és SB-030) az *in vitro* hypophysis sejt szuperfúziós rendszerben kivédtek az exogén LHRH-nak mind az LH, mind az FSH release-t kiváltó hatását. Ez a gátlás az LHRH-indukálta FSH release nevezve több mint háromszor tartósabbnak bizonyult, mint az LHRH-indukálta LH release vonatkozásában. Az antagonisták az exogén LHRH adását megelőző alkalmazás (előinkubáció) esetén már 10-20-szor kisebb koncentrációban képesek voltak ugyanolyan antagonistá hatás elérésére, mint az LHRH-val egyidőben történő alkalmazás esetén.
2. Az MI-1544 LHRH antagonistá egyszeri injekciója (10 illetve 100 μg) OVX patkányokban az emelkedett szérúm LH koncentráció azonnali és tartós csökkenését eredményezte mindkét dózisban, míg a szérúm FSH koncentráció nem csökkent az injekciót követő első 6 órában, és szignifikáns csökkenést csak a nagyobb dózis eredményezett a kezelést követő 12. órától.
3. Az OVX patkányokban 21 napon keresztül krónikus kezelés napi 10 μg MI-1544 LHRH antagonistával a szérúm LH koncentráció jelentős csökkenését eredményezte, mialatt a szérúm FSH koncentráció nem csökkent. Ezzel egyidőben a hypophysis LH koncentrációja emelkedett, de az FSH koncentrációja nem változott szignifikánsan.
4. Az intakt patkányokban 21 napon keresztül krónikus kezelés napi 10 μg MI-1544 illetve

SB-030 LHRH antagonistákkal a szérumban LH koncentrációnak a detektálhatósági szint alá történő csökkenését eredményezte, mialatt a szérumban FSH koncentráció nem változott szignifikánsan. Ezalatt a hypophysisek LH koncentrációja szignifikánsan emelkedett, viszont az FSH koncentrációja szignifikánsan csökkent a 3. hét végére.

5. Az intakt patkányokban 21 napon keresztül krónikus kezelés napi 10 μg MI-1544 illetve SB-030 LHRH antagonistákkal a szérumban P koncentráció jelentős csökkenését idézte elő, de a szérumban E_2 koncentráció nem változott. Ugyanebben a kísérletben a patkányok szabályos ovarialis ciklusa megszakadt és az ovárium súlyok jelentősen csökkentek mindkét antagonistával kezelt csoportban. Az uterus súlyok kisfokban emelkedtek (MI-1544) illetve változatlanok maradtak (SB-030) a kezelés során. A hypophysis súlyok szintén nem változtak a kísérlet alatt.

6. OVX patkányok eminentia medianájában végzett ECS a szérumban LH és FSH koncentráció szignifikáns emelkedését idézte elő a stimulációt követő 10. és 60. percben. Az ECS-t 60 perccel megelőzően adott LHRH antagonistá (MI-1544, 100 μg) képes volt kivédeni az ECS által kiváltott LH release-t, de nem tudta kivédeni az ECS által indukált FSH release-t. Az ECS-val kezelt állatok eminentia medianájában, a stimulált területen nem találtunk LHRH immunopozitivitást, de a stimulált régiótól laterálisan LHRH-immunopozitív idegrostok voltak láthatók. Az állstimulált kontroll állatok eminentia medianájában gazdag LHRH-immunopozitív idegrost-hálózat volt megfigyelhető.

7. Az *in vitro* hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszerben az exogén LHRH-val, valamint a stimulált MBH fragmentumokat előzőleg perfundáló médiummal egyaránt ki tudunk váltani LH és FSH release-t diszpergált hypophysis sejtekből. Az MI-1544 LHRH antagonista

alkalmazása után exogén LHRH-val FSH release-t nem, LH release-t pedig csak csökkent mértékben tudtuk kiváltani. Ugyanakkor az LHRH antagonistá alkalmazását követően, amikor a hypophysis LHRH receptorait az antagonistával hatásosan blokkoltuk, a stimulált MBH fragmentumokon átáramló médiummal sikerült FSH release-t kiváltanunk, de nem tudtuk LH release-t indukálni.

