

Bioaktív molekulák alapvető sejtélettani folyamatokra kifejtett hatásának vizsgálata emlős és egysejtű rendszerben

Doktori értekezés

Dr. Lajkó Eszter

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kőhidai László, egyetemi docens, C.Sc., habil.

Hivatalos bírálók: Dr. Miklya Ildikó, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Szeberényi Szabolcs, ny. tudományos
főmunkatárs, C.Sc.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Schaff Zsuzsa, egyetemi tanár, D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóthfalusi László, egyetemi docens,
Ph.D., habil.
Dr. Szabó Gábor, tudományos főmunkatárs,
Ph.D.

Budapest

2013

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	6
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1. Sejtélettani folyamatok	7
1.1.1. Sejt – extracelluláris mátrix adhesió	8
1.1.2. Sejt migráció – kemotaxis.....	8
1.1.2.1. Adhesió és kemotaxis biológiai és klinikai jelentősége.....	12
1.1.2.1.1. Adhesió és kemotaxis tumorprogresszióban betöltött szerepe.....	15
1.2. Bioaktív anyagok – extracelluláris szignálmolekulák	16
1.2.1. Emlősökre jellemző szignál molekulák jelentősége egysejtű szinten.....	18
1.2.1.1. <i>Tetrahymena pyriformis</i>	18
1.2.2. Az adhesió és kemotaxis gyógyszeres befolyásolásának lehetőségei	20
1.2.3. Célzott terápia	22
1.2.4. R-deprenyl és származékai.....	24
1.2.4.1. R-deprenyl farmakológiai hatásai.....	24
1.2.4.1.1. Monoamin-oxidáz B gátló hatás.....	25
1.2.4.1.2. R-deprenyl központi idegrendszeri hatásai – „neuro rescue” hatás.....	25
1.2.4.1.3. R-deprenyl perifériás hatásai	26
1.2.4.2. R-deprenyl metabolizmusa	27
1.2.4.2.1. Az R-deprenyl metabolitjainak farmakológiai hatásai	28
1.2.4.3. Szintetikus származékok	29
1.2.5. GnRH-III molekulacsalád	30
1.2.5.1. Természetes GnRH analógok.....	30
1.2.5.2. GnRH receptorok	31
1.2.5.2.1. GnRH peptidek tumorellenes hatása	32
1.2.5.2.2. GnRH peptidek adhesióra és migrációra kifejtett hatásai	34
1.2.5.3. GnRH-III és származékai	34
1.2.5.3.1. Tumorellenes hatóanyagot tartalmazó GnRH alapú konjugátumok	35
1.2.5.3.2. Citotoxikus GnRH-III konjugátumok.....	37
2. CÉLKITŰZÉSEK	39
3. MÓDSZEREK.....	42
3.1. Felhasznált anyagok.....	42
3.1.1. R-deprenyl és származékai.....	42
3.1.2. Hormonok és szignál molekulák.....	42
3.1.3. GnRH származékok	42

3.2. Modell-sejtek és tenyésztési körülményeik	43
3.2.1. <i>Tetrahymena pyriformis</i> sejt kultúra	43
3.2.2. Magasabb rendűekből származó sejt vonalak	43
3.2.2.1. Mono Mac 6 humán monocita sejt vonal	43
3.2.2.2. LM2 egér emlő adenokarcinóma sejt vonal	44
3.3. Kemotaxis mérő módszer	44
3.3.1. Két-kamrás kapilláris kemotaxis assay	44
3.3.2. Módosított Boyden-kamrás kemotaxis assay	44
3.4. Úszási paraméterek vizsgálata (tracking analízis)	45
3.5. Jelátviteli útvonalak vizsgálata	46
3.5.1. Foszfolipáz C- γ enzim aktiváció vizsgálata	46
3.5.2. Foszfátidil-inozitol 3-kináz (PI3K) útvonal gátlása	47
3.6. Impedimetrián alapuló adhézio mérő módszerek	47
3.6.1. xCELLigence rendszer	48
3.6.2. ECIS technika	50
3.7. Prolifерáció és citotoxicitás vizsgálat	51
3.8. CASY TT készülék	51
3.9. Hormontartalom meghatározás <i>Tetrahymena</i> sejtekben	53
3.10. Hormonális imprinting vizsgálatok	53
3.11. Statisztikai analízis	54
4. EREDMÉNYEK	55
4.1. R-deprenyl és származékai	55
4.1.1. A szerotonin, mint MAO szubsztrát, hatásai a <i>Tetrahymena pyriformis</i> modell-sejt élettani folyamataira	55
4.1.1.1. A szerotonin rövidtávú hatásai <i>Tetrahymena</i> modell-sejten	55
4.1.1.2. Szerotoninnal kiváltott imprinting hosszú távú hatása a <i>Tetrahymena</i> sejtek életfunkcióira	58
4.1.2. R-deprenyl és származékainak alapvető sejtélettani hatásai <i>Tetrahymena</i> <i>pyriformis</i> modell-sejten	63
4.1.2.1. R-deprenyl hatása a <i>Tetrahymena</i> sejtek szerotonin tartalmára	63
4.1.2.2. R-deprenyl és származékainak kemotaktikus hatása	64
4.1.3. R-deprenyl és derivátumainak sejtbiológiai hatása magasabb rendű modell-sejteken	66
4.1.3.1. Deprenyl származékok MM6 monocita sejteken mutatott hatásai	67
4.1.3.1.1. Sejtadhézio befolyásolása	67

4.1.3.1.2. Kemotaxis vizsgálatok.....	69
4.1.3.1.3. Sejtosztódásra kifejtett hatás	71
4.1.3.2. Deprenyl származékok hatása LM2 adenokarcinóma sejten	72
4.1.3.2.1. Sejtadhézió befolyásolása.....	73
4.1.3.2.2. Sejtmigráció vizsgálat.....	76
4.2. GnRH peptidek és különböző magasabb rendűekre jellemző hormonok.....	78
4.2.1. <i>Tetrahymena pyriformis</i> modell-sejten kifejtett hatások	78
4.2.1.1. Természetes és szintetikus GnRH peptidek hatása <i>Tetrahymena pyriformis</i> kemotaktikus aktivitására	78
4.2.1.1.1. Kemotaktikus jelátviteli útvonalak vizsgálata.....	80
4.2.1.2. GnRH-III származékok hatása a <i>Tetrahymena</i> úszási viselkedésére (kemokinetikus aktivitására)	82
4.2.1.3. A GnRH-III származékok hatása a <i>Tetrahymena pyriformis</i> endogén hormontermelésére	84
4.2.2. GnRH-III származékok és hatóanyag-tartalmú konjugátumaik sejtbioológiai hatása MM6 modell-sejteken	86
4.2.2.1. Irányító hatással rendelkező GnRH-III származékok vizsgálata	86
4.2.2.1.1. Sejtadhézióra kifejtett hatás.....	87
4.2.2.1.2. Kemotaktikus hatás	89
4.2.2.1.3. Kemotaktikus jelátviteli útvonalak vizsgálata.....	91
4.2.2.2. GnRH-III alapú, tumorelles hatóanyagot tartalmazó konjugátumok hatása MM6 modell-sejtekre	92
4.2.2.2.1. Sejtadhézió befolyásolása.....	95
4.2.2.2.2. Kemotaxis vizsgálatok.....	99
4.2.2.2.3. Antiproliferatív és citotoxicitási vizsgálatok.....	101
5. MEGBESZÉLÉS.....	106
5.1. R-deprenyl és származékai	107
5.1.1. A MAO szubsztrát szerotonin és a MAO-B gátló R-deprenyl származékainak sejtelettani hatásai <i>Tetrahymena pyriformis</i> modell- sejten	107
5.1.1.1. A szerotonin rövidtávú hatásai	108
5.1.1.2. Szerotonin imprinting.....	110
5.1.1.3. A deprenyl származékok sejtelettani hatásai <i>Tetrahymena</i> sejteken	113
5.1.2. R-deprenyl és derivátumainak hatása magasabb rendű modell-sejteken	114
5.1.2.1. Kemotaxis-adhéziós arány	117

5.2. GnRH-III peptid-származékok	120
5.2.1. Természetes és szintetikus GnRH peptidek hatása Tetrahymena sejteken	120
5.2.1.1. GnRH peptidek kemotaktikus hatás	121
5.2.1.1.1. GnRH származékok által kiváltott kemotaktikus jelátvitel	122
5.2.1.2. GnRH peptidek kemokinetikus hatása	123
5.2.1.3. GnRH-III származékok hatása a Tetrahymena hormontartalmára.....	123
5.2.2. GnRH-III származékok és hatóanyag-tartalmú konjugátumaik sejtbiológiai hatása MM6 modell-sejteken	125
5.2.2.1. Irányító hatással rendelkező GnRH-III származékok hatása	125
5.2.2.1.1. GnRH származékok által kiváltott kemotaktikus jelátvitel	128
5.2.2.1.2. Kemotaxis-adhéziós arány a GnRH peptidek esetén.....	129
5.2.2.2. GnRH-III alapú, tumorellenes hatóanyagot tartalmazó konjugátumok hatása MM6-modell sejteken	130
6. KÖVETKEZTETÉSEK	137
7. ÖSSZEFOGLALÁS	141
8. SUMMARY	142
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	143
10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	163
11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	165

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ac	Acetilcsoport	LM2	Egér emlő adenokarcinóma sejtvonal
ACTH	Adrenokortikotrop hormon	LY	LY294002
AN-152	Doxorubicin tartalmú [D-Lys ⁶]-GnrH-I alapú konjugátum	Lys⁸	8. Pozícióban lévő lizin aminosav
Aoa	Aminooxiecetsav	M	Moláris koncentráció, mol/liter
BSA	Marha szérum albumin, bovine serum albumin	MAO-A/B	Monoamin-oxidáz A és B izotípus
BT	Bacto Tryptone tápoldat	MM6	Mono Mac 6 humán monocita sejtvonal
CAR	Kemotaxis (chemotaxis) - adhéziós (adhesion) arány (ratio)	MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid
CYP450	Citokróm P450	Mtx	Metotrexát
Dau	Daunorubicin, daunomicin	N-MeSer	N-metilszerin
DDS	Drug Delivery System, hatóanyag-szállító rendszer	p-fluoro	Para helyzetű fluoro csoport
DMSO	Dimetil-szulfoxid	PBS	Foszfát puffer
Dox	Doxorubicin	PI3K	Foszfatidil-inozitol 3 kináz
ECIS	Electrical Cell-substrate Impedance Sensing	PLC	Foszfolipáz C
ECM	Extracelluláris mátrix	SD	Standard deviáció
FCS	Magzati borjúsérum	Szer	Szerotonin
FSH	Follikuluszstimuláló hormon	t_{1/2}	Maximális impedancia 50 %-ának eléréséhez szükséges idővel
GFLG	Enzim labilis spacer szekvencia	T3	Trijódtrionin
Glp	Piroglutaminsav	Tort	Tortuosity, tekervényesség
GnRH	Gonadotropint felszabadító (releasing) hormon	TSH	Tireotropin, tireoidea-stimuláló hormon
GnRH-R	Gonadotropint felszabadító (releasing) hormon receptor	vel	Átlagsebesség (velocity)
Inh. ind.	Gátlási index	Via	Viabilitás
Ktx. ind.	Kemotaktikus index	YRRL	Enzim labilis spacer szekvencia
LH	Luteinizáló hormon	Z	Impedancia
LL-oldat	Losina-Losinsky inorganikus oldat	Δt	Idő intervallum

1. BEVEZETÉS

1.1. Sejtélettani folyamatok

A sejt és környezete között fennálló állandó kommunikációs kapcsolat végeredményben a sejtek, ligand-receptor kölcsönhatáson alapuló, fiziológias folyamatainak megváltozásában realizálódik. Az egysejtű életforma megjelenésének kezdeteitől a különböző környezeti ingerek hatása az eukarióta sejt igen sokrétű élettani reakciójában nyilvánulhat meg. Megváltozhat például a sejt hormonszintézise, metabolikus aktivitása, osztódása vagy egy kémiai inger a sejtek elmozdulását indukálhatja. A magasabb rendűek életében a sejtek elmozdulása, a hozzá kötődő társjelenségekkel (adhézió, fagocitózis) együtt, számos végrehajtó mechanizmus központi eleme. A szignalizáció molekuláris evolúciójában (Lenhoff-féle szignálszelekciós elmélet) is jelentős szerepet tulajdonítanak ezeknek a sejtfiziológiai jelenségeknek. A szignálmolekulák és receptoraik kialakulása azon táplálékmolekulák szelekciós folyamataként értelmezhető, melyek specifikus sejtélettani folyamatok (pl. kemotaxis, proliferáció, hormon szintézis) modulálására is képesek voltak [1].

A sejtélettani folyamatok, elsősorban a sejtadhézió és migráció szerkezeti és funkcionális megismerése elengedhetetlen az eukarióta sejtek működésének és szabályozó folyamatainak minél részletesebb megértéséhez [2]. A sejt migráció egy univerzális folyamat. A legtöbb sejt az élete során egy adott időpontban jelenlévő specifikus ingerre irányított elmozdulással válaszol, értve ez alatt a primitív prokarióta vagy eukarióta egysejtű élőlények fény és táplálékkereső mozgását ugyanúgy, mint a szöveti kötélekben élő sejtek jól szervezett migrációját fiziológias (pl. embriogenezis) vagy patológias folyamatok során (pl. metasztázis képzés) [3]. A migráció létrejöttének, a sejtek szöveti szintű szerveződésének és a sejt-sejt és sejt-környezet közötti kommunikációs hálózatok szerveződésének (sejt belseje felé irányuló és az ellenkező irányú kémiai/mechanikus szignálok közvetítése – integrinek; másodlagos hírvivők passzív diffúziója – réskapcsolat) elengedhetetlen feltétele a sejtadhézió, a sejtek egymáshoz és az extracelluláris mátrix (ECM) elemeihez való kapcsolódása [2, 4].

1.1.1. Sejt – extracelluláris mátrix adhézió

A dinamikusan változó sejt – extracelluláris mátrix kapcsolat kialakításában, az ECM komponensei (pl. kollagén rostok, proteoglikánok, fibronectin, laminin), a plazmamembránhoz asszociált sejtfelszíni adhéziós proteinek, valamint a citoskeleton elemeit a membrán-fehérjékhez horgonyzó kapcsolófehérjék vesznek részt [5].

Az α és β láncból felépülő integrinek a sejtfelszíni ECM komponenseket kötő adhéziós fehérjék közül a legjelentősebb csoportot képviselik. A heterodimer felépítésű transzmembrán fehérjék többsége az extracelluláris doménjeik révén, bivalens kationok jelenlétében, képes az RGD (argininil-glicil-aszparátát) aminosav-szekvenciát tartalmazó ECM makromolekulák (pl. kollagén, laminin, fibronectin, vitronectin), szolubilis plazmafehérjék (pl. szolubilis fibronectin, fibrinogén), valamint sejtfelszíni receptorok (növekedési faktorok, mátrix bontó enzimek receptorai) felismerésére és kötésére [2, 5, 6]. Az ECM-fehérje kötését követően az integrin molekulák citoplazmatikus doménjei adaptor fehérjék közvetítésével (vinkulin, paxilin, α -aktinin) az aktin filamentumokhoz kapcsolódnak. Az így kialakult – valójában több mint 150 fehérjét tartalmazó – multimolekuláris komplexet nevezzük fokális kontaktusnak, vagy fokális adhézióknak [4]. Az integrinek, a fokális adhézió részeként, azon túl, hogy biztosítják a sejt számára a fizikai horgonyt az extracelluláris makromolekulák és az aktin filamentumok között, fontos szerepet játszanak a mechanikai és kémiai szignálok kétirányú közvetítésében. A sejtek kitapadása során az extracelluláris térből a sejt belseje felé irányuló jelek (outside-in signaling) az integrinek intracelluláris egységéhez kapcsolódó jelátviteli enzimek (pl. fokális adhéziós kináz - FAK) aktivációja révén a citoskeletonális átrendeződésben és következményesen a sejtmozgás szabályozásában játszanak szerepet. A citoplazmából a sejten kívüli térbe irányuló szignálok (inside-out signaling) megváltoztatják az integrinek konformációját és így az integrin – ECM-fehérje kötődés dinamikus össze- és szétkapcsolásán keresztül befolyásolhatják a kialakult adhézió erősségét a sejt aktuális állapotának megfelelően [2, 4-6].

1.1.2. Sejt migráció – kemotaxis

A környezetben jelenlévő kémiai stimulusok alapvetően két módon befolyásolhatják a sejtek motilitását. A kemokinetikus reakció során a sejtek random, nem irányított módon változtatják mozgási jellemzőiket (sebesség, irányváltások

frekvenciája) válaszolva az egyenletes koncentrációban jelenlévő kémiai szignálra. Koncentráció gradiens mentén ható kémia anyagok a sejtek irányított mozgását, kemotaxisát váltják ki. Ha az indukált vektoriális mozgás a növekvő gradiens irányába mutat, akkor ún. kemoattraktáns hatású anyagról beszélünk, míg ellenkező esetben, a gradiens csökkenésének irányába történő migrációt kemorepellens válasznak nevezzük. Kemotaxisról szűkebb értelemben akkor beszélünk, ha a kemotaktikus ligand oldott állapotban van jelen, és ez hoz létre koncentráció gradienst a sejteket körülvevő folyékony közegben. A többsejtű szervezetekben a szabadon elmozdulni képes sejtek migrációját vezérlő ligand folyadék fázisban sok esetben nem képes stabil koncentráció gradiens létrehozására (pl. erekben a véráramlás ritmusosan váltakozó sebességű, elmosó hatása miatt). Ilyenkor a migráció irányát meghatározó kémiai stimulusok valamilyen felszínhez (pl. érfalak endotéljének membránja) kötötten tudnak kialakítani hosszú ideig fennmaradó gradienst. A sejtek, e kötött gradiens mentén történő elmozdulása a haptotaxis [3, 7, 8]. A sejtek elmozdulásának iniciálásához szükséges, hogy az adott kémiai ligand kötődjön a receptorához, és a külső kémiai inger intracelluláris továbbítása is megtörténjen, ami végeredményben a mozgás kivitelezéséért felelős apparátusok aktiválódásához vezet [7]. A migrációs választ indukáló ligandok és felismerésükre, intracelluláris közvetítésükre képes apparátusok (receptorok és jelátviteli útvonalak) igen általánosnak tekinthetők. A professzionális, kemotaxis kiváltására szelektálódott molekulacsaládok (pl. bakteriális tripeptidek, arachidonsav metabolitok, kemokinek) mellett számos, alapvetően nem a sejtek mozgásának modulálására specializálódott hormonról (pl. inzulin, hipofízis hormonok) és szignálmolekuláról (pl. neurotranszmitterek, aminosavak, biogén aminok) beigazolódott, hogy rendelkezik kemotaktikus aktivitással is. Az elsődleges kemotaktikus hatással rendelkező molekulák esetén is megfigyelhető a „keresztszabályozás” jelensége, miszerint egy kemoattraktáns anyag képes a sejtek kemotaktikus válaszában túl befolyásolni a sejtek mozgásához tartozó egyéb funkciókat is, mint például a sejtek letapadását, a fagocitózist, egyes autokrin/parakrin ható faktorok szekrécióját, valamint a sejtosztódást is [3, 9]. A sejtmigráció egyike a legalapvetőbb, vélhetően a filogenezis korai szakaszában megjelenő fiziológiai reakcióknak. A migráció szempontjából fontos ligand családok szelekciójával párhuzamosan az őket kötni tudó receptorok is elkülönültek. Számos, a migrációban

szerepet játszó receptor- és jelátviteli fehérjét azonosítottak, és az elvégzett biokémiai vizsgálatok tanúsága szerint azok a mechanizmusok, amelyekkel az eukarióta sejtek érzékelik a kemoattraktáns ligandokat nagyon hasonlóak a hormonok vagy neurotranszmitterek transzdukciójában szereplő fehérjékhez, hírvivőkhöz. Filogenetikai szempontból is kiemelendő ez a hasonlóság; a *Dictyostelium discoideum* amőba cAMP receptora nagyfokú homológiát mutat az emlősöknél ismert β -adrenerg receptorokkal [10]. A kemotaktikus hatású vegyületek kötésére képes receptorok alapvetően két nagy – a 7-transzmembrán típusú G protein kapcsolt, és a membránt egyszer átérő tirozin kináz aktivitással rendelkező – receptorcsaládba tartoznak [11].

A sejtek tényleges elmozdulása a kemotaxis végrehajtó mechanizmusának tekinthető, amelynek két fő formája ismert a sejt felszínhez kötött, adhéziónak, valamint a szabadon úszó sejtek csillós-ostoros mozgása [7]. A szövetekbe rendeződött sejtek mozgásának feltétele a sejtadhézió létrejötte és a sejtek kihorgonyozódásából eredő jel hatására a sejt váz átrendeződése. Az adhézió mediált sejtmozgást további alcsoportokra, (i) amőboid, (ii) mezenchimális és (iii) kollektív formákra lehet osztani. A fenti mozgásformák szabályozásában és kivitelezésében a következő molekula csoportok játszanak kitüntetett szerepet: ECM-kötő adhéziónak fehérjék (integrinek), ECM-bontó enzimek (pl. mátrix metalloproteinázok), sejt-sejt kapcsolat kialakításában az adhéziónak és kommunikációs fehérjék és komplexek (pl. kadherine, rés kapcsolat), a sejt váz átrendeződés szabályozásában a kis G-fehérjék (pl. Rho) [12, 13].

Az irányított vektoriális mozgás alapja a polarizált sejtalak létrejötte, a vezető él (pszeudópódium, lamellopódium) és az elmaradó vég (uropódium) kialakulása. A kemokinezis és a kemotaxis közti alapvető különbség, a mozgás irányultságában van, a kemokinezist végző sejt polarizált alakváltozása nem jellemző. A vektoriális mozgás egy többlépcsős ciklikusan ismétlődő folyamatsor, a fent felsorolt adhéziónak mediált mozgásformák a főbb migrációs lépések tekintetében többé-kevésbé megegyeznek. Kemotaktikus inger hatására a kérgi aktin hálózat átrendeződése, polimerizációja következtében kialakul a polarizált sejtalak, és a vezető élen megjelenik a koncentráció gradiens irányába mutató pszeudópódium. Az előrenyúló álláb integrin adhéziónak receptorai kapcsolódnak az ECM fehérjékhez, ezzel egy időben adaptor fehérjék révén az integrinek intracelluláris része az aktin filamentum hálózathoz csatlakozik, ennek eredményeként kialakulnak a fokális adhéziónak és a sejt nyúlvány az ECM-hoz rögzül. A

fokális kontaktus szerveződésében részt vevő jelátviteli, valamint aktin filamentum asszociált és motor fehérjék (pl. alfa aktinin, filamin, illetve miozinok) az aktin hálózat keresztkötésével a mikrofilamentum rendszer stressz szálakká szerveződését és az aktin-miozin komplex kialakulását vezérlik. Az aktomiozin szálak összehúzódásából és sejtek kihorgonyzódásából eredő húzóerő hatására a citoplazma kérgi állomány alatti, nagyobb fluiditású belső része az elmaradó vég felől a vezető él irányába áramlik. A sejt farki részén pedig felbomlanak az adhéziós horgonyok és a sejt maga után „húzza” az elmaradó véget [12]. A különböző sejtípusok a fenti folyamattól többé-kevésbé eltérő migrációs stratégiák szerint változtatják a helyüket a szöveti környezetben. A mezenchimális sejtmozgásra jellemző a stabil adhéziós kontaktusok és a létrejövő húzóerő által meghatározott elnyúlt polarizált sejtforma, valamint az extracelluláris proteázok termelése (pl. mátrix metalloproteináz). Ez utóbbiak a környezeti vázelemek bontásával biztosítják az utat a mozgó sejt számára. Mezenchimális mozgás jellemző pl. a fibroblasztokra, keratinocitákra, valamint bizonyos daganatsejt típusokra. Ettől eltérően, az amőboid mozgás során a sejtek rövid ideig fennálló gyenge adhéziós kapcsolatokat alakítanak ki, és az extracelluláris váz emésztése sem játszik jelentős szerepet. Az amőboid mozgással mozgó sejtek, pl. az egysejtű *Dictyostelium discodium* és a magasabb rendű szervezetek fehérvérsejtjei dinamikus alakváltozásuk révén, amelyben a kortikális aktin háló átrendeződésének van kitüntetett jelentősége, mintegy átkúsznak az extracelluláris hálózat elemei között, ahelyett, hogy lebontanák azokat. Az amőboid mozgás, a stabil fokális kontaktusok hiányában, viszonylag gyors és hatékony formának tekinthető. Az utóbbi években leírt mozgásforma az ún. kollektív migráció, melyben a sejt kapcsoló struktúrák (dezmoszómák, rés-kapcsolatok) által összetartott sejtek együttes menetelése figyelhető meg. Az epitél sejtek ilyen kohorszban történő vándorlása jellemző a sebgyógyulás és a metasztázisképzés során [4, 12-14].

Egy kémiai inger nemcsak a sejtek térbeli elmozdulását indukálhatja, hanem a sejtek ún. „micromotion”-szerű helyzetváltoztató mozgását is befolyásolhatja [15]. A micromotion abból adódik, hogy a kitapadt sejtek folyamatosan változtatják morfológiájukat (sejtvázátrendeződés). A sejt-ECM adhéziós kontaktusok állandó átalakulásban vannak – felbomlanak és új kapcsolatok alakulnak ki – miközben a sejt kis pozícionáló (rezgésszerű, rotációs) mozgást végezve változtatja helyzetét. Egy bioaktív anyag migrációra kifejtett hatását az alapján is osztályozhatjuk, hogy milyen

változást idéz elő a sejtek lokomóciós mozgásában; fokozhatja, vagy csökkentheti/gátolhatja a sejtek alakváltozását és a kis rezgésszerű, rotációs mozgását [15, 16].

Az eukariótákra jellemző másik migrációs mechanizmus a csillós-ostoros mozgás. A csillókkal történő mozgás elemei a filogenezis különböző szintjét képviselő szervezetek esetén megtalálható. Az eukarióta egysejtű *Tetrahymena pyriformis* csillók segítségével változtatja helyét, míg a magasabb rendű szervezetekben a szabadon elmozdulni képes sejtek közül a spermiumokra jellemző az ostorral történő haladás. Az adhézíófüggő migráció létrejöttében az aktin sejtvázelemek átrendeződése, míg a csillók/ostorok felépítésében és a mozgás koordinálásban a mikrotubulus fehérjék (tubulin) és számos mikrotubulus asszociált fehérje (pl. dinein, nexin) vesz részt. A csillók és ostorok mozgása az ún. axonéma (csilló test) elhajlásából, csapásából eredő erő hatására következik be. Az axonéma szerkezetét tekintve 9, körben elhelyezkedő mikrotubulus pár vesz körül 2 centrális mikrotubulust, kialakítva a $9 \times 2 + 2$ elrendeződést. A csilló alapjánál található bazális test felépítése a csilló testéhez hasonló, 9×3 -as szerkezet figyelhető meg. A bazális test, illetve a bazális testek membrán alatti hálózattal összekötött rendszere a mozgás sejt szintű irányítója. A csapást kiváltó ingerek ugyanis e henger alakú képletek felől érkeznek a csilló testébe. A csilló hajlása a külső mikrotubulus-párokhoz kapcsolódó dinein motorfehérjék segítségével történik. A dinein karok hidat képeznek két mikrotubulus dimer között, és aktivációjuk (konformáció változásuk) következménye a sliding, a két mikrotubulus pár elcsúszása. A küllők és a nexin molekulák összekapcsolják a perifériás mikrotubulus párokat a centrális mikrotubulus párral és egymással is, ezért az elcsúszás mértéke igen csekély, helyette elhajlás (csapás) következik be. A csillók segítségével mozgó sejtek gyorsabb kemotaktikus válaszra képesek, mint az amőboid mozgást végző társaik [6, 9].

1.1.2.1. Adhézio és kemotaxis biológiai és klinikai jelentősége

Az egysejtű életforma megjelenésének kezdetétől a kemotaxisnak alapvető szerepe van a táplálék molekulák fellelésében és megközelítésében, valamint a sejt számára toxikus anyagok elkerülésében. Vélhetően a sejtek kemotaktikus válaszkészsége nagyban hozzájárulhatott a ma ismert ligand családok és receptorainak szelekciójához is [9]. A magasabb rendű szervezetek legtöbb sejtje fejlődésük, adott lépcsőjén, rendelkezik migrációs (kemotaktikus) aktivitással, míg a végdifferenciált sejtek csak kis csoportja (pl.

fibroblasztok, leukociták) őrzi meg kemotaktikus hajlamát [3]. Az egyedfejlődés kezdeti lépésének tekinthető megtermékenyítés során is a hímivarsejt kemotaxis révén találja meg a petesejtet. Az embriogenezis során az adhézió és kemotaxis egyaránt nélkülözhetetlen az egyes sejtek, sejtcsoportok megfelelő helyre történő vándorlásában és szöveti szerkezet felépítésében [4]. A központi idegrendszer kialakulásakor az idegsejt prekurzorok irányított migrációja figyelhető meg. A szerveződő szinaptikus kapcsolatokat stabilizálásában az integrinek (pl. $\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 2$) játszanak fontos szerepet. Az érrendszer fejlődésében, és a felnőtt szervezetre jellemző érhálózat integritásának fenntartásában számos integrin (pl. $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$) jelentőségét igazolták [17].

A hatékony immunválasz feltétele, hogy a védekezésben szerepet játszó fehérvérsejtek a megfelelő időben a megfelelő helyen legyenek. Az immunsejtek differenciálódásának és aktivációjának a legtöbb lépése a leukociták immunszervekbe és egyéb perifériás szövetekbe történő migrációjától függ. A tímuszban történő T limfocita ontogenezis során a sejtek kéregállományból a velőállomány felé történő vándorlását professzionális kemoattraktáns anyagok (kemokinek) vezérlik. A nyirokcsomókban sejt-sejt interakciók sorozata vezet el a naiv T sejtek aktivációjához. Az integrin mediált sejtmozgásnak kétségtelenül az egyik legjelentősebb szerepe az immunvédekezésben a leukociták homingjának, járőrözésének biztosítása, mely során a sejtek elhagyva az érpályát a másodlagos nyirokszervekbe, vagy a gyulladás (sérülés) területén a szövetközi térbe kerülnek [17, 18]. A leukocita sejtek transzmigrációjában a legfontosabb molekuláris szereplők a szelektinek, a kemokinek és az integrinek, amelyek az érfalon történő átjutás három fő lépését (rolling, aktiváció, szoros adhézió) közvetítik. A szelektinek, szénhidrát kötő receptoroknak is felfogható adhéziós molekulák, az endotél (P- és E-szelektin) és leukocita (L-szelektin) sejtek felszínén. Az extravazáció kezdeti lépésében az endotél sejteken expresszálandó szelektinek laza kötést létesítenek a fehérvérsejtek glikoprotein komponenseivel (P-szelektin glikoprotein ligand-1 – PSGL-1). A létrejövő kötés nem tartós, de a véráramlás ellenére a sejtek lelassulnak, és az érfal mentén gördülve haladnak tovább, ezt nevezzük rollingnak. Második lépésben, a gyulladás hatására aktiválódott endotél sejtek adhéziós molekula expressziója (CAM – cell adhesion molecules, immunglobulin-szerű adhéziós molekulák) fokozódik és kemotaktikus hatású citokinek (kemokinek), lipid természetű kemoattraktánsok szintézise is megfigyelhető, amelyek a koncentráció gradiensük révén

irányítják a gördülő fehérvérsejtek extravazációját. A kemokinek, kötődve a leukociták felszínén megtalálható receptorukhoz (G protein kapcsolt receptor), aktiválják az integrineket (inside-out jelátvitel), konformációjukat egy nagy affinitású kötésre alkalmas állapotba hozzák, és egyben csoportokba (klaszterekbe) szervezik őket. A fehérvérsejtek felszínén lévő, immár aktiválódott integrinek (pl. LFA1: α M – CD11b és β 2 – CD18, VLA4: α 4 – CD49 és β 1 – CD29) szoros kötésekkel létesítenek az érfal felszínét borító sejtek adhéziós molekuláival (ICAM-1 – CD54; CD-106) (firm adhesion). A nagy affinitású kötődés a leukociták alakváltozását és az ún. crawling-ját (kúszását) indukálja (outside-in szignalizáció), ami szükséges az érfalon történő átjutáshoz, a diapedezishez. A α M – ICAM-1 interakció segít a kúszó leukocitáknak (crawling) megtalálni az átjutás helyét az endotél sejtek között (paracelluláris transzmigráció), vagy transzcelluláris út esetén az endotél sejteken keresztül. Az endotél sejtek között történő áthaladás során az endotél sejtek között meglévő intercelluláris adhéziós kapcsolatok felszakadnak (VE-kadherin), és a junkcionális adhéziós molekulák (PECAM, JAM-A, CD-99), amik leukocita-liganddal rendelkeznek (LFA-1, PECAM, CD99), az intercelluláris rések felé, ill. azokon keresztül vezetik a fehérvérsejteket haptotaxis révén. Az endotél sejtek sejtestjén történő áthaladás kevésbé jellemző, és csak bizonyos helyeken figyelhető meg (pl. központi idegrendszer). A transzcelluláris áthaladásban az ún. vezikulo-vakuoláris organellumok játszanak kitüntetett szerepet, amelyek járatokat alakítanak ki a sejt két felszíne között. A sejtek áthaladását az aktin, vimentin sejtvázfehérjék és a kaveoláris transzport elemeinek közreműködésével kialakuló járatokon át az ICAM-1 irányítja. Az endotél sejtsoron átjutott leukocitáknak át kell hatolni a bazális laminán és a periciták rétegén is. A sejtek áthaladása leginkább azokon a területeken történik meg ahol a bazális lamina áteresztőbb (alacsonyabb laminin és magasabb heparánszulfát tartalom), és egyben a periciták között is rések találhatók. A folyamat teljes részletességgel nem ismert, de a PECAM1, a hatására termelődő laminin kötő integrinek (pl. α 6 β 1) és mátrix-bontó enzimek (MMP, elasztáz) szerepét már igazolták [17, 19-21].

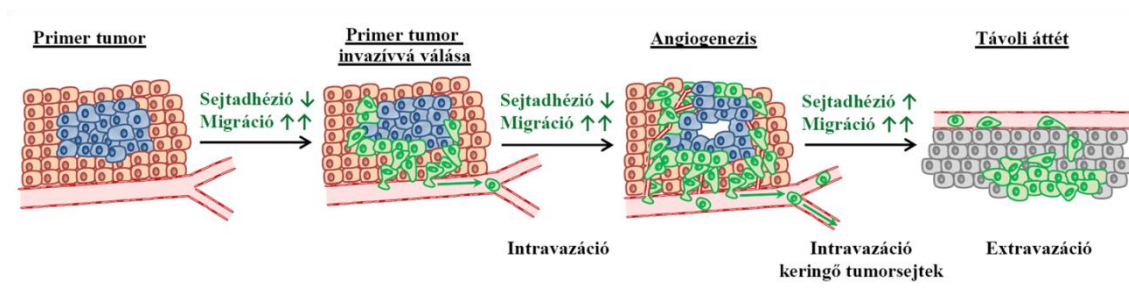
A gyulladásos területeken az aktivált immunsejtek extravazációja klinikai szempontból a kemotaktikus válaszkészség egyik legfontosabb megjelenési formája. A fehérvérsejtek fokozott migrációja a gyulladásos területekre, szövetkárosodáshoz és krónikus gyulladásos kórképek kialakulásához vezethet. Ilyen, krónikus gyulladással és

fokozatosan progrediáló nehézléggzéssel járó kórkép például a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), ahol a makrofágok és citotoxikus T sejtek túlzott migrációja figyelhető meg a légutak falába [22]. Egyre több adat igazolja az adhézió és kemotaxis szerepét a központi idegrendszert érintő gyulladásos (szkerózis multiplex), valamint a neurodegeneratív kórképek (Alzheimer-kór, Parkinson-kór) patogenezisében is. A neurodegeneratív kórképek kialakulása részben visszavezethető a neuronális differenciáció és a felnőtt kori neurogenesis zavarára. Ennek a két folyamatnak az irányításában az adhézió és a migráció fontos szereppel bír [17, 23]. Feltételezik, hogy a központi idegrendszerbe vándorló perifériás makrofágoknak, fagocitotikus aktivitásuknak köszönhetően, szerepük lehet az Alzheimer-kórban kimutatható β -amiloid plakkok eltávolításában [24, 25].

A sejt migráció kritikus szerepe az egyes élettani folyamatokban leginkább akkor válik nyilvánvalóvá, amikor a folyamat valamely eleme meghibásodik. A leukocita adhéziós deficiencia (LAD) egy örökletes, súlyos, visszatérő fertőzésekkel, elégtelen sebgyógyulással, csökkent gennyképződéssel járó kórkép. A betegség leggyakoribb formájában a β_2 integrin alegység érintett, amely szerepet játszik például a fagocitózisban és a T-sejtek aktivációjában [3, 17].

1.1.2.1.1. Adhézió és kemotaxis tumorprogresszióban betöltött szerepe

A tumorsejtek adhéziós kapcsolatainak átalakulása, megszűnése és ezzel párhuzamosan a sejtek motilis fenotípusának kialakulása korrelál a daganat áttétképző hajlamával. A tumorsejtek megváltozott adhéziós és migrációs viselkedése elengedhetetlen a tumorsejtek inváziójához, szóródásához és a távoli szervekben történő megtelepedéséhez [26, 27]. A metasztázisképzés egy soklépcsős folyamat (1. ábra): (i) a tumorsejtek leszakadnak a tumormasszáról és bontva az ECM-t, különböző általuk termelt extracelluláris proteázok segítségével, a környező szövetekbe vándorolnak (invázió); (ii) a proteázok közreműködhetnek a bazális membránon és az érfalon történő átjutásban, mely során az elszabadult tumorsejtek a véráramba, vagy a nyirokkeringésbe kerülnek (intravazáció); (iii) amennyiben a sejtek a keringésben túlélnek a következő lépésként (iv) megtörténik az elszabadult tumorsejtek kitapadása és extravazációja a szövetközi térbe, valamint (v) egy új szöveti térben történő sikeres megtelepedésüket követően osztódni kezdenek kialakítva a másodlagos daganatot (metasztázis) [28].



1. ábra: Metasztázisképzés folyamata

A tumorprogresszió folyamán a sejtek egymással és a mátrix elemeivel kialakított kapcsolatai meggyengülnek, aminek következtében a sejtek leválnak a primer tumorról és visszanyerik migrációs képességüket. A leszakadt daganatsejtek elkerülve az apoptózist, – ez a normál sejtekre jellemző az őket körülvevő mátrix elemekkel való kapcsolatok elvesztésekor – a normál sejtekhez hasonló migrációs mechanizmusok (mezenchimális, amöboid és kollektív migrációs forma) segítségével terjednek [29]. A daganatsejtek szóródása korán megindul, a leszakadt tumorsejtek aktív módon, intravazáció során jutnak keresztül az érfalon és kerülnek a vér- vagy nyirokkeringésbe. Az elszabadult daganatsejtek migrációját - invázióját és véráramba kerülését a daganatsejt adhéziós fehérje expressziója mellett, különböző szöveti növekedési faktorok és kemokinek vezérlik. A primer daganat a növekedése során nem nélkülözheti a sejtek működéséhez szükséges oxigént és tápanyagokat, ezért amikor térfogata meghaladja azt a kritikus méretet ($\varnothing=1\text{cm} \sim 10^9$ sejt), ami már egyszerű diffúzióval nem fedezhető, új erek képződése indukálódik (angiogenezis). A tumort infiltráló erek fala kevésbé intakt, nem alakulnak ki szoros sejt-sejt adhéziók az endotél sejtek között, így a daganatsejtek passzív módon is bekerülhetnek a véráramba tovább növelve ezzel az áttétek számát [27, 28]. A malignus sejtek extravazációja hasonló folyamatok sorozatán keresztül valósul meg, mint a leukociták toborzása a gyulladás alkalmával. A kilépés helyét, azt hogy mely szövetekben képezzenek áttétet, a szövetek kemokin expressziója és a tumorsejtek felszíni kemokin receptor mintázata szabja meg [24].

1.2. Bioaktív anyagok – extracelluláris szignálmolekulák

A sejt-sejt, valamint sejt és környezete közötti információcsere, leggyakrabban kémiai szignálok küldésén és fogadásán keresztül valósul meg. A sejtek közötti kommunikáció több mint egy kémiai ligand átadása az egyik sejtől a másikig. Egymásra épülő extra- és intracelluláris mechanizmusok sorozata vezérli egy adott

kémiai szignál időbeli és térbeli felszabadulását, azt hogy a célsejt, megfelelő jelfogó apparátusán (receptor) keresztül, észlelni és értelmezni tudja (intracelluláris jelátviteli folyamatok), valamint képes legyen felhasználni különböző élettani folyamatainak a szabályozására [6, 30, 31]. A magasabb rendű szervezetek sejtjei extracelluláris jelmolekulák százainak felhasználásával kommunikálnak egymással, befolyásolják egymás élettani folyamatait például a szöveti fejlődés vagy a homeosztázis fenntartása során. Az extracelluláris ligandok csoportosítása különböző elvek szerint történhet. A jelmolekulák kémiai természetük alapján lehetnek proteinek (inzulin), kis peptidek (gonadotropin-felszabadító hormon – GnRH), aminosavak (glutamát), nukleotidok (ATP), szteroidok (ösztrogén), zsírsavszármazékok (leukotriének), vagy akár gázok (NO) is. A jelmolekulák egy csoportja membrán kötött formában található, és a szomszédos sejtek közötti információcsere közvetítői. Ilyen, ún. juxtrakin hatású molekulák például a korábbi fejezetekben megismert adhéziós fehérjék, amik például a morfogenezisben, vagy immunfunkciókban játszanak kitüntetett szerepet. A legtöbb esetben a sejtekből szekréció (ritkább esetben egyszerű diffúzió) révén felszabaduló ligandok a szövetközi térbe kerülve lokálisan fejtik ki hatásukat, visszahathatnak a termelő sejtre (autokrin hatás) vagy diffúzió útján jutnak el a célsejthez (parakrin hatás). A parakrin/autokrin hatású extracelluláris mediátorok közé tartoznak a növekedési faktorok, citokinek, valamint a professzionális kemotaktikus molekulák: a kis komplement fehérjék, arachidonsav metabolitok vagy kemokinek. A nagy hatótávolságú extracelluláris hírvivő molekulák a magasabb rendű szervezetek működésének szabályozásában nélkülözhetetlen résztvevők. Különböző stratégiák és sejtek alakultak ki az evolúció során a hosszú távú kommunikáció biztosítására. Az endokrin sejtekből felszabaduló hormonok (pl. inzulin) a véráram útján jutnak el a távoli célsejtekhez (pl. izom-, zsírsejt), míg a neuronális transzmisszió során a neuronok az axonok segítségével érik el a célsejtet, és szinapszisokból az idegingerület hatására felszabaduló neurotranszmitterek (szerotonin, adrenalin) közvetítik a kémiai információt. Az extracelluláris hírvivő molekulák a kémiai jelen túl, időbeli és térbeli információt is közvetítenek. A morfogenezis során egyes jelmolekulák időbeli megjelenése és eltűnése kritikus tényező az adott fejlődési lépés megfelelő lezajlásához. A kemotaxis szempontjából az extracelluláris ligand térbeli elhelyezkedése a meghatározó, hiszen a

ligand a koncentráció gradiens mentén hatva képes kiváltani a sejtek irányított vektoriális mozgását [31].

Az egyedfejlődés során és a felnőtt szervezetben az endogén extracelluláris hírvivők által szabályozott folyamatok károsodása betegségek kialakulásához vezet. A betegségek kezelésére adott, különböző gyógyszermolekulák felfoghatók exogén jelmolekuláknak, amelyek a károsodott kommunikációs kapcsolatokat helyreállítására hivatottak.

1.2.1. Emlősökre jellemző szignál molekulák jelentősége egysejtű szinten

A magasabb rendűek élettani folyamatainak szabályzásában részt vevő kémiai kommunikációs hálózat elemei nagy hasonlóságot mutatnak az egysejtű szervezetekre jellemző hírvivő molekulák által közvetített információ-átviteli folyamatokkal. A sejtek közötti jelátvitelben szerepet játszó jelmolekulákat, a felismerésükre képes receptorokat, és az extracelluláris inger sejten belüli közvetítéséért felelős komponenseket nagyfokú filogenetikai konzerváltság jellemzi. Az evolúció különböző szintjét képviselő szervezetek gyakran ugyanazokat, vagy legalábbis közel hasonló mechanizmusokat és hírvivő apparátusokat használják ugyanazon folyamataik szabályozásához [6, 31, 32]. Az inzulin jelenlétét kimutatták egysejtű organizmusokban (*Tetrahymena pyriformis*, *Neurospora crassa*), igazolták, hogy rendelkeznek inzulin kötőhellyel, amelyen keresztül a hormon a sejtek glükóz anyagcseréjének szabályozásában játszik szerepet [33-35]. A koncentráció gradiens mentén ható jelmolekulák a sejtek egyes folyamataira, például osztódására vagy kemotaktikus aktivitására kifejtett hatásának megértése, és a folyamatok molekuláris biológiai alapjainak minél részletesebb megismerése is két egysejtű organizmus (*Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*) vizsgálatával vált lehetségessé [30, 36].

1.2.1.1. *Tetrahymena pyriformis*

Az 1970-es évek közepétől Csaba György és munkatársainak megfigyelései szerint a csillósok törzsébe tartozó *Tetrahymena pyriformis* rendelkezik a magasabb rendűekre jellemző szignál molekulák felismerésére képes kötőhelyekkel [37]. Ezen vizsgálatok folytatásaként igazolódott a kötőhelyek receptor jellege és nagyfokú hasonlósága az emlősökben leírt receptorokkal [33, 38]. Az egysejtű kommunikációs folyamatainak egyre részletesebb vizsgálata során kiderült, hogy a jelátviteli útvonalak egyes lépcsői is

jelen vannak, megtalálhatók a cAMP, cGMP és az inositol-foszfolipid másodlagos hírvivők mellett a jeltovábbításban fontos szerepet játszó molekulák is (pl. Ca^{2+} -kalmodulin komplex) [39-42]. A magasabb rendűek hormonjainak hatása a *Tetrahymena* fiziológiai paramétereire (pl. EGF – epidermális növekedési faktor – sejtosztódást befolyásoló hatása, hisztamin fagocitózist indukáló aktivitása) is összevethető az emlősökben leírt funkciókkal [43, 44]. Mindezek mellett *Tetrahymenában* számos hormon és jelmolekula, úgymint ACTH, inzulin, szerotonin, hisztamin, EGF, funkcionális jelenlétét kimutatták, igazolva azt, hogy a sejt képes ezen anyagok szintézisére, tárolására és szekréciójára is [35, 43, 45, 46]. E csillós protozoon parakrin és autokrin szabályozó folyamatai révén a szecernált anyagokkal képes más sejtek vagy a saját folyamatait (pl. hormon szintézisét), befolyásolni, szabályozni. A *Tetrahymenában*, tehát nemcsak az endokrin rendszer számos képviselője, de az azok működéséhez szükséges elemek is (receptor és szignál transzdukció) jelen vannak, a hormonális interakciókkal egyetemben [47].

A *Tetrahymena* egyik alapvető sajátossága a kemotaxis, s kemotaktikus aktivitása jó mutató lehet egyes kísérleti rendszerekben. Számos, az emlős szervezetben leírt molekulával (peptid hormonok, citokinek – IL-8, RANTES, lektinek), illetve azok kompetitív agonistáival és antagonistáival, lehet kemotaxist kiváltani/gátolni e sejteken, mely a megfelelő receptorok funkcionális jelenlétét bizonyítja [48, 49]. A sejt csillós jellegéhez és életformájához szorosan kapcsolódó kemotaktikus aktivitás sok esetben érzékenyebb a ligandok szerkezetbeli különbségeire, tehát jobban válogat, mint a magasabb rendű sejtek. Erre utal, hogy ez az egysejtű eukarióta érzékeli a klinikai gyakorlatban is alkalmazott és mindössze fizikokémiai tulajdonságaikban eltérő kristályos vagy amorf inzulinok közötti eltéréseket [50]. Kemotaktikus válaszkészsége számos magasabb rendűekben megtalálható szignálmolekula esetében (pl. citokinek) ugyanabban a koncentráció tartományban volt hatásos, mint amiben ezek a gerinces vagy emberi szervezetben megtalálhatók [48].

Fentiekben említett molekuláris szintű hasonlóságok, homológiák is hozzájárultak ahhoz, hogy a *Tetrahymenát* a sejtfiziológia terén és a szignálmolekulák kutatása mellett számos területen, így a kemotaxis vizsgálatokban is előszeretettel alkalmazzák.

1.2.2. Az adhézió és kemotaxis gyógyszeres befolyásolásának lehetőségei

A sejtadhézió és kemotaxis számos klinikai szempontból is fontos folyamat kulcsszereplői. A krónikus gyulladásos megbetegedések (pl. Crohn-betegség, szklerózis multiplex), az allergiás és autoimmun folyamatok (pl. asztma, reumatoid arthritis), a véralvadási zavarok (pl. trombocita aggregáció hibája), a neurodegeneratív kórképek (pl. Alzheimer-kór, Parkinson-kór) kialakulásában, vagy a daganatok áttétképzése során a kemotaxis és az adhézió kóros elváltozása mutatható ki. A fent felsorolt megbetegedések korszerű kezelésére irányuló gyógyszerfejlesztések célpontjai olyan fehérjék, amelyek az adhézió és kemotaxis kiváltásáért, szabályozásáért, vagy éppen kivitelezéséért felelősek [22, 24].