8. Patkányban, az AN-207 citotoxikus LHRH analóg (150 nmol/kg) által előidézett testsúlycsökkenés nem tért el szignifikánsan az AN-201 citotoxikus gyök (75 nmol/kg) által kiváltott testsúlycsökkenéstől. *In vitro*, egy héttel a kezelés után, az AN-207-el injektált csoportból származó hypophysisek LH szekréciójának szelektív károsodását tapasztaltuk, amit a GH- illetve TSH szekretáló sejtek enyhe diszfunkciója kísért. A citotoxikus gyökkel kezelt csoportban ugyanakkor mindhárom sejtpopuláció jelentős funkciózavarát észleltük. Három héttel a kezelés után mindkét kezelt csoportban megnövekedett az LH szekréció a kontrollhoz képest, míg a GH és TSH szekréció 10%-nál kisebb eltérést mutatott a kontrollhoz viszonyítva. *In vivo*, az AN-207-el illetve AN-201-el történt kezelés után 2, 4 és 6 héttel, a releasing hormon stimulusk alkalmazása előtt mért bazális szérum LH, GH és TSH koncentrációkban nem volt szignifikáns különbség a kísérleti csoportok között. Az LHRH, GHRH és TRH stimulusokra adott specifikus LH, GH és TSH válaszok egyik kísérleti időpontban sem tértek el a kontrolltól az AN-207-el kezelt csoportban. Az AN-201-el kezelt csoportban a citotoxikus gyök injekciója után 2 héttel az LHRH stimulusra adott LH válasz 60. percében kisfokú csökkenést mértünk a kontrollhoz képest. A GHRH-ra illetve TRH-ra adott specifikus GH és TSH válaszok ugyanakkor ebben a csoportban sem tértek a kontrolltól 2, 4 és 6 héttel a kezelés után.

9. Meztelen egerekben, az AN-207 citotoxikus LHRH analóg (200 nmol/kg) egyszeri

injekciója nem okozott szignifikáns testsúlycsökkenést a kontrollhoz képest. Az AN-201 citotoxikus gyök ugyanebben a dózisban szignifikáns testsúlyesést idézett elő. Az AN-207-el kezelt csoportban a fehérvérsejtszám és thrombocytaszám kezelést követő csökkenése kisebb mértékű volt és rövidebb ideig tartott, mint az AN-201-el injektált csoportban. Az AN-207 konjugát a PC-82 humán prosztata karcinóma xenograftok növekedésének tartós és jelentős gátlását eredményezte az egerekben, míg a citotoxikus gyökkel történt kezelésnek a kísérlet második felében már nem volt szignifikáns antitumor hatása. A konjugát komponenseként szolgáló [D-Lys⁶]LHRH önmagában illetve a citotoxikus gyökkel alkotott konjugátatlan keverék formájában egyaránt hatástalan volt a PC-82 tumor növekedésére.

5. Új eredmények

A négyzetes zárójelekben levő számok az értekezés témakörében megjelent vagy közlésre elfogadott saját publikációkra utalnak.

- I. Fiziológias körülmények között az FSH szekréció szabályozásában nem az LHRH játsza a döntő szerepet [1,5,6,8-10].
- II. Az FSH release szabályozásában szerepet játszó, LHRH-tól eltérő faktor (vagy faktorok) megtalálható az eminentia medianában (FSH-RF?) és release-e kiváltható [1,8,9].
- III. Az AN-207 citotoxikus LHRH konjugát nagyfokú szelektivitást mutat az LHRH receptorokat hordozó sejtek iránt és kevésbé toxikus más sejtekre nézve, míg citotoxikus komponense, az AN-201 doxorubicin származék, nem-szelektíven károsítja a recipiens

szervezet sejtjeit [2,3,7].

IV. Az AN-207 kismennyiségű általános toxicitás mellett erőteljesen képes gátolni LHRH receptorokat hordozó daganat növekedését, ezáltal alkalmas lehet egyes, LHRH receptor-pozitív karcinómák célzott kemoterápiájára [2,7].

6. Köszönetnyilvánítás

Első helyen szeretném kifejezni hálám Dr. Kovács Magdolnának, az orvostudományok kandidátusának, aki témavezetőként éveken keresztül irányította kutatói munkám, s akivel együtt dolgozni megtiszteltetés volt számomra. Tudományos diákköri tevékenységem kezdetétől PhD fokozatom megszerzésének küszöbéig élveztem fáradhatatlan segítőkészségét és támogatását, melyért végtelen tisztelettel és köszönettel adózom.

Külön köszönet illeti Dr. Sétáló György és Dr. Flerkó Béla professzorokat is, az Anatómia Intézet jelen és volt igazgatóit, akik támogatásukkal, biztatásukkal segítettek, és szakmai tanácsaikkal egyben hozzájárultak jelen munka elkészültéhez. Ugyancsak köszönettel tartozom Dr. A. V. Schallynek, aki külföldi tanulmányutam során lehetővé tette számomra a preklinikai onkológiai kutatásokba való bekapcsolódást, amely munka szakmai fejlődésemet nagyban előremozdította.

Szeretném megköszönni a Pécsi Orvostudományi Egyetem Humán Anatómia Intézete illetve az Endocrine, Polypeptide and Cancer Institute (VA Medical Center, Tulane University, New Orleans) valamennyi dolgozójának segítségét, támogatását és szeretetét.

Végezetül köszönettel tartozom feleségemnek, aki mindvégig osztozott velem a kudarcban és együtt örült velem a sikereknek.

7. Hivatkozások

1. Green JD, Harris GW. The neurovascular link between the neurohypophysis and adenoypophysis. *J Endocrinol* 1947; 5:136-46.
2. Harris GW. Neural control of the pituitary gland. London: E Arnold 1955.
3. Schally AV. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science* 1978; 202:18-28.
4. Schally AV. Hypothalamic hormones: from neuroendocrinology to cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* 1994; 5:115-30.
5. Schally AV, Arimura A, Baba Y et al. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43:393-9.
6. Schally AV, Nair RMG, Redding TW et al. Isolation of the LH and FSH-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem* 1971; 246:7230-6.
7. Conn PM, Crowley WF Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 1991; 324:93-103
8. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 1978; 202:631-633.
9. Hazum E, Conn PM. Molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action. I. The GnRH receptor. *Endocr Rev* 1988; 9:379-386.
10. Conn PM, Huckle WR, Andrews Wv, McArdle CA. The molecular mechanism of action gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary. *Recent Prog Horm Res* 1987; 43:29-68.
11. Clapper DL, Conn PM. Gonadotropin-releasing hormone stimulation of pituitary gonadotroph cells produces an increase in intracellular calcium. *Biol Reprod* 1985; 32:269-278.
12. Bates MD, Conn PM. Calcium mobilization in the pituitary gonadotrope: relative roles of intra and extracellular sources. *Endocrinology* 1984; 115:1380-1385.
13. Hansen JR, McArdle CA, Conn PM. Relative roles of calcium derived from intra- and extracellular sources in dynamic luteinizing hormone release from perfused pituitary cells. *Mol Endocrinol* 1987; 1:808-815.
14. Conn PM, Marian J, McMillian M, Stern J, Rogers D, Hamby M, Penna A, Grant E. Gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary: a three step mechanism. *Endocr Rev* 1981; 2:174-185.
15. Conn PM, Chafouleas JG, Rogers D, Means AR. Gonadotropin releasing hormone stimulates calmodulin redistribution in rat pituitary. *Nature* 1981; 292:264-265.
16. Jenness L, Bronson D, Stumpf WE, Conn PM. Evidence for an association between calmodulin and membrane patches containing gonadotropin-releasing hormone-receptor complexes in cultured gonadotropes. *Cell Tissue Res* 1985; 239:311-315.
17. Harris CE, Staley D, Conn PM. Diacylglycerols and protein kinase C. Potential amplifying mechanism for Ca^{++} mediated gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release. *Mol Pharmacol* 1985; 27:532-536.
18. Conn PM, Ganong BR, Ebeling J, Staley D, Niedel JE, Bell RM. Synthesis and use of diacylglycerols as activators of protein kinase C in neuroendocrine tissue. *Methods Enzymol* 1986; 124:57-63.
19. McArdle CA, Conn PM. Hormone-stimulated redistribution of gonadotrope protein kinase C in vivo: dependence on Ca^{++} influx. *Mol Pharmacol* 1986; 29:570-576.
20. Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Schally AV et al. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43:1334-9.
21. Baba Y, Matsuo H, Schally AV. Structure of porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 44:459-63.
22. Matsuo H, Arimura A, Nair RMG, Schally AV et al. Synthesis of the porcine LH- and FSH-releasing hormone by the solid-phase method. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 45:822-.
23. Schally AV, Kastin AJ, Arimura A. Hypothalamic FSH and LH-regulating hormone: structure, physiology and clinical studies. *Fertil Steril* 1971; 22:703-21.
24. Schally AV, Kastin AJ, Coy DH. LH-Releasing hormone and its analogues: recent basic and clinical investigations. *Int J Fertil* 1976; 21:1-30.
25. Schally AV, Comaru-Schally AM. Hypothalamic and other peptide hormones. In: Holland JF, Frei III E, Bast Jr. RC, Kufe DE, Morton DL, Weichselbaum RR. (eds.) *Cancer medicine*, 4th Edition, pp. 1067-1086. Baltimore, MD: Williams and Wilkins Publishers, 1997.