Annak ellenére, hogy a sejtek megváltozott adhéziós és kemotaktikus viselkedése számos betegségben ígéretes terápiás célpontnak számít, kevés olyan gyógyszer van forgalomban, amely célzottan e folyamatok befolyásolásán keresztül fejtené ki hatását. A koronária szindróma és a miokardiális infarktus kezelésében forgalomban lévő vérlemezke-aggregációt gátló gyógyszerek egy csoportja a trombociták membránjában lévő $\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin, vagy más néven GPIIb/IIIa antagonistái. A trombocita-aktiváció során GPIIb/IIIa fehérjekomplex konformáció változása következik be, ami már képes a fibrinogént az RGD motívumon keresztül megkötni és ily módon hidat képezve a vérlemezkek között, azok aggregációját eredményezi [51].

Az immunsejtek extravazációjának fokozott volta jelentősen hozzájárul a krónikus gyulladásos kórképek kialakulásához. A gyulladásgátló gyógyszerek egy új és különösen jelentős csoportját alkotják azok, a többnyire még kísérleti fázisban lévő hatóanyagok, amelyek szelektíven a sejtek megváltozott (fokozott) migrációs aktivitására fejtik hatásukat. Az első jóváhagyott migráció gátló gyógyszer egy integrin (α_4) ellenes monoklonális ellenanyag a natalizumab, amely a T limfociták gyulladásos területekre történő vándorlásának gátlásán keresztül fejt ki a hatását olyan krónikus gyulladásos autoimmun folyamatokban, mint a Crohn-betegség, vagy a szklerózis multiplex [22]. A migráció gátlásának egy másik kézenfekvő lehetősége a kemotaxis-receptorok, például G protein kapcsolt kemokin-, vagy komplement-receptorok blokkolása. Számos kemokinreceptor antagonista van klinikai kipróbálás alatt különböző gyulladásos (pl. reumatoid arthritisz) és allergiás (pl. asztma) kórképek kezelésében [22].

A daganatos megbetegedések kezelésére alkalmazott radikális gyógyszeres terápiák és a sebészi beavatkozások ellenére a daganat szóródásának veszélye, vagy a kialakult áttétek kezelése még mindig megoldatlan probléma. A daganatsejtek motilitásának gyógyszeres kezelése új terápiás stratégiának számít, amely azon túl, hogy csökkenti a primer tumorról a daganatsejtek leválásának esélyét, jól kiegészíthetné a konzervatív daganat terápiában adott gyógyszerek skáláját, segítségével csökkenthető lenne azok dózisa és így egyes súlyos mellékhatások is mérsékelhetőek lennének [27]. A migrációt célzó terápiás próbálkozások a mozgási mechanizmus több pontjának befolyásolásán – nem mindenesetben gátlásán – keresztül gátolnák a daganatok metasztatizálódását.

A tumorsejt-migráció irányítóinak számító, különböző szolubilis mediátorok receptorának (kemokin receptorok – CXCR4, CCR7, vagy növekedési faktor receptorok) blokkolásán keresztül, a daganatsejteknek a környező szövetekbe, vagy távoli szervekbe történő vándorlása lenne gátolható [27]. A tumorsejtek kemokin receptor mintázata és az egyes szövetek kemokin termelése alapvetően meghatározza, hogy a daganat mely szövetbe adjon áttétet [22, 24].

A tumorsejtek adhéziós kapcsolatainak megváltozása lényeges hatással van a sejtek migrációs és áttétképző képességére. Az E-kadherin sejt-sejt adhéziós molekula expressziójának csökkenése volt kimutatható számos epiteliális daganat invazív vá válása során [26, 52]. Az immunglobulin típusú adhéziós molekula család (CAM) tagjai közül is egyesek (ICAM, EpCAM, L1CAM), mint szövet specifikus addresszinek megszabják a tumorsejt áttétképzésének helyét. A sejt-sejt adhéziós kapcsolatok helyreállítása (E-kadherin), valamint gátlása (EpCAM ellenes monoklonális ellenanyag) egyaránt eredményes terápiás eljárásnak tekinthető [27, 52, 53]. Hasonlóan kétarcú a kép az integrinek tekintetében is. Egyes integrinek (pl. $\alpha_2\beta_1$) gátló hatást fejtenek ki a sejtek migrációjára és a daganatok áttétképzésére, míg más integrinek esetén (pl. $\alpha_v\beta_3$) fokozott expresszió volt megfigyelhető, ami egyenes arányban van a daganatok invazivitásával [27]. Az utóbbi esetben az integrinek gátlása kismolekulákkal, vagy monoklonális antitestekkel sem minden esetben váltotta be a hozzájuk fűzött reményt. Integrin antagonistával történő kezelés mellett fokozott tumorsejt-migráció volt detektálható. Több elképzelés is született ennek magyarázatára. Egyrészt a szolubilis RGD antagonistá vegyület mintegy meggyorsítja a migrációs folyamatot azáltal, hogy a meglévő adhéziós kontaktusok fokozott disszociációját indukálja [54]. Másrészt, ami

valószínűbb, a sejt mintegy alkalmazkodva, hogy elvesztette adhéziós kapcsolatait a mátrix elemekkel, átváltott egy másik, a szoros sejt-ECM kölcsönhatást nem vagy csak kismértékben feltételező migrációs formára az amőboid mozgásra, amely révén a sejtek gyorsabb migrációra képesek [12, 55].

Fenti példákból is adódik, hogy minden olyan terápiás eljárás során, amely sejtek migrációjára vagy adhéziójára irányul, szem előtt kell azt tartani, hogy célzottan a sejtek megváltozott adhéziós kapcsolataira vagy a sejtek kóros (fokozott) migrációjára hassunk anélkül, hogy a normál fiziológiás folyamatokban (sebgyógyulás, immunvédekezés) betöltött funkciójukat károsítanánk [27].

A sejtek migrációs képességére épülő terápiás próbálkozások sem új keletűek a kutatásban. Az Alzheimer-kórra jellemző β -amiloid lerakódások és az elpusztult idegsejtek eltakarításában a csontvelő eredetű makrofágoknak egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak. Az Alzheimer-kór terápiájában egy új, hatékony kezelési stratégiának számít olyan kismolekulák alkalmazása, amelyek a perifériás fagocita sejtek mozgósítása révén az agyba történő akkumulációjukat és következményesen a β -amiloid plakkok fagocitózist idézhetik elő [25]. A sejtmigráció indukálása a cél például a szövetbarát implantátumok fejlesztése során is, ahol a sejtek implantátum felszínére történő vándorlása és kitapadása biztosítaná az alkalmazott biopolimer váz (porc-, csontszövet pótlása, vagy stent beültetés) sejtekkel történő benövését [56].

1.2.3. Célzott terápia

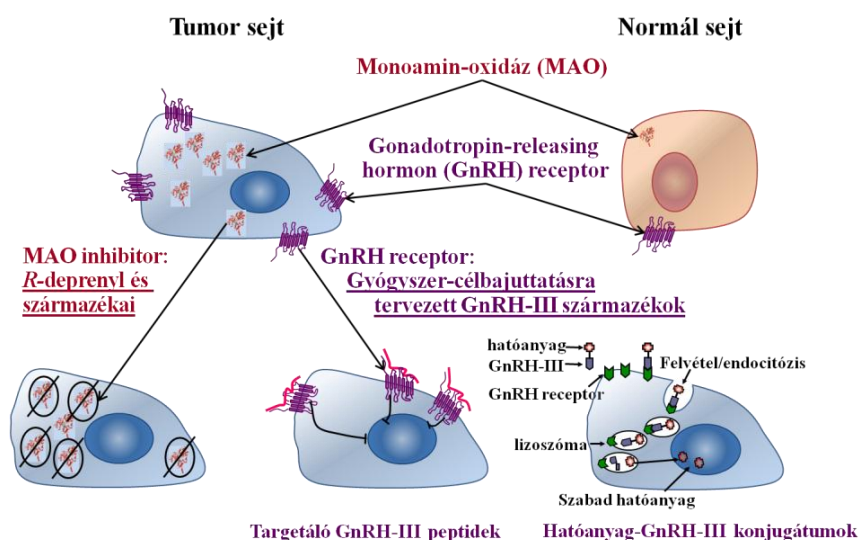
A hagyományos gyógyszeres terápia hatékonyságát alapvetően befolyásolja a szelektivitás hiányából adódó, esetenként súlyos mellékhatások megjelenése, a gyógyszer rezisztencia kialakulása, valamint a hatóanyag stabilitása és farmakokinetikai sajátosságai. Több kórkép esetén, a daganatos betegségekkel az élen, nem rendelkezünk kellően szelektív és hatékony terápiás eszközökkel. A konzervatív tumorterápiában alkalmazott nagy dózisú, és sokszor kombinált citosztatikus kezelések ellenére sem sikerül kivédeni a rezisztencia kialakulását, a hatóanyagok gyors eliminációját, és elérni az optimális lokális koncentrációt. A hatóanyagok célsejt szelektivitásának növelése egy értékes terápiás megoldás, különösen olyan gyógyszerek esetén, mint a tumorok kezelésében alkalmazott alacsony terápiás indexű hatóanyagok, amelyek felhasználásának legfőbb korlátja az egészséges szövetek károsodásából adódó súlyos

mellékhatások kialakulása [57-59]. A tumorelleses gyógyszerkutatások homlokterébe olyan stratégiák kerültek, amelyek képesek (1) közvetlen az adott daganat típusra jellemző és a malignus transzformációban kritikus szerepet játszó molekuláris hibát/hibákat célolni, ezzel oki terápiát megvalósítani, vagy (2) amelyek képesek egy citotoxikus hatóanyagot szelektíven, a hatásához szükséges koncentrációban a daganatsejthez juttatni az egészséges sejtek károsítása nélkül [60].

Napjainkban a célzott daganatterápia során alkalmazott monoklonális antitestek, vagy kismolekulák a daganat kialakulása, növekedése, vagy szóródása szempontjából meghatározó, hibás – rendszerint túltermelő, vagy fokozottan aktív – szabályozó/jelátviteli elem gátlásán keresztül fejtik ki tumorelleses hatásukat. Célpontjuk olyan fehérjék, amelyek az egészséges sejtekből gyakorlatilag hiányoznak, vagy kis mértékben fejeződnek ki, ezáltal biztosítják a terápia szelektivitását. Az azonosított és már terápiás célpontként bevezetett onkogének nagy részét a receptor tirozin kináz molekulacsalád adja (pl. epidermális növekedési faktor receptor család – trastuzumab) [61]. A monoamin-oxidáz enzim túltermelődését is több daganattípus (vese-, prosztata-, agydaganat) esetén kimutatták [62-64]. Az enzim egyrészt fontos szerepet játszik a mitokondrium mediált apoptózis szabályozásában, másrészt a működése (biogén aminok oxidatív deaminációja) során fokozott mértékben termelő hidrogén-peroxid hozzájárulhat a tumoros transzformáció hátterében álló génhibák kialakulásához [64]. A enzim, ígéretes terápiás célpont lehet egyes prosztata karcinómák esetén, ugyanis gátlásával *in vitro* és *in vivo* modellben egyaránt szignifikáns tumorelleses hatást sikerült elérni [62] (2. ábra).

A tumorelleses gyógyszerek daganatsejt szelektivitására egy másik lehetőség, olyan hatóanyag-szállító rendszerek kidolgozása, ahol a gyógyszermolekula valamilyen vektorhoz, hordozóhoz kapcsoltnak helyezkedik el. Vektorként szerepelhetnek a daganatsejtekben specifikus kötőhellyel rendelkező monoklonális antitestek, proteinek (pl. lektin), peptidok [58, 59]. A gyógyszer-célbajuttatást biztosító technikák nagy része a tumorsejtek felszínén szelektíven, vagy az egészséges sejtekhez képest nagyobb mértékben kifejeződő hormon receptorok (gonadotropin-fel szabadító hormon - GnRH, szomatostatin, vazóaktív peptid receptorok) elérésén alapul [58, 65] (2. ábra). A peptid hormonok, irányító hatású hordozóként történő felhasználása számos előnnyel jár. A peptidok jól penetrálnak a szöveteken és barrieréken keresztül, nem immunogének, nagy

affinitással kötődnek a sejtfelszíni receptorukhoz, és nem utolsó sorban könnyen előállíthatók és módosíthatók [60, 66]. A megfigyelések szerint, abban az esetben, ha a tumorellenes ágens peptid hordozóhoz kötötten, receptor mediált endocitózis révén jut a sejt citoplazmájába, a multidrug rezisztencia kialakulásával sem kell számolni [66]. Egyetlen hátrányuk, hogy proteolitikus enzimek hatására gyorsan degradálódnak a szérumban, azonban stabilabb peptid derivátumok állíthatók elő D-aminosav, vagy N-metil-aminosav beépítésével [66, 67]. Diagnosztikus és terápiás célokra egyaránt alkalmas jelöltek a peptid hordozók. A tumor terápiában alkalmazni kívánt, hatóanyag-tartalmú peptid konjugátumnak számos követelménynek kell megfelelnie: (i) biztosítania kell, hogy a hatóanyag szelektíven a célsejtekhez jusson, (ii) képes legyen bejutni a sejtbe (receptor mediált endocitózis), (iii) lehetővé kell tennie a hatóanyag felszabadulását, hogy az kifejthesse a rá jellemző farmakológiai hatást [58, 66].



2. ábra: Célzott tumorterápia a gonadotropin-releasing hormon receptor agonista GnRH-III alapú peptidek és a MAO-gátló *R*-deprenyl és származékainak felhasználásával

1.2.4. *R*-deprenyl és származékai

1.2.4.1. *R*-deprenyl farmakológiai hatásai

Az *R*-deprenyl (selegiline, phenyl-isopropyl-methyl-propargylamine), a Parkinson-kór kezelésében évtizedek óta eredményesen alkalmazott gyógyszer [68], a monoamin-oxidáz B (MAO-B) irreverzibilis gátlószere [69-71]. Az *R*-deprenyl kedvező hatását más neurodegeneratív kórképekben (pl. Alzheimer-kór) is megerősítették [72]. Birkmayer és

munkatársainak vizsgálatai nyomán, mint neuroprotektív hatású gyógyszer vonult be az irodalomba [68]. Később Tatton és munkatársai kimutatták az *R*-deprenyl antiapoptotikus hatását neuronális modell-rendszerben [73]. Az *R*-deprenyl citoprotektív hatását a központi idegrendszeren kívül is bizonyították, ami felveti annak lehetőségét, hogy az *R*-deprenyl a központi idegrendszert érintő kórképek mellett pl. az ateroszklerózis, az iszkémiás szívbetegség megelőzésében és terápiájában is fontos szerepet játszhat [74, 75].

1.2.4.1.1. Monoamin-oxidáz B gátló hatás

A mitokondrium külső membránjában található MAO enzimnek két izotípusa ismert, az A és a B, amelyek szöveti lokalizációjukban és szubsztrátspecifitásukban különböznek egymástól. A gasztrointesztinális traktusra jellemző MAO-A a szerotonin és noradrenalin szelektív oxidatív deaminálását végzi. A fenil-etilamin és a benzilamin oxidációjáért a központi idegrendszerben elhelyezkedő MAO-B izotípus felelős, míg a tiramin és a dopamin a két enzim közös szubsztrátjának tekinthető [76]. A MAO-B enzim gátlása a Parkinson-kór kezelésében több szempontból is hatékony terápiás megoldás. A Parkinson-kórban megjelenő tünetek a dopamin szint csökkenésére vezethetők vissza. Az *R*-deprenyl, az enzim gátlása révén fokozza a dopamin mennyiségét a nigrostriatális rendszerben [77, 78]. A neurodegeneratív megbetegedések kialakulásához vezető folyamatban, az egyes neuron csoportok progresszív pusztulásában fontos kóroki tényező az oxidatív stressz, a reaktív oxigén gyökök fokozott termelődése. Az *R*-deprenyl a biogén aminok metabolizmusának gátlásával, egyben a normál folyamat során keletkező hidrogén-peroxid (H_2O_2) szintjét is csökkenti [77, 79]. Vizsgálatok szerint az *R*-deprenyl képes mérsékelni az időskori MAO-B aktivitás fokozódását is [80, 81].

1.2.4.1.2. *R*-deprenyl központi idegrendszeri hatásai – „neuro rescue” hatás

A neurodegeneratív folyamatok hátterében álló oxidatív reakciókra az *R*-deprenyl két irányból is hat, egyrészt gátolja a reaktív oxigén gyökök keletkezését, másrészt a semlegesítésükért felelős antioxidáns enzimek (szuperoxid dizmutáz, kataláz) expresszióját fokozza [82]. Az „oxidatív stressz elmélet” mellett, feltételezhetően az idegsejtek fokozott apoptózisa is hozzájárulhat a neurodegeneratív kórképek kialakulásához. Ezen feltevések nyomán Tatton és munkatársai igazolták az *R*-deprenyl

antiapoptotikus hatását feokromocitóma sejtjeiből izolált, PC-12 sejtvonalon [73]. Ezek a vizsgálatok mutattak rá arra is, hogy az antioxidáns, antiapoptotikus hatások a MAO-B enzim gátlásához szükséges koncentrációnál kisebb tartományban (10^{-9} M) is megmutatkoznak, tehát a MAO-B enzimtől függetlenek [73, 82]. A hatások hátterében álló pontos mechanizmusok felderítésére irányuló vizsgálatok során kiderült, hogy az *R*-deprenyl egyes fehérjék szintézisének befolyásolásán keresztül fejt ki kedvező „neuro-rescue” hatását. A proapoptotikus fehérjék (BAX, BAD) szintézisének csökkenése és mitokondriális transzlokációjának gátlása, míg az antiapoptotikus hatású BCL-2 fokozott termelése figyelhető meg az *R*-deprenyl kezelés hatására [83].

Az *R*-deprenyl központi idegrendszeri hatásai, mint ahogy eddig is látható volt meglehetősen összetettek. Ezt támasztják alá a vegyület neuronális (dopamin) transzmisszióra kifejtett hatásairól szóló közlemények. A Parkinson-kór kezelésében különösen előnyös, dopamin potencírozó aktivitása abból ered, hogy fokozza a dopamin szintézisét, gátolja a dopamin visszavételért felelős mechanizmusokat és érzékenyíti a dopamin receptorokat [70, 79, 84].

1.2.4.1.3. *R*-deprenyl perifériás hatásai

Az *R*-deprenyl neurodegeneratív folyamatokban betöltött védő szerepéről sok ismeretanyag gyűlt össze, azonban a vegyület általános citoprotektív jellege a központi idegrendszeren kívül is megmutatkozik [85]. Az *R*-deprenyl MAO-B független antiapoptotikus hatását nem neuronális modell-rendszerekben is megerősítették [86]. Patkány kísérletekben az *R*-deprenyl kivédte a renális epitélium sejtek apoptotikus károsodását átmeneti iszkémia-reperfúziót követően [87]. Az *R*-deprenyl új hatásmechanizmusára világítottak rá Thomas és munkatársai. Az *R*-deprenyl a NO (nitrogén-monoxid) szintézis fokozásán keresztül gyors vazodilatátor hatással rendelkezik a cerebrális és perifériás erekben egyaránt. A csökkent NO termelést többek között összefüggésbe hozták az Alzheimer-kórra jellemző csökkent memória funkciókkal és az agyi véráramlás elégtelenségével, valamint számos egyéb érrendszeri megbetegedéssel (pl. atheroszklerózis). Ezek alapján felmerült a vegyület alkalmazása a kor előrehaladtával megjelenő demenciák (pl. Alzheimer-kór) vagy az endotél diszfunkcióra visszavezethető vaszkuláris problémák gyógyításában [88]. Az atheroszklerózis terápiájában az *R*-deprenyl létjogosultságát alátámasztja az a vizsgálati

eredmény is, amelyben kimutatták, hogy a vegyület ismert antioxidáns hatása révén képes gátolni az LDL (low density – alacsony sűrűségű – lipoprotein) oxidációját [75].

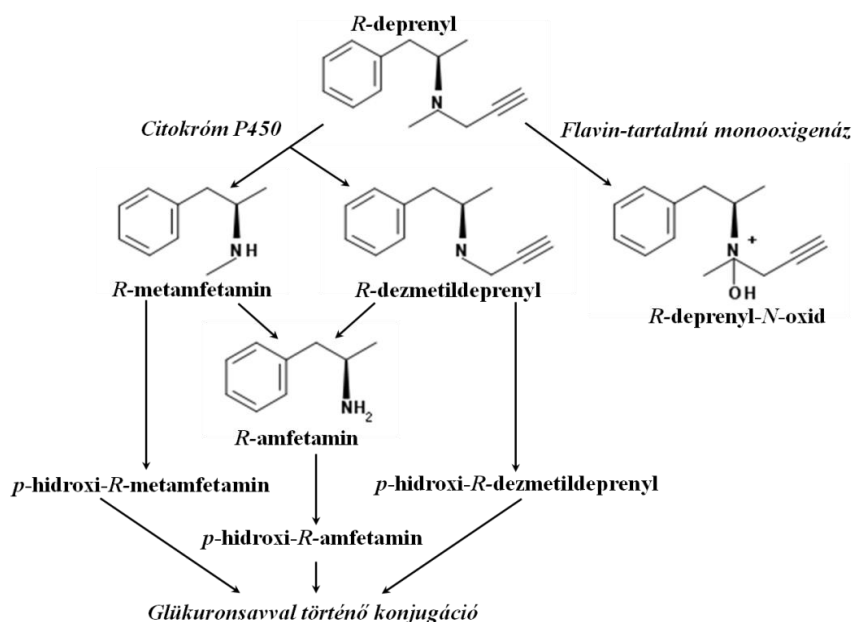
ThyagaRajan és munkatársai az *R*-deprenyl tumorellenes hatásáról is beszámoltak. A kezelés hatására csökkent a spontán indukálódó, valamint karcinogén hatásra kialakuló emlőtumzorok száma ill. mérete az egerekben. Elméletük szerint az *R*-deprenyl indirekt úton fejti ki daganatgátló hatását. A prolaktinszint csökkentő hatása révén emeli a centrális és perifériás katekolaminerg aktivitást, ami végeredményben, neuroendokrin hatásként stimulálja az immunrendszert, fokozza az NK sejtek funkcióját valamint az IL-2 és az IFN γ termelődést a lépben [89, 90].

A neurodegeneratív kórképek kialakulásában, és a tumorprogresszió során a sejtvázelemek és egyes sejtadhéziós molekulák lehetséges szerepének egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak. Jenei és munkatársai kimutatták, hogy az *R*-deprenyl a fent felsorolt hatásain túl, koncentrációfüggő módon fokozza a neuronális modellnek tekinthető PC-12 sejtekben és tumorsejteket reprezentáló NIH 3T3 sejtvonalon a sejt-sejt adhéziót [23]. A Parkinson-kór esetén kimutatták, hogy a dopamin visszavételéért felelős transzporter transzlokációja összefüggésbe hozható a sejt-sejt adhézió károsodásával [91]. Elképzelhető, hogy az *R*-deprenyl sejt-sejt adhéziót fokozó hatása révén csökkenti a dopamin visszavételét (dopamin potencírozó), a dopamin lebontásából származó oxidatív gyökök mennyiségét, és következményesen a dopaminerg neuronok pusztulását [23, 92].

1.2.4.2. *R*-deprenyl metabolizmusa

Az *R*-deprenyl féléletideje igen rövid a keringésben a gyors szöveti eloszlásának és jelentős first pass metabolizmusának (a hatóanyag lebomlása, ami a májon át történő első áthaladása során következik be) köszönhetően. Két fő metabolikus útvonal ismert, a CYP450 (citokróom P450) enzimcsalád mediálta dezalkiláció és az FMO (flavin tartalmú oxigenáz) által történő N-oxidáció (3. ábra). A dezalkiláció tekinthető a fő lebontási folyamatnak, mely során metamfetamin, amfetamin (N-depropargiláció) és dezmetildeprenyl (N-demetiláció) keletkezik [93, 94]. A dezalkilált metabolitok további átalakulása során, a benzol gyűrűn para-hidroxilált származékok keletkeznek, amelyek glükuronsavval történő konjugáció után ürülnek a szervezetből. A metabolikus átalakulás sztereoszelektív, a metabolitok megtartják az *R*-konfigurációt, ami a képződött metabolitok farmakológiai hatását alapvetően meghatározza [95]. A

dezalkiláció mellett Wu és Ichikawa által azonosított másik metabolikus útvonal az N-oxidáció, amely során egy új kiralitási centrummal és pozitív töltéssel rendelkező kvaterner deprenyl-N-oxid keletkezik [96].



3. ábra: *R*-deprenyl metabolikus átalakulása

1.2.4.2.1. Az *R*-deprenyl metabolitjainak farmakológiai hatásai

A metabolikus átalakulás (dezalkiláció) sztereoszelektív tulajdonsága folytán keletkező *R*-amfetamin, *R*-metamfetamin gyengébb, pszichostimuláns (katekolamin visszavétel gátló és felszabadító) hatással rendelkezik, összehasonlítva az enantiomerjeikkel, így az *R*-deprenyl terápiás dózisa mellett gyakorlatilag nem kell számolni a sztereotíp viselkedés, vagy a függőség kialakulásával [77].

Az *R*-deprenyl jelentős metabolikus átalakulása alapján feltételezték, hogy a keletkező metabolitok is hozzájárulhatnak az alap vegyület farmakológiai hatásaihoz. A dezalkilációs folyamat gátlásával igazolódott, hogy az *R*-deprenyl felelős a MAO-B gátlásért [97]. Az *R*-amfetamin és *R*-metamfetamin csak több nagyságrenddel nagyobb koncentrációban és reverzibilis módon gátolja az enzimet, míg a dezmetildeprenyl irreverzibilis hatású, de gátló hatása 60-szor gyengébb, mint az *R*-deprenylé.

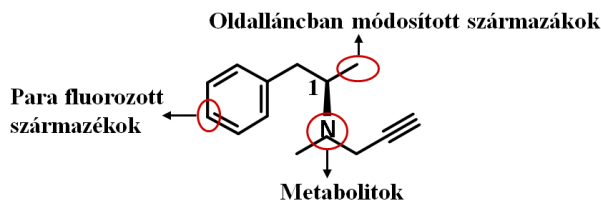
Amennyiben gátolták a CYP-450 enzimek által közvetített metabolikus útvonalat, az részben megszüntette az *R*-deprenyl neuroprotektív és antiapoptotikus hatását; azonban a fő metabolitok (*R*-metamfetamin, *R*-amfetamin) önmagukban nem rendelkeztek ilyen kedvező hatásokkal [86, 98]. Tatton és munkatársai mutatták ki

először PC-12 sejtvonalon, hogy az *R*-dezmethyldeprenyl lehet az antiapoptotikus hatást közvetítő aktív metabolit [83]. Később tanulmányok a *R*-dezmethyldeprenyl mellett az *R*-deprenyl-*N*-oxid in vitro, mind in vivo antiapoptotikus hatását is igazolták [99, 100]. Több vizsgálat is megerősíti azt a feltevést, hogy az *R*-deprenyl-*N*-oxid részben hozzájárulhat az *R*-deprenyl kedvező farmakológiai hatásaihoz. Az *N*-oxidált metabolit kivédte a szelektív, noradrenerg neurotoxin, a DSP-4 (N-(2-kloroetil)-*N*-etil-2-bromobenzil-amin) hatását egér hippocampusban, és egyedül ez a metabolit volt képes fokozni a sejt-sejt adhéziót PC-12 sejtvonalon [23, 77]. Az *R*-deprenyl és két aktív metabolitjának (*R*-dezmethyldeprenyl és *R*-deprenyl-*N*-oxid) szerkezet-hatás vizsgálata alapján megerősítést nyert Youdim és munkatársainak teóriája, amely kimondja, hogy a neuroprotektív és antiapoptotikus hatás feltétele a propargil csoport jelenléte [101].

1.2.4.3. Szintetikus származékok

A kezdeti vizsgálatokban még a racém deprenyl hatását tanulmányozták. Hamarosan bebizonyosodott, hogy a vegyület *R*-izomerje, enantiomer párjánál (*S*-deprenyl) majd 150-szer nagyobb MAO-B enzim gátló hatással rendelkezik [71]. A propargil csoport sztereokémiája meghatározó az *R*-deprenyl MAO-B gátlástól független hatásai szempontjából is. A neuroprotektív és antiapoptotikus hatások jelentős sztereoszelektivitást mutattak, az *S*-deprenyl hatástalannak bizonyult a PC-12 és A2058 sejtvonalakon az MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro-piridin) vagy a szérum megvonás hatására indukált apoptózis kivédésében [73, 98]. Az *S*-deprenyl hatékonysága a sejt-sejt adhézióra kifejtett hatás szempontjából is messze alulmaradt antipódjának mindkét sejtvonalon mért hatásától [23].

Az *R*-deprenyl metabolitjainak és enantiomerjének vizsgálata során nyert eredmények igazolták, hogy a szerkezeti jellemzőknek (konfiguráció, propargil csoport jelenléte) fontos szerepe van a farmakológiailag fontos hatások elérésében. Az összegyűlt adatok birtokában számos újabb propargilamin származék szintézisére és vizsgálatára került sor (4. ábra). Az *R*-deprenylben a C1 szénatomhoz kapcsolódó metil oldallánc hosszabbítása metil (*R*-metildeprenyl), vagy két geminális helyzetű metilcsoport (*R*-dimetildeprenyl) szubsztitúciójával a MAO-B gátló aktivitást a tizedére, ill. a századára csökkentette.



4. ábra: *R*-deprenyl szerkezete és főbb szerkezeti módosítások típusai

A benzol gyűrűt érintő változások közül, a para helyzetű fluoro csoport szubsztitúciója bizonyult eredményesnek [98, 102, 103]. Az *p*-fluoro-*R*-deprenyl, az *R*-deprenylhez hasonló mértékű, irreverzibilis MAO-B gátló hatással rendelkezett [102]. Annak ismeretében, hogy az *R*-deprenyl értékes neuroprotektív hatása nagyobb részben független a MAO-B enzim gátló hatásától, a cél olyan követő molekulák szintézise volt, amelyek szintén rendelkeznek az *R*-deprenylre jellemző citoprotektív hatással annak ellenére, hogy esetleg nincs MAO-B blokkoló hatásuk. A *p*-fluoro-*R*-deprenyl a citoprotektív hatás szempontjából is ígéretes jelölt, köszönhetően annak, hogy hatékonyabb az MPTP és DSP-4 neurotoxikus hatásának kivédésében, mint az anya vegyület [102]. A metabolizmusa során keletkező para-fluoro-metabolitok hosszabb ideig vannak jelen a szérumban, amihez hozzáadódik, hogy fokozottabb reuptake gátló hatással is rendelkeznek, mint az *R*-deprenyl metabolitjai [104]. A *p*-fluoro származék az *R*-deprenyl kezeléshez hasonlóan csökkentette az átmeneti globális agyi iszkiámiát követő idegsejt károsodást in vivo állat-modellben [105].

1.2.5. GnRH-III molekulacsalád

1.2.5.1. Természetes GnRH analógok

A gonadotropin felszabadító hormon (gonadotropin releasing hormon, GnRH) a központi idegrendszerben, a hipotalamuszban termelődik és a hipofízisben a follikuluszstimuláló hormon (FSH) és luteinizáló hormon (LH) szintézisét és szekrécióját indukálja. A hipofízeális hormonok hatásán keresztül a nemi szervek gametogenezisének és nemi hormon szintézisének központi szabályozója. Számos GnRH izoforma alakult ki az evolúció során a gerinces élővilágban, amelyek legalább 50%-os szekvencia homológiát mutató, 10 aminosav hosszúságú peptidek, és általában a hormon két izoformájának együttes jelenléte jellemző az egyes fajokra [106, 107]. Az első azonosított analóg a GnRH-I (emlős vagy humán GnRH, Glp-His-Trp-Ser-Tyr-

Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, ahol a Glp piroglutaminsavat jelent), amely az emberi szervezetben is megtalálható. A második humán hormon a GnRH-II (Glp-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂), amelyet először a csirkéből izoláltak és filogenetikailag a legkonzerváltabb analógnak tekinthető, a porcos halaktól egészen a humán szervezetig változatlan szekvenciával és szerkezettel megtalálható. Az azonosított 23 hormonvariáns három fő típusba sorolható génjeik szekvencia-homológiája alapján. A harmadik fő hormontípus a GnRH-III (Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂), amelyet ezidáig nem sikerült kimutatni az emberi szervezetben [108, 109]. A hormonok jelenlétét a központi idegrendszeren kívül, a perifériás szövetekben is igazolták. Neuroendokrin hatásuk mellett, mint parakrin/autokrin regulátorok közvetlen módon befolyásolják nemcsak a nemiszervek (ovárium, miometrium), hanem egyes nemihormon független szövetek vagy sejtek (csontvelő, gyomor-bél rendszer, T-limfocita) működését is [110, 111].

A hormonok N- (Glp¹-His²-Trp³-Ser⁴) és C-terminálisának (Pro⁹-Gly¹⁰-NH₂) aminosav sorrendje változatlan maradt az evolúciós fejlődés során. Ez arra enged következtetni, hogy ezeknek a régióknak kitüntetett szerepe van a receptorkötésben és részben a receptor aktiválásban. A központi, 5.-8. pozícióban lévő aminosavakban található eltérés felelős vélhetően az egyes izoformák hatásbeli és aktivitásbeli különbségeiért. A centrális régióban lévő aminosavak alapvetően meghatározzák a hormonok konformációját és receptor affinitását, specificitását. A hipofizeális hatások kiváltásának elengedhetetlen feltétele a GnRH-I-re jellemző β-II' turn bioaktív konformáció (a kis térkitöltésű Gly⁶ körül meghajlott szerkezet), amely nagy affinitású kötődést biztosít a receptorhoz [108]. Ha a GnRH-I hatos pozíciójába D-aminosav kerül beépítésre a β-II' turn szerkezet stabilizálása, és egyben hatékonyság növelése érhető el. Az így kapott szuperagonista analógok nagyobb receptor affinitással rendelkeznek [112].

1.2.5.2. GnRH receptorok

A GnRH-I és GnRH-II együttes jelenléte az emberi szervezetben két funkcióképes receptor meglétére utal. A GnRH-I típusú receptor (GnRH-IR) a 7TM, G-protein kapcsolt receptorcsaládba tartozik. Egyedülálló tulajdonsága, hogy hiányzik a citoplazmatikus C-terminális régiója, amely önmagában felelős lenne a receptor internalizációjáért. Tartós agonista kezelés hatására a C-terminális régió hiányában a

receptorok lassú down-regulációja figyelhető meg. A szintén G-protein kapcsolt receptorok közé sorolható humán GnRH-II típusú receptor (GnRH-IIR) mRNS expressziója megfigyelhető különböző szövetekben, azonban a teljes hosszúságú receptorproteint fehérjeszinten még nem sikerült azonosítani. A GnRH-I a β -II' turn konformációjának köszönhetően nagy affinitással kötődik a GnRH-IR-hoz. Annak ellenére, hogy a GnRH-II, szerkezetéből adódóan kisebb affinitást mutat a GnRH-IR iránt, feltételezhető, hogy hatásait is ez a receptor közvetíti [107, 108, 113]. A GnRH analógok extrahipofízis expressziója mellett a receptoruk jelenlétét is kimutatták számos perifériás szövetben. A perifériás GnRH receptorokon keresztül megvalósuló autokrin/parakrin hatások, fontos szerepet játszanak az ovárium normális fejlődésében, a menstruációs ciklus szabályozásában, a terhesség korai szakaszában az embrió beágyazódásában, valamint a megtermékenyítésben is. A GnRH variánsok sokféle, a nemiszervek működésének befolyásolásától független funkcióját is leírták. Az immunmoduláns hatásukra utal, hogy mind a hormonok, mind a GnRH-IR jelenlétét kimutatták a normál T limfocitákban [111, 114].

A filogenezis alacsonyabb szintjén álló élőlényekben (*Drosophila melanogaster*ben és *Caenorhabditis elegans*ban), ahol még nem alakult ki a klasszikus értelemben vett endokrin rendszer, szintén megtalálható a GnRH receptor. Ez a GnRH receptoron keresztül megvalósuló autokrin/parakrin szabályozás a kommunikációs kapcsolatok evolúciós jelentőségét látszik alátámasztani [108].

1.2.5.2.1. GnRH peptidek tumorelles hatása

Egészséges körülmények között a GnRH felszabadulása a hipotalamuszból ritmikus módon következik be. Amennyiben ettől eltérően a GnRH-t vagy agonista származékát folyamatosan nagy dózisban adagolják, az a hipofízis receptorok internalizációját, down-regulációját váltja ki, ami az FSH és LH termelés megszűnéséhez és végeredményben a gonádok atrófiájához, a nemi hormonok szintézisének leállításához vezet. Ez a terápiás protokoll a nemi hormon függő daganatok kezelésében széles körben elfogadott és alkalmazott [108].

A szakirodalmi adatok szerint a daganatsejtek is termelnek GnRH hormonokat, valamint membránjukban a GnRH-IR jelenléte is kimutatható volt. Összehasonlítva a perifériás, egészséges sejtekkel, a tumorsejtek felszínén nagyobb számban fejeződnek ki

ezek a receptorok [111, 115]. Kevés adat áll rendelkezésre, ami magyarázatot adhatna a GnRH – GnRH receptor jelátviteli rendszer pontos szerepére a tumoros transzformációban, vagy progresszióban. Ugyanakkor, a GnRH származékok közvetlen antiproliferatív hatását kimutatták GnRH-IR túltermelő emlő, ovárium és endometrium daganatok esetén [116]. A natív GnRH hormonok és analógjaik tumorgátló hatása azonban nem szorítkozik csak a gonádokat érintő daganatos elváltozásokra. Melanómák, limfómák, hasnyálmirigy-, vastagbél-daganatok nagy százalékára jellemző a GnRH receptor pozitivitás, és a különböző GnRH származékok eredményesen gátolták ezeknek a daganatoknak a növekedését is [66, 117-119]. A tumorsejtekben kimutatott receptorok mRNS szekvenciájuk és a fehérje szerkezetük alapján a klasszikus, hipofízisben expresszálandó receptorokkal feleltethetőek meg, azonban több szempontból különböznek is egymástól [115]. A tumorsejteken a GnRH kötőhelyek kisebb számban vannak jelen, mint a hipofízisben. Ezzel az expresszióbeli különbséggel magyarázható számos GnRH analógra jellemző endokrin mellékhatás. A másik fontos különbség, hogy a központi idegrendszeri receptorok (GnRH-IR) nagy affinitással kötik a GnRH-I hormont, míg a tumorsejtek felszínén, típustól függően, alacsony vagy nagy affinitású receptorokat, vagy ezek együttes jelenlétét írták le. [116] A hipofízeális receptorok esetében tapasztalt agonista és antagonist felosztás a tumorsejtek felszínén lévő receptorokra nem érvényes, az antagonist GnRH származékok is antiproliferatív hatásúnak bizonyultak. A farmakológiai hatásbeli eltérések (hipofízisben hormon szintézis és szekréció indukció, daganatsejteken antiproliferatív hatás) visszavezethetőek arra, hogy GnRH-IR által közvetített szignáltranszdukciós mechanizmusok is mások a tumorsejtekben, mint a hipofízisben [115, 120, 121].

A különböző daganat típusokban tapasztalt tumorelles hatás hátterében különböző mechanizmusok állhatnak: növekedési faktor (EGF, IGF) receptorok kifejeződésének, vagy a tirozin kináz aktivitásának gátlása (ovárium, prosztata karcinóma), az apoptotikus folyamatok beindítása kaspáz kaskád aktiváció, vagy fokozott Fas ligand expresszió révén (prosztata és endometrium daganatban) [116]. A GnRH származékok azon túl, hogy gátolják a daganat növekedését, antimetasztatikus hatással is rendelkeznek. Képesek befolyásolni a tumorsejtek adhéziós és migrációs viselkedését [120-122], valamint a tumor angiogenetikus folyamatait a VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor) és az angiopoetin csökkentésén keresztül [123].

1.2.5.2.2. GnRH peptidek adhézióra és migrációra kifejtett hatásai

Melanóma sejtvonalon bizonyították először, hogy a GnRH agonista származék (Zoladex) antiproliferatív hatása mellett, negatívan hat a sejtek invazivitására, a sejtek kemotaktikus aktivitásának és mátrixbontó enzimek termelődésének gátlásán keresztül [118, 124]. Hasonló eredményeket közöltek prosztata karcinóma sejtvonalakon is. A GnRH agonista és antagonisták kezelés egyformán hatott, csökkentették a sejtek migrációját, az urokináz plazminogén aktivátor szekrécióját, fokozták a sejt-sejt adhéziónak molekulák expresszióját (E-kadherin, α -katenin) [125-127]. Schubert és kollégái kimutatták, hogy GnRH analógok in vivo rendszerben is képesek gátolni az emlő daganatok csonttáttét képző hatását. Ezek az eredmények azt is jelzik, hogy a GnRH származékok nemcsak a metasztatizálás korai eseményeit (motilis fenotípus kialakulása, migráció, invázió) képesek gátolni, hanem hatással vannak a keringő emlőtumorsejtekre is, vélhetően indirekt módon, az oszteoblaszt eredetű kemokin (SDF-1) és kemokin receptor rendszer gátlásán keresztül [128, 129].

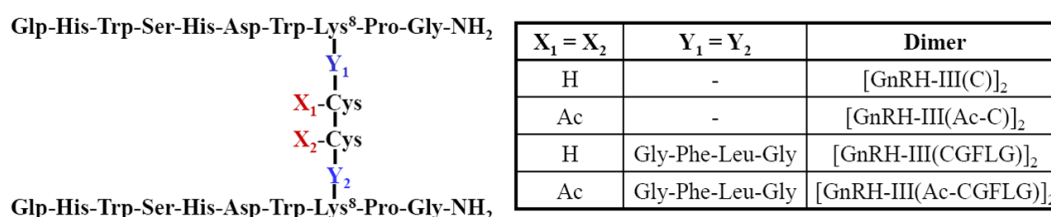
A GnRH-I és GnRH-II jelenléte normál és transzformált T limfocitákban arra utal, hogy a peptidek fiziológiai körülmények között az immunfolyamatok, míg kóros állapotban a metasztatizálás szabályozásában vesznek részt. GnRH hormonok, a nem-integrin típusú laminin receptor fokozott sejt-felszíni megjelenésével, in vitro körülmények között a T limfociták kemotaxisát, adhézióját, míg in vivo modellben a csontvelőbe, lépbe történő migrációját befolyásolják [114].

1.2.5.3. GnRH-III és származékai

A GnRH-III, annak ellenére, hogy nem természetes ligandja a GnRH-IR-nak, képes specifikusan kötődni hozzá [130]. A GnRH-III a 6-os pozícióban egy Asp aminosavat tartalmaz, amely térkitöltő oldallánca révén megakadályozza a GnRH-I analógra (6 Gly) jellemző β -II' turn harmadlagos szerkezet kialakulását [108], ebből adódóan gyenge agonistaként viselkedik a hipofizeális receptorokon és elhanyagolható FSH/LH felszabadító hatással bír. Ezzel ellentétben a GnRH-III a leghatékonyabb tumorelleses származék a természetes analógok között, koncentrációfüggő módon gátolja az emlő-, a prosztata-, a hasnyálmirigy-, és a vastagbél-daganat eredetű sejtek osztódását [131-134]. Ezek alapján a GnRH-III egy endokrin mellékhatásoktól mentes, perifériás GnRH receptoron ható, direkt tumorelleses hatású vegyület. Kiemelendő, hogy csak L-

aminosavakat tartalmaz, így a szintetikus, D-aminosav tartalmú származékokra jellemző allergiás reakciók kialakulásával sem kell számolni [132, 135].

Részletes szerkezet-hatás vizsgálatok adatai szerint a 8-as pozícióban található Lys aminosav módosítása megengedett, a többi aminosav (5.-7- pozíció) alaninra történő cseréje (Ala-scan) a receptor-kötő képesség és egyben a hatás elvesztését eredményezte [131]. Ebből adódóan a Lys⁸ oldallánca felhasználható további kémiai módosításokra az antiproliferatív hatás elvesztése nélkül. A GnRH-III peptid polimer hordozóhoz történő kapcsolása Lys⁸ oldallancán keresztül a vártan megfelelően az antiproliferatív hatás megtartásával, sőt emelkedésével, valamint a csekély endokrin hatás megszűnésével járt [130, 136]. A tumorelles hatas fokozasa érdekében két GnRH-III származékot a Lys⁸ oldallancukon keresztül közvetlenül, vagy GFLG enzim labilis távtartó szekvencia közbeiktatásával diszulfid híd kiépítésével kapcsoltak össze (5. ábra). Az így kapott szimmetrikus dimer származékok az antiproliferatív jelleg szempontjából hatásosabbnak bizonyultak az MCF-7 humán emlő- és a HT-29 humán vastagbél-daganat eredetű sejtvonalakon, míg hormonális (LH-felszabadító) hatásuk gyengébb volt, mint az alapmolekuláé [133, 137]. A szimmetrikus dimerek tumorsejt specifitása a bázikus karakter (Lys⁸) megszűnésének [135], míg a fokozott sejtosztódást gátló képessége részben a proteolitikus enzimekkel szemben mutatott nagyobb stabilitásuknak tudható be. Az sem kizárható, hogy a dimer mindkét monomer alegysége képes egy-egy receptorhoz kötődni, biztosítva ez által a receptorok mikroaggregációját, a dimerek jobb receptor telítettségét és hatékonyabb sejtbejutását [133, 137].



5. ábra: GnRH-III dimer származékainak szerkezete

Ac: acetyl-csoport

1.2.5.3.1. Tumorelles hatóanyagot tartalmazó GnRH alapú konjugátumok

A gyógyszer-célbajuttatás alapja a tumorok felszínén szelektíven megjelenő receptorokhoz nagy affinitással kötődni képes hatóanyag-szállító rendszerek alkalmazása. A GnRH receptor egy, a rákos sejtek felszínén nagyszámban kifejeződő, míg az egészséges sejtekből gyakorlatilag hiányzó fehérjecélpontok közül. A GnRH

származékok önmagukban egyszerre biztosítják a tumorszelektivitást és a tumorelles hatást. A gyógyszertervezés és célbajuttatás szempontjából a GnRH származékok hatékonysága két módon fejleszthető. Az egyik megoldás a peptid intrinsic tumorelles hatásának fokozása (dimer származékképzés – GnRH-III dimer származékok [133], GnRH analógok polimer hordozóhoz történő kapcsolása [130]). A másik lehetőség citotoxikus hatóanyag GnRH származékokhoz történő kapcsolása (GnRH – tumorelles hatóanyag konjugátum) [65, 66, 137].

A GnRH peptidek irányító hatással rendelkező hordozóként történő felhasználásának ötlete az egyes citotoxikus hatóanyagok célbajuttatására Schally és munkacsoportjától származik [138]. Számos GnRH – hatóanyag hibrid származékot állítottak elő, ahol az irányító egység szerepét legtöbb esetben a szuperagonista hatású [D-Lys]⁶-GnRH-I látta el, míg gyógyszer komponensként melfalán, ciszplatin, metotrexát fordult elő [138-140]. A vegyületek jó része igen hatékony tumorelles hatással rendelkezett, azonban jelentős endokrin hatásuk korlátozta a további eredményes felhasználásuk lehetőségét. A citotoxikus GnRH származékok ([D-Lys]⁶-GnRH-I alapú konjugátumok) közül a doxorubicint ill. analógját tartalmazó rendszerek (doxorubicin tartalmú: AN-152, 2-pirrolino-doxorubicin tartalmú: AN-207) bizonyultak a leghatékonyabbnak GnRH receptor pozitív emlő-, ovárium-, endometrium daganatokban, melanómában és non-Hodgkin limfómában, in vitro és in vivo modell-rendszerben egyaránt [65, 117, 141, 142]. A doxorubicin ill. származéka glutársav távtartó egységen keresztül, észterkötéssel lett a peptidhez kapcsolva. A receptor mediált internalizáció révén bejutott citotoxikus konjugátumokból a hatóanyag az észterkötést bontó karboxil-észteráz enzim hatására szabadul fel. A GnRH-alapú hatóanyag-szállító rendszerek a legtöbb esetben hatékonyabbnak bizonyultak, mint a szisztémásan adott hatóanyag, azonban ezek a konjugátumok is rendelkeztek nem kívánt, toxikus hatással, bár ez lényegesen kisebb mértékben fordult elő, mint a szisztémásan adott szabad hatóanyagoknál. A mellékhatások megjelenését két tényező segítette elő, egyrészt az észterkötés kevésbé stabil, a szérumban megtalálható karboxil-észteráz enzim hatására a hatóanyag korai felszabadulása következett be. Másrészt a [D-Lys]⁶-GnRH-I, mint szuperagonista hatású komponens a hipofízeális receptorokhoz kötődve endokrin hatás kialakulását eredményezte. A GnRH-alapú konjugátumok a hipofízeális sejtek reverzibilis károsodását okozták, amely a hormonális egyensúly

felborulásához vezetett. Ez a hormonfüggő daganatos megbetegedésben szenvedő páciensek esetén még kedvezőnek is bizonyult. A hormonális mellékhatások azonban visszafordíthatóak voltak hormonpótló kezelés mellett [65, 137]. Mindezek alapján az AN-152 hatékony és szelektív tumorellenes konjugátum, és az irányított tumor terápiában történő felhasználását támogatja az a tény is, hogy sikeresen zárta az ovárium és endometrium karcinómákon végzett klinikai vizsgálatok II. fázisát [<http://www.aeternazentaris.com/en/page.php?p=31&prod=16>].

Az AN-152 példáját követve több, hatóanyag-tartalmú GnRH származék került kidolgozásra azzal a céllal, hogy hatékonyabb tumorellenes hatású konjugátumot állítsanak elő, vagy a szelektívebb targetálásnak köszönhetően minimálisra csökkentsék a mellékhatások kialakulásának valószínűségét. A célbajuttatás szelektivitásának javítására az egyik lehetősége, olyan targetáló egységek alkalmazása, amelyek gyenge agonista hatással rendelkeznek a hipofizeális receptorokon. Janáky és munkatársai különböző hosszúságú N-terminális vég felől rövidített GnRH fragmenst állítottak elő, hogy megtalálják, a szelektív gyógyszer-célbajuttatás szempontjából legoptimálisabb méretű analógot. Egyes, tumorellenes hatóanyagot is hordozó fragmens származékok eredményesen gátolták a tumorsejtek növekedését, anélkül, hogy érdemleges LH-felszabadító hatásukat ki lehetett volna mutatni [143].

1.2.5.3.2. Citotoxikus GnRH-III konjugátumok

A GnRH-III, az emlő adenokarcinóma sejteken végzett vizsgálatok alapján, a leghatékonyabb tumorgátló természetes analóg, gyenge agonista hatásából (hipofizeális receptorokon) adódóan endokrin mellékhatások kialakulásával sem kell számolni [132, 135]. A GnRH-III, mint célzó egység szerepel Mező és munkatársai által tervezett és kifejlesztett doxorubicin/daunorubicin tartalmú hatóanyag-szállító rendszerekben [137]. A korábbi szerkezet-hatás vizsgálatok eredményei szerint a Lys⁸ oldallánca felhasználható tumorellenes hatóanyagok konjugálására, a receptorkötődés és a tumorellenes hatás elvesztése nélkül [131, 137]. Abból kiindulva, hogy egy hatékony konjugátumnak biztosítania kell a hatóanyag célsejthez történő jutását (kellő stabilitás), a célsejt általi felvételét (internalizáció), és a célsejtben a hatóanyag felszabadulását (intracelluláris degradáció), különböző összetételű és szerkezetű GnRH-III konjugátum előállítására került sor. Emlő és vastagbél adenokarcinóma sejtvonalakon végzett

vizsgálatok eredményeiből látható, hogy a hatóanyag kapcsolásának módja (észter-, hidrazon-, oximkötés) alapvetően meghatározza a hatóanyag felszabadulását és ennek következtében a tumorelles hatást. A hatékonysági sor a következőképpen alakult: észter- $\geq$ hidrazon- $>$ oxim- $\gg$ amidkötés. Az egyes kötéstípusok (oxim) kémiai stabilitása miatt a hatóanyagot tartalmazó aktív metabolit felszabadulása érdekében a hormon és hatóanyag közé egy, a daganatsejtben túltermelő lizoszómális enzim (katepszin B) által hasítható spacer szekvencia került beépítésre. Az így előállított konjugátumok hatékony tumorelles hatást fejtek ki in vitro modell-rendszerben, humán szérumban stabilnak bizonyultak, míg katepszin B hatására biztosított volt a hatóanyagot tartalmazó aktív metabolit felszabadulása [137, 144, 145]. A modell-sejteken leghatékonyabb származékok az in vivo vizsgálatok során toxikus mellékhatásoktól mentes, a tolerálható dózisban adott, szabad hatóanyagnál (daunomicinnél) nagyobb mértékű tumorelles hatást mutattak [144, 146]. A peptid konjugátumok orális adagolásának feltétele a gyomor-bél traktus proteolitikus enzimjeivel szembeni stabilitás. A GnRH-III alapú konjugátumok a -Trp³-Ser⁴- kötés helyén a legérzékenyebbek proteolitikus hasításra [133, 144]. A per os történő alkalmazás céljából, a peptid stabilitásának fokozására különböző megoldások (D-aminosav, N-metil-aminosav beépítése) terjedtek el az irodalomban [66, 67]. Az N-metil-szerin illetve az oldalláncában acetilezett lizin beépítése a daunomicint tartalmazó GnRH-III konjugátumba eredményesnek bizonyult a kimotripsinnel szembeni stabilitás növelésére. Az utóbbi, 4-es pozícióban történő cseréről már korábban igazolták, hogy nem befolyásolja szignifikánsan a hormon biológiai aktivitását. Az acetyl-lizin beépítése a szekvenciába növelte a daunorubicin-tartalmú konjugátum in vitro és in vivo tumorelles hatását is [147]. A lizin származék sikeres beépítése a 4-es pozícióba egy újabb lehetőséget teremtett a konjugátum daganatellenes hatásának továbbfejlesztésére. Amennyiben a [(Ac)Lys]⁴-GnRH-III peptidben az acetylcsoporthelyére egy második hatóanyagot kapcsolnak, akkor összesen két hatóanyag konjugálására (Lys⁸ és Ac-Lys⁴ oldalláncán keresztül) – ún. bifunkciós konjugátumok előállítására – nyílt lehetőség [148].

2. CÉLKITŰZÉSEK

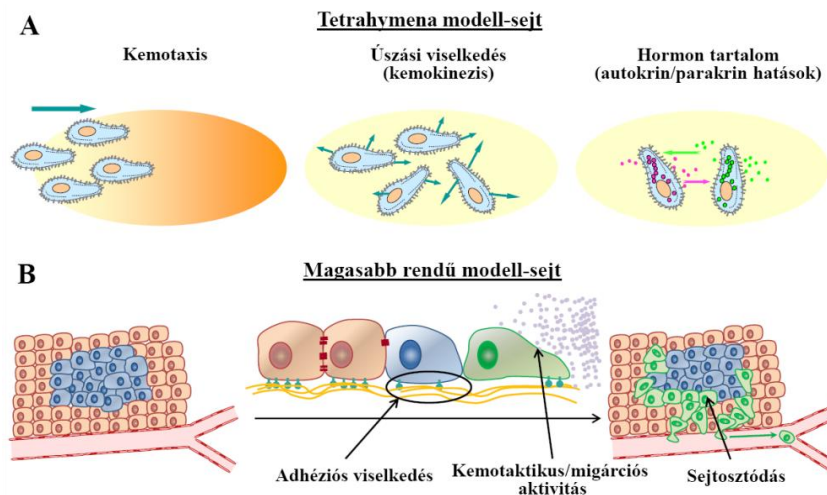
A sejt környezetében jelenlévő kémiai, időbeli és térbeli információt hordozó bioaktív molekulák, legyenek azok szecernált endogén hírvivők, vagy szintetikus gyógyszervegyületek, a sejtek élettani folyamatainak egész sorát képesek befolyásolni. A sejtfiziológiai reakciók sorában az adhézió, a migráció és a proliferáció összerendezett működése számos normál élettani folyamatban fontos szerepet játszik, míg működésük, vagy szabályozásuk zavara betegségek megjelenéséhez, többek között rosszindulatú daganatok kialakulásához, metasztázisok képződéséhez vezethet. A sejtek megváltozott adhéziójának, migrációjának és proliferációjának specifikus gyógyszeres befolyásolása (célzott terápia) ígéretes lehet például a tumorprogresszió lassítása, és egyben az áttétképzés megelőzése céljából. A sejtek érzékeny adhéziós és kemotaktikus válaszkészsége kitűnő alapot teremt egyes bioaktív anyagok – különböző célzott terápiás felhasználásra szánt szintetikus gyógyszerek (peptidek, kismolekulák) vagy endogén hormonok – kemotaktikus és adhéziót befolyásoló hatásának vizsgálatára az evolúció alacsonyabb és magasabb szintjét képviselő modell-rendszerekben egyaránt.

Doktori munkám során az alapvető sejtfiziológiai folyamatok célzott gyógyszeres kiváltásának és befolyásolásának két lehetőségét tanulmányoztam csillós egysejtű és magasabb rendű modell-sejteken (6. ábra). A vizsgálatok középpontjában, az egyes daganatokban szelektíven túltermelődő (1.) MAO(-B) enzim specifikus gátlószereként ismert, és a gyógyászatban (Parkinson-kór kezelésében) jelenleg is alkalmazott, *R*-deprenyl és származékai, valamint (2.) szelektív gyógyszer-célbajuttatásra kifejlesztett GnRH-III molekulacsalád vizsgálata állt.

1. Munkám első fázisában a deprenyl származékok antimetasztatikus hatását és a sejtélettani hatások filogenetikai megőrzöttségét vizsgálva a következő kérdések megválaszolását tűztem ki célul.

- A MAO szubsztrátok közül a szerotonin képes-e befolyásolni a *Tetrahymena* endogén hormon tartalmát, valamint előkezelés formájában alkalmazva (szerotonin imprinting) képes-e hosszú távon megváltoztatni a modell-sejt fiziológiai reakcióit?
- A MAO-B gátló *R*-deprenyl milyen hatást fejt ki a *Tetrahymena* szerotonin tartalmára?
- Az *R*-deprenyl és származékai képesek-e kiváltani a csillós modell-sejt kemotaktikus reakcióját? (6. ábra)

- Az R-deprenyl és származékai rendelkeznek-e adhéziót befolyásoló, kemotaktikus és antiproliferatív hatással eltérő malignitású tumorsejtvonalakon, és ezek a hatások hozzájárulhatnak-e a tumorok növekedésének és szóródásának megakadályozásához?
(Hiba! A hivatkozási forrás nem található. 6. ábra)



6. ábra: A két anyagcsoport hatásainak vizsgálata a két modell-rendszerben
 (Az 6. ábra egyes részletei, külön számozás nélkül, az 4. Eredmények fejezet egyes alfejezeti elején, mint magyarázó és összefoglaló ábrák vannak ismételtelen feltüntetve segítve az olvasót, hogy abban a részben milyen hatások kerülnek tárgyalásra.)

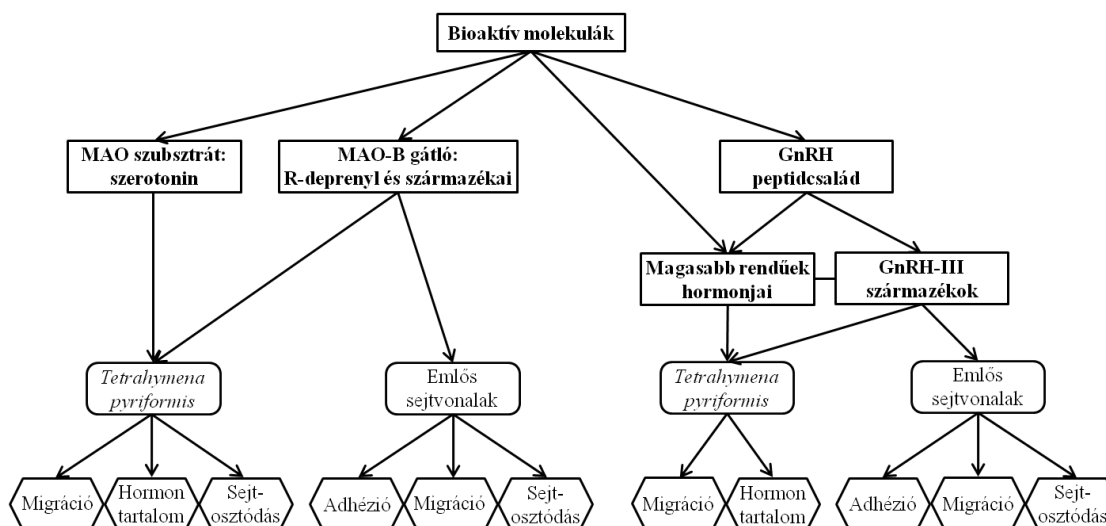
2. Munkám folytatásában különböző GnRH peptidek sejtfiziológiai folyamatokra kifejtett hatását először *Tetrahymena pyriformis* modell-sejten vizsgáltam. A GnRH-III származékok és hatóanyag-tartalmú konjugátumaik magasabb rendű sejtvonalon végzett, részletesebb in vitro vizsgálatával az irányított tumorterápiában történő felhasználásuk lehetőségét tanulmányoztam. Kísérleteink során a következő kérdések megválaszolására helyeztem a hangsúlyt.

- Milyen kemotaktikus hatást fejtenek ki a GnRH származékok *Tetrahymena* sejteken és milyen szerkezet-hatás összefüggések mutathatóak ki?
- A természetes GnRH izoformák és szintetikus származékok milyen hatással vannak a csillós protozoon hormon termelésére és kemokinetikus aktivitására, összehasonlítva más magasabb rendűekre jellemző hormonok hatásaival? (6. ábra)
- Rendelkeznek-e adhéziót befolyásoló és kemotaktikus hatással az egyes GnRH-III származékok és konjugátumaik magasabb rendű modell-sejten.

- A tumorelleses hatóanyag tartalmú konjugátumok megtartják-e a szabad gyógyszermolekulára jellemző antiproliferatív hatásukat?
- A gyógyszer-célbajuttatására tervezett GnRH-III hordozók és konjugátumaik komplex hatásprofiljuk alapján alkalmasak-e az irányított tumorterápiában történő felhasználásra, mint tumorelleses és antimetasztatikus ágensek? (6. ábra)

Munkám során minden esetben igyekeztem összehasonlítani a filogenetikailag alacsonyabb szinten álló *Tetrahymena* és a magasabb rendű modell-sejteken kapott eredményeket azzal a céllal, hogy a *Tetrahymena* mennyiben tekinthető adekvát modellnek, magasabb rendű sejteken történő vizsgálatok bevezető méréseihez.

Az alábbi ábra (7. ábra) disszertáció főbb vizsgálatait foglalja össze.



7. ábra: Disszertáció főbb célkitűzéseit és vizsgálatait összefoglaló ábra

3. MÓDSZEREK

3.1. Felhasznált anyagok

3.1.1. R-deprenyl és származékai

A vizsgálatainkban szereplő 10 deprenyl származékot a Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára, Sanofi-Aventis Zrt. (Budapest, Magyarország) ingyen bocsájtotta rendelkezésünkre, amiért itt szeretnénk köszönetünket kifejezni. Mindegyik vizsgált vegyület jó vízzoldékonysággal rendelkezett, az in vitro vizsgálatok során alkalmazott koncentrációk kihígítása a sejtek tenyésztésére használt médiumban történt.

3.1.2. Hormonok és szignál molekulák

Tetrahymena pyriformis sejtélettani folyamatainak vizsgálata során a következő hormonok, szignál molekulák hatását elemeztük: szerotonin (Sigma-Aldrich Ltd. St. Louis, MO, USA), gonadotropinok (Pergonal porampulla[®] – FSH és LH 50-50 %, Human Gyógyszergyártó Rt., Gödöllő, Magyarország), TSH (tireoidea-stimuláló hormon, Sigma-Aldrich Ltd. St. Louis, MO, USA), GnRH származékok (peptidek szintézisét az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportja végezte, 3.1.3 fejezet).

3.1.3. GnRH származékok

A gyógyszer-célbajuttatás kérdéskörben végzett kísérleteink során 12 GnRH-III származékot, mint irányító hatású hordozót, a munka folytatásában pedig 16 hatóanyagot tartalmazó GnRH-III konjugátum hatását tanulmányoztam. A disszertációban szereplő összes GnRH származék szintézise, tisztítása és analitikai vizsgálata az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport és a Konstanz Egyetem, Kémiai Tanszék, Analitikai Kémiai és Biopolimer Szerkezetanalitikai Laboratórium közreműködésével történt.

A GnRH peptideket szilárdfázisú szintézissel állították elő MBHA illetve Rink-Amid MBHA gyantákon vegyes Boc/Bzl és Fmoc/tBu illetve Fmoc/tBu stratégiával. A peptidek dimerizációja, illetve a hatóanyagok konjugálása a GnRH származékokhoz oldatban történt a megadott irodalmakban leírt körülmények között [133, 144, 145, 147, 148]. A nyers peptideket és peptidkonjugátumokat félpreparatív HPLC segítségével tisztították. A tisztított termékek analitikai jellemzésére Knauer (Knauer H., Bad Homburg, Németország), vagy UltiMate 3000 system (Dionex, Idstein, Németország) RP-HPLC és ESI-MS Bruker

Esquire 3000 Plus ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Németország) alkalmaztak. Az előállított peptidek jól oldódtak vízben, így a további sejtbiológiai vizsgálatokban alkalmazott oldataik elkészítéséhez sejtenyészítő médiumot használtunk.

3.2. Modell-sejtek és tenyésztési körülményeik

3.2.1. *Tetrahymena pyriformis* sejt kultúra

A kísérletekhez a növekedés logaritmikus fázisában lévő (10^4 sejt/ml) *Tetrahymena pyriformis* GL sejt kultúrát használtunk. A sejteket 0,1% élesztőkivonatot (Oxoid, Basingstoke, UK) és 1% Bacto tryptone-t (Difco, Detroit, MI, USA) tartalmazó tápoldatban, légköri O_2/CO_2 tartalom mellett, $28^\circ C$ -on tenyésztettük.

A magasabb rendűek hormonjainak hatásvizsgálata során, csak inorganikus sókat (1% NaCl; 0.1% $MgCl_2$; 0.1% $CaCl_2$; 0.1% KCl és 0.2% $NaHCO_3$) tartalmazó, Losina-Losinsky (LL) oldatot használtunk. Az LL puffert, a tápanyagdús médiumban lévő fehérjék zavaró hatásnak kiküszöbölésére használják, valamint annak elkülönítésére, hogy a *Tetrahymena* megnövekedett hormonmennyisége mennyiben az endogén szintézis eredménye, és mennyiben függ a környezetben lévő anyagok felvételétől.

3.2.2. Magasabb rendűekből származó sejt vonalak

3.2.2.1. Mono Mac 6 humán monocita sejt vonal

A Mono Mac 6 (MM6) akut mieloid leukémiából izolált humán monocita sejt vonal, az érett monocitákra jellemző fenotípussal (M42, LeuM3, 63D3, Mo2, My4 és CD14 sejt felszíni markerek konstitutív expressziója) és funkciókkal (fagocitózis, reaktív oxigén gyökök termelése) rendelkezik [149]. A monocita specifikus kemokinek (pl. RANTES), amelyek az immunválasz során vezérlik a sejtek toborzását a gyulladásos területekre, in vitro kísérletek során, hasonlóan az izolált normál monocita sejtekhez, képesek kiváltani a MM6 sejtek rollingját, adhézióját és kemotaktikus választ statikus és a véráramlását modellező, dinamikus rendszerekben egyaránt. [150, 151].

A MM6 sejt vonalat 10% hőinaktivált, magzati borjú savót (FCS) tartalmazó RPMI 1640 médiumban (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) tartottuk fenn $37^\circ C$ -on, 5% CO_2 tartalom mellett. A médiumot 2mM L-glutaminnal (Gibco®/Invitrogen Corporation, New York, USA) és 100UI/ml penicillin / 100 μg /ml streptomycin (Gibco®/Invitrogen Corporation, New York, USA) oldattal egészítettük ki.

3.2.2.2. LM2 egér emlő adenokarcinóma sejtvonala

Az LM2 egy BALB/c egér eredetű emlő adenokarcinóma sejtvonala. Az LM2 sejtek, bár jellemző rájuk az urokináz plazminogén aktivátor és a MMP expresszió, gyakorlatilag egyáltalán nem rendelkeznek metasztatikus potenciállal [152, 153].

Az LM2 emlő adenokarcinóma sejtek tenyésztése 10% hőinaktivált FCS-t, 2mM L-glutamint, 100UI/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint (Gibco®/Invitrogen Corporation, New York, USA) tartalmazó F12 mediumban (Sigma Ltd. St. Luis, MO, USA) történt, 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett.

3.3. Kemotaxis mérő módszer

3.3.1. Két-kamrás kapilláris kemotaxis assay

Tetrahymena pyriformis modell-sejten végzett kemotaxis vizsgálatainkhoz Leick és Helle által kidolgozott kapilláris assay [154] egy továbbfejlesztett formáját alkalmaztuk [155]. Ebben a két-kamrás összeállításban egy nyolc-csatornás automata pipetta, cserélhető steril hegyei jelentik az ún. belső/felső kamrát, amelyben a vizsgálandó ligand különböző koncentrációjú oldatai vannak. Az ún. külső/alsó kamrák egy 96 lyukú lemez egyes mélyedései (welljei), ezekben található a vizsgálni kívánt sejtek (10⁴ sejt/ml). A két kamra közti kapcsolatot a pipetta kapilláris méretű nyílása képviseli, ami 0,5 mm-re belemerül a sejteket tartalmazó táptalajba. Az inkubációs idő 15 perc; ez a viszonylag rövid idő biztosítja azt, hogy csak a koncentrációgradiens-függő mozgásra képes sejtek jussanak a pipettába, kiküszöbölve a nem vektoriális jellegű mozgás során történő bejutást [156]. Az inkubációs idő letelte után a pozitívan válaszoló (pipettába feljutott) sejteket 4% formalint tartalmazó PBS oldatban (0.05 M foszfát puffer, pH=7.2) fixáltuk. A sejtszám meghatározása Neubauer hemocitóméterrel történt. Mintánként öt párhuzamos mérést végeztünk, és kontrollként a sejtek tenyésztéséhez használt tápfolyadékot szolgált. A mérési eredmények átlagát a kontrollra normalizáltuk (kontroll = 100%) és kemotaxis index (Ktx. ind.) formájában fejeztük ki [155].

3.3.2. Módosított Boyden-kamrás kemotaxis assay

A magasabb rendű sejtek kemotaktikus válaszkészségét módosított Boyden-kamra felhasználásával határoztuk meg. A módszer előnye, hogy stabil gradiens alakítható ki és gyors, egyszerre sok párhuzamos mérése válik lehetővé.

A kétkamrás rendszerben az alsó kamrát jelentő, 96 lyukú szövettenyésztő lemez mélyedéseibe helyezett vizsgálandó anyag különböző koncentrációjú oldatait (10^{-11} - 10^{-6} M) egy 8 μ m pórusátmérőjű polikarbonát filter választja el a sejteket (10^5 sejt/100 μ l) tartalmazó felső kamrától. A sejtek méretükből adódóan (15-20 μ m), csak aktív migrációjuk, citoszkeletális átrendeződés révén juthatnak át a filter pórusain, az ott kialakuló koncentráció gradiens hatására. A 3 órás inkubáció után a filteren át, az alsó kamrába vándorolt sejtek számát MTT-teszt segítségével határoztuk meg.

Az MTT-teszt során alkalmazott tetrazolium vegyületet 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid (MTT) csak az élő sejtekben működő mitokondriális dehidrogenáz enzimek redukálják és végeredményben oldhatatlan, lila formázán származék képződik. A kristályok oldása után a felülúszó folyadék fázisokban mérhető színintenzitás mértéke egyenesen arányos a mintában található élő sejtek számával, illetve azok mitokondriális aktivitásával.

A kemotaxis vizsgálatok kiértékelésénél az 5mg/ml MTT oldatot (steril PBS-ben oldva) 1:10 térfogat arányban adtuk hozzá a pozitívan válaszoló sejteket tartalmazó wellkekhez (kamrákhoz). A 37°C-on történő, 16 órás inkubáció leteltével a kialakult formázán kristályokat DMSO-ban oldottuk és a spektrofotometriás mérést ELISA reader-ben (Labsystems Multiskan MS, Helsinki, Finland) 540 és 620 nm hullámhosszon végeztük. A csak médiumot tartalmazó vak minták értékeinek kivonása után az abszorbancia különbségek arányosak a pozitívan válaszoló sejtek számával.

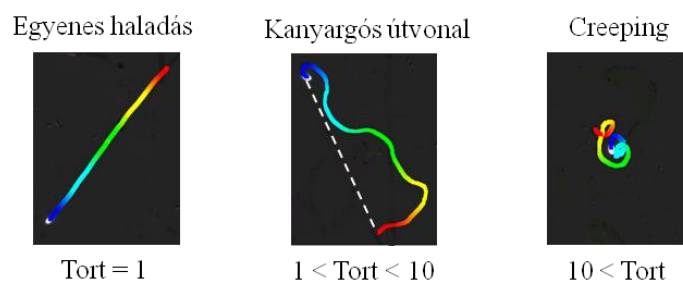
Koncentrációnként 15 párhuzamos mérést végezzünk, kontrollként tenyésztő médiumot használtunk. A ligandok kemotaktikus aktivitásának jellemzésére a kemotaktikus index (Ktx. ind.) szolgált, ami a kontrollhoz (100%) viszonyított százalékos érték.

3.4. Úszási paraméterek vizsgálata (tracking analízis)

Tetrahymena pyriformis úszási viselkedésének elemzése során, az egyes bioaktív molekulák hatására, a sejtek általános mozgás állapotában (úszási sebesség, irányváltások frekvenciája) bekövetkező nem vektoriális jellegű változásokat (kemokinetikus aktivitás) követtük nyomon.

A kezelést követően a *Tetrahymena* sejtek mozgásáról, Axio Observer inverz fénymikroszkóp (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) felhasználásával, az AxioVision Rel 4.7.1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) program Time lapse

modul segítségével készítettünk felvételt (5 ms időtartam, maximális kép sebesség). A sejtek mozgás analízisét ezt követően AxioVision Rel 4.7.1. program Cell tracker moduljának felhasználásával végeztük el. Látóterenként 25 sejt úszási mintázatát figyeltük meg, sejtenként 2 x 25 filmkockán keresztül, mintánként négy látóteret vizsgálva. A sejtek úszási viselkedésének jellemzésére két paramétert használtunk az átlagsebességet és az útvonal tekervényességét ($Tortuosity = Tort.$). Ez utóbbi mutatószám a megtett út és az egyenes haladás (elmozdulás), tehát a kezdő és végpont közötti távolság, hányadosával jellemezhető. Amennyiben a tekervényesség 1, akkor a sejtek nyílegyenesen haladtak (megtett út = egyenes haladás), ha ez az index 1 és 10 közé esik, akkor a sejtek kanyargós útvonalat jártak be, ha 10-nél nagyobb, akkor a mozgás cirkuláris jellegű és a sejtek úszási mintázataiban kifejezetten a lassú mozgáselemek (pl. creeping) dominanciája figyelhető meg [157] (8. ábra).



8. ábra: *Tetrahymena pyriformis* modell-sejt mozgását jellemző tekervényesség paraméter ($Tort - Tortuosity$) alapján besorolt úszási mintázatok.

Creeping: a csillós egysejtűek lassú körkörös mozgása

3.5. Jelátviteli útvonalak vizsgálata

3.5.1. Foszfolipáz C- γ enzim aktiváció vizsgálata

A PLC- γ enzim részvételét a GnRH származékok által kiváltott pozitív kemotaktikus reakcióban, direkt immuncitokémiai jelölést követően áramlási citométerben határoztuk meg. A PLC aktivitált, foszforilált formáját felismerő PLC anti-phospho-PLC- γ 1 monoklonális ellenanyagot (BD Biosciences Pharmingen, San Jose, CA, USA) használtunk méréseink során.

Modell-sejtjeinket (*Tetrahymena pyriformis* és MM6) a kemoattraktáns GnRH ligandok tápfolyadékban (*Tetrahymena*: Bacto tryptone, MM6: RPMI 1640) oldott, hatásos (kemoattraktáns) koncentrációival 1, 3, 5, 10 és 15 percig kezeltük, majd 2%-os PBS-ben oldott paraformaldehiddel fixáltuk 5 percig. A kezeletlen sejteket tartalmazó minta jelentette a kontrollt. A mintákhoz, PBS-sel történő kétszeri mosást követően, 0,1%-os

szaponin oldatot (permeabilizáló oldat) adtunk és ezzel párhuzamosan a sejteket Anti-Phospho-PLC- γ 1(Y783): Alexa Fluor[®] 647 antitesttel (1:1000 hígításban) jelöltük 30 percig, fénytől védett helyen. Az antitest felesleg eltávolítása érdekében PBS-es mosást alkalmaztunk, majd a mintákat az áramlási citometriás mérésig 2%-os PBS-ben oldott paraformaldehidben tároltuk 4°C-on. A reakció specifitásának ellenőrzésére és az autofluoreszcencia kiküszöbölésére a festetlen abszolút kontrollt szolgált. A PLC enzim aktivitás meghatározását áramlási citométer segítségével végeztük. A mérés menete és az eredmények kiértékelése a 3.9. fejezetben leírtak szerint zajlott.

3.5.2. Foszfatidil-inozitol 3-kináz (PI3K) útvonal gátlása

A PI3K működését a GnRH származékok kemotaktikus jelátvitelében az enzim specifikus gátlószereinek, a *Penicillium funiculosum*-ból származó wortmannin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és a szintetikus LY294002 (LY, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) felhasználásával indirekt módon vizsgálatuk [158, 159].

A sejtek (*Tetrahymena pyriformis* és MM6) enzim inhibitorokkal (10^{-5} M) [160, 161] történő előkezelését (*Tetrahymena*: 5 perc, MM6: 25 perc) követően, a korábbi mérés során attraktánsként hatott ligandokkal egy ismételt kemotaxismérést végeztünk a 3.3.1. (*Tetrahymena pyriformis*) és a 3.3.2. (MM6) bekezdésekben leírt módon. A gátlási reakció során a kontroll sejteket a gátlószerek oldószerével DMSO-val kezeltük azonos térfogatszázalékban. Az eredményeket gátlási index (Inh. ind.) formájában fejeztük ki, ami az előkezelt és a kontroll sejtek kemotaxis indexének a hányadosaként értelmezhető.

$$\text{Inh. ind. [\%]} = \frac{(G_{\text{inh}} \times C_c)}{(C_{\text{inh}} \times G_c)} \times 100$$

G_{inh} : gátlószerezrel előkezelt sejtek kemotaktikus válasza a „G” anyaghoz

C_c : kontroll (DMSO-val kezelt) sejtek kemotaktikus válasza a kontroll médiumhoz

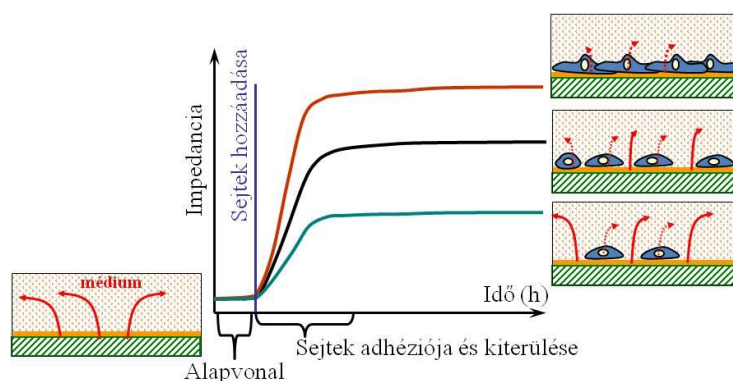
C_{inh} : gátlószerezrel előkezelt sejtek kemotaktikus válasza a kontroll médiumhoz

G_c : kontroll (DMSO-val kezelt) sejtek kemotaktikus válasza a „G” anyaghoz

3.6. Impedimetrián alapuló adhézio mérőmódszerek

Az impedancia regisztrálásán alapuló bioszenzorok az élő sejtek viselkedésének, dinamikus, valósídejű, érzékeny vizsgálatát teszik lehetővé. Az adhézio és migráció mérésére alkalmas impedimetriás módszerek közé sorolhatók az ECIS (Electrical Cell

Substrate Impedance Sensing) és az xCELLigence rendszerek. A két rendszer közös jellemzője, hogy a sejtek az alkalmazott elektródok felszínére történő kitapadásuk során impedancia változást (emelkedést) okoznak, mely annak köszönhető, hogy a sejtmembrán elektromosan szigetelő, így az áram csak a sejtek közötti és alatti térrészben tud terjedni. Ez az impedancia változás több tényezéből tevődik össze: (i) a sejt-sejt adhézióból eredő ohmikus ellenállásból, (ii) a plazmamembrán kapacitív ellenállásából, valamint abból, hogy mekkora az elektród és a sejt közötti távolság, illetve az itt elhelyezkedő közeg vezetőképessége. Az impedancia változásból következtetni tudunk az elektródfelszín sejtek általi fedettségére, valamint indirekt módon a sejtek mennyiségére (9. ábra). Az impedancia változása alapján monitorozhatjuk a sejtek kitapadásának kinetikáját, a sejtek migrációs aktivitását és proliferációját, valamint olyan anyagok rövid/hosszú távú hatását, amelyek a sejtek alakváltozását, vagy számát befolyásolják (antiproliferatív, citotoxikus hatású vegyületek) [162-165].



9. ábra: A sejtadhézió során kapott impedancia görbék értelmezése

3.6.1. xCELLigence rendszer

A deprenyl származékok és a GnRH peptidek MM6 modell-sejt adhéziós viselkedésére kifejtett hatását xCELLigence SP készülékek felhasználásával (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) határoztuk meg. A rendszer lelke a 96-lyukú E-plate, egyszerre nagyszámú párhuzamos mérést tesz lehetővé és ennek révén a rendszer átmenetet képez a nagyáteresztő képességű módszerek és a fiziológias jelenségek mechanizmusának vizsgálatára szolgáló módszerek között [9]. Ez a platform jól alkalmazható különböző szintetikus bioaktív molekulák (pl. gyógyszerek, toxikus anyagok) gyors in vitro szűrővizsgálatára is [162]. Az E-plate kamráinak felszíne 80%-ban arany elektródokkal fedett, erre kerülnek a sejtek, amelyek kitapadásuk során a sejtszámmal és kiterülés mértékével arányos impedancia emelkedést okoznak. Az

impedancia változás kifejezésére szolgál a Sejtindex (SI), ami egy relatív (kiindulási időpontra vonatkoztatott) mértékegység nélküli mutatószám.

$$SI = \frac{(Z_i - Z_0)}{F_i}$$

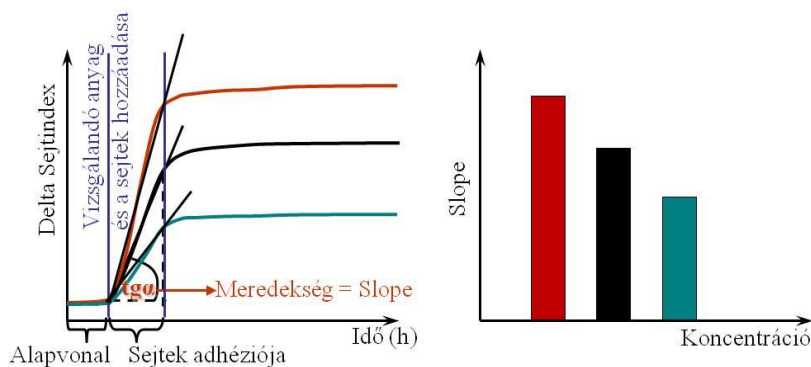
Z_i : adott T_i pontban mért impedancia

Z_0 : T_0 időpontban (kiindulási időpont) mért háttér impedancia

F_i : frekvenciától függő állandó ($F_{10\text{kHz}}=15$).

A mérés során az elektródok felszínét $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ humán fibronektint (Chemicon® International Inc., Temecula, Canada) tartalmazó 0,1% gelatin oldattal (Sigma Ltd. St. Louis, MO, USA) fedtük 20 perces, 4°C -on történő inkubáció során. A feleslegben lévő fibronektin oldatot steril körülmények között eltávolítottuk és 5 perces beszárítást követően a $100 \mu\text{l}$ tenyésztő médiumot adtunk minden egyes well-hez (kamrához). A konstans, háttér SI érték beállításához 2 órán keresztül 1 perces mérési időközökkel regisztráltuk az impedancia változást. Ezt követően először a vizsgálandó anyagok különböző koncentrációjú oldatait (tenyésztő médiumban hígítva), majd végül a sejteket (10^4 sejt/ $100 \mu\text{l}$ /well végkoncentráció) pipettáztuk a wellékbe. Adhézió méréseink során 3 párhuzamost alkalmaztunk; kontrollként a hatóanyagmentes tápfolyadék szolgált. A sejtmentes, csak a vizsgált ligandok legtöményebb oldatait tartalmazó wellék mérésével azt ellenőriztük, hogy a vegyületek befolyásolják-e önmagukban a tiszta médium vezetőképességét. Ez egyik vizsgált ligand esetében sem volt megfigyelhető, így a tapasztalt impedancia változások a ligandok adhézióra kifejtett hatásának voltak tulajdoníthatók. A sejtek kitapadását 24 órán keresztül monitoroztuk 20 másodperces mintavételezési intervallum alkalmazásával.

Az eredmények kiértékelésénél a Delta Sejtindex (a sejtek rátételétől számított Sejtindex változás), és a Slope (Meredekség) paraméterek kiszámítására a készülékbe integrált RTCA 1.2 programot használtuk. A Slope paraméter az adhéziós görbe felszálló szakaszára illesztett egyenes meredekségéből származtatott mutatószám, amit a kontroll százalékában fejeztünk ki (10. ábra). A Slope érték arányos a kitapadt sejtek számával, illetve a kitapadás mértékével. Minél több sejt tapad le, illetve minél nagyobb mértékű a szétterülésük, annál nagyobb a Sejtindex változás; meredekebben nő a Sejtindex, így nagyobb a számolt Slope érték is.



10. ábra: Adhéziós görbék kiértékelése

3.6.2. ECIS technika

Az *R*-deprenyl és származékainak LM2 sejtekre kifejtett adhéziót befolyásoló hatását ECIS 1600 készülék (Applied Biophysics, Troy, NY, USA) felhasználásával vizsgáltuk. A mérés egy 8 kamrát tartalmazó lapkán (array-n) történik. Minden egyes kamra aljának közepén egy 250 μm átmérőjű mérő elektród, szélén pedig egy nagyobb referencia elektród található. Az elektródok méretbeli különbségéből adódik, hogy a sejtek kitapadása során mérhető impedancia változás döntően a mérő elektródon megtapadt sejtektől származik, ennek köszönhetően már 10 - 100 sejt jelenléte, adhéziós viselkedése és migrációs aktivitása igen érzékenyen vizsgálható. A sejtek gyors kitapadásukat követően szétterülnek, kialakulnak a sejt-sejt közötti adhéziós kapcsolatok és egy zárt, konfluens réteget hoznak létre. A kitapadt sejteket azonban folyamatos migrációs aktivitás jellemzi, változtatják morfológiájukat, ami az impedancia értékek fluktuációjában jelentkezik [164].

A méréshez az elektródokat 10^{-2} M L-cisztein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) vizes oldatával inkubáltuk 20 percig szobahőmérsékleten. Az arany elektródák felszínén, a cisztein tiol csoportjai révén monomolekuláris réteget képez, ami stabil impedancia értéket biztosít sejtmentes közeg esetén, az alapvonal felvétele során [164]. A cisztein eltávolítását követően az elektród felszínét 5mg/ml koncentrációjú poli-L-lizinnel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (desztillált vízben hígítva) fedtük 30 percig szobahőmérsékleten. Az inkubációs idő letelte után a poli-L-lizin oldat feleslegét eltávolítottuk és az elektród felszínét beszárítottuk. Az alapvonal felvételéhez 200 μl sejtmentes tápfolyadékot adtunk az elektródákra és legalább 1 órán keresztül regisztráltuk az impedanciát. A stabil háttér-impedancia elérése (kb. 2000 - 2500 Ω) után először a vizsgálandó anyag, különböző koncentrációjú oldatait majd az LM2

sejteket, 5×10^5 sejt/200 μ l koncentrációban injektáltuk a kamrákba. A sejtek adhézióját és kiterülését jellemző impedancia változást 48 órán keresztül követtük 15 kHz-es mérési frekvencián. Az ECIS méréseink során 2 párhuzamost alkalmaztunk, és kontrollként hatóanyagmentes médiumot használtunk. A mérési adatok elemzése a készülékbe integrált program segítségével történt.

3.7. Proliferáció és citotoxicitás vizsgálat

Munkánk során a szerotonin kezelés (imprinting) hatását tanulmányoztuk a *Tetrahymena pyriformis* proliferációjára. Csoportonként 10^3 sejt/ml kiindulási sejtkoncentrációt beállítva, vizsgáltuk a sejtek osztódási ütemét tenyésztési körülmények között. Az inkubáció 6., 18., 24., és 48. órájában steril körülmények között, mintát vettünk és a sejtszám meghatározásához CASY TT (Roche, Germany) sejtszámláló és sejtméreteloszlást meghatározó készüléket használtunk.

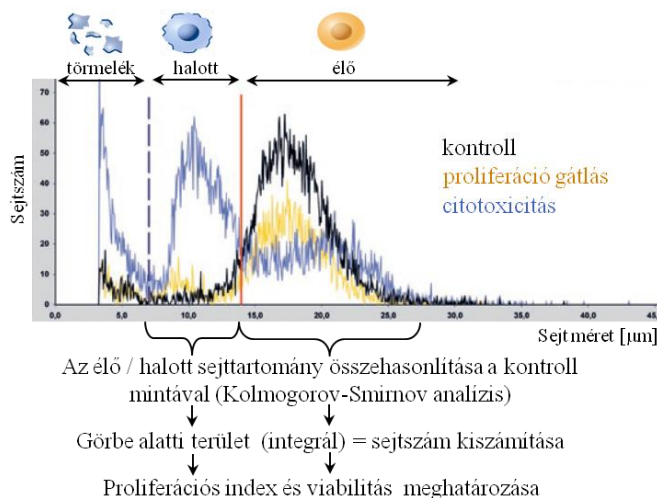
A deprenyl származékok és a hatóanyag-tartalmú GnRH-III konjugátumok direkt tumorelles aktivitását a vegyületek antiproliferatív és citotoxikus hatásának vizsgálatával kívántuk igazolni MM6 sejteken.

A MM6 sejteket (5×10^4 és 10^5 sejt/ml) a vizsgált deprenyl származékok 10^{-6} , 10^{-9} és 10^{-12} M, valamint a GnRH-III peptidkonjugátumok 10^{-12} - 10^{-6} -M végkoncentrációjú, tápfolyadékban készített oldatával kezeltük. Abszolút kontrollként kezeletlen sejteket használtunk, míg pozitív kontrollként (a citotoxikus GnRH-III konjugátumok esetén) a tumorelles hatóanyagok (daunorubicin – Dau, doxorubicin – Dox, metotrexát – Mtx) a konjugátumokkal azonos koncentrációjú (10^{-12} – 10^{-6}) oldatai szerepeltek. A 48 és 72 órás inkubációt követően, a sejtszámot CASY TT (Roche Innovatis, Penzberg, Németország) sejtszámláló készülék segítségével határoztuk meg.

3.8. CASY TT készülék

A *Tetrahymena* modell-sejten végzett proliferációs vizsgálatok, és a MM6 sejteken tanulmányozott antiproliferatív és citotoxikus hatások mennyiségi analizisére CASY TT (Roche Innovatis, Penzberg, Németország) sejtszámláló készüléket használtuk. Ez az impedimetria elvén működő készülék lehetőséget ad a sejtszám mellett a sejtméret eloszlás nagy pontosságú meghatározására. A méréseink során 100 μ l sejtes mintát 5ml speciális elektrolit oldatban (CASY ton[®]) szuszpendáltunk, amelyből a készülék 3 x 400

µl mintát vesz és egy 60/150 µm pórusátmérőjű mérő kapilláris elektródjai között állandó sebességgel átáramoltat. A sejtek sejtmembránjuknak köszönhetően szigetelő képletek, így a kapillárisban elhelyezett elektródok között történő áthaladásuk során ellenállás növekedés detektálható, amely arányos lesz a sejtek méretével. A készülék alkalmas az élő, halott sejtek és a sejtörmelék elkülönítésére. Az élő sejtek plazmamembránja intakt, így áthaladásuk során kapott ellenállás változás a sejt térfogatával arányos, míg az elpusztult sejtek plazmamembránja már nem funkcionál elektromos barrierként, így a halott sejteket a rendszer az élőknél kisebbeknek látja, az ellenállás értéke a sejtmag méretét tükrözi ("Pulse Area Analysis" módszer) (11. ábra). Az egyes időpontokban minden vizsgálati csoport esetén 3 mintát vettünk, és meghatároztuk az élő sejtek mennyiségét, valamint a teljes sejtszámot is. Az adatok elemzéséhez és feldolgozásához CASYexcell 2.3 program volt segítségünkre. A kezelések citotoxikus és sejtosztódásra kifejtett hatásának jellemzésére két mérőszámot, az élő sejtek számát, valamint a viabilitást (életképességet) vezettünk be. A kezelt csoportokban az élő sejtek számát a kontroll százalékában határoztuk meg, míg a viabilitás (via) paraméter az élő sejtek arányát mutatja a teljes (élő + halott) sejtszámhoz viszonyítva. Az élő és halott sejtek érzékeny elkülönítése lehetőséget ad arra, hogy egy anyag esetén pontosan eldöntsük, hogy citotoxikus, vagy antiproliferatív hatással rendelkezik. Toxikus anyagok hatására csökken az élő sejtek száma, és ezzel párhuzamosan emelkedik a halott sejtek + sejtörmelék aránya (viabilitás csökken), míg antiproliferatív hatású anyag esetén az élő sejtek mennyisége csökken, de ezzel együtt a sejtek viabilitása (halott sejtek száma) nem változik (11. ábra).



11. ábra: CASY TT sejt-méreteloszlás grafikonjainak értelmezése és kiértékelése
[www.roche-applied-science.com]

3.9. Hormontartalom meghatározás *Tetrahymena* sejtekben

A magasabb rendűekre jellemző szignálmolekulák a *Tetrahymena pyriformis* endogén hormontartalmára kifejtett hatását indirekt immuncitokémiai jelölést követően, áramlási citometriás mérés során határoztuk meg.

A *Tetrahymena* sejteket a kezeléseket követően 4%-os PBS-ben oldott paraformaldehiddel fixáltuk 5 percig. A hormontartalom meghatározáshoz a sejteket kétszer mostuk 0,1% BSA-t (bovine serum albumin; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és Nonidet NP-40 permeabilizáló reagenst tartalmazó PBS alapú pufferben. Az ellenanyagok aspecifikus kötődésének kiküszöbölésére a sejteket 30 percig, szobahőmérsékleten blokkoló pufferben (1% BSA tartalmú PBS) inkubáltuk. A sejtszuspenziót szétszöttük (50 µl/cső) és az elsődleges ellenanyag (nyúl eredetű anti-serotonin, anti-hisztamin, anti-T3, anti-endorfin, anti-ACTH – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, antiadrenalin – ABCAM, Cambridge UK) 1:200 hígításban (1% BSA tartalmú PBS-ben) történő hozzátétele után a mintákat 45 percig szobahőmérsékleten, fénytől elzárva inkubáltuk. Az inkubáció elteltével, a feleslegben lévő elsődleges ellenanyag eltávolítása érdekében a mintákat kétszer 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben, centrifugálási lépések közbeiktatásával mostuk. A következő lépésben a sejteket, PBS-ben 50-szeresére hígított, FITC-jelölt (fluoreszcein-izotiocianát), másodlagos ellenanyaggal (kecske eredetű anti-nyúl ellenanyag, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) inkubáltuk fénytől védve, 30 percig, szobahőmérsékleten. A sejtes mintákat kétszeri PBS-ben történő mosást követően, 2% paraformaldehid tartalmú PBS-ben reszuszpendáltuk. Az immuncitokémiai reakció specifitásának ellenőrzésére, festetlen és csak másodlagos ellenanyagot tartalmazó tesztcsövek szolgáltak. A jelölt minták fluoreszcencia intenzitását, FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) áramlási citométer segítségével mértük (10000 sejt/minta). Az eredmények kiértékelését CellQuest Pro program (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) segítségével végeztük. A relatív fluoreszcencia intenzitás (Geo mean) értékek alapján az intracelluláris hormonmennyiséget a kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg.

3.10. Hormonális imprinting vizsgálatok

A szerotoninnal kiváltott imprinting hosszú távú hatását *Tetrahymena* sejteken az 500. és 1000. utódgenerációk funkcionális vizsgálatával elemeztük.

A *Tetrahymena pyriformis* sejtek 10^{-15} és 10^{-6} M koncentrációjú szerotoninnal (Sigma Ltd. St. Louis, MO, USA) történő egy órás előkezelését (imprinting) követően, 28°C -on 0.1% élesztőkivonatot és 1% Bacto tryptone-t (Difco, Michigan, USA) tartalmazó tápoldatban, hetente kétszeri átoltással, tenyésztettük tovább. Az előkezelésben nem részesített, kontroll sejtek fenntartása a fenti körülmények között történt. Az 500. és 1000. generációban négy index mérésére került sor: (i) hormon tartalom (3.9. fejezet), (ii) sejtosztódás (3.7. fejezet), (iii) kemotaktikus aktivitás (3.3.1. fejezet) és (iv) úszási viselkedés (3.4. fejezet). A kemotaktikus és kemokinetikus válaszkészség meghatározása során a sejteket ismételt kezelésben (10^{-15} és 10^{-6} M szerotonin) is részesítettük, vizsgálva a hormonokkal történő második találkozás hatását. A többi folyamat (szaporodás, hormontartalom) vizsgálata során nem alkalmaztunk újramezelést.