26. Karten MJ, Rivier JE. Gonadotropin-releasing hormone analog design. Structure-function studies toward the development of agonists and antagonists: rationale and perspective. *Endocr Rev* 1986; 7:44-66.
27. Vickery BH. Comparison of the potential for therapeutic utilities with gonadotropin-releasing hormone agonists and antagonists. *Endocr Rev* 1986; 7:115-24.
28. Hall R, Gomez-Pan A. The hypothalamic regulatory hormones and their clinical applications. *Adv Clin Chem* 1976; 18:173-212.
29. Schally AV. LH-RH analogues in medicine. Keynote address, XIV World Congress of Fertility and Sterility, Caracas, Venezuela, November 22-27, 1992. In: Rodriguez Armas O, Baumgartner W, Burgos L, ed. *Progress in research practice*. Parthenon Publishing, Carnforth, UK 1994.
30. Schally AV, Radulovic S, Comaru-Schally AM. Experimental and clinical studies in hormone dependent cancers. In: Mazzaferrri E, Samaan N, eds. *Endocrine tumors*. Boston: Blackwell 1993; 49-73.
31. Fujino M, Yamazaki I, Kobayashi S et al. Some analogs of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) having intense ovulation-induction activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1974; 57:1248-58.
32. Konig W, Sandow J, Geiger R. Structure-function relationships of LH-RH/FSH-RH. In: Walter R, Meinhofer J, eds. *Peptides: chemistry, structure and biology. Proceedings of the Fourth American Peptide Symposium*. Ann Arbor, MI: Ann Arbor Science 1975; 883-88.
33. Dutta AS, Furr BJA, Giles MB et al. Potent agonist and antagonist analogues of luteinizing hormone containing an azaglycine residue in position 10. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 81:382-90.
34. Nestor Jr JJ, Ho TL, Simpson RA et al. Synthesis and biological activity of some very hydrophobic superagonist analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Med Chem* 1982; 25:795-801.
35. Emons G, Schally AV. The use of LHRH agonists and antagonists in gynecological cancers. *Human Reproduction* 1994; 9.
36. Sandow J, von Rechenberg W, Jerzabek G et al. Pituitary gonadotropins inhibition by a highly active analog of luteinizing hormone-releasing hormone. *Fertil Steril* 1978; 30:205-9.
37. Johnson B, Gendrich RL, White WF. Delay of puberty and inhibition of reproductive processes in the rat by a gonadotropin-releasing hormone agonist analog. *Fertil Steril* 1976; 27:853-60.
38. Corbin A, Beatrice CW, Tracy J et al. The anti-reproductive pharmacology of LHRH and antagonistic analogs. *Int J Fertil* 1978; 23:81-92.
39. Zorn JR, Boyer P, Guichard A. Never on a Sunday: programming for IVF-ET and GIFT. *Lancet* 1987; i:385-6.
40. Ayalon D, Ben-David M, Wohl R, et al. Induction of ovulation with [D-Trp6]LHRH combined with purified FSH in patients with polycystic ovarian disease. *Gynecol Endocrinol* 1988; 2:319-30.
41. Kovács M, Mező I, Flerkő B, Teplán I, Nikolics K. Long-term inhibition of ovulation by GnRH antagonist at low dose level *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 118: 351-355.
42. Bajusz S, Kovács M, Gazdag M, Bokser L, Karashima T, Csernus VJ, Janaky T, Guoth J, Schally AV. Highly potent analogs of luteinizing hormone-releasing hormone free of edematogenic effects. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:1637-1641.
43. Bajusz S, Csernus VJ, Janaky T et al. New antagonists of LHRH: II. Inhibition and potentiation of LHRH by closely related analogues. *Int J Peptide Prot Res* 1988; 32:425-35.
44. Ljungqvist A, Feng DM, Hook W et al. Antide and related antagonists of luteinizing hormone release with long action and oral activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:8236-40.
45. Rivier JE, Porter J, Rivier CL et al. New effective gonadotropin releasing hormone antagonists with minimal potency for histamin release *in vitro*. *J Med Chem* 1986; 29:1846-51.
46. Gonzalez-Barcena D, Vellido-Buenfil M, Garcia-Procel E et al. Inhibition of LH and FSH release in hypergonadotropic patients with new potent antagonists free of anaphylactoid reactions. *Abstract Endocrine Society Meeting*, Seattle, WA 1989: 1712.
47. Gonzalez-Barcena D, Vellido-Buenfil M, Guerra-Arguero L et al. Potent antagonistic analog of LH-RH (SB-75) inhibits LH, FSH and testosterone levels in human beings. *Abstract Endocrine Society Meeting*, Atlanta, GA 1990: 1318.
48. Pavlou SN, Wakefield G, Schlechter NL et al. Mode of suppression of pituitary and gonadal function after acute or prolonged administration of a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist in normal men. *J Clin Endoc Metab* 1989; 68: 446-54.
49. Gonzalez-Barcena D, Vellido-Buenfil M, Gomez-Orta F et al. Response to the antagonistic analog of LH-RH (SB-75) in patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatic cancer. *The Prostate* 1994; 24: 84-92.
50. Schally AV, Nagy A, Szepeshazi K, Pinski J, Halmos G, Armatis P, Miyazaki M, Comaru-Schally AM, Yano T, Emons G. LHRH analogs with cytotoxic radicals. In: Filicori M and Flamigni C, eds. *Treatment with*