Vizsgálati csoportok 500. és 1000. generációban végzett kísérletek során:

Minden folyamat vizsgálata során

C_C: nem előkezelt sejtek – nincs ismételt kezelés (kontroll médium)

Szer-6_K: 10^{-6} M szerotoninnal előkezelt sejtek – nincs ismételt kezelés

Szer-15_K: 10^{-15} M szerotoninnal előkezelt sejtek – nincs ismételt kezelés

Kizárólag a kemotaxis és úszási viselkedést monitorozó kísérletek során

K_Szer-6/Szer-15: nem előkezelt sejtek – ismételt 10^{-6} M/ 10^{-15} M szerotonin kezelés

Szer-6_Ser-6/Szer-15: 10^{-6} M szerotoninnal előkezelt sejtek – ismételt 10^{-6} M/ 10^{-15} M szerotonin kezelés

Szer-15_Szer-6/Szer-15: 10^{-15} M szerotoninnal előkezelt sejtek – ismételt 10^{-6} M/ 10^{-15} M szerotonin kezelés

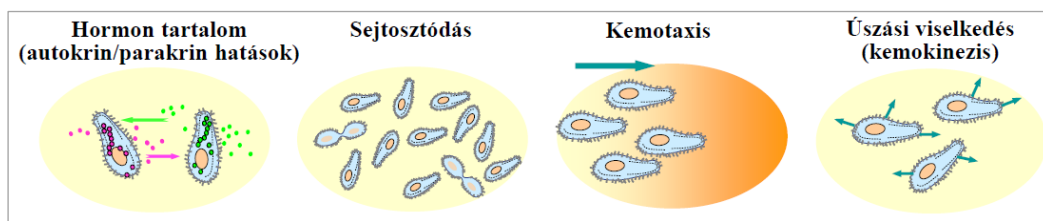
3.11. Statisztikai analízis

Az 4. Eredmények fejezetben feltüntetett adatok – a párhuzamos mérések átlaga $\pm$ SD – statisztikai kiértékelése Origin Pro 8.0 program (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) segítségével történt. A kemotaxis és sejtdhézióról nyert adatok szignifikancia analíziséhez az ANOVA módszert használtuk, az áramlási citometriás hisztogramok és CASY TT (11. ábra) által szolgáltatott méreteloszlás grafikonok szignifikancia vizsgálata az MS Excel XLSTAT moduljában lévő Kolmogorov-Smirnov teszttel történt. A szignifikancia szintek jelölése a következő módon történt: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$; z – $p < 0,001$.

4. EREDMÉNYEK

4.1. R-deprenyl és származékai

4.1.1. A szerotonin, mint MAO szubsztrát, hatásai a *Tetrahymena pyriformis* modell-sejt élettani folyamataira



A biogén aminok közé tartozó szerotonin jelenlétét először Essman igazolta *Tetrahymena pyriformis*ban, Feltételezései szerint ez a csillós egysejtű is rendelkezik egy, a magasabb rendűekre jellemző szerotonerg rendszerrel [166]. A hormon termelésén túl a lebontásáért felelős mechanizmusok meglétét, és a sejtelettani funkciók szabályzásában betöltött szerteágazó szerepét is bizonyították. A szerotonin sejtosztódást fokozó [167], kemorepellens [168], fagocitózist indukáló [44] és hormontermelést befolyásoló [47] hatása a hormon élettani jelentőségét támasztja alá. Azonosították a hormon szintézisét végző triptofán dehidrogenáz enzimet [169], és a monoamin-oxidáz (MAO) aktivitást is kimutatták már korábban a *Tetrahymena* sejtek mitokondriumában [170]. A szerotonin dezaminálása során keletkező 5-hidroxi-indolecetsav jelenléte, a MAO enzim szerepére utal a szerotonin metabolizmusában és a hormon által kiváltott sejtelettani hatások befolyásolásában [166]. A MAO enzim részvétele a szerotonin háztartás szabályozásában, és a MAO-B specifikus gátlószereként ismert R-deprenyl derivátumainak a *Tetrahymena* sejtфизиológiai paramétereire (hormontartalom, kemotaktikus aktivitás) kifejtett hatásai nem értékelhetők megfelelő módon a szerotonin rövid és hosszú távú hatásának részletes ismerete nélkül.

4.1.1.1. A szerotonin rövidtávú hatásai *Tetrahymena* modell-sejten

Mint azt a modell-sejt bemutatásáról szóló 1.2.1.1 fejezetben is említettük, a *Tetrahymena pyriformis* csillós egysejtűben a magasabb rendűekre jellemző endokrin rendszer számos kulcsfontosságú eleme jelen van, beleértve a gerincesekre jellemző hormonokat, a nagyfokú homológiát mutató receptorokat és jelátviteli

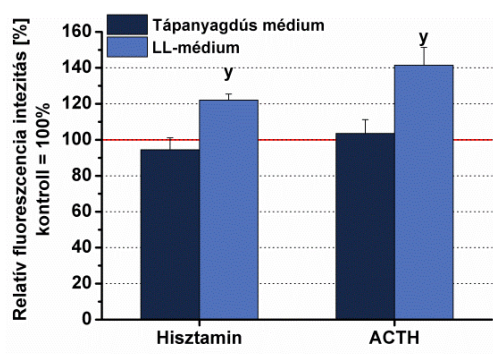
mechanizmusokat. A hormonok nem kizárólag közvetlenül, hanem más hormonok termelődésén és szekrécióján keresztül is kifejthetik hatásukat, tehát a környezetben jelen lévő szignálok hatására megváltozik a sejtek hormontartalma [47]. A hormonális interakciók vizsgálata során figyelembe kell venni, hogy a *Tetrahymena*, mint édesvízi egysejtű, természetes közegében nagy hígításban jelen lévő szignálmolekulákra igen érzékenyen kell, hogy reagáljon. [171, 172]. Arról sem szabad megfeledkezni, hogy a ligandok hatását egyéb faktorok – az oldott tápanyag molekulák és a hormonális expozíció ideje – is befolyásolhatják [173].

Munkám során vizsgáltam a szerotonin kezelések következtében kialakuló, akut, endogén hormonális válasz koncentráció- és időfüggését, valamint azt, hogy a tápanyagdús tenyésztő médium és a sejtek természetes környezetét jobban modellező inorganikus sókat tartalmazó Losina-Losinsky oldat (LL-oldat) alkalmazása hogyan befolyásolja a sejtek biológiailag aktív anyagainak (hisztamin, ACTH) szintjét.

Szerotonin hatása a *Tetrahymena pyriformis* hisztamin és ACTH tartalmára tápanyagdús és szervesen sókat tartalmazó, LL-médiumban.

(Csaba G, Lajkó E, Pállinger É. (2010) Comparison of effect of hormones (histamine, serotonin, insulin) on the hormone (serotonin, histamine, triiodothyronine, ACTH) synthesis of *Tetrahymena* in medium or salt solution. *Cell Biol Int.* 34: 1095-1098.)

A kétféle médiumban (tápanyagdús – Bacto tryptone + élesztő kivonat; és LL-oldat) tartott sejteket 1 órán keresztül kezeltük a szerotonin 10^{-15} M-os oldatával. A femtomoláris koncentrációt abból kiindulva választottuk, hogy a sejt által szecernált hormonok a környezetben ezt megközelítő mennyiségben lehetnek jelen [171, 174].



12. ábra: Szerotonin (10^{-15} M) kezelés (1 óra) hatása a *Tetrahymena pyriformis* hisztamin és ACTH tartalmára tápanyagdús és LL-médiumban.

Szignifikancia: y – $p < 0,01$

Tápanyagdús médiumban a szerotonin nem volt szignifikáns hatással a sejtek ACTH, hisztamin mennyiségére (12. ábra). Ellenben LL-oldatban a szerotonin mindkét vizsgált endogén hormon mennyiségét fokozta, legnagyobb mértékű változás az ACTH-tartalomban (142%) volt mérhető.

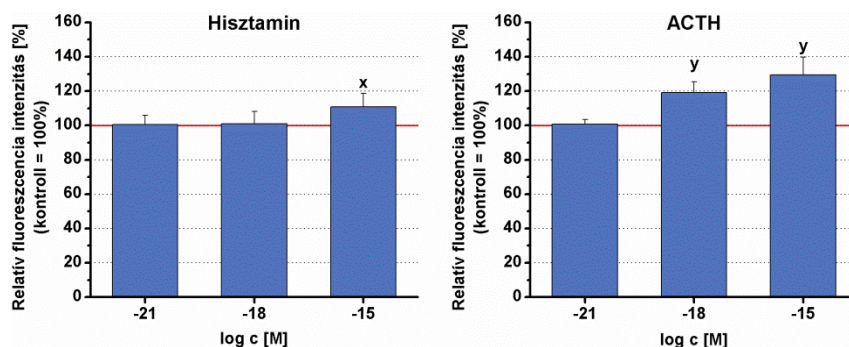
Szerotonin különböző koncentrációjú oldatainak hatása a *Tetrahymena pyriformis* hisztamin és ACTH tartalmára szervesen sókat tartalmazó, LL-médiumban.

(Csaba G, Lajkó E, Pállinger É. (2010) Serotonin in *Tetrahymena*. How does it work? *Acta Protozool* 49: 133-138.)

Csaba G, Lajkó E, Pállinger É. (2011) Effect of different concentrations of hormones on the hormone production of *tetrahymena* in nutrient-free physiological milieu. *Exp Parasitol*. 129: 179-182.)

Eredményeinkből az látható, hogy a szerotonin hatása kifejezettebb volt a *Tetrahymena* természetes közegét jobban megközelítő, csak inorganikus sókat tartalmazó LL-médiumban. Továbbá feltételezhető, hogy a sejt által szecernált szignálmolekulák a sejt közvetlen környezetében nagy koncentrációt is elérhetnek, de bizonyos esetekben hathatnak a termelő sejttől távol is, ahol gyakorlatilag pár molekula jut egy sejtre [171, 174]. Mindezeket figyelembe véve, a sejtek hisztamin és ACTH tartalmának változásait vizsgáltuk a szerotonin különböző koncentrációjú oldataival történő 1 órás kezelést követően LL-médiumban.

A szerotonin 10^{-15} M-ban, az előző vizsgálatainkkal összhangban, fokozta a sejtek hisztamin (111,7%) és ACTH (129,5%) tartalmát. Alacsonyabb koncentrációkban (10^{-21} - 10^{-18} M) nem volt befolyással a sejtek hisztamin koncentrációjára, míg az ACTH mennyiségére (10^{-18} M: 119,2%) pozitívan hatott (13. ábra).



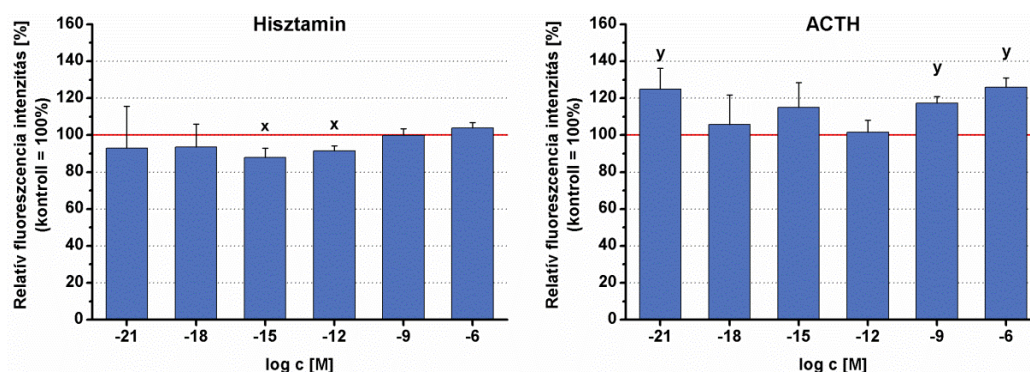
13. ábra: Különböző koncentrációjú szerotonin (10^{-21} - 10^{-15} M) kezelés (1 óra) hatása a *Tetrahymena pyriformis* hisztamin és ACTH tartalmára LL-médiumban.

Szignifikancia: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$

Számos, a magasabb rendűekre jellemző szignál molekula képes a *Tetrahymena* endogén hormon mennyiségét és hormon kötési képességét befolyásolni [175], ám a kialakuló hatások mértékét és tartósságát sok tényező együttese határozza meg. Amint az a fenti eredményekből már látható, a szerotonin koncentrációja és a sejt környezete hatással van a hormonális változás irányára és mértékére. Korábbi tanulmányok alapján az is feltételezhető, hogy a kezelés időtartama is hasonlóan fontos tényező a hatás kialakítása szempontjából [173, 176].

Következő a kísérletünkben, az előzőekhez képest rövidebb, 30 perces, 10^{-21} - 10^{-6} M-os szerotonin kezelések hatását vizsgáltuk az LL-médiumban tartott sejtek hisztamin és ACTH tartalmára.

A szerotonin csökkentette a sejtek hisztamin tartalmát 10^{-15} és 10^{-12} M koncentrációban (10^{-15} M: 87,9%; 10^{-12} M: 91,4%). Ezzel szemben pozitív hatással volt a sejtek ACTH mennyiségére, mind 10^{-9} - 10^{-6} M tartományban (10^{-9} M: 117,3% és 10^{-6} M: 125,8%), mind a vizsgált legalacsonyabb (10^{-21} M: 124,9%) koncentrációban (14. ábra).



14. ábra: Különböző koncentrációjú szerotonin (10^{-21} – 10^{-6} M) kezelés (30 perc) hatása a *Tetrahymena pyriformis* hormon tartalmára LL-médiumban.

Szignifikancia: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$; z – $p < 0,001$

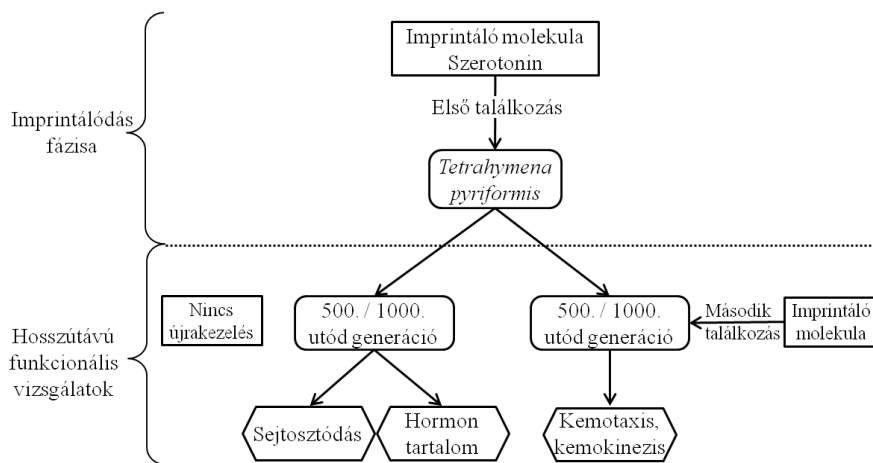
4.1.1.2. Szerotoninnal kiváltott imprinting hosszú távú hatása a *Tetrahymena* sejtek életfunkcióira

(Kőhidai L, Lajkó E, Pállinger É, Csaba G. (2012) Verification of epigenetic inheritance in a unicellular model system. Multigenerational effects of hormonal imprinting. Cell Biol Int. 36: 951-959)

A *Tetrahymena* természetes közegében egyszerre több ezer extracelluláris hírvivő kedvező vagy gátló, esetleg semleges hatásának van kitéve, azonban receptor-készlete filogenetikai helyzetéből adódóan igen plasztikus. Az emlős sejtekkel ellentétben nem

rendelkezik az összes környezeti molekula észleléséhez szükséges genetikailag meghatározott receptor-készlettel, hanem a ligand jelenléte indukálja a kötőhelyek megjelenését vagy összeszerelődését és receptoriális funkciók bekövetkeztét [37, 177]. A hormonális imprinting (bevésődés) egy bioaktív anyag hatására a plasztikus állapotban lévő receptor számbeli és funkcionális megerősödését jelenti, melynek következtében mind membrán, mind intracelluláris szinten megváltozik a sejt válaszkészsége. A sejtek memorizálják a receptorszinten ható anyagokkal történő első találkozást, amelynek értelmében reakciójuk és az utódsejtjeik alapvető funkciói (kemotaxis [168], proliferáció [178], hormonszintézis [179]) életre szólóan megváltoznak. A magasabb rendűek hormonjaival való többszöri találkozás alkalmával a *Tetrahymena* válasza eltér az első stimulus hatásától, általában sokkal intenzívebbé válik. Tehát az első találkozás információja valamilyen módon átadódik, és ez akár több száz generáció után is megfigyelhető [177, 178, 180].

Munkánk során, a szerotonin a sejtek hormon tartalmára kifejtett rövidtávú hatásán túl, tanulmányoztuk a hosszú távú hatását négy sejtélettani index (15. ábra): (1) szerotonin tartalom, (2) osztódási képesség, (3) kemotaktikus válaszkészség és (4) az úszási viselkedés vizsgálatával, az imprintinget követő 500. és 1000. utódgenerációban.



15. ábra: Hosszú távú funkcionális vizsgálatok a szerotoninnal imprintált sejtek 500. és 1000. generációjában

Korábbi kísérletek eredményei azt igazolták, hogy hormonális imprinting kiváltására magas (mikromoláris) és alacsony (femtomoláris) koncentrációkban jelenlévő hormonok (pl. inzulin, dijódtirozin) egyaránt képesek voltak [178, 181]. A 10^{-13} M inzulin előkezelés hatására a sejtek emelkedett inzulin kötő képessége 70 generáció

elteltével is kimutatható volt és az előkezelő koncentráció növelése nem erősítette tovább ezt a hatást [181]. A sejtek osztódási képességében is megfigyelhető volt az alacsony és magas koncentrációk hatékonysága. A 10^{-10} - 10^{-5} M koncentráció tartományban alkalmazott szerotonin előkezelés hatása közvetlenül és 1-14 nappal az előkezelést követően a sejtek fokozott osztódási rátájában nyilvánult meg [167]. Ezek alapján fontosnak tartottuk a szerotonin indukálta imprinting megtartottságát két reprezentatív, magas (10^{-6} M) és alacsony (10^{-15} M) koncentrációban is megvizsgálni.

(1) Szerotonin tartalom

Szerotoninnal történő imprinting hatására a *Tetrahymena* sejtek endogén szerotonin tartalma az 500. utódgenerációban, mindkét alkalmazott előkezelő koncentráció esetén, csökkent (10^{-15} M: 61,0%; 10^{-6} M: 70,7%). Ezzel szemben az imprintinget követő 1000. generációban az alacsony imprintáló koncentráció esetén emelkedett az endogén szerotonin mennyisége (10^{-15} M: 119,0%), míg a 10^{-6} M-os szerotonin előkezelés hosszútávon hatástalannak (103,2%) bizonyult (1. táblázat).

1. táblázat: Szerotonin imprinting hatása a *Tetrahymena* sejtek szerotonin tartalmára az 500. és az 1000. generációban

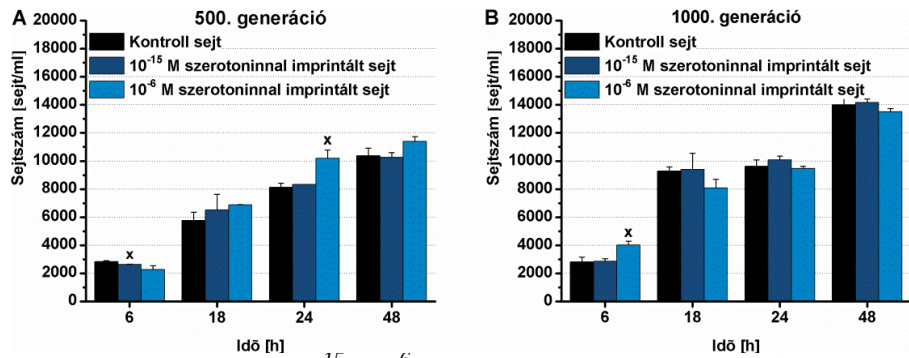
Imprinting	500. generáció Geo mean [%] $\pm$ SD	$P_{kontroll}$	1000. generáció Geo mean [%] $\pm$ SD	$P_{kontroll}$
Nem imprintált / kontroll	100 $\pm$ 5,32		100 $\pm$ 2,86	
10^{-15} M szerotonin	61,0 $\pm$ 2,05	<0,01	119,0 $\pm$ 1,61	<0,01
10^{-6} M szerotonin	70,7 $\pm$ 1,6	<0,01	103,2 $\pm$ 2,59	n.s.

$P_{kontroll}$: szignifikancia a kontrollhoz viszonyítva
n.s.: nem szignifikáns

(2) Osztódási képesség

A szerotoninnal imprintált sejtek 500. generációjában a friss tenyésztő közegbe került utódsejtek osztódási rátája, függetlenül a kezelés koncentrációjától, csökkent (10^{-15} M: 92,4%; 10^{-6} M: 80,1%) a vizsgálat korai szakaszában (6 óra), azonban 24-48 óra távlatban vizsgálva a proliferációt neutrális (10^{-6} M) ill. sejtszám fokozó (10^{-15} M: 125,3%) hatás volt megfigyelhető (16. ábra).

Az 1000. generációban egyedül a 10^{-6} M-os előkezelés hatására emelkedett a sejtszám (142,9 %) a vizsgálat 6. órájában, míg a 10^{-15} M alkalmazása nem befolyásolta a sejtek osztódási képességét (16. ábra).

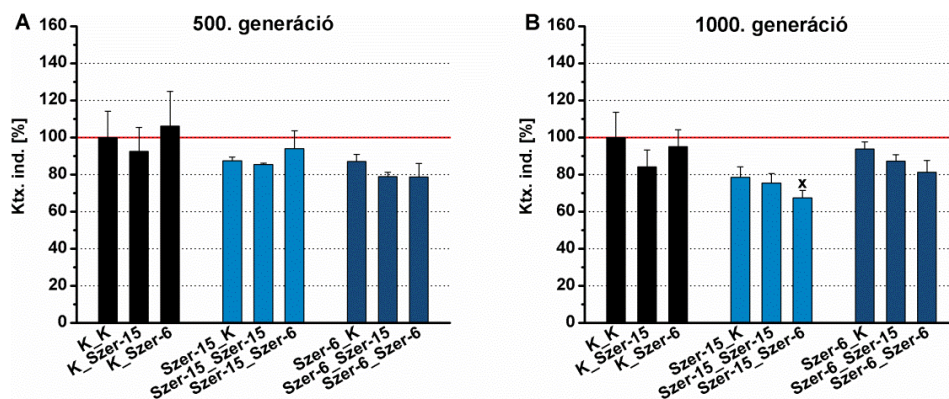


16. ábra: Szerotonin (10^{-15} , 10^{-6} M) imprinting hatása a sejtek osztódási képességére az 500. és 1000. utódgenerációban

Szignifikancia: x – $p < 0,05$

(3) Kemotaktikus válaszkészség

A szerotoninnal kiváltott imprinting önmagában az 500. utódgeneráció sejtjeinek kemotaktikus válaszkészségét mindkét koncentrációban egyforma mértékben csökkentette (Szer-15_K: 87,4%; Szer-6_K: 87,1%) (17. ábra). Az újramezelés mind a kontroll, mind a 10^{-15} M-os szerotoninnal előkezelt sejtek 500. generációjában neutrális hatást mutatott. A 10^{-6} M-os imprintinget követően a szerotonin mindkét koncentrációja a második találkozás alkalmával gyenge repellens hatással rendelkezett (Szer-6_Szer-15: 78,9%; Szer-6_Szer-6: 78,7%).



17. ábra: Szerotonin (10^{-15} , 10^{-6} M) imprinting hatása a sejtek kemotaktikus aktivitására az 500. és 1000. utódgenerációban

Ktx. ind.: kemotaxis index, kontrollra (K_K) normalizált érték

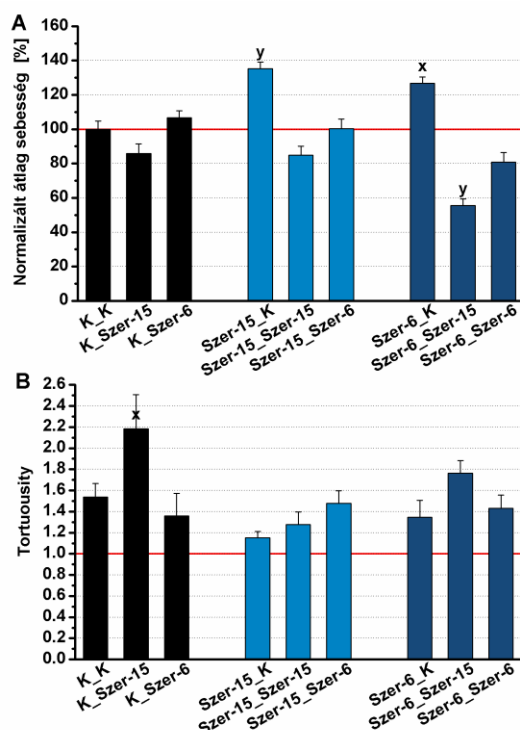
Szignifikancia: x – $p < 0,05$

Az 1000. generációban csak a 10^{-15} M szerotoninnal kiváltott imprinting migrációt csökkentő hatása maradt meg és vált szignifikánsabbá (Szer-15_K: 78,4%). A 10^{-6} M-os előkezelés hatása hosszútávon (1000 generáció múltán) már neutrális volt (17. ábra). Az ismételt kezelés során a 10^{-15} M szerotonin gyenge repellens hatást fejtett ki a kontroll (nem imprintált) sejtekre (K_Szer-15: 84,1%). Az előkezelt

sejtek esetén, függetlenül az imprintáló koncentrációtól, csak a 10^{-6} M szerotonin bizonyult kemorepellens hatásúnak (Szer-6_Szer-6: 81,2%; Szer-15_Szer-6: 67,5%). A szerotonin kemotaktikus hatásprofilja hasonló volt a két imprintált csoportban, bár 10^{-15} M szerotoninnal előkezelt sejtek kemotaktikus index értékei rendre alacsonyabbak voltak a 10^{-6} M szerotoninnal imprintált csoporthoz képest.

(4) Úszási viselkedés

A szerotonin imprinting úszási viselkedésre kifejtett hatásában nem találtunk jelentős különbséget az 500. és 1000. generáció között, ezért itt csak a biológiai értelemben is érdekesebb, hosszabb távú hatásokat mutatom be.



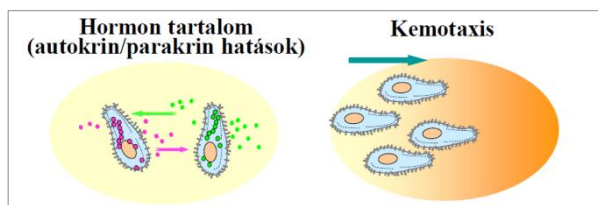
18. ábra: Szerotonin (10^{-15} , 10^{-6} M) imprinting hatása a sejtek úszási viselkedésére az 500. és 1000. utódgenerációban

Szignifikancia: x – p < 0,05, y – p < 0,01; z – p < 0,001

Önmagában a szerotonin imprinting koncentrációfüggő módon fokozta a sejtek úszási sebességét (Szer-15_K: 135,2%; Szer-6_K: 126,8%) az 1000. generációban (18. ábra). Az újbóli szerotonin behatások (10^{-15} M) minden csoportban gátolták/csökkentették a sejtek mozgási sebességét (K-Szer-15: 85,7%; Szer-15_Szer-15: 84,9%, Szer-6_Szer-15: 55,5%). Ez a hatás a 10^{-6} M szerotoninnal imprintált csoportban volt a legkifejezettebb.

Az imprintinget követően az 1000. generáció sejtjeinek mozgását, az egyenes vonalú haladás jellemezte (K_K: 1,53; Szer-6_K: 1,34; Szer-15_K: 1,15) (18. ábra). Az ismételt kezelésre a szerotoninnal imprintált csoportok eltérő érzékenységgel reagáltak: a 10^{-15} M előkezelések esetében a 10^{-6} M (Szer-15_Szer-6: 1,47), míg a 10^{-6} M előkezelés esetében a 10^{-15} M szerotonin (Szer-6_Szer-15: 1,76) adásakor mértünk kanyargósabb mozgási pályákat (18. ábra). A 10^{-15} M-os kezelés hatására a kontroll sejtek úszási mintázata vált, a lassú mozgáselemek dominanciája miatt, a legnagyobb mértékben kanyargóssá (K_Szer-15: 2,18).

4.1.2. R-deprenyl és származékainak alapvető sejtélettani hatásai *Tetrahymena pyriformis* modell-sejten



A MAO enzim jelenlétét *Tetrahymena pyriformis* sejtekben különböző funkcionális tesztekben – szerotonin és egyéb biogén aminok (pl. noradrenalin) metabolizmusában – kimutatták [170]. Az emlős sejtekhez hasonlóan a MAO aktivitás mitokondriális lokalizációt mutatott, és az enzimatis reakció érzékenysége egy nagyságrenddel meghaladta az egér májsejtre jellemző értéket. Hiányos adatok állnak azonban rendelkezésre arról, hogy melyik izotípus van jelen a sejtben, az enzim szubsztrát iránti érzékenysége a következő sorrendet eredményezte: triptamin > szerotonin > dopamin, ami a MAO-A és -B együttes jelenlétére utalhat [182].

A fenti adatok birtokában a MAO-B specifikus gátlószereként ismert R-deprenyl és 9 derivátuma *Tetrahymena* sejtфизиológiai paramétereire (szerotonintartalom, kemotaktikus aktivitás) kifejtett hatásának felmérését tűztük ki célul.

4.1.2.1. R-deprenyl hatása a *Tetrahymena* sejtek szerotonin tartalmára

(Csaba G, Lajkó E, Pállinger É. (2011) Serotonin in *Tetrahymena*. How does it work? *Acta Protozool* 49: 133-138.)

A szerotonin szintézisét végző triptofán dehidrogenáz [169] és a lebontásáért felelős MAO enzim jelenléte is egy szerotoninerger rendszer meglétét látszik igazolni már

az egysejtűek szintjén is [166]. Annak tisztázására, hogy a szerotonin háztartás szabályozásában melyik MAO enzim játszik ténylegesen szerepet, különböző A és B izotípus inhibitorok – *R*-deprenyl (MAO-B), chlorgyline (MAO-A) – hatását vizsgáltuk a *Tetrahymena* szerotonin mennyiségére.

Az *R*-deprenyl a MAO-B gátláshoz szükséges mikromoláris koncentrációban kismértékben, de szignifikánsan fokozta a *Tetrahymena* szerotonin tartalmát (112,4%). Ha a sejteket szerotoninnal (10^{-12} M) kezeltük az önmagában is képes volt fokozni a sejtek hormon tartalmát (117,0%), azonban az *R*-deprenyl, a szerotonin kezelés mellett is további szerotoninszint emelkedést váltott ki (125,1%) (2. táblázat). A MAO-A gátló chlorgyline egyik kísérletben sem mutatott hormonszint növelő hatást.

2. táblázat: *R*-deprenyl hatása a *Tetrahymena pyriformis* szerotonin tartalmára

Kezelés	Geo mean [%] ± SD	$P_{kontroll}$	P_{Szer}
kontroll	100 ± 5,54		
<i>R</i> -deprenyl (5×10^{-5} M) [103]	112,4 ± 2,23	< 0,01	
Chlorgyline (10^{-4} M) [183]	97,7 ± 3,31	n.s.	
Szerotonin (10^{-12} M)	117,0 ± 2,87	< 0,01	
Szerotonin (10^{-12} M) + <i>R</i> -deprenyl (5×10^{-5} M)	125,1 ± 0,57	< 0,01	< 0,01
Szerotonin (10^{-12} M) + chlorgyline (10^{-4} M)	121, 2 ± 10,0	< 0,01	n.s.

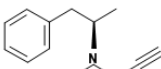
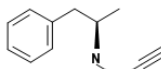
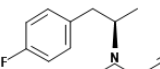
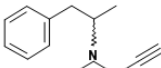
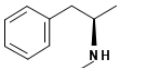
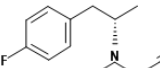
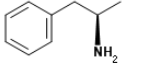
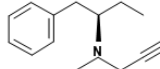
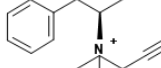
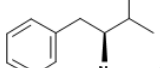
$P_{kontroll}$: szignifikancia a kontrollhoz viszonyítva; P_{Szer} : szignifikancia az szerotoninnal kezelt sejtekhez viszonyítva; n.s.: nem szignifikáns

4.1.2.2. *R*-deprenyl és származékainak kemotaktikus hatása

Az *R*-deprenyl farmakológiai hatásait több különböző in vitro és in vivo rendszerben vizsgálták, és jelentős különbségeket találtak az egyes hatásokra jellemző effektív koncentrációtartományok között. A MAO-B gátlás szempontjából a 10^{-8} - 10^{-6} M koncentráció tartomány bizonyult hatásosnak [103], míg a vegyületre jellemző antiapoptotikus, antioxidáns karakter csak 10^{-9} M, illetve az alatti koncentrációkban volt regisztrálható [73, 82]. Ezek alapján a kemotaxis méréseinkben széles koncentráció tartományban, 10^{-12} - 10^{-6} M vizsgáltuk az *R*-deprenylt és származékait *Tetrahymena pyriformis* modell-sejten. A vizsgálatok célja annak elemzése volt, hogy a vegyületek lehetséges kemotaktikus aktivitása mennyiben magyarázható a MAO-B gátlással, vagy

hasonlóan az *R*-deprenyl számos egyéb hatásához [23, 73, 82], attól független jelenség. A vegyületek csoportosításánál az *R*-deprenylt vettük alapul, és az eredményeket a következő kategóriák (3. táblázat) szerint tárgyaljuk az alábbiakban: (1) deprenyl sztereoizomerek (*R*-deprenyl, *S*-deprenyl), (2) metabolitok (*R*-dezmetildeprenyl, *R*-metamfetamin, *R*-amfetamin, *R*-deprenyl-*N*-oxid), (3) szintetikus származékok (*p*-fluoro-*R*-deprenyl, *p*-fluoro-*S*-deprenyl, *R*-metildeprenyl, *R*-dimetildeprenyl).

3. táblázat: Vizsgálatainkban felhasznált deprenyl származékok és szerkezeti képleteik

Alap molekulák		Metabolitok		Szintetikus származékok	
<i>R</i> -deprenyl		<i>R</i> -dezmetildeprenyl		<i>R</i> - <i>p</i> -fluoro-deprenyl	
<i>S</i> -deprenyl		<i>R</i> -metamfetamin		<i>S</i> - <i>p</i> -fluoro-deprenyl	
		<i>R</i> -amfetamin		<i>R</i> -metildeprenyl	
		<i>R</i> -deprenyl- <i>N</i> -oxid		<i>R</i> -dimetildeprenyl	

- (1) Az *R*-deprenyl 10^{-11} M koncentrációban bizonyult szignifikánsan attraktáns (172,3 %) hatásúnak, ezzel szemben a MAO-B inaktív enantiomer párja 10^{-11} - 10^{-10} M tartományban gyenge repellens jelleget (78,3 - 72,5%) mutatott (4. táblázat).
- (2) Mindegyik vizsgált metabolit az *R*-dezmetildeprenyl kivételével, 10^{-8} - 10^{-6} M tartományban szignifikáns kemorepellens hatással rendelkezett (*R*-amfetamin – 70,5%; *R*-metamfetamin – 55,3%; *R*-deprenyl-*N*-oxid – 62,4%) (4. táblázat). Az *R*-dezmetildeprenyl esetén gyenge kemoattraktáns trend (10^{-10} - 10^{-7} M: 129,9 - 141,1%) volt tapasztalható.
- (3) Az aromás gyűrű fluorozása a kemorepellens jelleg erősödésével járt. A *p*-fluoro-*R*-deprenyl gyenge repellens hatása (73,2%) 10^{-7} M koncentrációban mutatkozott, míg a *p*-fluoro-*S*-deprenyl esetén jóval szélesebb tartományban (10^{-11} - 10^{-6} M), és nagyobb amplitúdóval (57,6 - 73,1%) jelentkezett ez a hatás (4. táblázat).

Az *R*-deprenyl oldalláncának hosszabbításával (metilálásával) előállított *R*-metildeprenyl kemorepellens hatású volt (10^{-6} M: 69,6%), és egy következő metilcsoport kapcsolása (*R*-dimetildeprenyl) tovább erősítette ezt az aktivitást (10^{-8} - 10^{-6} M: 58,7 - 76,2%).

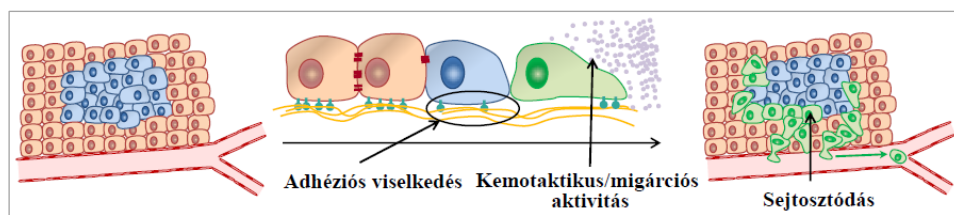
4. táblázat: Deprenyl származékok kemotaktikus hatása *Tetrahymena* modell-sejten

Deprenyl származék	Kemotaxis index [%] (kontroll = 100%)						
	10^{-12} M	10^{-11} M	10^{-10} M	10^{-9} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
R-deprenyl	110,9 ± 2 ¹ ,73	172,3 ^x ± 29,34	104,0 ± 16,71	114,9 ± 20,83	117,8 ± 18,34	106,9 ± 23,7	103,0 ± 24,53
S-deprenyl	111,6 ± 10,14	78,3 ± 12,82	72,5 ± 11,43	94,2 ± 8,44	102,9 ± 13,91	105,8 ± 22,25	75,4 ± 17,39
R-dezmetildeprenyl	86,0 ± 14,13	119,6 ± 29,87	129,9 ± 23,83	118,7 ± 15,7	134,6 ± 17,96	141,1 ± 22,48	88,8 ± 11,59
R-metamfetamin	93,6 ± 19,08	104,3 ± 24,04	125,5 ± 20,17	112,8 ± 14,55	55,3 ^x ± 10,61	76,6 ± 20,85	85,1 ± 15,54
R-amfetamin	92,1 ± 11,29	97,1 ± 15,33	87,9 ± 12,04	99,3 ± 14,14	101,4 ± 20,3	78,4 ± 12,11	70,5 ^x ± 6,05
R-deprenyl-N-oxid	109,2 ± 28,97	124,5 ± 14,44	122,4 ± 13,14	89,8 ± 7,28	112,2 ± 9,51	62,4 ^x ± 12,71	98,0 ± 14,3
p-fluoro-R-deprenyl	88,6 ± 11,4	90,2 ± 7,71	82,9 ± 7,45	104,9 ± 5,48	90,2 ± 9,88	73,2 ± 8,22	87,0 ± 11,94
p-fluoro-S-deprenyl	66,4 ^x ± 10,76	66,4 ^x ± 9,73	57,6 ^x ± 9,29	63,2 ^x ± 9,15	72,8 ± 12,02	73,1 ± 12,1	87,4 ± 13,14
R-metildeprenyl	112,8 ± 10,66	99,3 ± 11,17	98,0 ± 10,62	85,8 ± 10,66	77,0 ± 16,37	85,8 ± 7,93	69,6 ^x ± 5,33
R-dimetildeprenyl	79,4 ± 10,31	66,7 ± 8,13	82,5 ± 12,02	79,4 ± 10,31	58,7 ^x ± 9,48	69,8 ± 14,04	76,2 ± 9,1

Kemotaxis index a kontrollra vonatkoztatott százalékos érték (n=10)

Szürke kiemeléssel a szignifikáns hatásokat jelöljük. Szignifikancia: x – p < 0,05

4.1.3. R-deprenyl és derivátumainak sejtbilógiai hatása magasabb rendű modell-sejteken



Az R-deprenyl hatásai nem lokalizálódnak kizárólag a központi idegrendszerre, a perifériás szövetek sejtjein is igazolták az R-deprenyl antiapoptotikus, antioxidáns és sejt-sejt adhéziora kifejtett hatását, ami egyes esetekben meg is haladta a neuronális modell-sejteken tapasztalt aktivitását [85]. ThyagaRajan és munkatársai az R-deprenyl in vivo tumor ellenes hatásáról számoltak be, amely magyarázatára egy indirekt szabályozási mechanizmust feltételeznek a katekolaminerg rendszeren keresztül [90]. A sejt-ECM adhúzió és migráció kóros megváltozása a neurodegeneratív betegségek kialakulásában ugyanúgy számottevő, mint a tumorprogresszióban és

metasztázisképzésben [23, 27]. Mindezek alapján felmerül a kérdés, hogy az *R*-deprenyl a sejtek kitapadásának és kemotaxisának esetleges befolyásolása révén hozzájárulhat-e az említett kórképek megelőzéséhez, kezeléséhez. Céljaim között szerepelt az alapmolekula komplex sejtbiológiai (sejtadhézió, kemotaxis, proliferáció) vizsgálatán túl sztereoisomerjének, metabolitjainak és további 6 szintetikus származéknak a tanulmányozása két, eltérő malignitású sejtvonalon: a MM6 akut mieloid leukémia eredetű és az LM2 emlő adenokarcinóma sejteken. A deprenyl származékokat, az *R*-deprenyl, a szakirodalomból ismert, hatásainak dóziszfüggése alapján, 10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} M reprezentatív koncentrációkban vizsgáltuk.

4.1.3.1. Deprenyl származékok MM6 monocita sejteken mutatott hatásai

(Lajkó E, Polgár L, Lengyel J, Láng O, Kőhidai L, Magyar K. (2012) Basic cell physiological activities (cell adhesion, chemotaxis, proliferation) induced by deprenyl and its derivatives in Mono Mac 6 human monocytes. J Neural Transm. 119: 545-556)

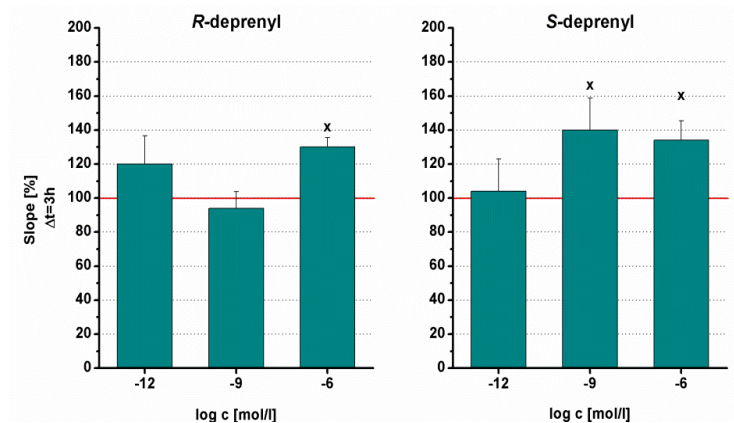
Az *R*-deprenyl a monocita/makrofág sejtek citokin termelésére [184], reaktív oxigén gyökök felszabadulására [185], és kemotaxis célreakciójának számító fagocitózisra [186] kifejtett hatásáról rendelkezésre álló adatok azt valószínűsítik, hogy a vegyület hatásmechanizmusa szempontjából fontos célsejtek a mononukleáris fagocita rendszer tagjai. A monocitás leukémia modell alkalmazása az *R*-deprenyl és származékainak sejt-ECM adhéziót befolyásoló, kemotaktikus, antiproliferatív hatásának vizsgálatára mind a tumorprogresszió, mind a neurodegeneratív folyamatok szempontjából releváns lehet.

4.1.3.1.1. Sejtadhézió befolyásolása

A humán MM6 monocita sejtek adhéziós viselkedésének és a deprenyl származékok hatásának vizsgálatára a viszonylag nagy áteresztő képességű xCELLigence rendszert választottuk. A monociták amőboid mozgással migráló sejtszuszpenziók a szervezetnek. A mozgásformából adódóan átmeneti sejt-ECM kapcsolatok jellemzik ezeket a sejteket [4], azonban a választott módszer érzékenysége miatt adhéziós viselkedésük is jól tanulmányozható.

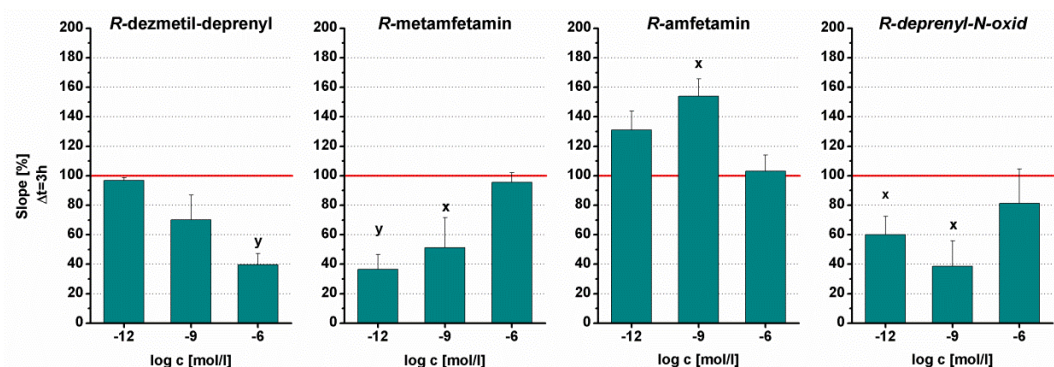
(1) Az *R*-deprenyl már 10^{-12} M koncentrációban is képes volt fokozni a sejtek adhézióját (119,7%), míg a MAO-B gátlás tekintetében releváns koncentráción (10^{-6} M) adhéziót növelő hatása (130,5%) csak hosszú távon mutatkozott; a 10^{-9} M

R-deprenyl neutrális hatású (93,9%) volt (19. ábra). Az *S*-deprenyl adhézióra kifejtett hatása ellentétes koncentrációfüggést mutatott, 10^{-9} M *S*-deprenyl váltott ki maximális adhézió növekedést (140,1%), és az *R*-deprenyl esetén leghatékonyabb koncentráción (10^{-12} M) nem volt hatással a sejtek kitapadására (103,9%).



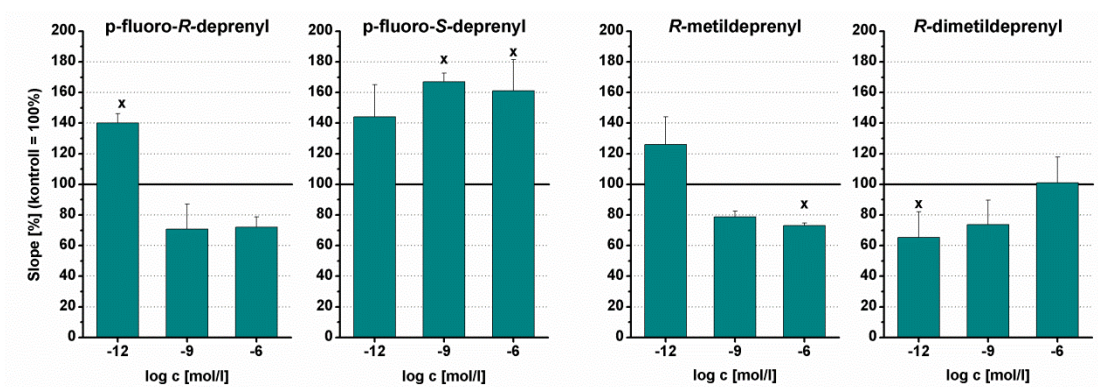
19. ábra: Deprenyl sztereoizomerek sejtadhéziót befolyásoló hatása MM6 sejteken
Szignifikancia: x – $p < 0,05$

(2) A metabolitok adhéziót befolyásoló viselkedése lényegesen eltért az *R*-deprenyl hatásától. Az *N*-metilcsoport hiánya (*R*-dezmetildeprenyl) neutrális hatással (10^{-12} M: 96,9%), valamint a nagyobb koncentrációk felé haladva erősödő adhézió csökkenéssel (10^{-9} M: 70,2%; 10^{-6} M: 39,7%) párosult (20. ábra). Az *R*-metamfetamin (propargilcsoport hiánya) esetén ellentétes koncentrációfüggést kaptunk ($10^{-12} > 10^{-9} > 10^{-6}$ M) és az adhéziót gátló hatás erősödését tapasztaltuk (95,6%, 51,3%, 36,4%). Egy metilcsoportban különböző *R*-amfetamin (primer aminocsoport) éppen ellenkezőleg, az egyik leghatásosabb adhéziót fokozó ligandnak bizonyult (10^{-12} M: 130,8%; 10^{-9} M: 154,0%). Az aminocsoport oxidációja és a kialakuló pozitív töltésű kvaterner aminocsoport adhéziót gátló hatást tulajdonított az *R*-deprenyl-*N*-oxidnak (10^{-12} M: 60,1%; 10^{-9} M: 38,6%).



20. ábra: *R*-deprenyl metabolitjainak sejtadhéziót befolyásoló hatása MM6 sejteken
Szignifikancia: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$

(3) Az aromás gyűrűt és az oldalláncot érintő szerkezeti módosítások egy kivételtől eltekintve döntően lerontották a referencia molekula (*R*-deprenyl) adhéziót fokozó hatását. A para helyzetű fluoro csoport jelenléte a *p*-fluoro-*R*-deprenyl esetén gyenge adhéziót csökkentő hatást eredményezett 10^{-9} M és 10^{-6} M koncentrációkban (70,8%, 71,9%), míg 10^{-12} M-ban megmaradt az *R*-deprenylre jellemző adhéziót fokozó hatás (140,1%). A *p*-fluoro-*S*-deprenyl, mint az egyetlen kivétel a csoportban, az *S*-deprenyl pozitív adhéziós aktivitását tovább erősítette (10^{-9} M: 167,0%; 10^{-6} M: 160,5%) (21. ábra).



21. ábra: Para-fluoro-deprenyl sztereoizomerek és oldalláncban módosított deprenyl származékok sejtadhéziót befolyásoló hatása MM6 sejteken
Szignifikancia: x – p < 0,05

Az oldalláncban módosított származékok közül a *R*-metildeprenyl 10^{-9} és 10^{-6} M koncentrációkban kismértékben csökkentette a sejtek kitapadását (78,8%, 73,1%). A nagyobb térkitöltésű oldallánc megléte (*R*-dimetildeprenyl) neutrális (10^{-6} M), vagy negatív (10^{-12} M: 65,1%; 10^{-9} M: 73,5%) adhéziós karaktert kölcsönzött a molekulának (21. ábra).

4.1.3.1.2. Kemotaxis vizsgálatok

Az *R*-deprenyl és származékainak kemotaktikus hatását a kemotaxis szempontjából professzionális modell-sejtnak tekinthető humán MM6 monocita sejteken vizsgáltuk.

(1) Az *R*-deprenyl esetén 10^{-12} , 10^{-9} M koncentrációban szignifikáns, a kontrollhoz képest 280,5; 406,2%-os aktivitásfokozódást mértünk, míg a MAO-B gátláshoz szükséges tartományban (10^{-6} M) gyengén repellens (76,0%) volt (5. táblázat). Ezzel szemben az enantiomer párja (*S*-deprenyl) repellens hatásának bizonyult mindegyik vizsgált koncentráción (57,4 - 73,2%).

5. táblázat: *R-deprenyl származékok kemotaktikus hatása MM6 modell-sejten*

Deprenyl származékok	Kemotaxis index [%] (kontroll = 100%)		
	10^{-12} M	10^{-9} M	10^{-6} M
<i>R</i> -deprenyl	280,5 ^x ± 65,46	406,2 ^y ± 66,18	76,0 ± 9,93
<i>S</i> -deprenyl	57,4 ^z ± 7,27	48,6 ^z ± 11,62	73,2 ± 12,74
<i>R</i> -dezmetildeprenyl	37,2 ^z ± 8,61	45,9 ^z ± 9,67	67,5 ^y ± 6,75
<i>R</i> -metamfetamin	76,1 ± 11,63	87,7 ± 11,56	100,5 ± 10,80
<i>R</i> -amfetamin	60,1 ^y ± 10,74	62,6 ^x ± 11,20	174,0 ^z ± 15,51
<i>R</i> -deprenyl- <i>N</i> -oxid	89,0 ± 5,48	83,0 ± 8,50	58,1 ^z ± 6,77
<i>p</i> -fluoro- <i>R</i> -deprenyl	20,8 ^z ± 9,32	54,0 ^y ± 16,84	67,7 ^z ± 4,66
<i>p</i> -fluoro- <i>S</i> -deprenyl	80,2 ± 11,67	97,4 ± 18,35	205,6 ^z ± 23,19
<i>R</i> -metildeprenyl	82,4 ± 12,04	110,6 ± 17,27	32,2 ^z ± 7,13
<i>R</i> -dimetildeprenyl	139,0 ^x ± 13,24	159,7 ^x ± 23,93	63,3 ^y ± 9,57

Kemotaxis index a kontrollra vonatkoztatott százalékos érték (n=10)

Szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01; z – p < 0,001

Szürke kiemeléssel a szignifikáns hatásokat jelöltük.

- (2) Az *R*-deprenyl metabolizmusa során keletkező termékek döntően neutrális, vagy repellens hatással rendelkeztek. Egyedül az *R*-amfetamin esetén tudtunk kimutatni attraktáns hatást, bár mind erősségében (174,0%), mind koncentrációfüggésében (10^{-6} M) eltért az anyavegyület hatásától (5. táblázat). Az *R*-dezmetildeprenyl repellens jellege a koncentráció csökkenésével párhuzamosan erősödött (10^{-12} M: 37,2%, 10^{-9} M: 45,9%; 10^{-6} M: 67,5%), míg az *R*-metamfetamin repellens hatása csak 10^{-12} M koncentráción volt detektálható. Az *R*-deprenyl-*N*-oxid mérésekor, 10^{-6} M esetén jelentkezett ez a negatív hatás (58,1%).
- (3) A fluoro-csoport szubsztitúciója ellentétére fordította a referencia molekulákra jellemző kemotaktikus hatást. Az *p*-fluoro-*R*-deprenyl esetén az *R*-deprenyl markáns attraktáns jellege repellenssé (10^{-12} M: 20,8%, 10^{-9} M: 54,0%, 10^{-6} M: 67,7%) míg az *S*-deprenyl széles tartományban jellemző repellens aktivitása neutrálissá (10^{-12} M: 80,2%, 10^{-9} M: 97,4%), illetve attraktánssá (10^{-6} M: 205,6%) változott (5. táblázat).

Az oldalláncban módosított származékok esetén hasonló koncentrációfüggést tapasztaltunk, mint az alap vegyületek esetében, bár az attraktáns válaszreakció mértéke kisebb lett, míg a repellens jelleg erősödött. *R*-metildeprenyl esetén szignifikáns repellens hatás (32,2%) volt csak kimutatható 10^{-6} M koncentrációban (5. táblázat). Az *R*-dimetildeprenyl kemotaktikus aktivitása szélesebb skálán mozgott, alacsony koncentrációkban szignifikánsan attraktáns (10^{-12} M – 139,0%); 10^{-9} M – 159,7%), míg 10^{-6} M-ban repellens (63,3%) hatást mutatott.

4.1.3.1.3. Sejtosztódásra kifejtett hatás

A sejtleletani folyamatok közül, a sejtek megváltozott osztódási készségének klinikai jelentősége, a sejtheadzió és kemotaxis károsodása mellett, a tumorok kialakulásában és progressziójában vitathatatlan. Melanóma modell-sejten végzett vizsgálatok tanúsága szerint az *R*-deprenyl és az *R*-dezmetildeprenyl antiapoptotikus hatásuk mellett nem hatottak szignifikánsan a sejtek proliferációjára, míg az *R*-deprenyl-N-oxid antiapoptotikus tulajdonsága sejtosztódást elősegítő hatással párosult [99]. A deprenyl származékok tumorelles hatásának, illetve a tumor progresszióban betöltött szerepének tisztázásához elengedhetetlen az adhéziót befolyásoló és kemotaktikus aktivitásuk mellett a sejtosztódásra gyakorolt hatásuk vizsgálata is. Annak eldöntésére, hogy a deprenyl származékok sejtosztódásra kifejtett hatása általános, vagy sejttípustól függő jelleg, illetve, hogy az *R*-deprenyl önmaga, vagy metabolitjain keresztül felelős e hatás kialakulásáért, a vegyületek monocita sejtek osztódására gyakorolt hatását is elemeztük 48 és 72 órás kezeléseket követően, a sejtheadzió és kemotaxis mérések során alkalmazott referencia koncentrációkon (10^{-12} , 10^{-9} , 10^{-6} M).

Eredményeink alapján elmondható, hogy egyik vizsgált származék sem rendelkezett szignifikáns proliferáció serkentő hatással 48 és 72 órás időintervallumban, azonban 5 vegyület esetén (a szürke hátérrel kiemelt koncentrációkon) szignifikáns sejtszámcsökkenést tudunk regisztrálni (6. táblázat).

- (1) A 10^{-6} M *R*-deprenyl enyhe, de szignifikánsan citotoxikus (88%), míg 10^{-9} M oldata antiproliferatív hatást (63,4%) mutatott 48 óra elteltével. Enantiomerjének (*S*-deprenyl) vizsgálata során hasonló aktivitás nem volt detektálható.
- (2) A metabolitok közül egyedül, az *R*-metamfetamin fejtett ki kismértékű citotoxikus hatást (10^{-12} M: 89,6 %; 10^{-9} M: 84,3%) 48 órás inkubációt követően.

6. táblázat: Deprenyl származékok hatása MM6 sejtek proliferációjára

Deprenyl származék	Élő sejtek száma [%] kontroll = 100%					
	48 h			72 h		
	10 ⁻¹² M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻¹² M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁶ M
R-deprenyl	102,0	63,4 ^z Via: 1,01	88,0 ^x Via: 0,77	101,9	87,5 Via: 1,09	89,5 Via: 1,06
S-deprenyl	97,3	113,7	113,3	91,0	97,0	100,0
R-dezmetildeprenyl	120,8	115,1	104,0	102,3	100,6	95,4
R-metamfetamin	89,5 ^x Via: 0,77	84,3 ^z Via: 0,72	93,8	99,3 Via: 1,13	94,3 Via: 1,06	100,4
R-amfetamin	99,5	92,4	96,0	104,0	97,5	98,3
R-deprenyl-N-oxid	100,3	115,5	102,8	116,8	111,9	115,3
p-fluoro-R-deprenyl	95,2	100,1	77,9 ^x Via: 1,06	93,7	104,3	95,8 Via: 0,88
p-fluoro-S-deprenyl	99,4	91,0	85,9 ^x Via: 1,01	87,3	82,6 ^x Via: 0,90	96,4 Via: 0,88
R-metildeprenyl	95,7	99,0	104,1	86,2	88,5	97,8
R-dimetildeprenyl	93,0	86,4	102,7	98,0	95,9	94,9

Az élő sejtek száma a kontrollra normalizált százalékos érték. Via (viabilitás): életképesség a kontrollra vonatkoztatott arányszám. Szürke kiemeléssel a szignifikáns hatásokat jelöltük. Szignifikancia: x – p < 0,05; z – p < 0,001.

- (3) Az R-deprenyl fluorozása az antiproliferatív hatás szempontjából jelentős szerkezeti módosításnak bizonyult. Mindkét izomer közel egyforma mértékben csökkentette az élő sejtek számát (p-fluoro-R-deprenyl: 77,9%, p-fluoro-S-deprenyl: 85,9%) a 48 órás, 10⁻⁶ M koncentrációval történő kezelés alatt. A 72 órás kezelést követően egyedül a p-fluoro-S-deprenyl rendelkezett szignifikáns antiproliferatív (82,6%) hatással, a többi származék hosszútávon nem befolyásolta a sejtek osztódását.

4.1.3.2. Deprenyl származékok hatása LM2 adenokarcinóma sejten

(Kőhidai L, Lajkó E, Láng O, Igaz A, Lengyel J, Magyar K. (2010) Cell adhesion induced by Deprenyl and its derivatives - Investigations of adenocarcinoma cell lines (LM2, LM3) by ECIS technique and introduction Cell-LED® a new lighting equipment dedicated to ECIS. 2010 ECIS Users Meeting, Rensselaerville, USA)

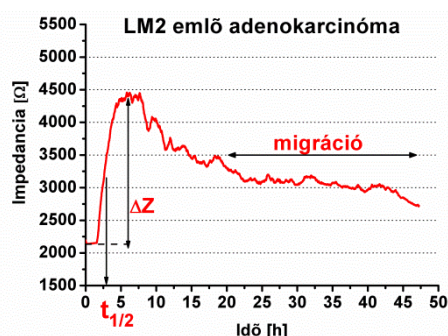
Az R-deprenyl tumorellenes hatását spontán indukálódó és karcinogén-kezelés hatására kialakuló egér emlődaganatok esetén mutatták ki először. Az R-deprenyl gátló hatása alacsony dózisban is megfigyelhető volt, azonban a tumorok incidenciáját csak a nagyobb dózis alkalmazásakor volt képes csökkenteni. Az in vivo daganatellenes hatás hátterében a vegyület a prolaktin-katekolaminerg rendszeren keresztül megnyilvánuló

immunstimuláns hatását feltételezik, azonban direkt sejtosztódás gátló hatását in vitro rendszerben, ösztrogénreceptor pozitív emlő tumor eredetű sejtvonalakon is megerősítették [89, 90].

Munkánk során a deprenyl származékok LM2 emlő adenokarcinóma sejtvonal adhéziós és migrációs viselkedésére kifejtett hatásának vizsgálata ECIS technika felhasználásával történt.

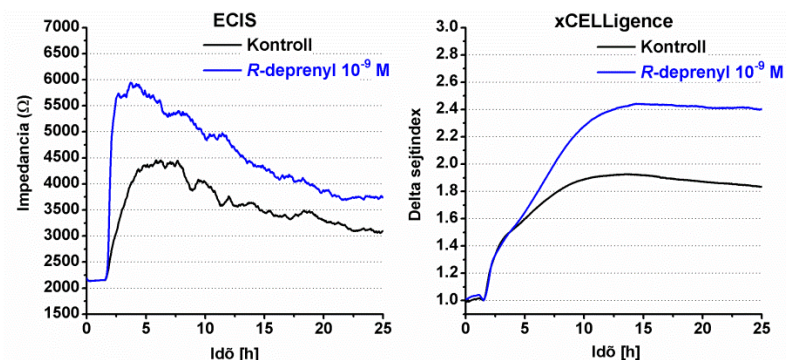
4.1.3.2.1. Sejtadhézió befolyásolása

A deprenyl származékok LM2 sejtek kitapadására kifejtett hatásának kiértékeléshez két paraméter változását vizsgáltuk a kontroll (nem kezelt) sejtekhez viszonyítva (22. ábra). A kitapadás mértékének jellemzésére szolgál a maximális impedancia emelkedés értéke (ΔZ : impedancia_{max}), míg az adhézió időbeli lefutását leíró görbe karakterisztikáját a maximális impedancia 50 %-ának eléréséhez szükséges idővel ($t_{1/2}$) jellemeztük [164]. Az LM2 sejtek gyors kitapadását követően ($t_{1/2} = 0,5 - 1h$) egy rövid plató fázis figyelhető meg, ahol az impedancia viszonylag állandó érték ($\Delta Z = 4500 - 5000 \Omega$) körül mozog, majd a görbe jellege megváltozik, az impedancia, valószínűleg a kitapadt sejtek morfológiai változása miatt csökken, majd egy alacsonyabb impedancia értéken ($\Delta Z = 500 - 1000 \Omega$) közel állandó érték körül fluktuál.



22. ábra: Az LM2 adenokarcinóma sejtek adhéziós viselkedése ECIS rendszerben

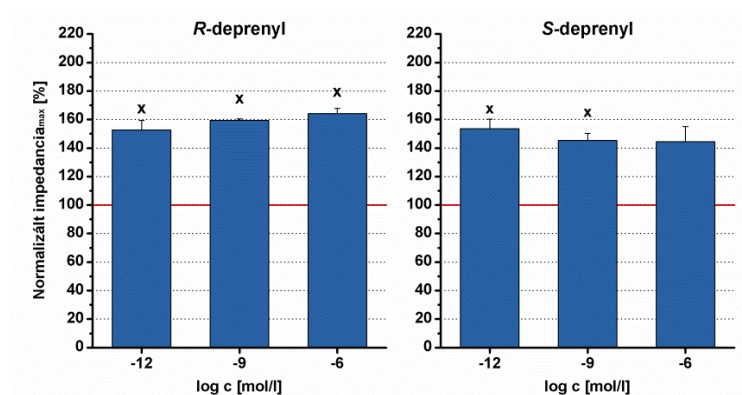
Az ECIS készülék alkalmazását az LM2 sejtek adhéziós viselkedésének monitorozására több tényező is indokolja: (i) a választott modell-sejtre viszonylag nagymértékű adhézió jellemző, így az ECIS mérőelektrod átmérőjéből (250 μm) adódóan már 10 - 100 sejt is érzékenyen vizsgálható; (ii) az impedancia fluktuációjából következtetni tudunk a sejtek migrációs aktivitására; (iii) a két, ismertetett impedimetriás módszerrel lemérve a sejtek kitapadását poli-L-lizinnel (5mg/ml) fedett elektrod felszínhez (23. ábra) látható, hogy hasonló az adhéziós görbe lefutása és a kezelés (R-deprenyl 10^{-9} M) hatása.



23. ábra: *R-deprenyl* (10^{-9} M) hatása az LM2 sejtek adhézios viselkedésére ECIS és xCELLigence rendszerben

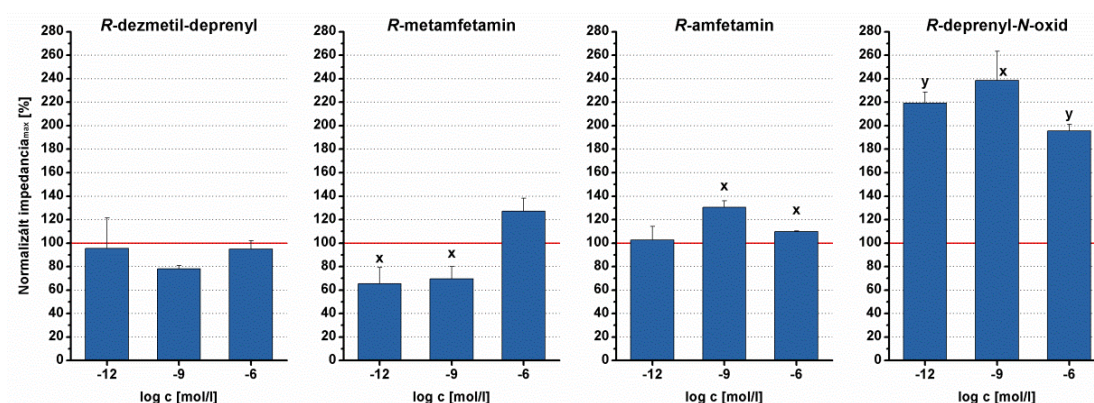
A görbe karakterisztikájában mutatkozó némi eltérés a két rendszer geometriai, biofizikai paramétereinek különbözőségéből adódik. Például, az aktív mérő elektród felszíne az ECIS esetén pontszerű; míg az E-plate welljeinek felszíne 80%-ban fedett elektródokkal. A legszembetűnőbb különbség, a mért impedancia/sejt index érték fluktuációjában látható, ami túlnyomórészt az eltérő elektród felszínnel, és ebből adódóan az egyéni sejtek mozgásállapotában beállt változás regisztrálhatóságával magyarázható. Az adhézió lefutásában mutatkozó eltérés hátterében az állhat, ismerve az impedancia frekvenciafüggését [174], hogy a két műszerben más az alkalmazott váltóáram frekvenciája (ECIS: 15kHz, xCELLigence: 10kHz).

(1) LM2 sejtek kitapadásának kinetikájára és mértékére mindkét vizsgált izomer – *R-deprenyl* > *S-deprenyl* aktivitási sorrendben – pozitívan hatott (24. ábra). Az *R-deprenyl* esetén a 10^{-6} M koncentráció bizonyult a leghatásosabbnak (ΔZ : 164,2%; $t_{1/2}$: 0,43 h vs. Ktrl: 1,37h), míg az *S-deprenyl* esetén fordított koncentrációfüggés volt megfigyelhető (ΔZ – 10^{-12} M: 153,4%; $t_{1/2}$ – 10^{-12} M: 0,83h vs. Ktrl: 1,51h).



24. ábra: *Deprenyl* sztereoizomerek hatása LM2 sejtek kitapadására
Szignifikancia: x – $p < 0,05$

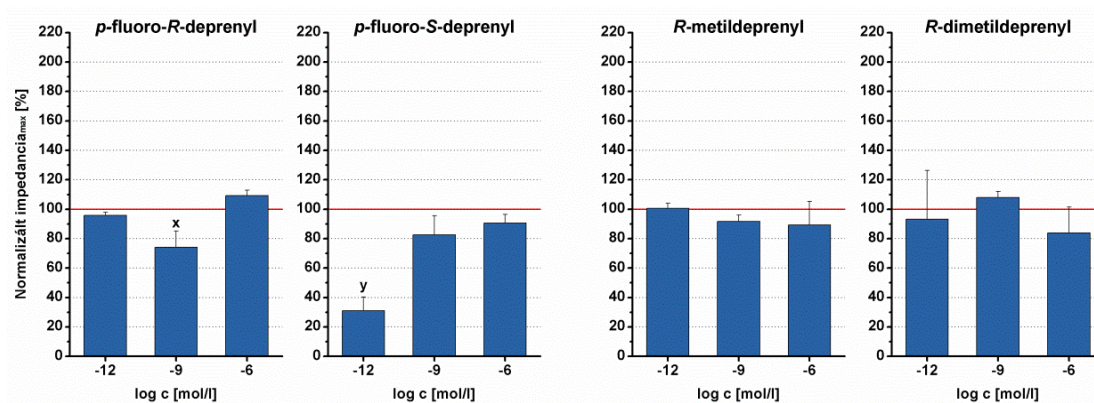
- (2) Az *R*-dezmildeprenyl neutrális ill. gyenge adhéziót csökkentő hatással ($\Delta Z - 10^{-9}$ M: 78,8%) rendelkezett (25. ábra). Az *R*-metamfetamin esetében a kisebb koncentrációk szintén gátlóan hatottak, csökkent mértékű ($\Delta Z - 10^{-12}$ M: 65,4%; 10^{-9} M: 69,4%) és elnyújtottabb adhéziós profil ($t_{1/2} - 10^{-12}$ M: 0,84h; 10^{-9} M: 1.19 vs. Ktrl: 0,60h) volt megfigyelhető. Az *R*-amfetamin és az *R*-deprenyl-N-oxid esetén éppen ellenkezőleg, fokozott sejtheadhézió volt kimutatható. Az *R*-amfetamin 10^{-9} , 10^{-6} M bizonyult hatékonynak ($\Delta Z - 10^{-9}$ M: 130,4%; 10^{-6} M: 109,8%) míg, az *R*-deprenyl-N-oxid esetén minden vizsgált koncentráción nagymértékben fokozta a sejtek kitapadását (ΔZ : 238,6 - 195,5%).



25. ábra: *R*-deprenyl metabolitjainak hatása az LM2 sejtek adhéziójára

Szignifikancia: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$

- (3) A molekula fluorozása adhézió csökkentő hatással párosult, 10^{-9} M *p*-fluoro-*R*-deprenyl $\Delta Z - 74\%$ -os hatása mellett a sejtek elnyújtottabb adhézióját eredményezte ($t_{1/2} - 10^{-9}$ M: 1,79h vs. Ktrl: 0,66) (26. ábra). A *p*-fluoro-*S*-deprenyl rendelkezett a vizsgált származékok közül a legszignifikánsabb adhéziót csökkentő hatással ($\Delta Z - 10^{-12}$ M: 31,1%) 10^{-12} M koncentrációban.



26. ábra: Para-fluoro-deprenyl sztereoizomerek és oldalláncban módosított deprenyl származékok hatása az LM2 adhéziójára

Szignifikancia: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$

Az oldalláncban módosított derivátumok (*R*-metildeprenyl, *R*-dimetildeprenyl) neutrálisan viselkedtek minden vizsgált koncentrációban (26. ábra).

4.1.3.2.2. Sejtmigráció vizsgálat

Az LM2 sejtvonal 48-72 órán keresztül történő monitorozása lehetőséget teremtett arra, hogy nemcsak a sejtek kitapadását jellemző impedancia-emelkedés karakterisztikáját elemezhessük, hanem a kiterülésüket követően, az impedancia egy állandó érték körüli hullámzásából következtetni tudjunk a sejtek migrációs aktivitására és a deprenyl származékok migrációra kifejtett hatására is. Az LM2 sejtek esetén a mérés 12-15 órájáig tart a sejtek kitapadása és a többé-kevésbé szabályos sejtréteg kialakítása. Ezt követően az impedancia viszonylag állandó $\Delta Z = 500 - 1000 \Omega$ közötti értékre áll be 25 - 120 Ω -os fluktuációkkal (22. ábra). A deprenyl származékok migrációra kifejtett hatását ezen a viszonylag állandó szakaszon, 10 órás időintervallumban vizsgáltuk. A kiértékelés során ezt az impedancia ingadozást, az átlag impedanciától vagy trendtől való eltérésként, azaz standard deviációként definiáltuk. A 10 órás időtartamra jellemző standard deviációk átlagát a kontroll százalékában fejeztük ki. Minél nagyobb a standard deviáció (impedancia fluktuációja), annál gyorsabb a sejtek alakváltozása, nagyobb a migrációs, rotációs aktivitása.

- (1) LM2 sejtek motilitás készségét a két deprenyl sztereoizomer, hasonlóan a MM6 sejtekhez, ellentétesen befolyásolta. Az *R*-deprenyl alacsonyabb koncentrációi (10^{-12} , 10^{-9} M) bizonyultak ez esetben is hatékonynak a migráció fokozása (148,6 - 148,4%) szempontjából, míg a MAO-B gátló 10^{-6} M-ban gyenge gátló/neutrális hatással (89,5%) bírt (7. táblázat). Az *S*-deprenyl hatása 10^{-6} M koncentrációban nyilvánult meg, csökkentve a kontrollhoz képest a sejtek mozgását (21,6%).
- (2) Az *R*-dezmethyldeprenyl kisebb mértékben (69,0%) és csak 10^{-9} M-ban míg az *R*-metamfetamin nagyobb hatékonysággal és szélesebb koncentráció tartományban csökkentette (10^{-12} - 10^{-9} M: 55,3 - 31,0%) a sejtek migrációs aktivitását (7. táblázat). Ezzel szemben az *R*-amfetamin és az *R*-deprenyl-N-oxid serkentette a sejtek migrációs viselkedését, hatásereőségük meghaladta az anyavegyület aktivitását. Az *R*-amfetamin hatása (171,7 - 186,3%), hasonlóan az *R*-deprenylhez, csak 10^{-12} - 10^{-9} M koncentrációkban volt jellemző, míg az *R*-deprenyl-N-oxid minden vizsgált koncentrációban hatékonynak (163,5 - 208,5%) bizonyult.

7. táblázat: LM2 sejtek migrációs aktivitásának változása a deprenyl származékokkal történő kezelés hatására

Deprenyl származékok	Migráció [%] (Standard deviáció a kontroll %-ban)		
	10^{-12} M	10^{-9} M	10^{-6} M
R-deprenyl	148,6 ^y ± 12,18	148,4 ^y ± 15,49	89,5 ± 6,27
S-deprenyl	83,9 ± 10,24	99,7 ± 11,41	21,6 ^z ± 8,07
R-dezmetildeprenyl	111,4 ± 8,26	69,0 ^x ± 9,24	101,2 ± 7,54
R-metamfetamin	55,3 ^x ± 8,2	31,0 ^z ± 6,71	134,4 ± 9,76
R-amfetamin	171,7 ^z ± 11,78	186,3 ^z ± 10,53	112 ± 9,04
R-deprenyl-N-oxid	178,9 ^z ± 20,44	208,5 ^z ± 28,5	163,5 ^y ± 21,5
p-fluoro-R-deprenyl	151,7 ^x ± 14,96	148,5 ± 22,77	63,2 ^x ± 7,45
p-fluoro-S-deprenyl	93,6 ± 15,56	93,3 ± 16,02	185,6 ^x ± 35,77
R-metildeprenyl	96,4 ± 19,99	96,7 ± 20,3	68,8 ^x ± 9,99
R-dimetildeprenyl	88,5 ± 15,75	134,5 ± 22,28	78,7 ± 9,77

Standard deviáció: trendtől (átlag impedanciától) való eltérés mérőszáma

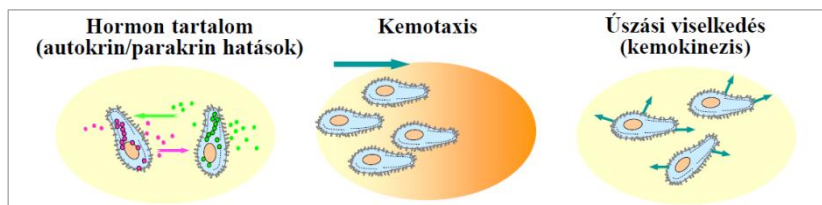
Szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01; z – p < 0,001

Szürke kiemeléssel a szignifikáns hatásokat jelöltük.

- (3) A p-fluoro-R-deprenyl alacsony 10^{-12} - 10^{-9} M koncentrációkban, az R-deprenyl aktivitásával azonos mértékű migrációt fokozó (151,7 - 148,5%) hatást mutatott (7. táblázat). A 10^{-6} M-ban a p-fluoro-R-deprenyl gátolta (63,2%), míg az p-fluoro-S-deprenyl fokozta (185,6%) a sejtek migrációs aktivitását. Az R-metildeprenyl egyedül 10^{-6} M-ban rendelkezett egy migrációt csökkentő (68,8%) hatással. Ellenben az oldallánc hosszabbításával nyert R-dimetildeprenyl esetén egy gyenge motilitást fokozó hatást (134%) tudunk detektálni 10^{-9} M koncentrációban.

4.2. GnRH peptidek és különböző magasabb rendűekre jellemző hormonok

4.2.1. *Tetrahymena pyriformis* modell-sejten kifejtett hatások



4.2.1.1. Természetes és szintetikus GnRH peptidek hatása *Tetrahymena pyriformis* kemotaktikus aktivitására

(Lajkó E, Szabó I, Andódy K, Pungor A, Mező G, Kőhidai L. (2013) Investigation on chemotactic drug targeting (chemotaxis and adhesion) inducer effect of GnRH-III derivatives in *Tetrahymena* and human leukemia cell line. *J Pept Sci.* 19: 46-58.)

A kemotaxis kiváltására képes ligandok keresése során számos vegyületcsoportról derült ki, hogy rendelkezik kemotaktikus hatással *Tetrahymena* sejteken. A hipotalamo-hipofizeális hormonok sorában az ACTH, az FSH és LH kemotaktikus hatása, annak ellenére kimutatható volt *Tetrahymena pyriformis* sejtekben, hogy magasabb rendűekben alapvetően nem fejtenek ki ilyen hatást [49, 168]. Mindezek alapján felmerült a kérdés, hogy hasonlóan egyéb peptidtípusú hormonokhoz, a GnRH izoformák és szintetikus származékaik rendelkeznek-e kemotaktikus hatással *Tetrahymena* sejteken.

8. táblázat: A vizsgált 12 GnRH származék megnevezése és csoportosításuk

Természetes hormonok	GnRH-I
	GnRH-II
	GnRH-III
'N' terminális felől rövidített fragmensek	Ac-HWSHDWKPG-NH ₂
	Ac-WSHDWKPG-NH ₂
	Ac-SHDWKPG-NH ₂
Monomer származékok	GnRH-III(Ac-C)
	GnRH-III(Ac-CGFLG)
Szimmetrikus dimerek	[GnRH-III(C)] ₂
	[GnRH-III(Ac-C)] ₂
	[GnRH-III(CGFLG)] ₂
	[GnRH-III(Ac-CGFLG)] ₂

A kemotaxis vizsgálatok során a peptideket szerkezetük alapján csoportosítottuk (8. táblázat), a (1) természetes hormonok, a (2) N-terminális vég felől rövidített GnRH-III fragmensek, az (3) elágazó szénláncú GnRH-III monomerek és a (4) GnRH-III dimer származékok hatását a fiziológiásnak tekinthető 10^{-12} - 10^{-6} M koncentráció tartományban vizsgáltuk. Az N-terminális vég felől rövidített fragmensek vizsgálatával arra kerestük a választ, hogy a szekvencia rövidítése mennyiben befolyásolhatja kemotaktikus hatásukat. Az elágazó szénláncú GnRH-III származékokból, mint monomer egységekből diszulfid hídon keresztül összekapcsolt szimmetrikus dimerek a linker szekvencia felépítésében – enzimlabilis távtartó (GFLG szekvencia) meglétében és acetiláltságában – különböztek egymástól.

- (1) A natív hormonok közül a GnRH-II gyenge repellensként hatott 10^{-11} - 10^{-7} M tartományban (76,0 - 77,4%), míg a GnRH-III negatív hatása (79,1 %) csak 10^{-6} M-ban jelentkezett. A GnRH-I esetén 10^{-7} - 10^{-6} M-os tartományban egy attraktáns (132,9 – 129,9%) trend volt megfigyelhető (9. táblázat).
- (2) A GnRH-III fragmenseken kapott eredményekből kitűnik, hogy az N-terminális aminosav kémiai karaktere alapvetően meghatározza a molekula kemotaktikus jellegét. Az aromás triptofán jelenléte az amino-terminálison (Ac-WSHDWKPG-NH₂) repellens hatást (66,1 - 56,5%) okozott 10^{-9} - 10^{-6} M koncentrációkon (9. táblázat). Ezzel szemben poláris oldalláncú aminosavak esetén a peptid származékok attraktáns hatásúnak bizonyultak. Az Ac-SHDWKPG-NH₂ mikromoláris (10^{-7} - 10^{-6} M: 144,0 - 145,3%) koncentrációkban, míg az Ac-HWSHDWKPG-NH₂ vizsgálatokor 10^{-9} M-nál (191,9%) jelentkezett a legnagyobb attraktáns hatás.
- (3) A GnRH-III Lys⁸ oldalláncának módosításával előállított monomerek a kapcsolt szekvencia hosszától függően különböző kemotaktikus hatást fejtettek ki. A rövid oldalláncú GnRH-III(Ac-C) szignifikánsan repellens (10^{-8} M: 49,2%, 10^{-6} M: 55,9%), míg a hosszabb GFLG szekvenciát hordozó monomer GnRH-III(Ac-CGFLG) szignifikánsan attraktáns (10^{-9} M: 149,3%) hatást mutatott (9. táblázat).
- (4) A kemoattraktáns hatás szempontjából a [GnRH-III(C)]₂ dimer – két GnRH-III közvetlenül, diszulfid hídon keresztül történő összekapcsolása – bizonyult a leghatékonyabbnak az összes származék közül. Két koncentráció optimum volt megfigyelhető 10^{-12} - 10^{-10} M (189,5 – 236,8%) és magasabb 10^{-7} - 10^{-6} M (176,3 –

150,0%) tartományban (9. táblázat). A kapcsoló régió acetilálása ([GnRH-III(Ac-C)]₂) neutrális hatással párosult.

A hosszabb távtartó GFLG szekvencia közbeiktatása ([GnRH-III(CGFLG)]₂) a teljes koncentráció tartományra kiterjedő repellens hatást (10^{-12} - 10^{-6} M: 49,2 – 37,7%) eredményezett. A [GnRH-III(Ac-CGFLG)]₂ dimer, vélhetően az acetilcsoport jelenlétéből adódóan neutrális hatással rendelkezett (9. táblázat).

9. táblázat: GnRH peptidek kemotaktikus hatása *Tetrahymena* modell-sejten

GnRH peptid	Kemotaxis index [%] (kontroll = 100%)						
	10^{-12} M	10^{-11} M	10^{-10} M	10^{-9} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
GnRH-I	110,4 ± 19,58	100,0 ± 11,62	115,6 ± 14,8	124,7 ± 13,99	102,6 ± 15,54	132,5 ± 21,63	129,9 ± 17,42
GnRH-II	91,6 ± 11,21	76,0 ± 11,58	71,5 ^x ± 10,6	76,7 ± 6,48	81,2 ± 6,88	77,4 ± 11,6	98,3 ± 9,79
GnRH-III	110,4 ± 9,32	91,3 ± 7,16	105,9 ± 9,18	113,4 ± 12,75	104,2 ± 9,5	86,4 ± 6,17	79,1 ^x ± 7,65
Ac-HWSHDWKPG-NH ₂	137,8 ± 26,25	135,1 ± 22,79	151,4 ± 27,68	191,9 ^y ± 26,86	164,9 ± 50,39	164,9 ^x ± 26,86	159,5 ± 31,32
Ac-WSHDWKPG-NH ₂	74,8 ± 9,37	97,5 ± 17,4	92,2 ± 13,55	66,1 ^x ± 4,71	81,2 ± 10,56	68,7 ^x ± 6,14	56,5 ± 7,61
Ac-SHDWKPG-NH ₂	82,7 ± 14,45	112,0 ± 10,42	84,0 ± 9,26	117,3 ± 11,87	128,0 ± 15,82	144,0 ^x ± 13,93	145,3 ± 22,84
GnRH-III(Ac-C)	81,4 ± 10,57	128,8 ± 17,75	103,4 ± 20,81	79,7 ± 6,5	49,2 ^y ± 8,08	96,6 ± 12,41	55,9 ^y ± 5,4
GnRH-III(Ac-CGFLG)	110,7 ± 20,08	88,0 ± 9,15	114,7 ± 10,17	149,3 ^x ± 19,45	70,7 ± 10,9	93,3 ± 13,48	96,0 ± 18,52
[GnRH-III(C)] ₂	189,5 ^x ± 32,53	236,8 ^y ± 48,16	226,3 ^x ± 23,69	160,5 ± 22,48	126,3 ± 24,59	176,3 ^x ± 36,29	150,0 ± 30,00
[GnRH-III(Ac-C)] ₂	122,5 ± 16,54	116,9 ± 16	133,8 ± 14,43	76,1 ± 11,54	104,2 ± 12,1	109,9 ± 11,84	69,0 ± 9,26
[GnRH-III(CGFLG)] ₂	49,2 ^x ± 10,65	49,2 ^x ± 7,33	70,5 ± 18,78	57,4 ± 10,72	60,7 ± 12,23	49,2 ^x ± 12,46	37,7 ^x ± 11,48
[GnRH-III(Ac-CGFLG)] ₂	89,6 ± 14,02	105,2 ± 14,67	113,0 ± 19,56	92,2 ± 22,2	140,3 ± 28,24	111,7 ± 26,7	120,8 ± 25,25

Kemotaxis index a kontrollra vonatkoztatott százalékos érték (n=10)

Szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01. Szürke kiemeléssel a szignifikáns hatásokat jelöltük.

4.2.1.1.1. Kemotaktikus jelátviteli útvonalak vizsgálata

A GnRH hormonokra jellemző élettani, farmakológiai hatások különböző jelátviteli mechanizmusok indukcióján keresztül valósulnak meg. Az FSH és LH szekréció kiváltásában a $G\alpha_{q/11}$ fehérjén keresztül, a PLC (foszfolipáz C) – IP3 (inozitol-1,4,5-trifoszfát) – Ca^{2+} jelátviteli kaszkád aktivációja játszik fontos szerepet. Ezzel szemben

tumorkok felszínén lévő GnRH-IR által közvetített daganatellenes hatás a $G\alpha_i$ fehérjéhez kötötten több párhuzamosan futó jelátviteli út aktivációján keresztül valósul meg. A MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) útvonal mellett a PI3K – PIP3 (foszfatidil-inozitol 3-kináz – foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát) rendszer is részt vesz a GnRH-I hormon antiproliferatív, proapoptotikus és invazivitást gátló hatásának közvetítésében [120, 121]. A GnRH-III izoforma tumorelles hatásának kiváltásában tumor típustól függően, különböző a $G\alpha_{q/11}$ – PLC – Ca^{2+} (emlő tumor), míg a $G\alpha_i$ – cAMP (vastagbél tumor) jelátviteli útvonalak játszanak fontos szerepet [187].

A fentiek alapján adódik a kérdés, hogy a GnRH származékok indukálta kemotaktikus válasz Tetrahymena sejtek esetén, milyen mértékben függ a PLC vagy a PI3K enzim aktivációjától? A Tetrahymena magasabb rendű sejtekkel mutatott hasonlósága az intracelluláris hírvivők szintjén is bizonyított. A cAMP, inositol-foszfolipid mediátorok azonosítása egyben feltételezi a szintézisükért felelős enzimek (adenilát-cikláz, PLC, PI3K) meglétét is a Tetrahymena sejtekben [39, 42, 188, 189].

A **PLC** szerepét, a Tetrahymena modell-sejten kemoattraktáns hatással rendelkező GnRH-III származékok jelátvitelében, indirekt immuncitokémiai jelölést követően áramlási citometriás mérés segítségével határoztuk meg.

Az attraktáns vegyületek vizsgálatakor, azon a koncentráción alkalmazva őket, amelyeken hatásuk megnyilvánult, a PLC enzim aktivitásbeli változását nem tudtuk kimutatni.

A **PI3K** részvételét a GnRH származékok indukálta kemoattraktáns válasz jelátvitelében, indirekt módon, specifikus inhibítorok alkalmazásával vizsgáltuk. A wortmannin és LY gátlószerekkel előkezelt sejtekkel egy ismételt kemotaxismérést végeztünk az optimális koncentrációban alkalmazott kemoattraktáns hatású GnRH-III származékokkal szemben. Az eredményeket összehasonlítva a nem kezelt sejtek kemotaktikus reakciójával következtettünk a PI3K aktivitás szerepére.

A PI3K gátlásával a GnRH-III származékok által kiváltott kemoattraktáns válasz gátolhatónak bizonyult, bár az egyes peptidek eltérő érzékenységet mutatottak az inhibítorokkal szemben. Az Ac-HWSHDWKPG-NH₂ kemoattraktáns hatását a LY hatékonyan gátolni tudta (65,3%), míg a wortmannin hatástalannak (93,4%) bizonyult (10. táblázat). Az Ac-SHDWKPG-NH₂ esetén épp ellenkező profilt kaptunk a wortmannin kezelés hatására csökkent a Tetrahymena sejtek válaszkészsége (34%), míg a LY nem befolyásolta (92%) a fragmens kemoattraktáns hatását. A [GnRH-III(C)]₂

dimer kemoattraktáns hatását is egyedül a LY tudta eredményesen gátolni (62,7%). Érdekes módon, a gátlószerek hatására a GnRH-III(Ac-CGFLG) monomernél fokozott kemotaktikus válasz volt megfigyelhető.

10. táblázat: PI3K gátlás hatása a GnRH-III származékok kemotaktikus hatására

GnRH származék	Konc. [M]	Ktx. ind. [%]	Gátlási index [%]	
			Wortmannin	LY
Ac-HWSHDWKPG-NH ₂	10 ⁻⁹	191,9 ^y	93,4	65,3 ^y
Ac-SHDWKPG-NH ₂	10 ⁻⁷	144,0 ^x	34 ^y	92
GnRH-III(Ac-CGFLG)	10 ⁻⁹	149,3 ^x	170 ^y	130
[GnRH-III(C)] ₂	10 ⁻¹¹	236,8 ^y	100,2	62,7 ^x

Gátlási index: 3.5.2. fejezet alapján számított százalékos érték; Konc.: kemoattraktáns hatás szempontjából hatékony koncentráció; Ktx. ind.: kemotaxis index a kontroll százalékában megadva; LY: LY294002 PI3K inhibitor;

Szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01. Szürke kiemeléssel a szignifikáns hatásokat jelöltük.

4.2.1.2. GnRH-III származékok hatása a Tetrahymena úszási viselkedésére (kemokinetikus aktivitására)

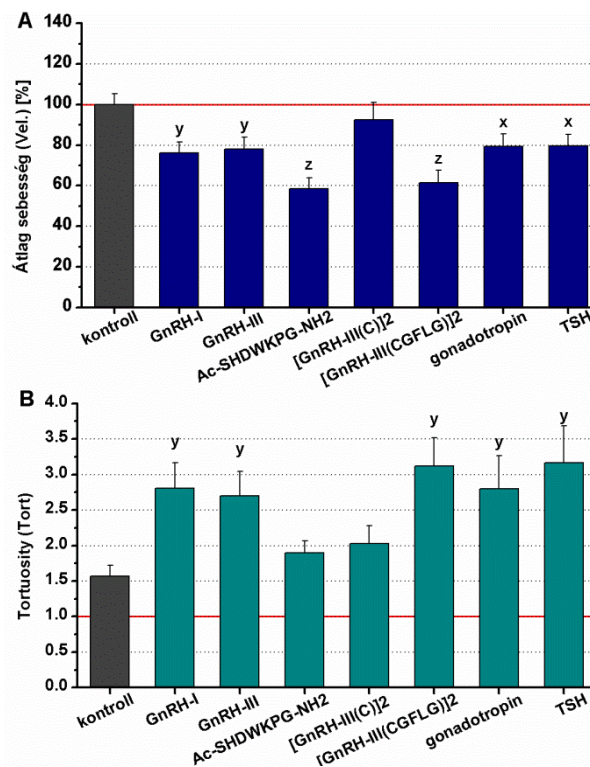
(*Lajkó E, Pállinger É, Szabó I, Mező G, Kőhidai L, Csaba G. The selectivity of the hormone receptors of Tetrahymena. Effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its analogues on the physiological behavior and hormone production. Cell Biol Int. (Kézirat preparálás alatt)*)

Az állandóan változó környezet kémiai ingereire a csillós egysejtű Tetrahymena érzékenyen reagál. Ezek a ligandok koncentráció gradiens mentén hatva kémiai karakterükből adódóan befolyásolják a sejtek vektoriális mozgását, a kemotaktikus választ, míg ha ugyanez a ligand azonos koncentrációban van jelen a sejtek körül, akkor a sejtek úszási viselkedésében, azaz kemokinetikus aktivitásában – úszási sebességben, irányváltások frekvenciájában – következik be változás.

Vizsgálatainkban arra kerestük a választ, hogy milyen összefüggés figyelhető meg egy anyag kemotaktikus és kemokinetikus aktivitása között. A GnRH-III származékok közül azokat a peptideket választottuk, amelyek szignifikáns attraktáns vagy repellens hatással rendelkeztek. A vizsgált ligandok körét kibővítettük, a repellens hatásukról ismert, gonadotropinnal (FSH és LH 1:1 arányú keveréke) és TSH-val [49], annak megválaszolására érdekében, hogy a Tetrahymena kemotaktikus és kemokinetikus aktivitása között megfigyelt esetleges korrelációk általános jelenségnek tekinthetők-e.

A mérési eredmények a kezeletlen kontroll sejtek esetén, az irodalomból ismert jellegzetes spirális úszási mintázatot (Tortuosity – Tort: 1,56) mutattak [190] (27. ábra).

- (1) A **természetes hormonok (GnRH-I és GnRH-III)** hatására a sejtek mozgási mintázata hasonló képet mutatott; a kontrollhoz képest kanyargósabb útvonal volt megfigyelhető (Tort: GnRH-I – 2,8; GnRH-III – 2,7) (27. ábra). Ezzel párhuzamosan a sejtek átlagsebessége (Vel) is alacsonyabb volt a kontrollhoz képest (GnRH-I – Vel: 76,3%; GnRH-III – Vel: 78,1%) (27. ábra).
- (2) Az attraktáns **Ac-SHDWKPG-NH₂ fragmens** esetén a sejtek úszási mintázata szignifikánsan nem különbözött a kontroll sejtektől (27. ábra), azonban a mozgás sebessége nagymértékben lecsökkent (Vel: 58,5%) (27. ábra).



27. ábra: GnRH-III származékok hatása a *Tetrahymena* úszási viselkedésére

Tort (tortuosity): tekervényesség

Szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01; z – p < 0,001

- (3) Az attraktáns hatású **[GnRH-III(C)]₂ dimer** kismértékben, nem szignifikáns módon, de fokozta a mozgás kanyarulatosságát (Tort: 2,03) (27. ábra), azonban a sejtek átlagsebessége (Vel: 92,3%) a kontrollhoz képest nem változott (27. ábra), így a sejtek mozgását inkább a gyors előrehaladás jellemezte. Ezzel szemben a repellens hatású **[GnRH-III(CGFLG)]₂ dimer** adásakor kanyargósabb mozgási

pályákat (Tort: 3,12) (27. *ábra*) és alacsonyabb átlagsebességet (Vel: 61,5%) mértünk mind a kontrollhoz, mind a [GnRH-III(C)]₂-hez viszonyítva (27. *ábra*).

- (4) **A glikoprotein típusú hipotalamo-hipofizeális hormonok közül a TSH a kontrollhoz képest kanyarulatossabb mozgást (Tort: 3,16) (27. *ábra*) és kisebb úszási sebességet váltott ki (27. *ábra*). Hasonló tendencia volt megfigyelhető a **gonadotropin** esetén is, de a sejtek úszási mintázatát leíró érték alacsonyabb volt (Tort: 2,79), mint a TSH esetén (27. *ábra*).**

4.2.1.3. A GnRH-III származékok hatása a *Tetrahymena pyriformis* endogén hormontermelésére

(*Lajkó E, Csaba G, Pállinger É. (2011) Investigations on the triiodothyronine (T3)-specificity of thyrotropic (TSH) and gonadotropic (HCG) hormone in the unicellular Tetrahymena. Acta Microbiol Immunol Hung. 58: 85-91*)

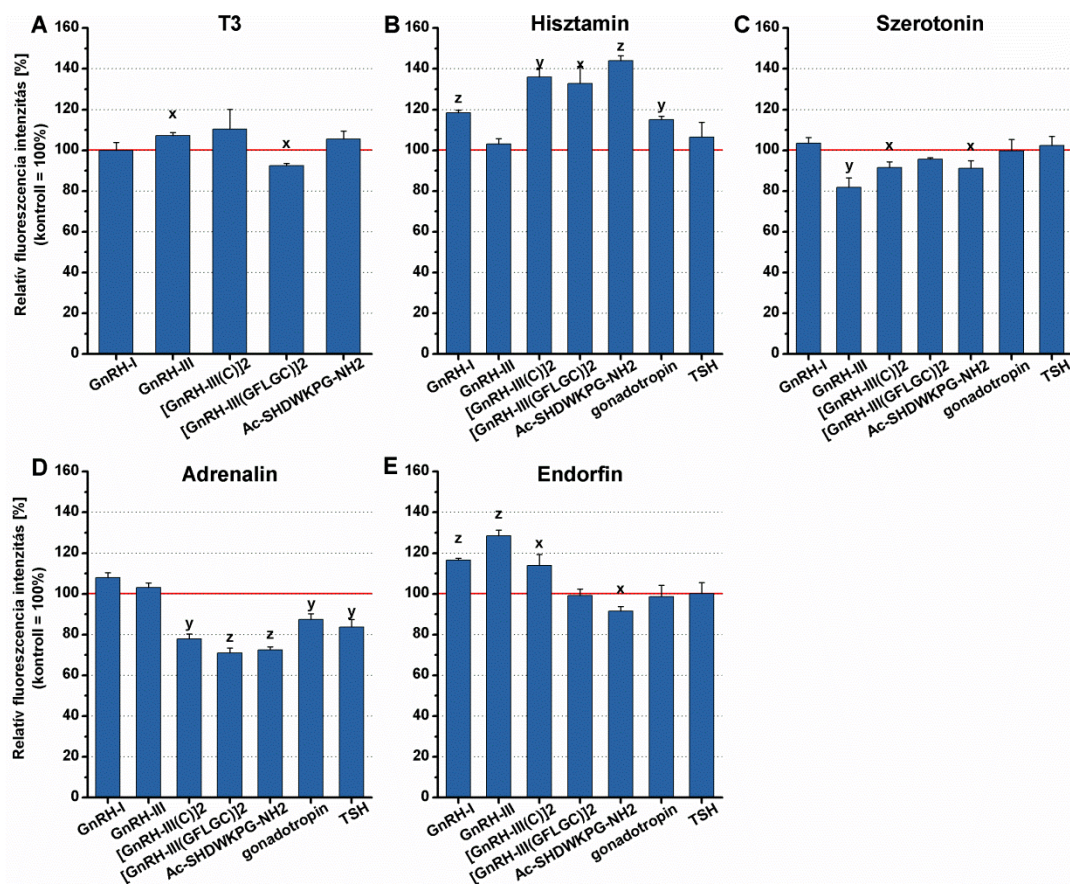
(*Lajkó E, Pállinger É, Szabó I, Mező G, Köhidai L, Csaba G. The selectivity of the hormone receptors of Tetrahymena. Effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its analogues on the physiological behavior and hormone production. Cell Biol Int. (Kézirat preparálás alatt)*)

A magasabb rendűekre jellemző hormonok *Tetrahymena* sejtekre kifejtett hatása, amint azt a szerotonin példáján láttuk, sokkal komplexebb, mint kizárólag a sejtek mozgásának szabályozása. Például, hormonális stimulusra endogén anyagainak szintézisével, osztódás intenzitásának megváltozásával reagál a sejt [47].