- GnRH analogs: Controversies and Perspectives*, Carnforth: Parthenon Publishing 1996; 33-44.
51. McCann SM, Taleisnik S, Friedman HM. LH-releasing activity in hypothalamic extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960; 104:432-34.
 52. Mittler JC, Meites J. *In vitro* stimulation of pituitary FSH release by hypothalamic extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 1964; 117:309-13.
 53. Schally AV, Arimura A, Bowers CY et al. Hypothalamic neurohormones regulating anterior pituitary function. *Recent Prog Hormone Res* 1968; 24:497-590.
 54. Kastin AJ, Schally AV, Gual C et al. Stimulation of LH release in men and women by hypothalamic LH-releasing hormone purified from porcine hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 1969; 29:1046-50.
 55. Kastin AJ, Schally AV, Gual C et al. Administration of LH-releasing hormone to selected human subjects. *Am J Obstet Gyn* 1970; 108:177-82.
 56. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ et al. The gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates the secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones. *Science* 1971; 173:1036-8.
 57. Kastin AJ, Schally AV, Gual C et al. Release of LH and FSH after administration of synthetic LH-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34:753-6.
 58. McCann SM, Marubayashi U, Sun HQ, Yu WH. Control of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone release by hypothalamic peptides *Ann N Y Acad Sci* 1993; 687:55-59.
 59. Mizunuma H, Samson WK, Lumpkin MD, McCann SM. Evidence for an FSH-releasing factor in the posterior portion of the rat median eminence *Life Sci* 1983; 33:2003-2009.
 60. Marubayashi U, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Altered gonadotropin and prolactin release induced by median eminence (ME) lesions and pharmacological manipulation of prolactin release: Further evidence for separate hypothalamic control of FSH and LH release *Brain Res Bull* 1989; 23 (3):193-200.
 61. Lumpkin MD, Moltz JH, Yu WH, Samson WK, McCann SM. Purification of FSH-releasing factor: its dissimilarity from LHRH of mammalian, avian, and piscine origin *Brain Res Bull* 1987; 18 (2):175-178.
 62. Wenger T, Rettori V, Snyder GD, Dalterio S, McCann SM. Effects of delta-9- tetrahydrocannabinol on the hypothalamic-pituitary control of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in adult male rats *Neuroendocrinology* 1987; 46: 488-493.
 63. Lopez FJ, Meade EH, Negro-Vilar A. Endogenous galanin modulates the gonadotropin and prolactin proestrous surges in the rat *Endocrinology* 1993; 132 (2):795-800.
 64. Sakurai H, Adams BM, Adams TE. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-like stimuli sufficient to induce follicular growth and ovulation in ewes passively immunized against GnRH *Biol Reprod* 1992; 47:177-184.
 65. Pau K-YF, Gliessman PM, Oyama T, Spies HG. Disruption of GnRH pulses by anti-GnRH serum and phentolamine obliterates pulsatile LH but not FSH secretion in ovariectomized rabbits *Neuroendocrinology* 1991; 53:382-391.
 66. Ruiz E, Osorio R, Osorio E, Ortega E, Ortega E. Modulation of LH secretion by progesterone and estradiol after naloxone injection in the median eminence *Biochem Mol Biol Int* 1993; 30 (6):1093-1100.
 67. Kalra PS, Ajika K, Krulich L, Fawcett CP, Quijada M, McCann SM. Effects of hypothalamic and preoptic electrochemical stimulation on gonadotropin and prolactin release in proestrous rats. *Endocrinology* 1971; 88:1150-8.
 68. Chappel SC, Barraclough CA. Hypothalamic regulation of pituitary FSH secretion *Endocrinology* 1976; 98:927-935.
 69. Bishop W, Kalra PS, Fawcett CP, Krulich L, McCann SM. The effects of hypothalamic lesions on the release of gonadotropins and prolactin in response to estrogen and progesterone treatment in female rats. *Endocrinology* 1972; 91:1404-10.
 70. Lumpkin MD, McDonald JK, Samson WK, McCann SM. Destruction of the dorsal anterior hypothalamic region suppresses pulsatile release of follicle stimulating hormone but not luteinizing hormone *Neuroendocrinology* 1989; 50:229-235.
 71. Kalra SP. Ovarian steroids differentially augment pituitary FSH release in deafferented rats. *Brain Res* 1976; 114:541-544
 72. Berardo PV, De Paolo LV. Different neuroendocrine mechanisms regulate the acute pituitary follicle-stimulating hormone response to orchidectomy and ovariectomy *Neuroendocrinology* 1986; 43:511-518.
 73. Levine JL, Duffy MT. Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats *Endocrinology* 1988; 122:2211-2221.
 74. Vigh S, Schally AV. Interactions between hypothalamic peptides in a superfused pituitary cell system *Peptides* 1984; 5 (Suppl. 1): 241-247.