Kísérleteink során a hormonális interakciók jelentőségét kívántuk vizsgálni, annak tisztázására, hogy a GnRH-III hormon és szintetikus származékainak hatása mennyire specifikus, vagy megfigyelhetőek-e átfedések az egyes társhormonok (TSH, gonadotropin) hatásaival. Az is ismeretes, hogy az endogén hormonok (szerotonin, hisztamin, stb.) is rendelkeznek kemotaktikus és kemokinetikus aktivitással. Ezért felvetődik annak lehetősége, hogy az egyes GnRH peptidek a sejtek hormon tartalmának befolyásolásán keresztül kiválthatják azok szekrécióját is, és ily módon szecernálódott endogén anyagok parakrin/autokrin hatásuk révén képesek lehetnek befolyásolni a sejtek kemokinetikus, kemotaktikus aktivitását.

- (1) A sejtek **T3 tartalmát** enyhe, bár szignifikáns mértékben egyedül a GnRH-III fokozta (107,1%), míg a [GnRH-III(CGFLG)]₂ dimer csökkentette azt (92,4%) (28. *ábra*).

- (2) A sejtek **hisztamin szintje** a kezelések hatására mindegyik szintetikus GnRH-III származék alkalmazásakor fokozódott, legnagyobb hatást a két attraktáns hatású anyag ($[\text{GnRH-III}(\text{C})]_2$ – 136,0%; Ac-SHDWKPG-NH_2 – 144,0%) esetén mértük, míg maga a GnRH-III inaktívnak bizonyult (28. ábra).
- (3) A sejtek **serotonin mennyiségére** a vizsgált származékok közül a GnRH-III, Ac-SHDWKPG-NH_2 és $[\text{GnRH-III}(\text{C})]_2$ dimer volt hatással, kismértékben, de szignifikánsan csökkentette (81,8%, 91,2%, 91,6%) azt (28. ábra).



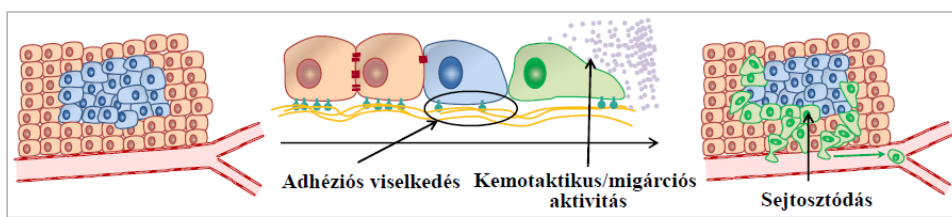
28. ábra: GnRH-III származékok hatása a *Tetrahymena pyriformis* endogén hormon termelésére

Szignifikancia: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$; z – $p < 0,001$

- (4) A *Tetrahymena* **adrenalin tartalma** a TSH és a gonadotropin hatására csökkent (84,5% és 83,6%), míg a GnRH-I és GnRH-III nem volt képes modulálni azt. Ellenben a GnRH-III dimer és fragmens származékai jelentős hormonszint csökkenést idéztek elő ($[\text{GnRH-III}(\text{C})]_2$ – 77,8%; $[\text{GnRH-III}(\text{CGFLG})]_2$ – 71,0%; Ac-SHDWKPG-NH_2 – 72,4%) (28. ábra).

- (5) A sejtek **endorfin koncentrációja** a két természetes GnRH hormonnal történő kezelés esetén emelkedett, és ez a jelleg a GnRH-III esetén volt kifejezettebb (128,5%). A származékok közül egyedül a [GnRH-III(C)]₂ őrizte meg ezt a hatást bár kisebb amplitúdóval (114,0%). Ezzel szemben a GnRH-III fragmens (Ac-SHDWKPG-NH₂) csökkentette az endorfin-tartalmat (91,5%) (28. ábra).

4.2.2. GnRH-III származékok és hatóanyag-tartalmú konjugátumaik sejtbiológiai hatása MM6 modell-sejteken



A szolid tumorról elszabaduló daganatos sejtek vándorlása és az áttétek kialakulása hasonló folyamatok sorozatán keresztül valósul meg, mint a leukociták homingja, vagy toborzása a gyulladás alkalmával [24]. A GnRH-III származékok és konjugátumaik sejtelettani (adhézió, kemotaxis, sejtosztódás) hatásainak vizsgálatára egy humán monocita sejtvonalat, a MM6-ot választottuk. Azontúl, hogy a MM6 egy professzionális migráló sejt típus, modell-sejt választásunkat az is indokolja, hogy ez egy akut mieloid leukémia modell is [149]. A már ismertetett (8. táblázat), irányított tumorterápiás felhasználásra tervezett GnRH-III származékok, mint a gyógyszer-célbajuttatás targetáló egységei szerepelnek a MM6 sejteken végzett vizsgálataink során. Elemeztük a GnRH-III származékok és tumorelleses hatóanyag-tartalmú konjugátumaik adhéziót befolyásoló és kemotaktikus hatását, amely a metasztázisképzés folyamatára kifejtett hatásuk szempontjából alapvető. Továbbá vizsgáltuk a GnRH-III-alapú konjugátumok antiproliferatív/citotoxikus aktivitását, igazolva ezzel azt, hogy a gyógyszer tartalmú származékok ténylegesen kifejtik a szabad hatóanyagra jellemző hatást.

4.2.2.1. Irányító hatással rendelkező GnRH-III származékok vizsgálata

(Lajkó E, Szabó I, Andódy K, Pungor A, Mező G, Kőhidai L. (2013) Investigation on chemotactic drug targeting (chemotaxis and adhesion) inducer effect of GnRH-III derivatives in Tetrahymena and human leukemia cell line. J Pept Sci. 19: 46-58.)

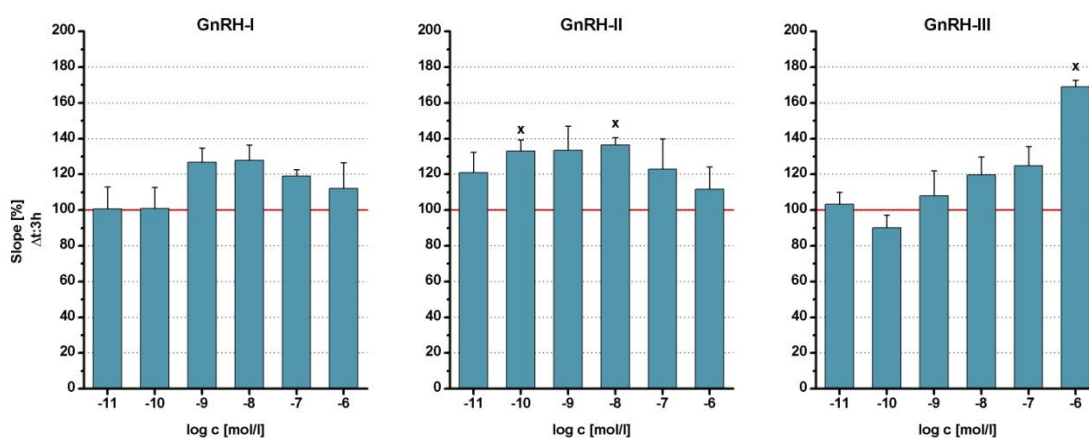
A célzott daganat terápiára kifejlesztett hatóanyag-szállító rendszerek részeként az irányító egység, jelen esetben a GnRH-III illetve származékai hivatottak biztosítani a

tumorselektivitást. Ígéretes lehetőség egy olyan hatóanyag-szállító rendszer (targetáló rendszer) alkalmazása, amely nem kizárólag a tumorsejtek növekedését hivatott gátolni a szállított tumorelles hatóanyagának köszönhetően, hanem egyben a tumorprogresszió romlásához vezető invazív folyamatokat is negatívan befolyásolja.

A fentiek alapján céljaink között szerepelt a potenciális irányító hatással rendelkező GnRH-III származékok humán monocita sejtek adhézios és kemotaktikus aktivitására kifejtett hatásának vizsgálata és a kapott szerkezet-hatás összefüggések értelmezése annak érdekében, hogy olyan származékokat találjunk, amelyek egyszerre alkalmasak egy adott hatóanyag szelektív célbajuttatására, és képesek megakadályozni a tumorsejtek szóródását. A vizsgálatainkban szereplő GnRH peptideket a következő csoportokba soroltuk szerkezetük alapján: a (1) természetes hormonok, a (2) GnRH-III N-terminális felől rövidített fragmensei, az (3) elágazó szénláncú GnRH-III monomerek és a (4) GnRH-III szimmetrikus dimer származékok (8. táblázat).

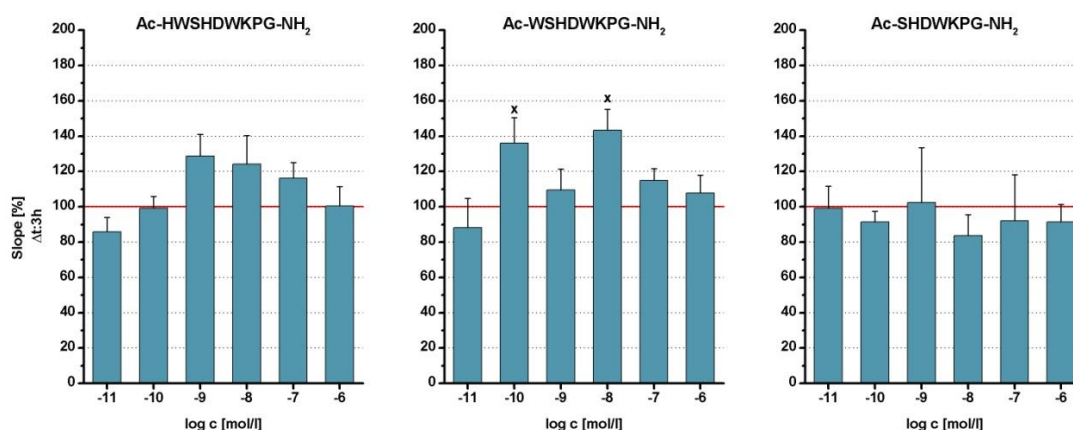
4.2.2.1.1. Sejtadhézióra kifejtett hatás

A primer tumor invazív vá válásához, a tumorsejtek metasztatikus aktivitásának megjelenéséhez vezető komplex folyamatsor egyik első eseménye a tumorsejtek adhézios viselkedésének megváltozása, és ennek következtében a sejtek leválása és a motilis fenotípusuk kialakulása. A tumorsejtek adhézios kapcsolatai az áttétképzés későbbi állomásain, a tumorsejtek szöveti vándorlásában, intra és extravazációjában is meghatározó szereppel rendelkeznek [27]. Így a GnRH-III származékok adhéziot befolyásoló hatásának vizsgálata egy hatékony antimetasztatikus hatóanyag-szállító rendszer kidolgozásához elengedhetetlen.



29. ábra: Természetes hormonok adhéziot befolyásoló hatása MM6 sejteken
Szignifikancia: x – $p < 0,05$

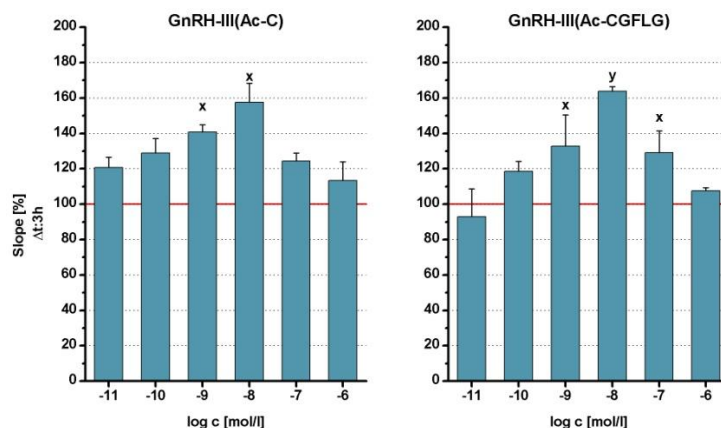
- (1) Mindegyik természetes hormon pozitívan befolyásolta a monocita sejtek kitapadását (GnRH-III > GnRH-II > GnRH-I) (29. ábra). A két humán variáns szélesebb tartományban (GnRH-I: 10^{-9} - 10^{-7} M; GnRH-II: 10^{-10} - 10^{-7} M) mutatta a fent említett hatást (GnRH-I: 126,8 - 119,1%; GnRH-II: 133,0 - 136,4%). A GnRH-III adhéziót fokozó hatása (169,0%), ami a vizsgált összes származékok között is a legnagyobb mértékű volt, csak 10^{-6} M jelentkezett.
- (2) Az N-terminális első (Ac-HWSHDWKPG-NH₂) és második (Ac-WSHDWKPG-NH₂) aminosavának elhagyásával előállított GnRH-III fragmensek megőrizték az intakt hormonra jellemző adhéziófokozó hatást. A két fragmens pozitív hatása azonban, a GnRH-III jellegéhez képest, alacsonyabb koncentrációkban (10^{-10} - 10^{-8} M) és kisebb amplitúdóval jelentkezett (Ac-HWSHDWKPG-NH₂: 128,7 - 124,3%; Ac-WSHDWKPG-NH₂: 136,1 - 143,4%) (30. ábra). A GnRH-III további rövidítésével nyert fragmens (Ac-SHDWKPG-NH₂) a kezelés 0-3 órájában neutrális, míg hosszú távon az összes koncentrációban adhéziót gátló hatást mutatott.



30. ábra: N-terminális felől rövidített GnRH-III fragmensek MM6 sejtek kitapadására gyakorolt hatása

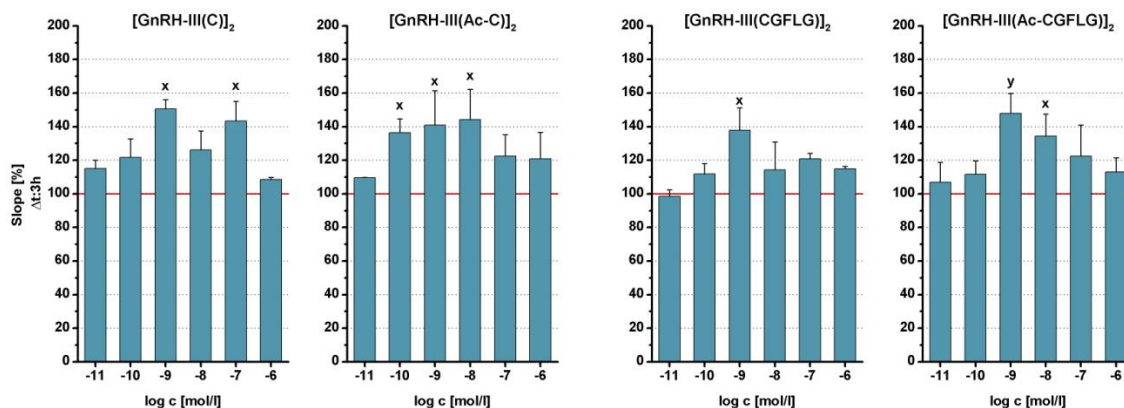
Szignifikancia: x – p < 0,05

- (3) Az elágazó oldalláncú GnRH-III monomerek, függetlenül a Lys⁸ oldalláncához kapcsolt szekvencia hosszától (Ac-C; Ac-CGFLG), gyakorlatilag egyforma adhéziót növelő hatással rendelkeztek (31. ábra). Mindkét monomer esetén a hatás maximuma 10^{-8} M-ban volt kimutatható ((GnRH-III(Ac-C): 157,6%; GnRH-III(Ac-CGFLG): 163,8%).



31. ábra: Elágazó szénláncú GnRH-III monomerek adhéziót fokozó hatása MM6 sejteken
Szignifikancia: x – $p < 0,05$, y – $p < 0,01$

(4) A vizsgált dimer vegyületek adhéziót fokozó tulajdonsága a monomerek hatásához hasonló koncentrációfüggést követett (10^{-10} - 10^{-7} M), de valamelyest elmarad azok hatásától (32. ábra). A rövid távtartón keresztül kapcsolt ([GnRH-III(C)]₂ dimer pozitív sejtadhéziós hatását (150,5 - 143,4%) a linker régió acetilálása ([GnRH-III(Ac-C)]₂: 136,3 - 144,3%) lényegében nem változtatta meg. A GFLG szekvenciát tartalmazó [GnRH-III(CGFLG)]₂ adhéziót fokozó hatása (137,9 - 120,9%) elmaradt a távtartó nélküli peptid aktivitásához képest. Ebben az esetben a linker régió acetilálása ([GnRH-III(Ac-CGFLG)]₂), kismértékben bár, de javított a nem acetilált forma adhéziós viselkedésén (147,8 - 134,4%).



32. ábra: GnRH-III dimer származékok adhéziót befolyásoló képessége MM6 sejteken
Szignifikancia: x – $p < 0,05$, y – $p < 0,01$

4.2.2.1.2. Kemotaktikus hatás

A tumorprogresszió során az egyik fő problémát a tumorsejtek migrációs aktivitása jelenti. Első körben a daganatsejtek a tumort körülvevő egészséges szövetek közé vándorolnak (invazivitás), majd a vér- vagy a nyirokkeringésen keresztül a szervezet

egy távoli pontjára jutva, ott megtapadnak és behatolva normál szöveti térbe másodlagos tumorok létrejöttét eredményezik [27]. Tehát nem elegendő egyedül az adhézió keresztül beavatkozni a folyamatba, hanem a sejtek migrációs hajlamát is szabályozni kell ahhoz, hogy eredményesen gátolni tudjuk a daganatsejtek szóródását.

11. táblázat: GnRH peptidek kemotaktikus hatása MM6 modell-sejten

GnRH peptid	Kemotaxis index [%] (kontroll = 100%)					
	10^{-11} M	10^{-10} M	10^{-9} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
GnRH-I	137,1 ± 11,69	116,1 ± 11,07	142,2 ^x ± 13,99	111,3 ± 12,27	95,7 ± 8,4	131,7 ± 7,08
GnRH-II	79,7 ± 4,99	98,6 ± 8,11	82,4 ^x ± 5,92	102,6 ± 15,72	149,4 ^x ± 16,79	137,5 ± 14,96
GnRH-III	117,7 ± 8,53	78,2 ± 9,95	58,1 ^y ± 5,46	104,4 ± 15,85	189,6 ^z ± 14,73	177,3 ^z ± 9,91
Ac-HWSHDWKPG-NH ₂	79,2 ± 12,44	73,8 ± 8,71	84,5 ± 14,04	74,1 ± 18,41	73,4 ± 21,74	49,0 ^x ± 19,18
Ac-WSHDWKPG-NH ₂	126,4 ± 13,94	122,6 ± 18,58	147,7 ^x ± 16,44	99,8 ± 11,44	119,2 ± 11,97	82,7 ± 8,91
Ac-SHDWKPG-NH ₂	96,4 ± 9,08	81,0 ± 8,9	80,3 ± 10,94	82,0 ± 9,64	87,3 ± 10,38	76,1 ± 14,24
GnRH-III(Ac-C)	46,2 ^z ± 8,76	26,1 ^z ± 6,75	71,7 ^x ± 10,43	78,6 ± 17,11	40,9 ^z ± 11,97	23,9 ^z ± 8,8
GnRH-III(Ac-CGFLG)	115,6 ± 30,7	196,5 ^x ± 27,53	72,9 ± 21,88	43,0 ^z ± 7,81	65,1 ^z ± 10,26	119,7 ± 8,91
[GnRH-III(C)] ₂	67,3 ^z ± 8,08	70,6 ^z ± 4,42	26,2 ^z ± 4,35	74,8 ^x ± 8,58	151,3 ^y ± 15,86	134,6 ^y ± 7,84
[GnRH-III(Ac-C)] ₂	76,7 ± 10,09	97,8 ± 7,74	63,9 ^y ± 4,3	107,0 ± 11,03	171,2 ^y ± 19,31	81,0 ± 9,67
[GnRH-III(CGFLG)] ₂	39,2 ^z ± 10,07	182,3 ^z ± 14,71	96,4 ± 11,68	93,8 ± 10,74	98,6 ± 9,52	105,7 ± 8,94
[GnRH-III(Ac-CGFLG)] ₂	68,1 ^y ± 5,62	93,2 ± 8,97	114,4 ± 6,75	54,6 ^z ± 6,54	63,0 ^y ± 7,16	72,5 ^x ± 6,82

Kemotaxis index a kontrollra vonatkoztatott százalékos érték (n=15 ± SD). Szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01; z – p < 0,001. Szürke kiemeléssel a szignifikáns hatásokat jelöltük.

- (1) A GnRH-III és GnRH-II által kiváltott kemotaktikus reakció nagy hasonlóságot mutatott, 10^{-7} - 10^{-6} M-os koncentrációban szignifikánsan attraktáns, míg 10^{-11} - 10^{-9} M tartományban szignifikánsan repellens hatással rendelkeztek. A GnRH-III esetén az attraktáns és repellens hatások (10^{-7} M: 189,6%, 10^{-9} M: 58,1%) nagyobb amplitúdóval jelentkeztek, mint a GnRH-II (10^{-7} M: 149,4%; 10^{-9} M: 82,4%) vizsgálatokor. A GnRH-I kemoattraktáns hatása (142,2%) alacsonyabb koncentrációban (10^{-9} M) volt megfigyelhető (11. táblázat).

- (2) Az amino-terminálison lévő aminosav kémiai karaktere a GnRH-III fragmensek monocita modellen mutatott kemotaktikus hatását is befolyásolta. Az attraktáns hatás szempontjából, az N-terminálison triptofánt tartalmazó fragmens (Ac-WSHDWKPG-NH₂) bizonyult hatékonynak (10^{-11} - 10^{-9} M: 126,4 - 147,7%) (11. táblázat). Ezzel szemben a poláris aminosavat hordozó fragmensek, a peptid hosszától függően, erősebb (Ac-HWSHDWKPG-NH₂: 79,2 - 49,0%), vagy gyengébb (Ac-SHDWKPG-NH₂: 81,0 - 76,1%) repellens hatást mutattak 10^{-11} - 10^{-6} M tartományban.
- (3) A ciszteint tartalmazó monomerek a GnRH-III Lys⁸ oldalláncához kapcsolt szekvencia hosszától függően eltérő kemotaktikus hatást fejtettek ki. A rövid oldalláncú GnRH-III(Ac-C) intenzív repellens hatást mutatott mind alacsony (10^{-11} - 10^{-10} M: 46,2 - 26,1%), mind magas koncentrációkban (10^{-7} - 10^{-6} M: 40,9 - 23,9%). A hosszabb GFLG szekvenciát hordozó monomer GnRH-III(Ac-CGFLG) esetén a repellens karakter csak 10^{-8} - 10^{-7} M tartományban (43,0 - 65,1%) jelentkezett, míg 10^{-10} M-ban szignifikáns attraktáns hatást (196,5%) mutatott (11. táblázat).
- (4) A dimer származékok közül, a [GnRH-III(C)]₂ hasonló kemotaktikus profillal rendelkezett, mint az alaphormon; 10^{-11} - 10^{-8} M tartományban erős repellens (74,8 - 26,2%), míg 10^{-7} - 10^{-6} M koncentráción attraktáns (151,3 - 134,6%) választ indukált (11. táblázat). A [GnRH-III(Ac-C)]₂ kemotaktikus hatása alapján, a linker régió acetilálása, a [GnRH-III(C)]₂ dimerre jellemző attraktáns hatás mértékét fokozta (151,3% vs 171,2%), míg a repellens jellegét csökkentette (26,2% vs 63,9%). A GFLG spacer jelenléte, a nem acetilált forma ([GnRH-III(CGFLG)]₂) esetén attraktáns hatással párosult 10^{-10} M-ban (182,3%). Ebben az esetben az acetilálás vélhetően komoly szerkezet módosítást okozhatott, ugyanis a [GnRH-III(Ac-CGFLG)]₂ repellensnek bizonyult (10^{-8} - 10^{-6} M: 54,6 - 72,5%).

4.2.2.1.3. Kemotaktikus jelátviteli útvonalak vizsgálata

A GnRH izoformák tumorellenes és invazivitást gátló hatásukat, a daganat típusától és a kezelésben alkalmazott hormon variánstól függően, különböző jelátviteli útvonalak (pl. PLC, PI3K, MAPK) szabályozásán keresztül érik el (4.2.1.1.1 fejezet). A Tetrahymena modell-sejten nyert adatok birtokában a magasabbrendű modellen is vizsgálni kívántuk a két központi jelátviteli enzim, a PLC és PI3K szerepét a GnRH-III származékok által indukált kemotaktikus hatás közvetítésében.

A **PLC** enzim aktivációja (foszforilációja) az optimális koncentrációban – ahol a kemotaktikus hatásuk detektálható volt – alkalmazott kemoattraktáns anyagokkal történő kezelés hatására nem volt megfigyelhető.

A **PI3K** szerepére az előzetesen enzimgátlókkal (wortmannin, LY) kezelt monocita sejtek kemotaktikus reakciójából tudtunk következtetni (12. táblázat).

A natív hormonok kemotaktikus hatását a wortmannin előkezelés közel egyforma mértékben tudta gátolni (GnRH-II: 79%, GnRH-III: 83%), míg a LY csak a GnRH-II hatását csökkentette (77%). A [GnRH-III(C)]₂ dimer kemoattraktáns hatását hasonlóan a Tetrahymena sejteken kapott eredményekhez egyedül a LY tudta hatékonyan gátolni (82%). A GFLG szekvenciát, és/vagy az acetilsoportot tartalmazó származékok kemoattraktáns jellegét egyik inhibitor sem befolyásolta.

12. táblázat: PI3K gátlás hatása a GnRH-III származékok MM6 sejtekre kifejtett kemotaktikus hatására

GnRH származék	Konc. [M]	Ktx. ind. [%]	Gátlási index [%]	
			Wortmannin	LY294002
GnRH-II	10 ⁻⁷	149,4 ^x	79	77
GnRH-III	10 ⁻⁷	189,6 ^z	83	99
Ac-WSHDWKPG-NH ₂	10 ⁻⁹	147,7 ^x	106	147
[GnRH-III(C)] ₂	10 ⁻⁷	151,3 ^y	110	82
[GnRH-III(Ac-C)] ₂	10 ⁻⁷	171,3 ^x	102,8	93,2
GnRH-III(Ac-CGFLG)	10 ⁻¹⁰	196,5 ^x	95,8	99
[GnRH-III(CGFLG)] ₂	10 ⁻¹⁰	182,3 ^z	96	116,7

Gátlási index: 3.5.2. fejezet alapján számított százalékos érték; Konc.: kemoattraktáns hatás szempontjából hatékony koncentráció; Ktx. ind.: kemotaxis index a kontroll százalékaiban megadva
Szignifikancia: x – p < 0,05, y – p < 0,01; z – p < 0,001. Szürke kiemeléssel a gátló hatásokat jelöltük.

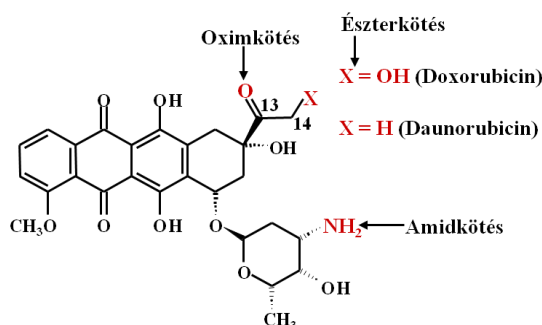
4.2.2.2. GnRH-III alapú, tumorelleses hatóanyagot tartalmazó konjugátumok hatása MM6 modell-sejtekre

(Leurs U*, Lajkó E*, Mező G, Orbán E, Öhlschläger P, Marquardt A, Köhidai L, Manea M. (2012) GnRH-III based multifunctional drug delivery systems containing both daunorubicin and methotrexate. Eur J Med Chem. 52: 173-183. (*Megosztott elsőszőrő))

Az irányító egység mellett a gyógyszer-célbajuttató rendszerek másik fontos elemét, maga a hatóanyag jelenti. Kihasználva azt, hogy a GnRH-III receptor affinitása a Lys⁸ oldalláncának módosítása mellett is megtartott [131, 135], különböző tumorelleses hatóanyagok – daunorubicin (Dau) és doxorubicin (Dox), metotrexát (Mtx) –

kapcsolására került sor az egyes irányító hatású GnRH-III származékokhoz. A konjugátumokban szereplő gyógyszermolekulákat elsődlegesen különböző hematológiai tumorok kezelésében alkalmazzák. Az antraciklin típusú antibiotikumok – daunorubicin és doxorubicin – terápiás hatása több mechanizmusra vezethető vissza. Képesek gátolni a topoizomeráz II-t, interkalálódni a bázispárok közé, és kisebb részben a reaktív oxigénradikálok képzése is hozzájárul tumorelles hatásukhoz. A metotrexát egy antimetabolit, a dehidrofólsav reductáz gátlásán keresztül vezet a purinanyagcsere zavarához és a daganatsejtek pusztulásához [191]. A legtöbb daganatellenes szerhez hasonlóan ezen gyógyszerek alkalmazásakor is számolni kell a csontvelő szuppresszió, és a gyomor-bél nyálkahártya károsodás következtében megjelenő mellékhatásokkal. Az antraciklinek az egyik leghatékonyabb tumorelles gyógyszerceport, azonban a fentiekén túl, súlyos kardiotoxikus mellékhatásuk is korlátozhatja eredményes felhasználásukat. Kardiotoxicitásuk annak tulajdonítható, hogy a szívizomsejtek csökkent antioxidáns kapacitásuk révén nagyobb mértékben vannak kitéve az antraciklinek hatására képződő reaktív szabadgyökök károsító hatásának [192, 193]. A mellékhatások kiküszöbölése, és a rezisztencia visszaszorítása céljából különböző, hordozókhoz konjugált, vagy liposzómába zárt formákat állítottak már elő, és tumorelles hatékonyságukat széles körben vizsgálják [194] (drugs.com/pro/daunoxome.html).

A vizsgált konjugátumok irányító egységei különböző GnRH-III származékok voltak, amelyekhez a hatóanyagok, kémiai szerkezetükből adódóan, különböző kémiai kötésekén keresztül lettek kapcsolva. A konjugátumok tervezésénél a kiindulási alapot a doxorubicin tartalmú AN-152 jelentette, ahol a hatóanyag egy észterkötésén keresztül kapcsolódik a [D-Lys⁶]-GnRH-I [142].



33. ábra: Doxorubicin és daunorubicin szerkezete és a konjugálás során kialakítható kötés típusok

A doxorubicin tartalmaz egy OH (C14-OH) csoportot, ami alkalmassá teszi az észterkötésén keresztüli kapcsolásra a GnRH-III Lys⁸ oldalláncához. Ez a funkciós

csoport azonban a daunorubicinben (C14-H) hiányzik, így a konjugálás egy oximkötés kialakításával lehetséges (C13), vagy amidkötésen keresztül a cukorrész aminos csoportjának felhasználásával, ez utóbbi azonban a citotoxikus hatás elvesztésével párosulhat [137] (33. ábra).

(Vizsgálatainkban szereplő doxorubicin tartalmú konjugátumok esetén több különböző kötéstípus – észter-, amid-, oximkötés – kipróbálására került sor, ezt mindenhol külön jeleztem. A daunorubicin, azonban minden esetben oximkötésen keresztül volt a hordozóhoz kapcsolva, így ezt a későbbiekben külön nem tüntettem fel.)

A konjugátum internalizációját követően magának a hatóanyagnak, vagy a tumorelles hatás kiváltása szempontjából aktív metabolitjának a felszabadulásához a peptid-hatóanyag kötésnek fel kell szakadnia [145]. Az észterkötést az észterázok bontják, azonban az oxim és az amidkötés kémiaiailag meglehetősen stabil, így a tumorsejtekben rendszerint túltermelődő, lizoszómális enzimre (katepszin B) érzékeny távtartó szekvencia (GFLG, YRRL) beépítésére került sor a daunorubicin/doxorubicin és a GnRH-III peptid közé [137, 145].

Az irányító hatású GnRH-III peptid enzimatisz stabilitásának javítására a 4-es pozícióba egy N-MeSer (N-metil-szerin), vagy egy az oldalláncán acetilezett lizin (Lys(Ac)) került beépítésre [147, 148]. Az ⁴Lys(Ac)-t tartalmazó szekvenciánál az acetyl csoport helyett egy hatóanyag molekula is kapcsolható; ez esetben a 4-es és 8-as pozícióban lévő lizinekhez egy-egy hatóanyag konjugálására nyílt lehetőség. Az így előállított bifunkciós (két hatóanyagot tartalmazó) konjugátumok segítségével a hatóanyag kétszeres dózisban juttatható el a sejthez, vagy két eltérő támadáspontú hatóanyag kombinálására van lehetőség, amely additív vagy szinergista módon növelheti a konjugátum aktivitását. A tumorelles hatás fokozása érdekében kifejlesztett bifunkciós konjugátumok előállítására egy másik konjugálási stratégia is lehetőséget biztosított. A hordozó GnRH-III Lys⁸ oldalláncához egy következő Lys aminosav kapcsolható, aminek mind az α mind az ϵ aminos csoportjain keresztül egy-egy hatóanyag konjugálása vált lehetségessé. A fenti két kapcsolási eljárás segítségével összesen négy bifunkciós konjugátum szintézisére került sor, amelyek vagy két daunorubicint [148] vagy egy daunorubicin és egy metotrexátot tartalmaztak [195]. Bifunkciós konjugátumok előállítására a dimer származékok is felhasználhatók, ez esetben mindkét monomer rész alkalmas egy-egy hatóanyag kötésére (13. táblázat).

Munkám során a konjugátumok komplex in vitro vizsgálatával egy olyan hatékony tumorellenes és egyben a sejtek metasztatikus terjedését is gátló GnRH-III konjugátum(ok) kiválasztása volt a cél, amely(ek) alkalmas(ak) lehet(nek) az irányított tumorterápiában történő továbbfejlesztésre és felhasználásra. A konjugátumok MM6 sejteken mutatott adhéziót befolyásoló, kemotaktikus és antiproliferatív/citotoxikus aktivitását a 13. táblázat szerinti bontásban ismertetem, összehasonlítva az AN-152 hatásával.

13. táblázat: Hatóanyag-tartalmú GnRH-III konjugátumok

Felépítés	Rövid név	Szabályos név
GnRH-I + hatóanyag	AN-152	GnRH-III[⁶ D-Lys(Dox-CO-(CH ₂) ₃ -CO)]
GnRH-III + hatóanyag	GnRH-III(Dox-észter)	GnRH-III[⁸ Lys(Dox-CO-(CH ₂) ₃ -CO)]
	GnRH-III(Dau)	GnRH-III[⁸ Lys(Dau=Aoa)]
GnRH-III + spacer + hatóanyag	GnRH-III(Dox-oxim-GFLG)	GnRH-III[⁸ Lys(Dox=Aoa-GFLG)]
	GnRH-III(Dox-amid-GFLG)	GnRH-III[⁸ Lys(Dox-CO-(CH ₂) ₂ -CO-GFLG)]
	GnRH-III(Dau-GFLG)	GnRH-III[⁸ Lys(Dau=Aoa-GFLG)]
	GnRH-III(Dau-YRRL)	GnRH-III[⁸ Lys(Dau=Aoa-YRRL)]
Módosított GnRH-III + hatóanyag	(N-MeSer) ⁴ GnRH-III(Dau)	GnRH-III[⁴ N-MeSer, ⁸ Lys(Dau=Aoa)]
	(Lys(Ac)) ⁴ GnRH-III(Dau)	GnRH-III[⁴ Lys(Ac), ⁸ Lys(Dau=Aoa)]
Monomer bifunkciós konjugátumok	(Lys) ⁴ GnRH-III(Dau ⁴ -Dau ⁸)	GnRH-III[^{4,8} Lys(Dau=Aoa)]
	(Lys) ⁴ GnRH-III(Mtx ⁴ -Dau ⁸)	GnRH-III[⁴ Lys(Mtx), ⁸ Lys(Dau=Aoa)]
	GnRH-III(Dau ⁸ -Dau ⁸)	GnRH-III[⁸ Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))]
	GnRH-III(Mtx ⁸ -Dau ⁸)	GnRH-III[⁸ Lys(Mtx-Lys(Dau=Aoa))]
Dimer bifunkciós konjugátumok	[GnRH-III(Dau)] ₂	[GnRH-III[⁸ Lys(Dau=Aoa-C)]] ₂
	[GnRH-III(Dau-YRRL)] ₂	[GnRH-III[⁸ Lys(Dau=Aoa-YRRLC)]] ₂
	[(N-MeSer) ⁴ GnRH-III(Dau)] ₂	[GnRH-III[⁴ N-MeSer, ⁸ Lys(Dau=Aoa-C)]] ₂

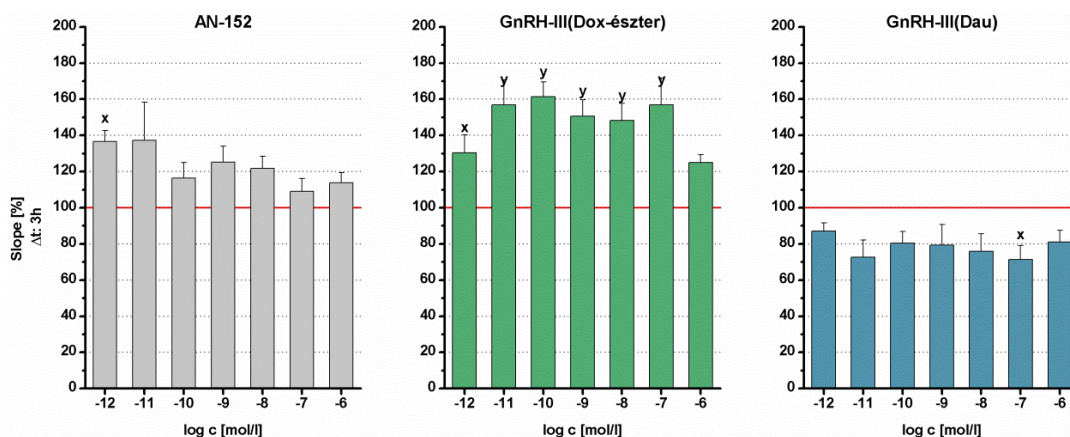
Aoa: aminooxiacetsav; N-MeSer: N-metil-szerin; Lys(Ac): ^εN-acetilezett lizin; Dau: daunorubicin; Dox: doxorubicin, Mtx: metotrexát. A daunorubicin mindenesetben oximkötéssel volt közvetlenül, vagy spacer szekvencián keresztül a hordozóhoz kapcsolva, így ezt külön nem tüntettem fel.

4.2.2.2.1. Sejtadhézió befolyásolása

Az ECM - daganatsejt adhéziós kapcsolatok jelentősége nem kizárólag a sejtek metasztázisképző sajátsága szempontjából fontos tényező, hanem a tumorsejtek DNS károsító szerek iránti érzékenységet is képesek befolyásolni. Megfigyelések szerint a gyenge adhéziós kölcsönhatásokkal rendelkező, vagy letapadás független tumorsejtek kevésbé reagáltak a citotoxikus kezelésre, azonban a sejtek kitapadásakor a citotoxikus szerek hatására bekövetkező DNS károsodás a sejtek apoptózist okozta [196].

A tumorelleses hatóanyagot hordozó GnRH-III konjugátumok adhézióra kifejtett hatásának vizsgálata egyrészt antimetasztatikus hatásuk feltérképezése, másrészt tumornövekedést gátló hatékonyságuk szempontjából is fontos.

- (1) Az AN-152 az alacsonyabb koncentrációk felé haladva koncentrációfüggő módon fokozta a sejtek kitapadását (10^{-12} - 10^{-6} M: 137,2 - 113,8%) (34. ábra). A GnRH-III alapú párja, a doxorubicint észterkötésben tartalmazó GnRH-III(Dox-észter) esetén egy nagyobb mértékű és a teljes koncentráció tartományra kiterjedő, adhéziót fokozó hatás volt kimutatható (125,1 - 161,4%), ezzel szemben a daunorubicin kapcsolása – oximkötésen keresztül – a GnRH-III peptidhez (GnRH-III(Dau)) adhéziót csökkentő hatással (71,3 - 87,1%) járt mindegyik vizsgált koncentrációban.



34. ábra: Spacer nélküli, hatóanyag-tartalmú konjugátumok sejtadhézióra kifejtett hatása MM6 sejteken

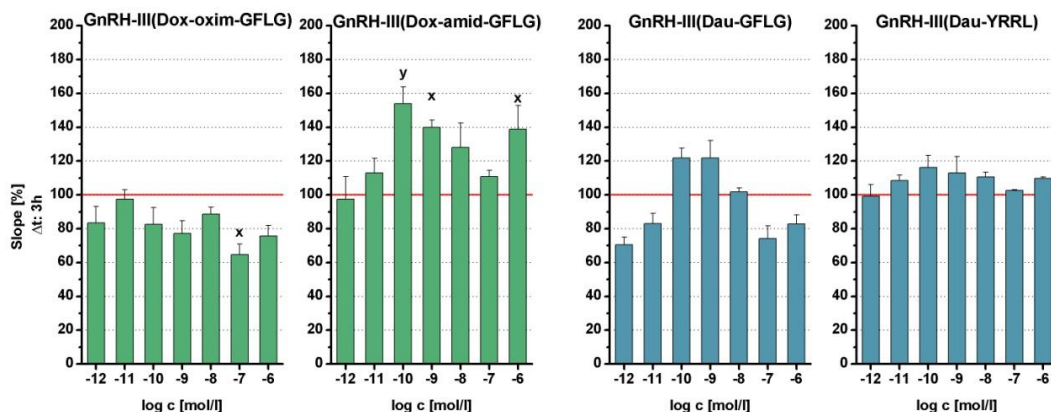
Szignifikancia: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$

- (2) Az adhéziót fokozó hatás szempontjából a spacer szekvencia beépítése a konjugátumba nem bizonyult kedvezőnek. A kötés típusa jelentősen kihatott a GFLG távtartón keresztül kapcsolt doxorubicin tartalmú konjugátumok adhéziós jellegére.

Az oximkötésű konjugátum (GnRH-III(Dox-oxim-GFLG)) csökkentette a sejtek kitapadását (83,4 - 75,6%), míg az amidkötés alkalmazása (GnRH-III(Dox-amid-GFLG)) mellett továbbra is az adhéziót fokozó hatás (153,9 - 140,0%) dominált 10^{-10} - 10^{-6} M tartományban. Ez a hatás azonban kisebb mértékű volt, mint a GnRH-III(Dox-észter) konjugátum esetén mért érték (35. ábra).

Az oximkötést tartalmazó GnRH-III(Dau-GFLG) származékokra is az adhéziót csökkentő hatás volt jellemzőbb (10^{-12} - 10^{-11} M: 70,5 - 83,1%; 10^{-7} - 10^{-6} M: 74,2 - 82,7%) (35. ábra). A GFLG szekvencia meglehetősen hibrofőb, és így az egész

konjugátum vízdékonysága valamelyest rosszabb volt. Az oldékonyság növelése érdekében egy jobb vízdahatóságú, katapszin B érzékeny YRRL szekvencia került beépítésre a GnRH-III peptid és a daunorubicin közé [145]. Az így előállított GnRH-III(Dau-YRRL) azonban nem rendelkezett adhéziót befolyásoló aktivitással. (A korábbi vizsgálatok szerint az amidkötéssel kapcsolt daunorubicin elvesztette citotoxikus hatását [137], így méréseinkbe ezt a származékot nem választottuk be.)

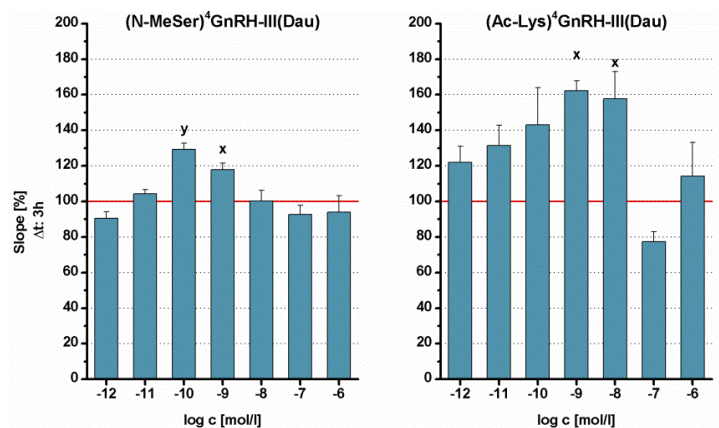


35. ábra: Spacer szekvenciát tartalmazó konjugátumok adhéziót befolyásoló hatása MM6 sejteken

Szignifikancia: x – $p < 0.5$; y – $p < 0.1$

Az N-MeSer és Lys(Ac) szubsztitúciója (4. pozícióban) adhéziót fokozó hatással párosult. Az (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau) konjugátum pozitív hatása (129,2 - 117,8%) 10^{-10} - 10^{-9} M koncentrációban volt kimutatható, míg (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) esetén ez a hatás nagyobb amplitúdóval (131,5 - 157,6%), és szélesebb koncentráció tartományban (10^{-11} - 10^{-8} M) jelentkezett

(3) 36. ábra).

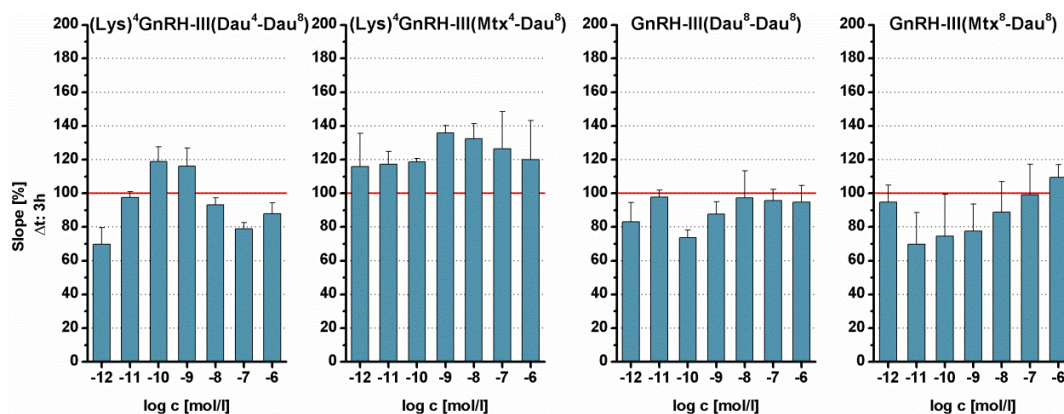


36. ábra: Módosított GnRH-III származékot és hatóanyagot tartalmazó konjugátumok adhéziót befolyásoló hatása MM6 sejteken

Szignifikancia: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$

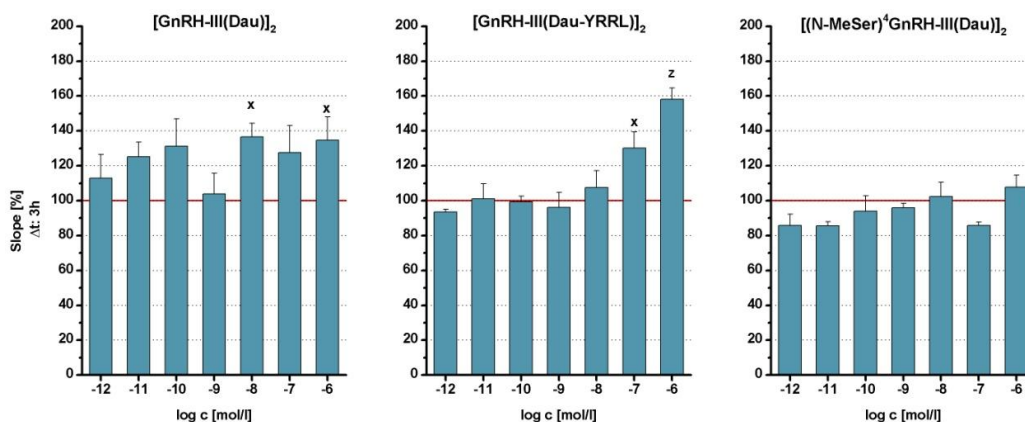
- (4) Egy második hatóanyag – daunorubicin vagy metotrexát – kapcsolása a $(\text{Lys}(\text{Ac}))^4\text{GnRH-III}(\text{Dau})$ konjugátumhoz, lerontotta az egyszeres hatóanyag-tartalmú konjugátum adhéziót serkentő hatását. Az $(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Dau}^4\text{-Dau}^8)$ konjugátumra neutrális/adhéziót csökkentő hatás volt jellemző, míg az $(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Mtx}^4\text{-Dau}^8)$ esetén kisebb mértékben, de megmaradt az adhéziót fokozó jelleg (10^{-9} - 10^{-7} M: 136-127%) (37. ábra).

Mindkét, a 8-as pozícióban kétszeresen konjugált peptid esetén az alacsonyabb koncentrációk felé haladva (10^{-12} - 10^{-9} M) egy adhéziót csökkentő trend ($\text{GnRH-III}(\text{Dau}^8\text{-Dau}^8)$: 73,6 - 87,6%; $\text{GnRH-III}(\text{Mtx}^8\text{-Dau}^8)$: 69,8 - 77,6%) volt kimutatható (37. ábra).



37. ábra: Monomer típusú bifunkciós konjugátumok adhéziót befolyásoló hatása MM6 sejteken

- (5) A dimer származékok közül a $[\text{GnRH-III}(\text{Dau})]_2$ és a $[\text{GnRH-III}(\text{Dau-YRRL})]_2$ jelentősen növelték a sejtek kitapadását, azonban hatásuk eltérő koncentrációfüggést mutatott.



38. ábra: Dimer típusú konjugátumok sejtadhézióra kifejtett hatása MM6 sejteken

Szignifikancia: x – $p < 0,05$; z – $p < 0,01$

Az YRRL spacer tartalmazó dimer 10^{-7} - 10^{-6} M-ban bizonyult hatásosnak (130,1 - 158,1%), míg a [GnRH-III(Dau)]₂ szélesebb koncentráció tartományban fejtette ki hatását (10^{-11} - 10^{-6} M: 125,2 - 134,6%) (38. ábra). Az [(N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau)]₂, a [GnRH-III(Dau)]₂ dimerhez viszonyítva, egy neutrális/gyenge adhéziót csökkentő hatást (10^{-12} - 10^{-11} M: 85,8 - 85,6%, 10^{-7} M: 85,7%) eredményezett. (A [GnRH-III(Dau-GFLG)]₂ dimert rossz víz oldhatósága miatt nem tudtuk megfelelő koncentrációban kihígítani, így vizsgálatainkban csak az YRRL szekvenciát tartalmazó dimer származék szerepelt.)

4.2.2.2. Kemotaxis vizsgálatok

Munkacsoportunk korábbi eredményei azt jelzik, hogy egy hatóanyag-tartalmú konjugátum kemotaktikus hatását nem egyedül a hordozó/irányító rész, valamint az esetleg jelenlévő spacer szekvencia alakítja ki. Hasonlóan az adhézióra kifejtett hatásokhoz a konjugátum kemotaktikus potenciálját maga a hatóanyag és konjugálás módja is szignifikáns mértékben befolyásolhatja [197]. Így a hatóanyag-tartalmú származékok vizsgálata során elemeztük egyrészt, hogy a különböző gyógyszer komponensek hogyan befolyásolják a konjugátum kemotaktikus hatását, másrészt összehasonlítottuk a spacer nélküli és spacer tartalmazó konjugátumok valamint a GnRH-III agonista származékaiból felépülő monomer és dimer konjugátumok MM6 humán monocita sejteken mutatott kemotaktikus karakterét.

- (1) Az AN-152 és a GnRH-III alapú analógja, a GnRH-III(Dox-észter) hasonló kemotaktikus profillal rendelkeztek, 10^{-8} - 10^{-6} M tartományban szignifikáns repellens hatásúnak bizonyultak (AN-152: 74,4 - 59,6%; GnRH-III(Dox-észter): 71,4 - 61,9%) (14. táblázat). A daunorubicin tartalmú GnRH-III konjugátum (GnRH-III(Dau)) kemorepellens hatását két koncentráció optimum jellemezte: 10^{-6} M (62,9%) és 10^{-12} M (75,9%).
- (2) A GFLG távtartó beépítése a konjugátumba a GnRH-III(Dox-oxim-GFLG) esetén egy neutrális/gyenge attraktáns hatást (116,1 - 126,3%) eredményezett 10^{-8} - 10^{-6} M tartományban, míg 10^{-9} M-nál egy negatív csúcs (62,5%) volt megfigyelhető (14. táblázat). Az amidkötésű származék esetén (GnRH-III(Dox-amid-GFLG)) a repellens jelleg egyedül 10^{-6} M-ban maradt meg (73,3%); alacsony koncentrációban (10^{-12} , 10^{-10} M) már attraktáns hatást (117,4 - 132,1%) fejtett ki a konjugátum. A

GFLG szekvencia jelenléte a GnRH-III(Dau-GFLG) konjugátumban potenciórozta a spacert nem tartalmazó GnRH-III(Dau) konjugátum alacsony és magas koncentrációban egyaránt jelentkező repellens aktivitását (10^{-12} - 10^{-11} M: 59,1 - 56,3%; 10^{-7} - 10^{-6} M: 68,7 - 67,8%). Az YRRL szekvencia, ezzel szemben gyenge, de szignifikáns attraktáns jelleget kölcsönzött a konjugátumnak széles, 10^{-10} - 10^{-6} M tartományban (128,8 - 136,3%) (14. táblázat).

14. táblázat: Hatóanyag-tartalmú konjugátumok kemotaktikus hatása MM6 sejteken

GnRH-III konjugátumok	Kemotaxis index [%] (kontroll = 100%)						
	10^{-12} M	10^{-11} M	10^{-10} M	10^{-9} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
AN-152	109,2 ± 4,45	87,7 ± 11,97	94,0 ± 9,99	91,5 ± 8,21	74,4 ^x ± 5,91	84,5 ± 9,49	59,6 ^x ± 3,86
GnRH-III(Dox-észter)	87,5 ± 7,44	92,6 ± 9	100,6 ± 5,37	84,2 ± 5,41	71,4 ^y ± 3,65	77,1 ^y ± 6,06	61,9 ^y ± 4,34
GnRH-III(Dau)	75,9 ^x ± 3,1	86,7 ± 4,45	116,0 ± 7,73	101,5 ± 5,74	88,2 ± 5,97	93,2 ± 2,13	62,9 ^y ± 3,28
GnRH-III(Dox-oxim-GFLG)	87,8 ± 12,39	84,4 ± 13,14	120,7 ± 10,96	62,5 ^x ± 4,92	93,8 ± 11,12	116,1 ± 5,15	126,3 ± 9,91
GnRH-III(Dox-amid-GFLG)	117,4 ^x ± 3,18	98,1 ± 9,88	132,1 ^x ± 7,06	99,0 ± 6,99	94,8 ± 10,58	101,7 ± 6,2	73,3 ^x ± 2,96
GnRH-III(Dau-GFLG)	59,1 ^y ± 7,91	56,3 ^z ± 6,9	87,9 ± 13,76	107,3 ± 7,02	132,8 ^x ± 8,95	68,7 ^x ± 8,79	67,8 ^x ± 13,11
GnRH-III(Dau-YRRL)	120,2 ± 9,2	70,3 ^x ± 8,12	128,8 ^x ± 7,87	87,8 ± 4,42	125,4 ^x ± 5,48	121,5 ^x ± 4,27	136,3 ^x ± 6,58
(N-MeSer) ⁴ GnRH-III(Dau)	66,8 ^y ± 8,34	64,8 ^y ± 7,37	77,2 ^x ± 8,22	98,4 ± 4,77	110,7 ± 2,23	66,8 ^y ± 7,32	58,6 ^z ± 7,92
(Lys(Ac)) ⁴ GnRH-III(Dau)	91,6 ± 4,98	81,7 ^x ± 6,13	85,9 ^x ± 5,04	93,9 ± 10,18	56,0 ^z ± 3,75	98,7 ± 5,88	57,8 ^z ± 3,84
(Lys) ⁴ GnRH-III(Dau ⁴ -Dau ⁸)	106,7 ± 7,64	61,9 ^y ± 3,49	69,8 ^x ± 5,74	80,5 ± 9,76	90,9 ± 7,87	103,5 ± 8,82	97,7 ± 4,79
(Lys) ⁴ GnRH-III(Mtx ⁴ -Dau ⁸)	81,7 ± 10,19	91,8 ± 11,19	93,5 ± 11,79	68,3 ^y ± 8,11	99,7 ± 11,66	65,2 ^y ± 9,65	80,0 ± 10,52
GnRH-III(Dau ⁸ -Dau ⁸)	57,7 ^z ± 8,11	66,3 ^y ± 7,90	88,5 ± 9,15	92,6 ± 4,78	112,1 ± 11,66	46,0 ^z ± 7,53	54,9 ^z ± 11,24
GnRH-III(Mtx ⁸ -Dau ⁸)	94,5 ± 6,87	100,1 ± 5,47	98,2 ± 7,20	84,7 ± 6,05	93,1 ± 5,20	119,7 ± 11,24	136,8 ^x ± 20,23
[GnRH-III(Dau)] ₂	55,2 ^z ± 4,14	57,2 ^y ± 9,6	103,2 ± 12,65	102,5 ± 8,75	161,5 ^z ± 8,72	64,9 ^y ± 5,56	73,4 ^x ± 12,02
[GnRH-III(Dau-YRRL)] ₂	87,9 ± 6,89	78,5 ^x ± 10,15	100,0 ± 9,96	63,0 ^z ± 3,37	77,1 ^x ± 7,52	92,7 ± 3,47	74,0 ^x ± 3,52
[(N-MeSer) ⁴ GnRH-III(Dau)] ₂	86,1 ^x ± 5,52	83,0 ^x ± 5,73	85,9 ^x ± 5,81	88,2 ^x ± 2,56	85,3 ^x ± 5,03	73,0 ^z ± 4,86	57,7 ^z ± 4,34

Kemotaxis index: kontrollra vonatkoztatott százalékos érték. Szürke kiemeléssel a szignifikáns hatásokat jelöltük. Szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01; z – p < 0,001.

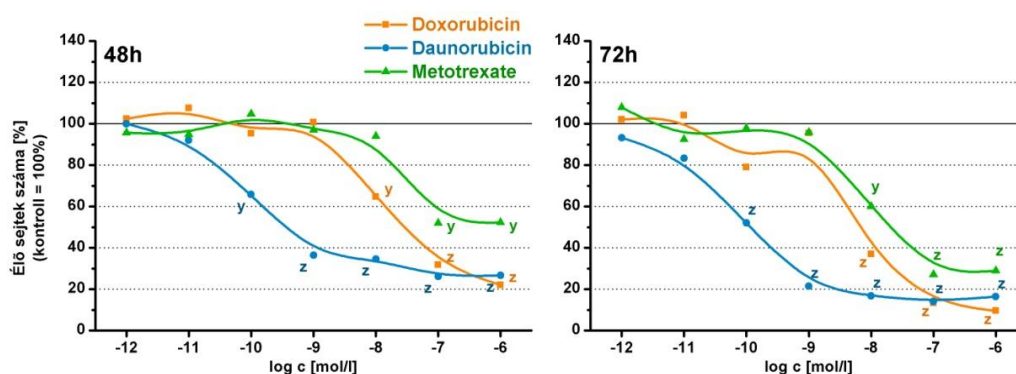
- (3) A GnRH-III agonista származékaira épülő konjugátumok is döntően repellens hatással rendelkeztek. Az (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau) esetén, a GnRH-III(Dau) származékhoz viszonyítva, egy intenzívebb, és több koncentrációra kiterjedő repellens hatás (10^{-12} - 10^{-10} M: 66,8 - 77,2%; 10^{-7} - 10^{-6} M: 66,8 - 58,6%) volt kimutatható (14. táblázat). Az (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) repellens hatása magasabb koncentrációkban volt kifejezettebb (10^{-8} M: 56,0%, 10^{-6} M: 57,8%).
- (4) A Lys⁴ oldalláncához egy metotrexát konjugálásával előállított (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸) továbbra is repellensen (68,3 - 65,2%) viselkedett 10^{-9} - 10^{-7} M tartományban. Az (Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸) repellens hatása ellenkező koncentrációfüggést mutatott (10^{-11} - 10^{-10} M: 61,9 – 69,8%) (14. táblázat). A 8-as pozícióban egy második daunorubicin kapcsolása (GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸)) erős repellens hatást eredményezett, ami a monofunkciós konjugátumhoz (GnRH-III(Dau)) hasonló koncentrációfüggést – 10^{-12} - 10^{-11} M: 57,7 - 66,3%; 10^{-7} - 10^{-6} M: 46,0 - 54,9% – mutatott (14. táblázat). Ezzel szemben a metotrexát hasonló pozícióban történő konjugálásával előállított GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸) kemoattraktáns hatással (136,8%) rendelkezett 10^{-6} M-os koncentrációban.
- (5) Két GnRH-III(Dau) dimerré kapcsolása is az alacsony és a magas koncentrációkra egyaránt jellemző repellens hatás erősödését (10^{-12} - 10^{-11} M: 55,2 - 57,2%; 10^{-7} - 10^{-6} M: 64,9 - 73,4%) eredményezte (14. táblázat). A [(N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau)]₂ esetén a teljes koncentráció tartományra kiterjedő repellens hatás maximuma 10^{-7} - 10^{-6} M-ban volt megfigyelhető (73,0 - 57,7%). A [GnRH-III(Dau-YRRL)]₂ dimer, az attraktáns monomer származékhoz GnRH-III(Dau-YRRL) képest, ellentétes, repellens hatást mutatott; ami legintenzívebben 10^{-9} M-ban jelentkezett (63,0%).

4.2.2.2.3. Antiproliferatív és citotoxicitási vizsgálatok

Az irányított tumorterápiára tervezett konjugátumokkal szemben támasztott egyik legfontosabb követelmény, hogy a tumorsejtekhez jutva képesek legyenek elpusztítani azokat, tehát a konjugátumnak rendelkeznie kell a szabad gyógyszermolekulára jellemző farmakológiai hatással [66]. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a hatóanyagok konjugátum formában is kifejtik-e sejtosztódást gátló hatásukat citotoxicitási vizsgálatokat végeztünk. Vizsgálataink során az indukciós terápia során kialakuló plazma koncentrációnak megfelelő koncentrációk (10^{-7} - 10^{-6} M) [198, 199] mellett, alacsonyabb

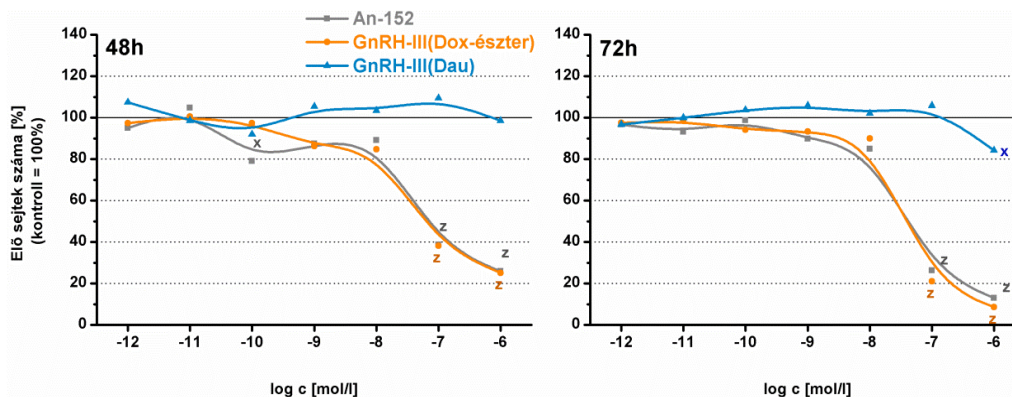
tartományban (10^{-12} - 10^{-6} M) is elemeztük a konjugátumok MM6 sejtekre kifejtett antiproliferatív/citotoxikus hatását az idő függvényében (24-48-72 h). A konjugátumok aktivitását, egyrészt a szabad hatóanyagok (doxorubicin, daunorubicin), másrészt a korábbi méréseink során is referenciaként alkalmazott AN-152 hatásával vetettük össze. A hatóanyag-tartamú konjugátumok antiproliferatív /citotoxikus hatását 24 órás kezelést követően is vizsgáltuk, azonban szignifikáns sejtszám csökkenést csak 48 óra elteltével tudtunk detektálni. Ezért az ábrákon csak a 48 és 72 órás eredményeket mutatom be.

- (1) A MM6 monocita modell-sejt a daunorubicin hatására volt a legérzékenyebb, már 48 óra elteltével 10^{-10} M-ban is szignifikánsan sejtszám csökkentő hatással rendelkezett (65,8%; Via_{48h} : 0,90), és a kezelés végére 10^{-6} M koncentrációban közel 90%-os citotoxicitás (16,5%; Via_{72h} : 0,50) volt detektálható (39. ábra). A doxorubicin magasabb koncentrációi (10^{-8} - 10^{-6} M) mutattak csak hasonló mértékű hatást 72 órás kezelést követően (37,1 - 9,6%; Via_{72h} : 0,72 - 0,43).



39. ábra: Szabad hatóanyagok sejtosztódást gátló/citotoxikus hatása MM6 sejteken
Szignifikancia: y – p < 0,01; z – p < 0,001

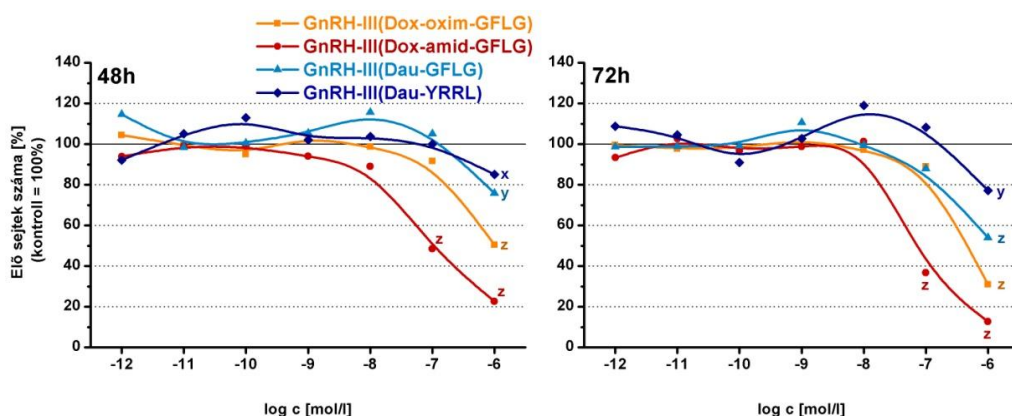
- (2) Az AN-152 és GnRH-III(Dox-észter) dózis-hatás görbéje szinte teljes átfedést mutat. Sejtosztódást gátló hatásuk már 48 óra elteltével 10^{-7} M koncentrációban megnyilvánult (AN-152: 38,8%, Via_{48h} : 0,80, GnRH-III(Dox): 38,2%, Via_{48h} : 0,82). Hosszú távon (72h) 10^{-7} - 10^{-6} M-ban jelentkező citotoxikus tulajdonságuk összemérhető volt a szabad doxorubicin hatásával (AN-152: 26,3 - 13,1%, Via_{72h} : 0,64-0,38; GnRH-III(Dox-észter): 21,0 - 8,6%, Via_{72h} : 0,68-0,38) (40. ábra). Ezzel szemben, a 10^{-6} M GnRH-III(Dau) konjugátummal történő 72 órás inkubáció enyhe, de szignifikáns sejtszámcsökkenést eredményezett (84,2%, Via_{72h} : 0,98).



40. ábra: Spacer nélküli, hatóanyag-tartalmú konjugátumok antiproliferatív/citotoxikus hatása MM6 sejteken

Szignifikancia: $x - p < 0,05$; $z - p < 0,001$

- (3) A doxorubicin-távtartó-GnRH-III összetételű konjugátumok közül a 72 órás kezelést követően az amidkötésű forma (GnRH-III(Dox-amid-GFLG)) okozott a szabad hatóanyaghoz hasonló mértékű sejtpusztulást (10^{-7} - 10^{-6} M: 36,7 - 12,7%; Via_{72h} : 0,66 - 0,61). Az GnRH-III(Dox-oxim-GFLG) gyengébb citotoxikus hatást (67,9%; Via_{72h} : 0,66) fejtett ki, ami csak 10^{-6} M-os koncentrációban volt megfigyelhető (41. ábra). A daunorubicin-tartalmú konjugátumok hatását a távtartó beépítése szignifikánsan javította. A GnRH-III(Dau-GFLG) bizonyult aktívabbnak, összehasonlítva a GnRH-III(Dau-YRRL) 77,1%-os hatásával (Via_{72h} : 0,89), közel 50%-os sejtszámcsökkenés volt megfigyelhető 72 óra elteltével (54,0%, Via_{72h} : 0,8).

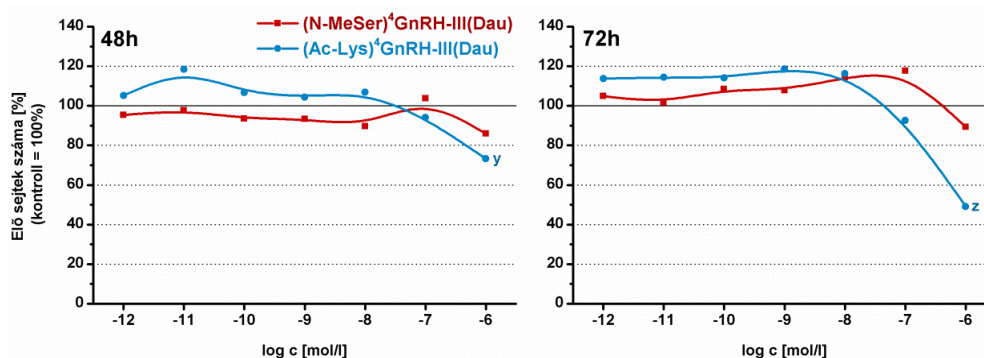


41. ábra: Spacer szekvenciát tartalmazó hatóanyag-GnRH-III konjugátumok antiproliferatív / citotoxikus hatása MM6 sejteken

Szignifikancia: $x - p < 0,05$; $y - p < 0,01$; $z - p < 0,001$

- (4) Az alapszekvenciában módosított konjugátumok aktivitása nagy különbséget mutatott. Az (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau) nem befolyásolta szignifikáns mértékben a sejtek osztódását még 72 órás kezelést követően sem (42. ábra). Ezzel szemben az

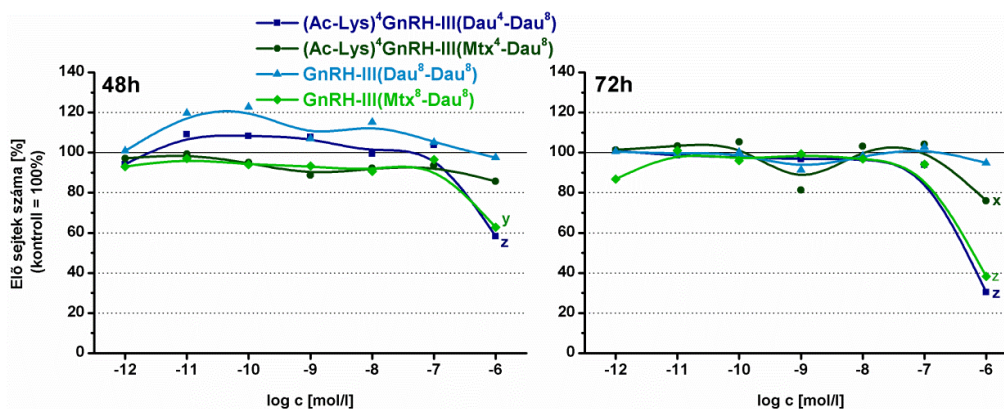
(Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) 10⁻⁶ M koncentrációban, már 48 óra elteltével antiproliferatív hatással rendelkezett (10⁻⁶ M: 73,2%, Via_{48h}: 0,96), ami 72 órás kezelést követően tovább erősödött (49,1%, Via_{48h}: 0,77).



42. ábra: Módosított GnRH-III származék - hatóanyag konjugátumok antiproliferatív/citotoxikus hatása MM6 sejteken

Szignifikancia: y – p < 0,01; z – p < 0,001

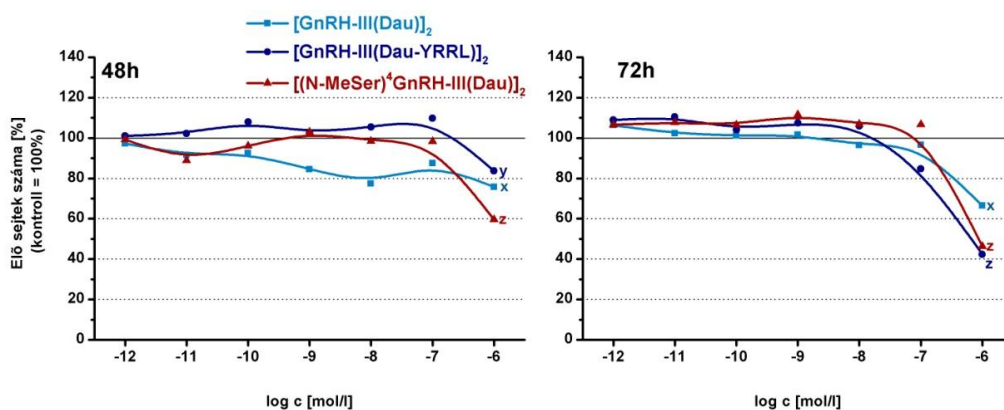
- (5) A kétszeres hatóanyag-tartalmú derivátumok közül a (Lys)⁴GnRH-III(Dau-Dau) 72 óra elteltével közel másfélszer nagyobb citotoxikus hatással (10⁻⁶ M: 30,3%; Via_{72h}: 0,64) rendelkezett, mint a monofunkciós (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) (43. ábra). A (Lys)⁴GnRH-III(Mtx-Dau) hatékonysága (10⁻⁶ M: 76,0%; Via_{72h}: 0,96) 72 órás kezelés után sem közelítette meg az egyszerűen konjugált származék aktivitását. Egy második daunorubicin kapcsolása a Lys⁸ oldalláncához (GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸)) hosszú távon sem váltott ki szignifikáns sejtszám csökkenést (94,8%; Via_{72h}:1,01) (43. ábra). Ezzel szemben az ugyanilyen típusú, de metotrexátot tartalmazó, GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸) konjugátum 10⁻⁶ M-ban jelentős mértékben csökkentette az élő sejtek számát 72 órás kezelés során (38,2%, Via_{72h}: 0,77).



43. ábra: Monomer típusú bifunkciós konjugátumok antiproliferatív/citotoxikus hatása MM6 sejteken

Szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01; z – p < 0,001

(6) Mindegyik dimer származék esetén, a monomer egységek hatásához viszonyítva jelentős, legalább kétszeres aktivitásfokozódás volt megfigyelhető. Az inaktív monomer formához képest az $[(N\text{-MeSer})^4\text{GnRH-III(Dau)}]_2$ már 48 óra után 59,6%-os antiproliferatív hatással rendelkezett ($\text{Via}_{48\text{h}}$: 0,88) (44. ábra). A 72 órás eredmények szerint a spacer szekvencia (YRRL) jelenléte ($[\text{GnRH-III(Dau-YRRL)}]_2$), ez esetben is nagyobb aktivitást kölcsönzött a vegyületnek (42,4%; $\text{Via}_{72\text{h}}$: 0,7), összehasonlítva a $[\text{GnRH-III(Dau)}]_2$ dimer 66,4%-os, sejtosztódást gátló hatásával ($\text{Via}_{72\text{h}}$: 0,99).



44. ábra: Hatóanyag-tartalmú dimer származékok antiproliferatív/citotoxikus hatása MM6 sejteken

Szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01; z – p < 0,001

5. MEGBESZÉLÉS

A korszerű tumorterápiás törekvések közös jellemzője, hogy a tumorokban szelektíven megjelenő receptorokat vagy a transzformációban kulcsfontosságú biokémiai folyamatok egyes elemeit célozva, a kezelés szelektivitását fokozzák. Ezáltal elkerülhetőek a nem kívánt mellékhatások és a gyógyszerrezisztencia kialakulása [60]. A tumorsejtek disszeminációja a daganatprogresszió folyamatának fontos mozzanata, amely a célzott terápia sikerességét is jelentősen befolyásolhatja. A tumorsejtek adhéziós kapcsolatainak kóros átalakulása, és migrációs aktivitásának fokozódása a metasztatikus kaszkád szinte minden lépésében (invázió, intra- és extravazáció, szöveti vándorlás és megtapadás) kiemelkedő jelentőségű [27]. Korábbi vizsgálatokban a monoamin-oxidáz (MAO) enzim túltermelődését, és malignus transzformáció kialakulásában betöltött szerepét több különböző daganat esetén leírták [62-64]. Ezek a megfigyelések azt is felvetik, hogy a MAO-gátlók, például az *R*-deprenyl és származékainak alkalmazása eredményes lehet a célzott daganatterápiában [62]. A szakirodalmi adatok szerint az egyes tumortípusok, a normál egészséges szövetekhez képest, erőteljes GnRH receptor (GnRH-R) expressziót folytatnak [66], és a GnRH-III természetes hormon közvetlen és specifikus módon – gyakorlatilag endokrin mellékhatások fellépése nélkül – képes gátolni ezen daganatok növekedését [132]. A tumorsejtek felszínén nagyszámban kifejeződő GnRH receptorokon keresztül megvalósítható egy kérdéses hatóanyag célbajuttatása is. A GnRH-III, egy hatóanyag-szállító rendszer részeként, képes egy hozzá kapcsolt gyógyszermolekulát szelektíven a daganatsejtekhez juttatni. A fenti ismeretek fényében a tumorsejtek adhéziós és migrációs tulajdonságainak célzott, gyógyszeres befolyásolása – egyrészt a MAO enzim gátlásán keresztül az *R*-deprenyl és származékainak adásával, másrészt a GnRH receptoron ható különböző GnRH-III származékok és hatóanyag-szállító konjugátumaik felhasználásával – nyilvánvaló fontossággal bír a metasztázisok kialakulásának megelőzése és gátlása szempontjából.

Jelen dolgozatban a célzott daganatterápiás felhasználásra szánt két anyagcsoport antimetasztatikus hatásának elemzésére vállalkozva, azok sejtfiziológiai hatását egy csillós, eukarióta egysejtű – *Tetrahymena pyriformis* – és egy emlős – döntően akut mieloid leukémia eredetű monocita sejtvonal (MM6) – modell-sejteken vizsgáltam.

A *Tetrahymena pyriformis* csillós egysejtű vizsgálatát több tényező is indokolja. Gyakorlati előnye, hogy laboratóriumi feltételek mellett könnyen, gyorsan tenyészhető, és

rövid (~150 perc) ciklusidejének köszönhetően egyes környezeti hatások rövid és hosszú távú, akár több generáción keresztül tartó (hormonális imprinting) vizsgálatára is lehetőség adódik [200]. Elméleti szempontból, a magasabb rendűek sejtélettani válaszreakcióival és szabályozó folyamataival homológ funkciók és mechanizmusok jelenléte, többek között hormonszerű anyagok termelésének, tárolásának, kibocsátásának képessége, kemotaktikus és kemokinetikus reakciójának érzékenysége [168, 175] szintén indokolja, hogy a metasztázisok kialakulásának megelőzését és gátlását célzó vizsgálatok bevezető méréseihez ezt a modell-sejtet választottuk [201, 202]. A *Tetrahymena* felhasználásával egyes bioaktív anyagok – természetes hormonok, vagy szintetikus vegyületek (gyógyszerek) – hatásainak egyszerű és adekvát vizsgálatára nyílik lehetőség.

A választott monocita modell-sejt, mint a szervezet migrációra specializálódott sejttípusa kiváló lehetőséget nyújt az adhézió és kemotaxis mellett egyes anyagok antiproliferatív és citotoxikus tulajdonságának adekvát vizsgálatára is [203]. A MM6 egy akut mieloid leukémia modell is egyben [149]. Azok a mechanizmusok – megváltozott adhéziós fehérje expresszió, és ennek következtében megjelenő sejtosztódási és migrációs képesség –, amelyek révén biztosított a malignus hematopoetikus sejtek érpályába jutása (leukocitózis), valamint megfelelő jelre (pl. kemokin expresszió) a szövetekbe (pl. tüdő, agy, bőr) történő kilépése (szóródása), jelentős hasonlóságot mutatnak a szolid tumorok invazivitását és metasztázisképzését eredményező folyamatokkal [204-207].

5.1. R-deprenyl és származékai

5.1.1. A MAO szubsztrát szerotonin és a MAO-B gátló R-deprenyl származékainak sejtélettani hatásai *Tetrahymena pyriformis* modell-sejten

A szerotoninszint szabályozásában, mind emlősök, mind egysejtűek esetén a MAO enzim fontos szerepet játszik. A *Tetrahymena*-ban különböző funkcionális tesztekkel igazolták, hogy a MAO aktivitás pH függése, nem szelektív gátlószerek iránti érzékenysége jó egyezést mutat az emlős sejtekben leírt hatásokkal [182, 208]. A chlorgyline és az R-deprenyl, mint szelektív MAO-A és -B inhibitorok, hatásukat részben az enzim gátlása folytán befolyásolt szubsztrátok hatásain keresztül fejtik ki (pl. R-deprenyl dopamin potenciózó hatása a Parkinson-kór kezelésében). A szubsztrátok közül, a szerotonin rövid és hosszú távú hatásának vizsgálata során nyert eredményeink ismertetésével a gátlószerek későbbiekben bemutatott hatásainak jelentőségére szeretnénk rávilágítani.

5.1.1.1. A szerotonin rövidtávú hatásai

Korábbi vizsgálatok eredményei alapján feltételezhető, hogy a *Tetrahymena* által termelt vagy esetleg a környezetéből felvett szerotonin szekréciója révén képes parakrin/autokrin módon befolyásolni más hormonok szintézisét, felvételét, szekrécióját [167]. A hormonális interakciók jelenléte is egy, a magasabb rendűekre jellemző funkcióképes, szerotonerg rendszer jelenlétét feltételezi már az egysejtű szintjén [166]. Kísérleteink elsőnek bemutatott csoportjában a szerotoninnal történő kezelés hatására realizálódó intracelluláris hormonszint változások koncentráció-, idő- és környezeti tényezőktől (tápanyag-ellátottságtól) való függését vizsgáltunk.

Az egysejtű, édesvízi *Tetrahymena* túlélését, az állandóan változó környezeti feltételek között, az érzékeny és gyors reagálóképessége biztosítja. Nem csupán kémiai ingerek hatásával kell számolni, hanem például a hőmérsékletváltozás, vagy a tenyészetek megvilágítási viszonyai alapvető módon képesek megváltoztatni a sejtek élettani paramétereit (pl. szaporodás, hormontartalom és kötési képesség) [209, 210]. A *Tetrahymena* természetes vízi közegében az egyik ilyen alapvető, külső faktor lehet a tápanyag molekulák mennyisége. Laboratóriumi körülmények között a sejtek tenyésztése tápanyagdús, bacto tryptone-t és élesztő kivonatot tartalmazó médiumban történik, mindazonáltal a tenyészetek fenntarthatók – rövid ideig – teljesen inorganikus körülmények (pl. Losina-Losinsky – LL - médium) között is. A tápanyagdús médium tartalmazza mindazokat a növekedési faktorokat, amik a sejtek osztódásához szükségesek, és azokat a prekursor molekulákat, amelyeket az endogén anyagainak szintéziséhez használ fel. Ezek hiányában (tisztán só oldatban) a sejtek osztódása, és egyes, környezeti szerves molekulákat igénylő szintetikus folyamatai leállnak, a sejtek úgymond éheznek. Eredményeink szerint a szerotonin hatása a *Tetrahymena* sejtek endogén hormon tartalmára is jelentős eltérést mutatott attól függően, hogy milyen közegben történt a kezelés. Szignifikáns hormonszint (hisztamin és ACTH) emelkedést csak az LL-médiumban tartott sejtek esetén tudtunk kimutatni. Korábbi tanulmányokban kimutatták, hogy a stressz – hő, hiperozmózis és hosszantartó éheztetés (24 óra) formájában – fokozza a sejtek hormontartalmát [172, 211]. Jelen esetben az egy órás kezelés LL-médiumban nem számít hosszú éheztetésnek. Ha figyelembe vesszük azonban a *Tetrahymena* viszonylag rövid, kb. 150 perces ciklusidejét, akkor a sejt egyedi életében ez jelentős hatásnak tekinthető. Méréseink

során, hasonlóan az irodalmi adatokhoz, már a kontroll, éheztetett sejtek esetén is szignifikánsan magasabb hormonszinteket mértünk, mint a tenyésztő médiumban levőkben. A só oldatban kapott eredmények jelentőségét az adhatja, hogy ismerve a *Tetrahymena* természetes vízi közegét, feltételezhető, hogy a laboratóriumi tenyésztéshez használt tápanyagdús oldathoz képest az inorganikus összetevőket tartalmazó oldat jobban modellezi ezt a normál állapotot.

A sejt által termelt és szecernált hormonok a *Tetrahymena* normál környezetében extrém módon kihígulhatnak. Így a hormonális interakciók vagy a még a sejten belül következnek be (az ugyanazon sejt által termelt hormonok között), vagy receptoraiknak kell rendkívül érzékenynek lennie. Az alkalmazott femtomoláris és az az alatti koncentrációk hatékonysága azt jelzi, hogy a sejtek környezetébe szecernált szerotonin, a közegben történő kihígulása ellenére is befolyásolhatja a sejtek fiziológias folyamatait. Tehát *Tetrahymena* sejtekben a hormonokat (szerotonint) felismerni képes receptorok kifejezetten érzékenyek. A szerotonin koncentrációfüggő hatása alapján feltételezhető, hogy az evolúció alacsonyabb szintjén a hormonális szabályozásnak fontos eleme a hírvivő anyagok koncentráció változásaiban rejlő hatáskülönbségek. Más hatást fejtenek ki nagyobb koncentrációt elérve, a sejt közvetlen környezetében, mint a sejttől távol, ahol a receptorok érzékenységének köszönhetően a 10^{-21} - 10^{-18} M-os oldataik mennyiségben, avagy akár minőségben is eltérő hatást közvetíthetnek.

A 30 és 60 perces kezelések eltérő hatásai azt jelzik, hogy a ható hormonnak a mennyisége nem játszik kizárólagos szerepet a hatás előidézésében, az időtényező is meghatározónak tűnik. A szerotoninnak, a kezelés időtartamától függő, olykor a *Tetrahymena* hormon tartalmára kifejtett ellentétes irányú hatásait leíró megfigyeléseink nem tekinthetők a szakirodalomban egyedülállóak. Korábbi vizsgálatokban a sejt inzulin kötési képességét a szerotonin rövidtávon (1-30 perc) csökkentette, míg a 60 perces behatás után már fokozott FITC-inzulin kötődést eredményezett [173]. Az időfüggő hatások értelmezéséhez gondolni kell a sejtek sejtciklustól függő érzékenységére [212], vagy éppen a szerotonin kezelés hatására felszabaduló anyagok együttes, vagy éppen áttételes hatásaira is [213].

A szerotonin kezelés hatására mutakozó intracelluláris hormonszint változások több lehetőséget is felvetnek az indukált mechanizmusok tekintetében. Az irodalmi adatok tükrében egyrészt utalhatnak arra, hogy a kezelés hatására megváltozik a sejtek

hormon termelése. Egy korábbi vizsgálatban a szerotonin hatására több mint tízszeresére növekedett a sejtek RNS szintézise. Ez a megfigyelés a szerotonin hormonális hatásainak időfüggését is magyarázhatja, ugyanis ez az említett aktivitásfokozódás legalább 30 perces behatás után következett be, a rövidebb, 15 perces kezelés éppen ellenkezőleg hatott [167]. Az LL-médiumban kapott eredményeink továbbá azt is sugallják, hogy egyes hormonok szintéziséhez – legalábbis az alkalmazott 1 órás éheztetési periódus alatt – nem feltétlenül szükségesek a normál körülmények között a környezetben jelen lévő prekursorok, hanem szintézisük részben vagy teljes egészében endogén anyagok felhasználásával is történhet.

5.1.1.2. Szerotonin imprinting

A hormonális imprinting a kezelések egy olyan speciális típusát jelenti, amely a sejtek tartósan módosult válaszreakcióit idézi elő. A hormonális imprinting kiváltására már igen kis koncentrációban jelenlévő (10^{-15} , 10^{-13} M) hormon is képes volt [181, 214]. A hormonnal történő első kezelés indukálta reakció nem csupán a kezelt sejten, hanem annak utódsejtjein is, több generáción át megfigyelhető. A hormonnal történő többszöri találkozás a sejtek eltérő, rendszerint intenzívebb válaszát (pl. hormonkötés, proliferáció, kemotaktikus reakció) váltotta ki. A hormonális imprinting kialakíthatóságának, szabályozásának részletes feltérképezése során a korábbi munkák általában a kezelések hatására kialakult memóriát 24 óra (~9 generáció) vagy 1 hét (~70 generáció) távlatában vizsgálták. Ezeken az intervallumokon belül az imprinting érvényre jutását a különböző sejtelettani folyamatokban bekövetkezett, általában mennyiségi változások jelezték [168, 181, 215]. Munkánk során, az eddigiekkel ellentétben, a szerotonin imprinting hosszú távú hatását vizsgáltuk az imprintált sejtek 500. és az 1000. utódgenerációiban.

Mindegyik vizsgált index (szerotonintartalom, osztódási képesség, kemotaktikus és kemokinetikus aktivitás) az 500. és 1000. generációban mérve, kvantitatív eltérést mutatott a nem imprintált kontroll sejtekhez képest. A kiváltott imprinting tartóssága, és a hatások koncentrációfüggése ugyanakkor eltérést mutatott az egyes élettani paraméterek vizsgálata esetén. A sejtek szerotonin tartalmára különösen igaz ez a megállapítás. Az 500. generációban mindkét koncentráció negatív imprintinget, intracelluláris hormonszint csökkenést váltott ki. Az előkezelést követő 1000. generációban a 10^{-6} M-os szerotonin hatása a nem imprintált kontrollal volt egyenértékű, míg az alacsonyabb koncentráció

éppen ellenkezőleg, pozitívan hatott, mint a korábbi időpontban. Ennek hátterében több mechanizmus is állhat. Okozhatja az, hogy az egyes koncentrációk eltérő hatásmechanizmus mentén fejthetik ki hatásukat. Koncentrációfüggő módon változhat a sejtek szerotonin szintézise, felvétele vagy akár a szekréciója is. Továbbá ezekben a folyamatokban, az imprinting hatására beállt változások az időben is eltérő stabilitásúak lehetnek [167]. A korábban bemutatott eredményeink szerint is, a hormonális interakciók fontos elemei a sejt szabályozó folyamatainak. Tehát feltételezhető, hogy a szerotonin kezelés hatására bekövetkező intracelluláris hormonszint változások módosíthatják a szerotonin imprintáló képességét, a kialakult memória mértékét és tartósságát is.

Az 500. és az 1000. utódgeneráció sejteinek emelkedett osztódási rátája a 10^{-6} M szerotonin előkezelés imprintáló hatását és a hosszú távú memóriát kialakító képességét jelzi. Korábbi kísérletekben a hormon rövid távú hatását is kimutatták. A sejtek osztódása közvetlenül és 1-14 nappal a 10^{-10} - 10^{-5} M koncentrációban alkalmazott szerotonin előkezelést követően fokozódott [167]. A dijó-d-tirozin korábbi, hosszú távú (500 generáció) mitózist indukáló hatását [178] is alapul véve feltételezhető, hogy a szerotonin imprinting tartós funkcionális változást idézett elő, és az előkezelés formájában átvitt információ akár 1000 generáción keresztül is tovább adódik.

A jelmolekulával való első találkozás rögzülése sok esetben a Tetrahymena egy rá jellemző fiziológiai reakciójában, a mozgási viselkedésében bekövetkező változás formájában nyilvánult meg [157, 168]. A sejtek kemotaktikus aktivitása egy olyan érzékeny paraméter, amely egyes hormonok esetén a kötődésvizsgálatoknál is érzékenyebben, molekula-szerkezetre specifikus módon jelezte a hormonális memória kialakulását [50]. Kőhidai és munkatársai kimutatták, hogy a szerotonin, az első kezelés alkalmával, kemorepellens aktivitással rendelkezik és ez a hatás 24 óra múltán is észlelhető volt [168]. Vizsgálataink során a hosszú távú memória kialakulására és fennmaradására egyik legszebb példa a szerotonin kemorepellens karaktere volt, amely következetesen az 500. és 1000. utódgenerációban is megnyilvánult. Az egyszeri kezelés, 500 és 1000 generációt követően, a sejtek negatív kemotaktikus reakcióját indukálta, míg az ismételt kezelés kismértékben tovább erősítette ezt a profilt.

A Tetrahymena mozgása két fő mozgásformából tevődik össze. A mozgás mintázatát az egyenes haladások és az azokat megszakító elfordulások aránya határozza meg. A sejtek alapmozgása az egyenes vagy spirális nyomvonalat követő úszás. A sejtek gyors

előrehaladását az egyenes vonalú úszási szakaszok biztosítják, míg az elfordulások számának növekedésével a sejtek úszása kanyarulatossabbá válik. Az elforduló szakaszok adnak módot a sejtnak az úszás közben történő reorientálódásra és korrekciókra is. A csillós egysejtűek másik mozgástípusa abból adódik, hogy képesek a szilárd felületen, csillóikkal időleges, adhéziószerű kapcsolatot létesítve, egyenes vonalú (kúszás), vagy körkörös mozgást (creeping) végezni [157, 190]. A szerotoninnal kiváltott imprinting hosszú távú, a sejtek úszási viselkedésére kifejtett hatásából látható, hogy a hormon negatív – creepinget előidéző – hatása csak a másodszori expozíció alkalmával jelentkezett, míg önmagában az előkezelés az 1000. utódgeneráció gyors, egyenes vonalú úszását eredményezte. A mért két index – úszási sebesség és úszási mintázat – jó összefüggésben áll. A csillós mozgásból eredő hajtóerő alapján a gyors mozgások lineáris pályákon tehetők meg a legnagyobb valószínűséggel. Ebből adódik, hogy a lelassuló mozgásokat a vizsgált csillós *Tetrahymena* leggyakrabban kanyargósabb útvonalon tesz meg [216]. Ezt az elméleti fejtegetést látszik bizonyítani, egy kivételtől eltekintve (Szer-15_Szer-6 / Szer-15_Szer-15), a szerotonin esetében kapott két adatsor.

A szerotoninnal történő előkezelés 1000 generáció múltán is a sejtek megváltozott reakcióját eredményezte, tehát az így kiváltott imprinting hosszú távú memóriát kialakító információja generációról generációra átadódott. A hormonális imprinting összetett, részleteiben még nem teljesen feltérképezett folyamat. A rendelkezésre álló adatok a receptor-jelátviteli rendszer és a membrán funkcionális változása mellett génszintű (epigenetikus) hatások szerepét is felvetik az imprinting kialakulása során. Az imprinting kiváltására képes, receptor szinten ható molekulák, köztük a szerotonin, nem mutagének, valószínűleg génszintű hatásaikat, pl. a szerotonin esetében tapasztalt megnövekedett RNS expressziót [167], epigenetikus faktorok, pl. a DNS metiláció modulálásán keresztül fejtik ki. Az 5-azacitidinnel – metilációt gátló ágenssel – végzett vizsgálat már az evolúció alacsonyabb szintjén is bizonyítani látszott az epigenetikus szabályozás lehetőségét az imprinting kialakításában [217]. Az emlős modell-rendszerekben végzett kísérletek mellett, amelyek az imprinting metilációt átrendező hatását támasztják alá, a *Tetrahymena* szintjén kapott eredményeink – a szerotonin előkezelés 1000 generáció elteltével is érvényesülő hatásai – azt valószínűsítik, hogy a hormonális imprinting információjának fixálásában és generációról generációra történő továbbadásában az imprinterek metilációs mintázatot befolyásoló hatásának fontos szerepe lehet [177, 201].

5.1.1.3. A deprenyl származékok sejtélettani hatásai Tetrahymena sejteken

Irodalmi adatok alapján a szerotonin egyrészt membrán kötődése után, különböző jelátviteli mechanizmusokon (G-protein kapcsoltan, az adenilát cikláz és a cAMP szint szabályozásán) keresztül, másrészt, mint intracelluláris mediátor válthatja ki illetve szabályozhatja a Tetrahymena reakcióit [167]. Az imprinting következtében kialakuló magasabb endogén szerotonin koncentráció, legyen az megnövekedett felvétel, fokozott szintézis, vagy receptoriális mechanizmus eredménye, azt a teóriát látszik támogatni, hogy a szerotonin, mint intracelluláris szabályozó molekula játszik szerepet az egyes sejtélettani folyamatok szabályozásában. Azt sem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy az intracelluláris szerotoninszint közvetve, a Tetrahymena szekréciós folyamatai révén autokrin/parakrin módon is befolyásolhatja az élettani funkciókat. Így adódott a kérdés, hogy a metabolizációjáért felelős MAO milyen hatással van a szerotonin intracelluláris koncentrációjára, illetve a két izotípus közül, melyik játszhat ebben szerepet.