75. Csernus V, Schally AV, The dispersed cell superfusion system. In: Greenstein B, ed. *Neuroendocrine Research Methods*, London: Harwood Academic Publishers, 1991: 66-102.
76. Turgeon J, Barracough ChA. Temporal patterns of LH release following graded preoptic electrochemical stimulation in proestrus rats *Endocrinology* 1973; 92:755-761.
77. Berod A, Hartman B, Pujol JF. Importance of fixation in immunohistochemistry: Use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine hydroxylase *J Histochem Cytochem* 1970; 29:844-850.
78. Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, and Mayer HG. The unlabeled antibody enzyme method of immunochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes *J Histochem Cytochem* 1970; 81:315-333.
79. Csernus V. Antibodies of high affinity and specificity for radioimmunological determination of progesterone, testosterone and estradiol-17 β . In: Görög, S. ed. *Advances in steroid analysis* 1982; 171-177. Akadémiai Kiadó, Budapest.
80. Kinder JE, Adams TE, Nett TM, Coy D, Schally AV, Reeves JJ. Serum gonadotropin concentrations and ovarian response in ewes treated with analogs of LH-RH/FSH-RH *J Anim Sci* 1976; 42:1220-1226.
81. Kovács M, Bajusz S, Schally AV. Comparison between in vitro and in vivo effects of superactive LH-RH antagonists. *Neuroscience* 1987; 22 (Suppl): S157, 468.
82. Csernus VJ, Schally AV. Evaluation of luteinizing hormone-releasing hormone antagonistic activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:5759-5763.
83. Loumaye E, Wynn PC, Coy D, Catt KJ. Receptor-binding properties of gonadotropin-releasing hormone derivatives. *J Biol Chem* 1984; 259:12663-12671.
84. Kovács M, Mező I, Sepródi J, Csernus VJ, Teplán I, Flerkó B. Effects of long-term administration of a superactive agonistic and an antagonistic GnRH analog on the pituitary-gonad system. *Peptides* 1989; 10:925-931.
85. Smith A, Vale WW. Desensitization to gonadotropin-releasing hormone observed in superfused pituitary cells on cytodex beads. *Endocrinology* 1981; 106:752-759.
86. Franchimont P, Hazez-Hagelstein MT, Jaspard JM, Charlet-Renard Ch, Demoulin A. Inhibin and related peptides: Mechanism of action and regulation of secretion. *J Steroid Biochem* 1989; 32:193-197.
87. DePaolo LV, Shimonaka M, Ling N. Regulation of pulsatile gonadotropin secretion by estrogen, inhibin, and follistatin (activin-binding protein) in ovariectomized rats. *Biol Reprod* 1992; 46:898-904.
88. Hall JE, Brodie TD, Badger TM, Rivier J, Vale W, Conn PM, Schoenfeld D. Evidence of differential control of FSH and LH secretion by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the use of a GnRH antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:524-531.
89. Sharpe KL, Bertero MC, Lyon BP, Muse KN, Vernon MV. Follicular atresia and infertility in rats treated with a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Endocrinology* 1990; 127:25-31.
90. Ortega E, Ruiz E, Rodriguez E, Frias J. Effect of corticotropin releasing factor (CRF) in the median eminence on gonadotropins in ovariectomized rats with or without steroid priming: dose-response study *Neurochem Res* 1994; 19:1225-1230.
91. Rettori V, Gimeno MF, Karara A, Gonzalez MC, McCann SM. Interleukin 1 α inhibits prostaglandin E₂ release to suppress pulsatile release of luteinizing hormone but not follicle-stimulating hormone *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2763-2767.
92. Yu WH, McCann SM. Feedback of follicle-stimulating hormone to inhibit luteinizing hormone and stimulate follicle-stimulating hormone release in ovariectomized rats *Neuroendocrinology* 1991; 53:453-459.
93. DePaolo LV. Differential regulation of pulsatile luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone secretion in ovariectomized rats disclosed by treatment with a LH-releasing hormone antagonist and phenobarbital *Endocrinology* 1985; 117: 1826-1833.
94. Bogdanove EM, Gay VL. Studies on the disappearance of LH and FSH in the rat; A quantitative approach to adenohipophysial secretory kinetics. *Endocrinology* 1969; 84: 1118-1131.
95. Yu WH, Karanth S, Walczewska A, Sower SA, McCann SM. A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:9499-9503.
96. Limonta P, Dondi D, Moretti RM, Maggi R, Motta M. Antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists on the human prostatic cancer cell line LNCaP. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75:207-212.
97. Qayum A, Gullick W, Clayton RC, Sikora K, Waxman J. The effects of gonadotrophin releasing hormone analogues in prostate cancer are mediated through specific tumor receptors. *Br J Cancer* 1990; 62:96-99.
98. Miller WR, Scott WN, Morris R, Fraser H, Sharpe RM. Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature* 1985; 313:231-233.
99. Eidne KA, Flanagan CA, Harris NS, Millar RP. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-binding sites in

- human breast cancer cell lines and inhibitory effects of GnRH antagonists. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:425-432.
100. Fekete M, Witliff JL, Schally AV. Characteristics and distribution of receptors for [D-Trp⁶]luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, epidermal growth factor, and sex steroids in 500 biopsy samples of human breast cancer. *J Clin Lab Anal* 1989; 3:137-147.
101. Emons G, Ortmann O, Becker M, Irner G, Springer B, Laun R, Hölzel F, Schulz K-D, Schally AV. High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 1993; 53:5439-5446.
102. Emons G, Schröder B, Ortmann O, Westphalen S, Schulz K-D, Schally AV. High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:1458-1464.
103. Raghavan D: Non-hormone chemotherapy for prostate cancer: principles of treatment and application to the testing of new drugs. *Semin Oncol* 1988; 15:371-389.
104. Rangel C, Matzkin H, Soloway MS: Experience with weekly doxorubicin (adriamycin) in hormone-refractory stage D2 prostate cancer. *Urology* 1992; 39:577-582.
105. Tormey DC, Gray R, Gilchrist K, Grage T, Carbone PP, Wolter J, Woll JE, Cummings FJ, Adjuvant chemohormonal therapy with cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil, and prednisone (CMFP) or CMFP plus tamoxifen compared with CMF for premenopausal breast cancer patients. *Cancer* 1990; 65:200-206.
106. Bonadonna G. From adjuvant to neoadjuvant chemotherapy in high-risk breast cancer: the experience of the Milan Cancer Institute. Steiner Award Lecture 1992. *Int J Cancer* 1993; 55:1-4.
107. Varga JM. Hormone-drug conjugates. *Methods Enzymol* 1985; 112:259-269.
108. Varga JM, Asato N, Lande S, Lerner A. Melanotropin-daunomycin conjugates shows receptor-mediated cytotoxicity in cultured murine melanoma cells. *Nature* 1977; 267:56-58.
109. Tritton TR, Yee G. The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science* 1982; 217:248-250.
110. Tritton TR. Cell surface actions of adriamycin. *Pharmacol Ther* 1991; 49:293-309.
111. Fekete M, Redding TW, Comaru-Schally AM, Pontes AE, Connelly RW, Srikalovic G and Schally AV: Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone, somatostatin, prolactin and epidermal growth factor in rat and human prostate cancers and in benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1989; 14:191-208.
112. Nagy A, Armatis P and Schally AV: High yield conversion of doxorubicin to 2-pyrrolinodoxorubicin, an analog 500-1000 times more potent: Structure-activity relationship of daunosamine-modified derivatives of doxorubicin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2464-2469.
113. Nagy A, Schally AV, Armatis P, Szepeshazi K, Halmos G, Kovacs M, Zarandi M, Groot K, Miyazaki M, Jungwirth A and Horvath J: Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:7269-7273.
114. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.
115. Hoehn W, Schroeder FH, Riemann JF, Joebis AC, Hermanek P. Human prostatic adenocarcinoma: Some characteristics of a serially transplantable line in nude mice (PC-82). *The Prostate* 1980; 1:95-104.
116. van Steenbrugge GJ, Schroeder FH. Characterization and application of PC-82, a hormone-dependent, transplantable tumor line, derived from a human prostatic adenocarcinoma. *Progress in Cancer Research and Therapy* 1984; 31:453-465.
117. Redding TW, Schally AV, Radulovic S, Milovanovic S, Szepeshazi K, Isaacs JT. Sustained release formulations of luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75 inhibit proliferation and enhance apoptotic cell death of human prostate carcinoma (PC-82) in male nude mice. *Cancer Res* 1992;52:2538-2544.
118. Halmos G, Schally AV, Pinski J, Buenfil MV, Groot K. Down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist Cetrorelix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2398-2402.
119. Munson PJ, Rodbard D. LIGAND; a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems. *Anal Biochem* 1980; 107: 220-239.
120. Pigram WJ, Fuller W, Hamilton LD. Stereochemistry of intercalation: interaction of daunomycin with DNA. *Nat New Biol* 1972; 235(53):17-19
121. Moore HW. Bioactivation as a model for drug design bioreductive alkylation. *Science* 1977; 197:527-532.
122. Shalet SM. Endocrine sequelae of cancer therapy. *Eur J Endocrinol* 1996; 135:135-143.
123. Miyazaki M, Nagy A, Schally AV, Lamharzi N, Halmos G, Szepeshazi K, Groot K, Armatis P. Growth inhibition of human ovarian cancers by cytotoxic analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *J Natl*

Cancer Inst 1997; 89:1803-1809.

8. Az értekezés témakörében megjelent vagy közlésre elfogadott publikációk jegyzéke

Folyóiratcikkek:

1. **Koppán M., Kovács M., Mező I., Flerkó B.:** Electrochemical stimulation of the median eminence evokes FSH but not LH release after LHRH antagonist treatment *in vivo* and *in vitro*. *J Neuroendocrinol* 1998; 10:231-236.
2. **Koppán M., Nagy A., Schally A. V., Plonowski A., Halmos G., Arencibia J., Groot K.:** Targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207 inhibits the growth of PC-82 human prostate cancer in nude mice. *The Prostate* 1998; (accepted)
3. **Kovács M., Schally AV, Nagy A., Koppán M., Groot K.:** Recovery of pituitary function after treatment with a targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1420-1425.
4. **Mező I., Seprődi J., Vincze B., Pályi I., Kéri Gy., Vadász Zs., Tóth G., Kovács M., Koppán M., Horváth J.E., Kálnay A., Teplán I.:** Synthesis of GnRH analogs having direct antitumor and low LH-releasing activity. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1996; 2:33-40.
5. **Kovács M., Koppán M., Mező I., Teplán I.:** Diverse effects of a potent LH-RH antagonist on the LH and FSH release. *Acta Biol Hung* 1994; 45:285-296.

6. Kovács M., Koppán M., Mező I., Teplán I., Flerkó B.: Antioviulatory doses of antagonists of LH-RH inhibit LH and progesterone but not FSH and estradiol release. *J Neuroendocrinol* 1993; 5:603-608.

Előadáskivonatok:

7. Koppán M., Schally A.V., Nagy A., Halmos G., Arencibia J.: Cítotoxikus LHRH analóg gátolja az LHRH receptor-pozitív PC-82 prosztata karcinóma növekedését *in vivo*. *A Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XVII. Kongresszusa*, Pécs, 1998.

8. Koppán M., Kovács M., Mező I., Teplán I., Flerkó B.: Effects of a potent LHRH antagonistic analog on the FSH release in rats. *4th World Congress of Gynecological Endocrinology*, Madonna di Campiglio, Italy, 1995. *J Gynecological Endocrinol* 1995; 9(Supp11): P6.

9. Koppán M., Kovács M.: LH-RH antagonista analóg hatása az eminentia mediana elektrokémiai stimulációját követő LH és FSH release-re. E-8, p 17. *Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XV. Kongresszusa*, Budapest, 1994.

10. Kovács M., Koppán M., Mező I., Teplán I., Flerkó B.: Effects of new highly potent GnRH antagonists on the pituitary-gonad system. *Satellite Symposium on Gonadotropins, GnRH, GnRH Analogs and Gonadal Peptides*, Paris, 1992.

9. Rövidítések jegyzéke

AHA	elülő hypothalamikus area
DAG	diacylglycerol
DC	egyenáram
DCC	dextrane-coated charcoal
E ₂	ösztadiol
ECS	elektrokémiai stimuláció
FSH	follikulus stimuláló hormon
FSH-RF	follikuls stimuláló hormon-releasing faktor
GH	növekedési hormon
GHRH	növekedési hormon-releasing hormon
LH	luteinizáló hormon
LHRH	luteinizáló hormon-releasing hormon
MBH	mediobazális hypothalamus
min	perc
OVX	ovariektomia
P	progeszteron
PBS	phosphate-buffered saline
PSA	prosztata specifikus antigén
RIA	radioimmunoassay
SEM	az átlag standard hibája
TDT	tumortérfogat megkésereződési idő
TRH	tyreotroph hormon-releasing hormon
TSH	pajzsmirigy-stimuláló hormon
WBC	teljes fehérvérsejtszám