A különböző, MAO-A és -B izotípus szelektív gátlószerek (chlorgyline és *R*-deprenyl) a Tetrahymena szerotonin tartalmára kifejtett hatásai alapján feltételezhető, hogy az *R*-deprenyl, a MAO-B enzim gátlásán keresztül fokozza a sejtek szerotoninszintjét. Csillós modell-sejtünk esetében, az emlős sejtekben tapasztaltakkal ellentétben, ez az izoforma lehet felelős a szerotonin lebontásáért. Az sem zárható ki, hogy az *R*-deprenyl fent említett hatásában nem kizárólag a szerotonin metabolizmusának gátlása játszhat szerepet, hanem például a hormon szekréciójára vagy felvételére is hatással lehet. Az *R*-deprenyl azáltal, hogy fokozza a sejtek szerotonin tartalmát a Tetrahymena fiziológiás folyamatainak egész sorát lehet képes befolyásolni.

A kemotaxist illetően az *R*-deprenyl szignifikáns kemoattraktáns jelleggel rendelkezik, ráadásul ez a hatás a MAO-B gátláshoz szükséges dózisonál nagyságrendekkel kisebb koncentrációban mutatkozott meg, ami alapján feltételezhető, hogy az *R*-deprenyl kemotaktikus hatása független a MAO-B enzim gátlásától. Az még további vizsgálatokat igényel, hogy az *R*-deprenyl alacsonyabb koncentrációi, hogyan hatnak a Tetrahymena szerotonin tartalmára és ez mennyiben járulhat hozzá kemotaktikus hatásához. Az azonban bizonyos, hogy a kemotaktikus hatás szempontjából is érvényesül a sztereoszelektivitás [77], ugyanis az enantiomer, az *S*-deprenyl gyenge repellens hatást mutatott. Az *R*-deprenyl kemotaktikus hatásához hasonló aktivitást egyik vizsgált metabolit esetében sem tapasztaltunk. Az *R*-dezmethyldeprenylt leszámítva mindegyik

származék döntően repellens hatással rendelkezett a magas koncentráció tartományban. Azonban azt is meg kell említenünk, hogy a propargil csoportot tartalmazó vegyületek (*R*-dezmetildeprenyl, *R*-deprenyl-*N*-oxid) esetén, legszebben éppen az *R*-dezmetildeprenylnél, alacsony koncentrációban egy pozitív kemotaktikus trend volt megfigyelhető. Ezek a vegyületek abban is hasonlítanak az *R*-deprenylre, hogy gátolják a MAO-B enzimet, antiapoptotikus és neuroprotektív hatással is rendelkeznek [23, 85, 99]. Tetrahymena sejten kapott eredményeink is támogatják azt, a több munkacsoport által is megfogalmazott feltevést, miszerint az *R*-deprenyl hatásait részben e két metabolit közvetítésével fejt ki [83, 99], és a hatások feltétele a propargil csoport jelenléte [101].

A szintetikus származékok közül a *p*-fluoro-*R*-deprenylt irreverzibilis MAO-B gátló tulajdonsága mellett hatásosnak találták különböző a neurotoxinok (DSP-4, MPTP) károsító hatásának kivédésében is [102, 105]. Ezzel szemben a *p*-fluoro-*R*-deprenyl kemotaktikus viselkedése messze elmaradt az *R*-deprenyl hatékonyságától; mindkét optikai izomer repellensként viselkedett. Az *R*-metil- és *R*-dimetildeprenyl egy, illetve két nagyságrenddel kisebb MAO-B gátló aktivitása alapján úgy tűnik, hogy a propargil csoport jelenléte mellett meghatározó a C1 szénatomhoz kapcsolódó oldallánc térkitöltése is [103]. Vizsgálatainkban is hasonló eredményekre jutottunk. Az oldallánc módosítása (*R*-metil- és *R*-dimetildeprenyl) repellens hatást eredményezett szemben az *R*-deprenyl kemoattraktáns hatásával. A Tetrahymena szintetikus származékok esetén tapasztalt kemotaktikus viselkedése, a modell-sejt diszkriminációs képességére hívja fel a figyelmet. Az irodalomban már definiált szerkezet-hatás összefüggésekkel jórészt egyező kemotaxis eredményeink egyben megerősítik, hogy a Tetrahymena alkalmas modell a választott gyógyszercsoport vizsgálatára.

5.1.2. *R*-deprenyl és derivátumainak hatása magasabb rendű modell-sejteken

A MAO-B gátló *R*-deprenyl in vivo tumorelles hatását már korábban igazolták [89, 90], ugyanakkor a háttérben álló pontos mechanizmusok összességében még korántsem ismertek. Az *R*-deprenyl a tumorprogresszió gátlásában betöltött szerepének megértéséhez, a vegyület sejtbiológiai hatásvizsgálatát az alkalmazása szempontjából ígéretesnek tűnő MM6 leukémia és LM2 emlő adenokarcinóma sejteken is elvégeztük.

Az *R*-deprenyl hatásspektruma meglehetősen összetett, mikromolós tartományban koncentrációfüggő MAO-B gátló hatása dominál, míg 10^{-9} M és kisebb koncentrációkban

elsődlegesen, a MAO-B gátlástól független antiapoptotikus, antioxidáns tulajdonsága a jellemző [73, 82, 103]. Az *R*-deprenyl adhéziót fokozó hatása ugyan egyaránt megmutatkozott alacsony (10^{-12} M) és magas – klinikailag releváns 10^{-6} M – koncentrációban, a kemotaxis/migrációra kifejtett hatásában azonban már megfigyelhető volt a fent említett bifázisos jelleg. A MAO-B gátláshoz szükséges 10^{-6} M-ban repellens/migrációt csökkentő hatása dominált, míg alacsonyabb, 10^{-9} – 10^{-12} M dózisban – ahol már az *R*-deprenyl érdemleges MAO-B gátló hatással nem rendelkezik – jelentős kemoattraktáns hatásának bizonyult leukémia modellen és ezzel összhangban fokozta az LM2 adenokarcinóma sejtek migrációs készségét. Korábban Jenei és munkatársai kimutatták, hogy az *R*-deprenyl koncentrációfüggő módon fokozza mind a neuronális (PC-12), mind nem idegrendszeri eredetű (NIH3T3) sejtek asszociációját (sejt-sejt adhézióját). Vizsgálataik szerint az *R*-deprenyl hatékonyabbnak bizonyult az utóbbi sejtvonal esetén, valamint a tumorsejteket reprezentáló EGFR-t (epidermális növekedési faktor receptor) túltermelő NIH3T3/EGFR rendszerben még további aktivitás fokozódást tudtak kimutatni [23, 73, 86, 92]. Az *R*-deprenyl sejtbioológiai hatásával kapcsolatos eredményeink is megerősítik a vegyület általános, nem kizárólag idegrendszer-specifikus hatásairól szóló irodalmi adatokat, valamint újabb lehetséges hatásmechanizmust vetnek fel, amely magyarázatot adhat az *R*-deprenyl jótékony hatására különböző kórképekben.

Eredményeink arra utalnak, hogy a sejtmozgásra kifejtett hatás elérésében a vegyület konformációjának fontos szerepe lehet. Az *S*-deprenyl, az *R*-izomerhez képest, hasonlóan a Tetrahymena modellen kapott eredményünkhöz, ellentétes kemorepellens (MM6) és migrációt gátló (LM2) hatást váltott ki. Érdekes módon az *S*-enantiomer is pozitívan hatott mindkét modell-sejt kitapadására, ráadásul ez a hatás a monocita sejteken szignifikánsabb volt, mint az *R*-deprenylé. Az *S*-deprenyl fokozottabb aktivitása nem egyedülálló, protektív hatása erősebb a DSP-4 noradrenalin depletáló hatásánál [218], hatékonyabban gátolja a MAO-A enzimet [219], és noradrenalin felszabadító hatása is kifejezettebb, mint az *R*-módosulaté [77].

A metabolitok adhéziót befolyásoló és migrációs viselkedéséből egyrészt arra tudunk következtetni, hogy az aminocsoport szubsztituáltsága meghatározó a hatások előidézése szempontjából. A tapasztalt változások hátterében álló pontos mechanizmusokat még nem ismerjük, de korábbi eredményeink alapján okunk van feltételezni, hogy az egyes fiziko-kémiai paraméterek (pl. töltéseloszlás, logP –

megoszlási hányados, TPSA – poláris felszín), ill. méretbeli eltérések is részben meghatározóak lehetnek [220, 221]. Eredményeink másrészt arra is felhívják a figyelmet, hogy az *R*-deprenyl sejtbiológiai hatásainak előidézésében a metabolitjainak is jelentősége lehet. Az *R*-amfetamin aktivitása mindkét modell-sejt esetén megközelíti az anyavegyület hatékonyságát, bár eltérő koncentrációkban bizonyultak hatásosnak, az *R*-deprenyl-*N*-oxid hatásprofiljának hasonlósága azonban csak LM2 sejteken jelentkezett. Több vizsgálatban is igazolódott, hogy az *N*-oxidált metabolit osztozik az anyavegyület MAO-B gátló, antiapoptotikus [85, 100], neuroprotektív (noradrenerg neurotoxinnal szemben) [77], sejt-sejt adhéziót fokozó hatásával [23]. Az *R*-deprenyl hatása valószínűleg nem feltételezi az *N*-oxidált metabolit keletkezését, PC12 sejtvonalon a FMO gátlása mellett (metamizol) az *R*-deprenyl szignifikáns sejt-sejt adhéziót fokozó hatása volt kimutatható [98]. Ugyanakkor, az *R*-deprenyl-*N*-oxid hidroxilamin csoportja képes relatíve könnyen visszaredukálódni aminná, azaz *R*-deprenyllé [85, 222]. Így a tapasztalt hatásért lehetséges, hogy nem a metabolit, hanem maga az *R*-deprenyl felelős. A visszaredukálódás üteme különböző lehet a két sejtvonal esetén, ami magyarázatot adhat a sejtvonalokon kapott eltérő eredményekre is.

15. táblázat: Deprenyl származékok adhéziót befolyásoló és kemotaxisra /migrációra kifejtett hatása MM6 monocita és LM2 adenokarcinóma sejtvonalakon

Deprenyl származékok	Adhézió		Kemotaxis/migráció			
	MM6	LM2	MM6		LM2	
<i>R</i> -deprenyl	+	++	+++	-	++	-
<i>S</i> -deprenyl	+	+	--		--	
<i>R</i> -dezmetildeprenyl	--	(-)	--		-	
<i>R</i> -metamfetamin	--	-	-		--	
<i>R</i> -amfetamin	+	+	-	++	++	
<i>R</i> -deprenyl- <i>N</i> -oxid	--	+++	-		++	
<i>p</i> -fluoro- <i>R</i> -deprenyl	+	(-)	--		+	-
<i>p</i> -fluoro- <i>S</i> -deprenyl	++	--	++		++	
<i>R</i> -metildeprenyl	-	0	-		-	
<i>R</i> -dimetildeprenyl	-	0	+	-	(+)	

+: adhéziót növelő vagy kemoattraktáns/migrációt fokozó hatás; -: adhéziót csökkentő vagy kemorepellens/migrációt csökkentő hatás, 0: semleges hatás, (+) (-): jelzésértékű, nem szignifikáns hatás. Az osztott cellákban az alacsony (10^{-12} , 10^{-9} M) és magas (10^{-6} M) koncentrációkban tapasztalt eltérő hatások külön jelöltük.

A para-fluoro származékok adhéziót fokozó hatása csak leukémia modellen jelentkezett, és ez esetben is az *S*-izomer bizonyult hatásosabbnak. Ez az aktivitásbeli különbség LM2 sejteken is megfigyelhető, bár ellentétes, adhézió csökkenésben

nyilvánult meg. A vegyületek kemotaktikus és migrációra kifejtett hatásában nem tapasztaltunk hasonló eltérést, mindössze a hatások koncentrációfüggése volt különböző.

A magasabb rendű modell-sejteken kapott eredményeink összefoglalását a 15. táblázat tartalmazza. Amint látható, az esetek nagy százalékában egyező válaszokat kaptunk, azonban egyes esetekben a két sejttípus eltérő érzékenységet mutatott. Jelentősebb eltéréseket az *R*-deprenyl-N-oxid és a szintetikus származékok viselkedésében találtunk. A hatások előjele és mértéke is eltért a különböző sejtvonalakon, ami arra utal, hogy a vegyületeknek különösen a sejt-ECM adhézióra kifejtett hatása nemcsak a koncentrációra, hanem egyéb sejttípusfüggő faktorokra is visszavezethető. Ez a különбözőség adódhat a sejttípusok eltérő adhéziós viselkedéséből is. Ebből adódóan a deprenyl származékok különbözőképpen befolyásolhatják az adhéziós fehérjék szintézisét és a plazmamembránban történő expresszáldását [83, 98].

A pontos hatásmechanizmus felderítése ugyan még további vizsgálatokat igényel, néhány következtetést a fenti adatok birtokában is levonhatunk. Az esetek többségében az egyes deprenyl derivátumok már olyan alacsony koncentrációban is képesek voltak a sejtek adhéziójának és kemotaxis/migrációjának befolyásolására, amelyben már nem gátolják a MAO-B enzimet, így valószínűsíthető, hogy hasonlóan számos perifériás hatáshoz (pl. antiapoptotikus hatás [98]), a MAO-B enzim gátlásától független módon képesek a sejtek adhéziójának és kemotaxisának befolyásolására.

5.1.2.1. Kemotaxis-adhéziós arány

A tumorprogresszió során az áttétképzésben az egyik első meghatározó lépés a daganatsejtek adhéziós kapcsolatainak meggyengülése, és ezzel egyidőben a migrációs aktivitásuk fokozódása. E két esemény lényegében biztosítja a sejtek leválását és környező szövetekbe történő vándorlását. A sejtek adhéziós és migrációs fenotípusa az áttétképzés későbbi szakaszaiban, intra- és extravazációban, valamint az új szöveti térben történő vándorlásban is kiemelt szereppel bír. A sejt és az extracelluláris mátrix elemei között kialakuló kölcsönhatások létrejötte elengedhetetlen a sejtek elmozdulásához és a kialakult kapcsolatok erőssége alapvetően befolyásolja a migráció sebességét. A fokozott és a kismértékű adhéziós kapcsolat egyaránt a migráció csökkenéséhez vezet és inkább a sejtek helyben tartásának kedvez. Az előbbi esetben a mozgó sejtek szubsztrátumról történő elválása nehezített, míg az utóbbi esetben a

gyenge húzóerő vezet a migráció lassulásához, elmaradásához [4, 223]. A mikrokörnyezetben jelenlévő autokrin/parakrin kemotaktikus ligandok hatása és a daganatsejtek önálló motilitáskészsége (citoszkeletális átrendeződés, polarizált sejthalak kialakulása) is hozzájárul a sejtek irányított elmozdulásához a metasztatikus folyamat korai és késői eseményei során [27]. Tehát nem elegendő egyedül az adhézión keresztül beavatkozni a folyamatba a sejtek migrációs hajlamát is szabályozni kell, ahhoz, hogy eredményesen gátolni tudjuk a daganatsejtek szóródását. Elsődleges cél, hogy a metasztázisképzés korai eseményeibe tudjunk beavatkozni, így a primer tumor szintjén az adhézió fokozásán és a kemotaxis/migráció gátlásán keresztül megakadályozni a sejtek leválását, invázióját, és ezáltal megelőzni a távoli áttétek kialakulását. Amennyiben már megtörtént a daganatsejtek szóródása akkor a keringő tumorsejtek megtapadásának és kemotaktikus/migrációs aktivitásának csökkentésén keresztül nyílhat lehetőség a sejtek új szöveti környezetben történő kolonizációjának gátlására.

A deprenyl derivátumok antimetasztatikus hatásának értékelése a vegyületek sejtheadhézióra és kemotaxis/migrációra kifejtett hatásainak viszonyán alapul. Ennek jellemzésére szolgál a kemotaxis-adhézión arány (chemotaxis-adhesion ratio), vagy röviden CAR ($CAR = \text{kemotaxis [Ktx. ind.]} / \text{adhézió [Slope]}$) [224]. Ez az érték egy ideális antimetasztatikus ágens esetén, amely a primer tumor szintjén hatva fokozni tudja a sejtek adhézión és ezzel párhuzamosan kemorepellens/migrációt csökkentő hatású, egynél jóval kisebb szám ($CAR < 0,8$). A tumorprogresszió a sejtheadhézió és a migráció megváltozása mellett számos egyéb tényező (pl. sejtosztódás) együttes hatásának következménye. Így a vegyületek lehetséges tumorelles, antimetasztatikus karaktere a proliferációra kifejtett hatásukkal együtt elemezhető igazán.

Összesítve az eredményeket látható, hogy az *R*-deprenyl MAO-B gátláshoz szükséges koncentrációja (10^{-6} M) esetén ez a CAR érték (**16. táblázat**) egynél jóval kisebbnek adódott mindkét modell-sejten (CAR_{MM6} : 0,58; CAR_{LM2} : 0,55). Az *R*-deprenyl antiproliferatív hatását is figyelembe véve elmondható, hogy a klinikai szempontból elérendő célkoncentrációban képes lehet gátolni a tumorsejtek osztódását és szóródását. A leukémia modell-sejt (MM6) esetén az *R*-deprenyl alacsonyabb koncentrációiban tapasztalt igen magas CAR értékei (CAR_{MM6} : 10^{-12} M – 2,34, 10^{-9} M – 4,32) arra utalnak, hogy a kemotaktikus aktivitás a domináló. Mindazonáltal a 10^{-9} M *R*-deprenyl szignifikáns sejtszámcsökkentő hatása is megfigyelhető volt, ami

ellensúlyozhatja a metasztázisképzés szempontjából kedvezőtlen hatáseggyüttest. Bár az S-deprenyl nem rendelkezett antiproliferatív hatással, azonban mindkét modell-sejten a teljes koncentráció tartományra kiterjedő alacsony CAR értékek (CAR_{MM6} : 0,55-0,35-0,54; CAR_{LM2} : 0,55-0,69-0,15) arról tanúskodnak, hogy az antimetasztatikus hatás szempontjából hatékonyabb, mint az R-módosulat (**16. táblázat**).

16. táblázat: Deprenyl származékok MM6 és LM2 modell-sejteken jellemző CAR értékeinek összefoglalása

Deprenyl származékok	Kemotaxis/migráció-adhézió arány (CAR)					
	MM6			LM2		
	10^{-12} M	10^{-9} M	10^{-6} M	10^{-12} M	10^{-9} M	10^{-6} M
R-deprenyl	2,34	4,32	0,58	0,97	0,93	0,55
S-deprenyl	0,55	0,35	0,54	0,55	0,69	0,15
R-dezmetildeprenyl	0,38	0,66	1,71	1,16	0,88	1,07
R-metamfetamin	2,09	1,72	1,06	0,85	0,45	1,06
R-amfetamin	0,46	0,41	1,69	1,67	1,43	1,02
R-deprenyl-N-oxid	1,48	2,15	0,71	0,82	0,87	0,84
p-fluoro-R-deprenyl	0,15	0,76	0,94	1,58	2,00	0,58
p-fluoro-S-deprenyl	0,56	0,58	1,28	3,01	1,13	2,05
R-metildeprenyl	0,65	1,41	0,44	0,96	1,05	0,77
R-dimetildeprenyl	2,13	2,17	0,62	0,95	1,25	0,94

adhéziót fokozó hatás, kemorepellens/migrációt csökkentő hatás,

A szürke kiemelés az antimetasztatikus hatás szempontjából kedvező hatás kombinációt jelöli.

Eredményeink szerint a keletkező metabolitok összességében hozzájárulhatnak az alapvegyület tumorellenes hatásához: (i) az R-amfetamin adhéziót fokozó hatása leukémia modellen kemorepellens hatással párosult; (ii) az R-metamfetamin antiproliferatív hatással rendelkező monocita sejteken; (iii) abban az esetben, ha már megtörtént a sejtek szóródása az R-dezmetildeprenyl és az R-metamfetamin adhéziót csökkentő és kemorepellens/migrációt gátló hatása a keringő tumorsejtek megtapadását extravazációját gátolhatják. Az amfetamin-szerű metabolitok tekintélyes mennyiségben keletkeznek az emberi szervezetben, az R-deprenyl dózisának 16-30%-a R-metamfetaminná, 7-11%-a R-amfetaminná és 1-2%-a R-dezmetildeprenyllé alakul, így vizsgálatainkban megfigyelt hatásaik, összességükben is számottevők lehetnek [77].

A para-fluoro származékok hatása ellentmondásos, aktivitásuk az áttétképzés gátlása szempontjából elmaradt a referencia vegyületekétől (R- és S-deprenyl). Leukémia modell-sejten a legkisebb vizsgált koncentrációban kapott alacsony CAR index a p-fluoro-R-deprenyl esetén erős repellens jellegéből adódik, és kevésbé

vezethető le adhéziót fokozó hatásából (**16. táblázat**). LM2 sejtvonalon egyik fluorozott enantiomer sem rendelkezett a kívánt hatásprofillal. Kiemelendő azonban, hogy az antiproliferatív hatás tekintetében ez a szerkezeti módosítás hatékonynak bizonyult, mindkét izomer képes volt gátolni a sejtek osztódását. Az antiproliferatív hatások időbeli lefutását tanulmányozva látható, hogy egyedül a *p*-fluoro-*S*-deprenyl őrizte meg hosszútávon sejtosztódást gátló jellegét, a többi származék esetén a detektált hatások nem bizonyultak irreverzibilisnek, 72 órára a sejtek „kiheverték” azt. A jelenségre magyarázatot adhat, hogy a vegyületek citotoxikus, antiproliferatív hatásuk következményeként beindíthatják a sejtek védekező, antiapoptotikus folyamatait [225]. Ehhez hozzáadódhat a deprenylek hosszú távú antiapoptotikus aktivitása, ami végeredményben kompenzálni tudja a vegyületek korai sejtszámcsökkentő hatását.

5.2. GnRH-III peptid-származékok

5.2.1. Természetes és szintetikus GnRH peptidek hatása *Tetrahymena* sejteken

Az utóbbi évtizedek vizsgálatai nyomán számos magasabb rendű szignálmolekuláról derült ki, hogy képes specifikusan befolyásolni a *Tetrahymena* élettani folyamatait. Ilyen élettani reakció a *Tetrahymena* mozgási viselkedésében bekövetkező változás. A ligand, minőségének (kémiai természete, térbeli elhelyezkedése) és erősségének függvényében, pozitív, illetve negatív irányú vektoriális elmozdulást, azaz kemotaktikus választ eredményezhet, vagy a sejt általános mozgásállapotában – úszási sebességében, irányváltások gyakoriságában –, idézhet elő random jellegű, azaz kemokinetikus változást [175, 220]. Ez a két folyamat nem határolható el élesen egymástól. A *Tetrahymena* az attraktáns ligand körül kialakuló akkumulációt, vagy a repellens anyag elkerülését az úszási sebesség és az elfordulások frekvenciájának szabályozásával valósítja meg [226, 227]. Céljaink között szerepelt annak megválaszolása, hogy a vizsgált GnRH peptidek attraktáns, vagy repellens hatása mennyiben képezhető le a *Tetrahymena* sejtek úszási viselkedésében bekövetkező változásokkal, és ezek a hatáspárosok általános érvényűnek tekinthetőek-e egy tetszőleges attraktáns vagy repellens anyag vizsgálata során.

5.2.1.1. GnRH peptidek kemotaktikus hatás

A Tetrahymena reakciói nem esetlegesek, érzékeny válaszkészsége jól felhasználható egy kérdéses anyag kemotaktikus hatásának feltérképezésére. Például, a professzionális kemotaktikus molekulák (pl. IL-8, RANTES) attraktáns hatásai megközelítően ugyanazokban a koncentrációkban (1-100 ng/ml) nyilvánultak meg Tetrahymenában, mint amiben ezek a fehérjék az emberi szervezetben is hatékonyak [48]. A GnRH hormonok, bár elsődlegesen nem hatnak a sejtek mozgására, azonban, mint autokrin szabályozó szignálok, az egyedfejlődés során kemoattraktáns hatásuk révén vezérlik a GnRH termelő neuronok hipotalamuszba történő vándorlását [228]. Ezzel összhangban az eredményeink is azt mutatták, hogy a GnRH peptidek képesek már a Tetrahymena kemotaxisának indukálására is. Az egysejtű modell széles skálán képes kemotaktikus válaszával különbséget tenni a vizsgált, kisebb-nagyobb szerkezeti eltérést mutató GnRH származékok között. A Tetrahymena szerkezet- és szekvenciafüggő reakciója már korábbi vizsgálatokban (vazopresszin – oxitocin [220], bradikinin és származékai [229], endotelinek [230]) is megfigyelhető volt. A természetes GnRH hormonok kemotaktikus hatásbeli eltéréseinek okai az 5.-8. pozíció eltérő aminosav összetételében keresendők. Az itt található aminosavak a biológiailag aktív szerkezet, és ezáltal a hatás kialakulásában játszanak szerepet [108]. A GnRH-II esetén ebben a központi régióban nagyobb az aromás aminosavak aránya (Tyr⁶-Trp⁷), ami – alapul véve munkacsoportunk korábbi, az aromás aminosavak egyöntetű kemorepellens hatását leíró eredményeit [221] – felelős lehet a hormon széles koncentráció tartományra kiterjedő kemorepellens hatásáért. Annak lehetősége, hogy egy nagyobb peptid kemotaktikus hatását akár egy aminosav is képes alapvetően meghatározni, már korábbi vizsgálatainkban is bizonyítást nyert Tetrahymena esetén. Az SXWS peptidek kemotaktikus hatása nagy átfedést mutatott az X helyen lévő aminosav hatásával. A szerkezeti modellezés eredménye is megerősítette az X aminosav kiemelt szerepét a receptorkötésben [231]. A GnRH-III fragmensek eredményeiből is kitűnik, hogy az N-terminális aminosav kémiai karaktere alapvetően meghatározza a molekula kemotaktikus jellegét. Ez esetben is megfigyelhető volt, hogy az aromás aminosav (Ac-WSHDWKPG-NH₂) N-terminális elhelyezkedése kemorepellens hatással párosul. A láncvégi aminosav meghatározó szerepe sem számít egyedi jelenségnek, szignifikáns hatáscsökkenés volt tapasztalható a láncvégi triptofán jelenlétében az SXWS és WSXWS molekulacsalád kemotaktikus aktivitásának összehasonlításakor [232].

A különböző összetételű monomer és dimer származékok eredményei azt jelzik, hogy a Lys⁸ oldalláncának módosítása a GnRH-III natív kemotaktikus hatását az oldallánc méretének, valamint dimer származékok esetén a kapcsoló régió hosszának és kémiai módosításának (acetilálás) függvényében képes befolyásolni. A kemoattraktáns hatás szempontjából két GnRH-III közvetlenül diszulfid hídon keresztül történő összekapcsolása ([GnRH-III(C)]₂) bizonyult hatékonynak, míg a 'GFLG' szekvencia beépítése a dimerbe ([GnRH-III(CGFLG)]₂), ezt a hatást az ellentettjére fordította. A linker régió acetilálása azonban, mindkét esetben ([GnRH-III(Ac-C)]₂, [GnRH-III(Ac-CGFLG)]₂) a hatás elvesztésével társult. A tapasztalt hatások eltérő voltának pontos okát nem ismerjük, azonban a korábbi kísérletek alapján okunk van feltételezni, hogy az egyes derivátumok méretbeli eltérései, valamint a töltéseloszlásbeli változások magyarázhatják a tapasztaltakat [133, 220, 221].

5.2.1.1.1. GnRH származékok által kiváltott kemotaktikus jelátvitel

A GnRH származékok indukálta specifikus válaszreakciók egyben a sejt receptoriális érzékenységre és a jelátviteli útvonalak jelenlétére, indukálhatóságára hívják fel a figyelmet. A GnRH származékok hatására aktiválódó másodlagos hírvivők száma nagy. Ezek közé tartozik a Tetrahymenában is kimutatott PLC – IP3 – Ca²⁺ rendszer és a PI3K hatására keletkező inozitol foszfolipidek [121, 188, 189]. A PLC és PI3K szerepet játszik a Tetrahymena intracelluláris kalcium szintjének szabályozásában, amely a csillós mozgás indukálásán keresztül a kemotaxis, míg a mikrofilamentáris rendszer befolyásolása révén a szekréció és a fagocitózis folyamatában vesz részt. Specifikus enzim inhibitorok hatására ezek a fent említett jelenségek gátolhatók, mely a PLC és PI3K hatásainak karakterizálására is jól felhasználható [189, 233].

A PLC aktiválódása (foszforilációja) egyik kemoattraktáns GnRH peptid esetén sem volt kimutatható, így az általa közvetített jelátviteli út vélhetően nem játszik szerepet a peptidek kemotaktikus hatásának kiváltásában. Ezzel szemben a PI3K részvétele a GnRH-III származékok által kiváltott kemotaktikus jelátvitelben igazolható volt, bár a gátlószerekkel történő előkezelés eltérő hatékonyságú volt az egyes peptidek esetén. A fentiek értelmében úgy tűnik, hogy a GnRH-III peptidek nem csupán a Tetrahymena kemotaxisát képesek kiváltani, hanem e reakció intracelluláris szignalizációja is a magasabb rendű sejtekben (tumorsejtekben) már megismert útvonalon halad [121].

5.2.1.2. GnRH peptidek kemokinetikus hatása

Amint azt a 5.1.1.2 fejezetben bemutattuk, a *Tetrahymena* mozgása az egyenes vonalú úszási szakaszok és az azokat megszakító elfordulások eltérő arányú kombinációjából áll össze. Korábbi megfigyelések szerint az attraktáns anyagok (pl. proteose pepton) azáltal, hogy az irányváltások számát csökkentik, a sejtek gyors, egyenes vonalú haladását idézik elő, míg a repellens anyagok (pl. citronellol) hatására emelkedik az elfordulások száma, a sejtek mozgása lelassul és a kanyarulatosabbá válik [226].

A szignifikáns kemotaktikus tulajdonságú GnRH származékok, valamint a glikoprotein típusú TSH és gonadotropin hatására a sejtek mozgási sebessége és a megtett útvonal kanyarulatossága – a szerotonin példáján már bemutatott módon – döntően ellentétes irányba változott. A sejtek nagyobb úszási átlagsebessége mellett az egyenes vonalú előrehaladás (alacsony tekervényesség) volt megfigyelhető. A vizsgált kemorepellens anyagok egységesen, az irodalmi adatokkal összhangban, a sejtek lassú, kanyargós úszását eredményezték. Ez arra enged következtetni, hogy a repellens molekulák, sejtszintű adaptációs folyamatokat indíthatnak be, hasonlóan a baktériumok kemotaxisánál leírt bukdácsoló (tumbling) jelenséghez [226]. Az attraktáns anyagok hatása azonban nem bizonyult ennyire konzekvensnek, a [GnRH-III(C)]₂ dimer, a kontrollhoz hasonlóan, inkább a sejtek gyors előrehaladását váltotta ki. Az Ac-SHDWKPG-NH₂ fragmens volt az egyedüli kivétel a vizsgált ligandok közül, ahol a két úszási paraméter esetén megfigyelt kapcsolat nem érvényesült. A sejtek elmozdulását a lassú, de többnyire egyenes vonalú kúszás jellemezte.

Általánosnak tekinthető összefüggést találtunk a vizsgált ligandok kemotaktikus és kemokinetikus aktivitása között. Ezt az is megerősíti, hogy a különböző szerkezetű ligandok – a peptidek közé sorolt GnRH származékok és gliporoteín típusú tróphormonok – kemotaktikus tulajdonságuknak megfelelően, azonos módon hatottak a sejtek úszási (pl. kemorepellens – lassú, kanyarulatos úzás) viselkedésére.

5.2.1.3. GnRH-III származékok hatása a *Tetrahymena* hormontartalmára

A hipotalamo-hipofízisális hormonok hatása nem csupán a sejtek mozgásának befolyásolásában nyilvánulhat meg. A TSH, kemorepellens hatása mellett, hasonlóan az emlősökben leírt elsődleges hatásához, képes volt emelni a *Tetrahymena*-ban is a T₃ mennyiségét [176]. Ezek az adatok azt is előre vetítik, hogy a *Tetrahymena* hormonális

(GnRH peptidek, tróphormonok) stimulusra reagálva képes lehet az endogén anyagainak szekréciójára is. Az ily módon szecernált hormonok, az ismert kemotaktikus és kemokinetikus hatásaik révén [48, 168, 234], indirekt módon is befolyásolhatják a GnRH származékok közvetlen kemotaktikus/kemokinetikus hatását [175]. A 17. táblázatban a vizsgált GnRH származékok kemotaktikus (4.2.1.1 fejezet) és hormontartalomra (4.2.1.3 fejezet) kifejtett hatásáról szóló eredményeket foglaltam össze.

17. táblázat: GnRH származékok és tróphormonok kemotaktikus és hormontartalomra kifejtett hatása *Tetrahymena* sejteken [49, 168, 234]

Vizsgált ligandok	Ktx.	Hormontartalom				
		T3	Hisztamin	Szerotonin	Adrenalin	Endorfin
		rep ^z /attr ^y	attr ^z	rep ^y	neut	attr ^x
GnRH-I	(attr)	0	+	0	0	+
GnRH-III	(rep)	+	0	-	0	++
[GnRH-III(C)] ₂	attr ^y	0	++	-	--	+
[GnRH-III(CGFLG)] ₂	rep ^x	-	++	0	--	0
Ac-SHDWKPG-NH ₂	attr ^y	0	++	-	--	-
Gonadotropin	rep ^y	-	+	0	-	0
TSH	rep ^y	+	0	0	-	0

Ktx.: kemotaktikus hatás; attr.: attraktáns; rep.: repellens, +: hormonszint fokozó hatás; -: hormonszint csökkentő hatás; 0: neutrális hatás, szignifikancia: x – p < 0,05; y – p < 0,01.

A GnRH-III dimer ([GnRH-III(C)]₂, [GnRH-III(CGFLG)]₂) és fragmens (Ac-SHDWKPG-NH₂) származékai, kemotaktikus karakterüktől függetlenül, elsősorban a hisztamin és az adrenalin mennyiségét befolyásolták, az előbbi pozitív, míg az utóbbit negatív irányban. Ezzel szemben a természetes hormonok (beleértve a TSH és FSH-t is) vagy nem hatottak, vagy a szintetikus származékokhoz képest kisebb mértékű hatást fejtettek ki erre a két hormonra. A kemoattraktáns és repellens anyagok között az endorfin és szerotonin mennyiségére kifejtett hatásokban mutatkozott valamennyi különbség (17. táblázat). A kemorepellens anyagok semleges hormonális hatásukkal ebben az esetben is egységesebb csoportoknak bizonyultak. A kemoattraktáns peptidek zöme, bár eltérő aktivitással, a kemoattraktáns endorfin koncentrációját fokozták, míg a repellens szerotoninét csökkentették. A vizsgált ligandok kemotaktikus és a hormontartalomra kifejtett hatásaik között egyértelmű korreláció nem állapítható meg. Általánosságban elmondható azonban, hogy a kemoattraktáns anyagok egyrészt kemotaktikus aktivitásbeli (Ktx. ind.: [GnRH-III(C)]₂ – 236,8%; Ac-SHDWKPG-NH₂ – 144,0%; GnRH-I – 129,9%), másrészt úszási viselkedésre kifejtett hatásukban tapasztalt különbségek

hátterében részben az állhat, hogy parakrin hatásuk révén közvetett módon is befolyásolhatják a *Tetrahymena* migrációs reakcióját.

Azt is érdemes kiemelni, hogy a vizsgált peptidek és proteinek hatása nem volt specifikus egy adott hormonra. Például a TSH nem kizárólag a T3 szintjét befolyásolta, ami a fő feladata lenne a magasabb rendű szervezetekben, hanem a *Tetrahymena* adrenalin mennyiségét is. A vizsgált ligandok általános jellemzője, hogy ellentétesen befolyásolták az egyes hormonok mennyiségét, például a hisztamin szintet fokozták, míg az adrenalinét csökkentették. Ez a kettősség egyrészt annak lehet a következménye, hogy két különböző receptoron keresztül közvetítődik a két különböző hatás, de lehet, hogy egy receptor által aktivált szignáltranszdukció a géneket ellentétes irányban befolyásolja (egyiket bekapcsolja, másikat kikapcsolja) [175]. Mindazonáltal, a GnRH származékok szelektív, szerkezettől függő, sokszor ellentétes irányú hatásai a *Tetrahymena* kemotaktikus és endokrin reakciójában egyaránt megmutatkoznak, és egyben a *Tetrahymena* érzékeny receptív tulajdonságára engednek következtetni.

5.2.2. GnRH-III származékok és hatóanyag-tartalmú konjugátumaik sejtbíológiai hatása MM6 modell-sejteken

A irányított tumorterápiában ígéretes lehetőség olyan GnRH-III alapú hatóanyag-szállító rendszerek alkalmazása, amelyek képesek gátolni a tumorok növekedését és áttétképzését is. A tumorelles hatásért a szállított citotoxikus/citosztatikus jellegű hatóanyag felelős, míg az antimetasztatikus aktivitása a konjugátumnak az adhéziora és a kemotaxisra kifejtett hatásaiból következik. Munkám során azt vizsgáltam, hogy a targetáló GnRH-III származékok önmagukban, valamint hatóanyag-szállító konjugátum részeként rendelkeznek-e antimetasztatikus potenciállal, azaz képesek-e befolyásolni a tumorsejtek adhézior és kemotaktikus viselkedését, valamint a konjugátumok rendelkeznek-e a szabad hatóanyagra jellemző tumorelles hatással.

5.2.2.1. Irányító hatással rendelkező GnRH-III származékok hatása

Korábbi vizsgálatokban igazolták, hogy a tumorsejt specifitász és az antiproliferatív jelleg kedvezően ötvöződik a GnRH-III esetén [132, 135]. A diszulfid hidat tartalmazó GnRH-III dimerek a tumorelles hatás szempontjából hatékonyabbnak, a proteázokkal szemben stabilabbnak, míg endokrin hatás tekintetében gyengébbnek bizonyultak, mint

maga a GnRH-III [133, 137, 235]. Internalizációs vizsgálatok alapján, a GnRH-III és dimer származékai mellett az N-terminális felől rövidített GnRH-III fragmensek is ígéretes tumor targetáló egységei lehetnek a hatóanyag-szállító rendszereknek [236].

A GnRH peptidek adhéziót befolyásoló hatása egy általános, a hormonok szekvenciája által meghatározott tulajdonság. Egy kivételtől (Ac-SHDWKPG-NH₂) eltekintve mindegyik vizsgált peptid fokozta a MM6 sejtek kitapadását, bár a hatások mértékében és koncentrációfüggésében mutatkozott kisebb különbség. Ezzel szemben monocita modell-sejtünk kemotaktikus aktivitása érzékenyebben követte az egyes szerkezeti változásokat. A GnRH-II és GnRH-III jellegzetes bifázisos – nagy koncentrációkban (10^{-7} - 10^{-6} M) attraktáns, míg alacsonyabb tartományban (10^{-11} - 10^{-9} M) repellens – kemotaktikus választ váltott ki. Erre a kettős hatásprofilra az a tanulmány szolgálhat magyarázattal, amelyben triciált GnRH-III receptorkötési vizsgálatával kimutatták, hogy a tumorsejtek membránjában különböző affinitású, a GnRH-III felismerésére képes kötőhelyek vannak jelen [130]. Feltételezhető, hogy a hormon koncentrációjától függően képes kötődni a kis vagy a nagy affinitású receptorhoz, és mind mennyiségében, mind minőségében eltérő választ indukálni.

A GnRH-III fragmensek MM6 sejteken mutatott kemotaktikus hatása, hasonlóan a Tetrahymenán tapasztalt összefüggésekhez (18. táblázat), az N-terminálison lévő aminosav fiziko-kémiai karakterének fontosságára hívja fel a figyelmet. Az eredményekből az is látható, hogy a fragmens mérete is számottevő hatással bír. Az első két aminosav hiányában az Ac-HWSHDWKPG-NH₂ és Ac-WSHDWKPG-NH₂, az N-terminális aminosav karakterétől függően szignifikáns kemotaktikus aktivitással, és a GnRH-III-ra jellemző, adhéziót fokozó hatással rendelkezett. A legkisebb vizsgált Ac-SHDWKPG-NH₂ fragmens ezzel szemben neutrális/gyenge kemorepellens viselkedése mellett hosszú távon csökkentette a sejtek kitapadását. Feltételezések szerint a Trp³ fontos szerepet játszik a hormon-receptor kölcsönhatásban és a GnRH-III tumorelles hatásának kiváltásában. Így hiánya, vagy módosítása (pl. formilálása [134]) nemcsak a GnRH-III sejtosztódásra kifejtett hatását, hanem az adhézióra és kemotaxisra gyakorolt hatását is befolyásolhatja. Munkacsoportunk korábbi eredményei is azt mutatták, hogy a viszonylag rövid peptidek kemotaktikus hatásában, az N- és C-terminális régió, módosítása (acetilálása), hosszabbítása, hasonlóan a Tetrahymena esetén tapasztaltakkal, karakterisztikus változást eredményez a magasabb rendű sejtek reakciójában is [237].

18. táblázat: GnRH származékok kemotaxisra kifejtett hatása *Tetrahymena* és MM6 modell-sejteken

GnRH peptid	Kemotaxis			
	MM6		Tetrahymena	
	10^{-11} - 10^{-9} M	10^{-12} - 10^{-9} M	10^{-12} - 10^{-9} M	10^{-8} - 10^{-6} M
GnRH-I	+	0	0	(+)
GnRH-II	-	+	-	0
GnRH-III	-	++	0	++
Ac-HWSHDWKPG-NH ₂	(-)	-	++	+
Ac-WSHDWKPG-NH ₂	+	0	-	-
Ac-SHDWKPG-NH ₂	(-)	(-)	0	+
GnRH-III(Ac-C)	---	---	0	--
GnRH-III(Ac-CGFLG)	++	--	+	0
[GnRH-III(C)] ₂	--	++	+++	+
[GnRH-III(Ac-C)] ₂	-	++	(+)	0
[GnRH-III(CGFLG)] ₂	++	0	--	--
[GnRH-III(Ac-CGFLG)] ₂	-	-	0	(+)

+: kemoattraktáns hatás; -: kemorepellens hatás, 0: neutrális hatás, (+) (-): jelzésértékű, nem szignifikáns hatás.

A GnRH-III Lys⁸ oldalláncának módosítása, és az így kialakított monomerek dimerre kapcsolása a monocita sejtek kemotaktikus reakcióját hasonló módon, bár eltérő mértékben befolyásolta, mint a *Tetrahymena* modell esetén (18. táblázat). Amíg a rövid oldalláncú GnRH-III(Ac-C) monomer mindkét modell sejten intenzív repellens hatást mutatott, addig a belőle felépülő [GnRH-III(C)]₂ dimer attraktáns hatása kisebb mértékű volt a leukémia modellen és csak a nagy koncentrációkra korlátozódott. A 'GFLG' távtartót tartalmazó peptidek MM6 sejteken is ellenkező kemotaktikus választ indukáltak, mint a rövid oldalláncot/linker régiót hordozó származékok. Érdekes kiemelni, hogy a [GnRH-III(C)]₂ és a [GnRH-III(Ac-C)]₂ dimerek kemotaktikus hatásában hasonló bifázisos jelleg (10^{-11} - 10^{-9} M: repellens, 10^{-7} - 10^{-6} M: attraktáns) volt megfigyelhető, mint azt a GnRH-III példáján láttuk. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy maga a GnRH-III hormonrész felelős a dimerek receptorkötéséért és kemotaktikus hatásáért. Különböző szerkezetvizsgálatok során (CD, FTIR és NMR) kimutatták, hogy nincs szignifikáns eltérés a GnRH-III és a dimer származékainak térszerkezetei között. Így a monomerek és a dimerek között megfigyelt hatásbeli eltérések – pl. a [GnRH-III(Ac-C)]₂ emelkedett kemoattraktáns és adhéziót serkentő hatása a nem acetilált dimerpárjához képest – inkább magyarázhatóak, töltéseloszlásbeli, mintsem térszerkezeti változásokkal [133]. A korábbi szerkezet-hatás vizsgálatok szerint a Lys⁸ kémiai módosítása megengedett, bázikus karakterének elvesztése, pl. konjugálás következtében, az antiproliferatív hatás

erősödésével, és az endokrin hatás csökkenésével járt [130, 135]. A monomer és dimer származékok kemotaktikus karakterében a Lys^8 szerepe nem ennyire egyértelmű, mindazonáltal a két modell-sejten kapott eredményeink a Lys^8 általános szerepére utalnak a kemotaxis és az adhézio kiváltásában, modulálásában is.

A GnRH ligandok kemotaktikus hatásának koncentráció függését elemezve, egyes peptidek a klasszikus egycsúcsú dózis-hatás görbétől eltérő, kétszúcsú (két koncentráció optimummal rendelkező), vagy bifázisos (koncentrációtól függően eltérő, akár ellentétes hatással jellemzett – pl. GnRH-III) görbét vettek fel. Nem egyedi jelenségről van szó, az irodalmi adatok és munkacsoportunk saját eredményei is azt mutatták, hogy ez leginkább olyan esetekben fordulhat elő, amikor a ligandnak több, eltérő affinitású receptora van jelen ugyanazon a sejten [229, 238]. Így feltételezhető, hogy a kemotaktikus hatás hátterében az ismert két, eltérő GnRH receptor (GnRH-IR, GnRH-IIR) együttes jelenléte állhat. Az is ismert, hogy az egyes GnRH ligandok, különböző koncentrációban hatva eltérő intracelluláris folyamatokat (alacsony koncentráció: cAMP útvonal, magas koncentráció IP3 útvonal) képesek indukálni, amelyek akár ellentétes hatásokat – jelen esetben például kemotaktikus reakciókat – eredményezhetnek [121, 239].

5.2.2.1.1. GnRH származékok által kiváltott kemotaktikus jelátvitel

A GnRH-receptor interakció következtében indukálódó jelátviteli folyamatokat és a realizálódó hatásokat alapvetően meghatározza a kiváltó ligand szerkezete, koncentrációja, valamint maga a szöveti környezet is. Míg a GnRH izoformák központi idegrendszeri hatása a PLC aktivációján keresztül valósul meg, addig a tumorellenes és invazivitást gátló hatásuk jelátvitelében döntően a PI3K, MAPK játszik fontos szerepet [115, 120, 121]. Továbbá a PLC és PI3K a monociták kemotaxisát kiváltó intracelluláris szignalizációban is központi szereplők [14, 36].

Hasonlóan a Tetrahymena modellen kapott eredményekhez, a PLC a GnRH-III peptidek által kiváltott kemoattraktáns reakció jelátvitelében monocita sejtek esetén sem játszik szignifikáns szerepet, aktiválódását egyetlen származék esetén sem tudtuk igazolni. A PI3K klasszikus inhibitoraként ismert wortmannint és LY-t széles körben alkalmazzák a kemotaktikus ligandok által kiváltott reakciók jelátvitelének vizsgálatára emlős modell-sejtek esetében is [160, 161]. A PI3K szerepét csak natív hormonok (GnRH-II, GnRH-III) és egyes dimerek ($[\text{GnRH-III(C)}]_2$) által kiváltott kemotaktikus

hatások továbbításában sikerült igazolni MM6 sejteken. A két modell-sejten kapott gátlási index értékeket összehasonlítva elmondható, hogy Tetrahymena sejtek esetén nagyobb mértékű gátlás volt megfigyelhető, mint monocita sejteken. Például a kemoattraktáns fragmensek esetén szignifikáns gátló hatást csak Tetrahymena sejteken tudtunk kimutatni. Az acetilcsoportot és a 'GFLG' távtartót tartalmazó származékok, mindkét modell-sejten megnyilvánuló kemoattraktáns jellegét egyik inhibitor sem befolyásolta. Esetükben egy PI3K (és PLC) független jelátviteli út indukciója feltételezhető [113].

5.2.2.1.2. Kemotaxis-adhéziós arány a GnRH peptidek esetén

A GnRH peptidek antimetasztatikus hatásának értékelése a korábban már ismeretett CAR index [224] kiszámításán keresztül történt.

19. táblázat: GnRH származékok MM6 sejtekre kifejtett hatásaiból számolt CAR értékek

GnRH peptidek	Kemotaxis-adhézió arány (CAR)					
	10^{-11} M	10^{-10} M	10^{-9} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
GnRH-I	1,36	1,15	1,12	0,87	0,80	1,17
GnRH-II	0,66	0,74	0,62	0,75	1,22	1,23
GnRH-III	1,14	0,87	0,54	0,87	1,52	1,05
Ac-HWSHDWKPG-NH ₂	0,92	0,74	0,66	0,60	0,63	0,49
Ac-WSHDWKPG-NH ₂	1,43	0,90	1,35	0,70	1,04	0,77
Ac-SHDWKPG-NH ₂	0,97	0,89	0,78	0,98	0,95	0,83
GnRH-III(Ac-C)	0,38	0,20	0,51	0,50	0,33	0,21
GnRH-III(Ac-CGFLG)	1,24	1,66	0,55	0,26	0,50	1,11
[GnRH-III(C)] ₂	0,58	0,58	0,17	0,59	1,05	1,24
[GnRH-III(Ac-C)] ₂	0,70	0,72	0,45	0,74	1,40	0,67
[GnRH-III(CGFLG)] ₂	0,40	1,63	0,70	0,82	0,82	0,92
[GnRH-III(Ac-CGFLG)] ₂	0,64	0,84	0,77	0,41	0,51	0,64

adhéziót fokozó hatás, kemorepellens hatás

A szürke kiemelés az antimetasztatikus hatás szempontjából kedvező hatás kombinációt jelöli.

Amint az 19. táblázatból látható sok esetben a kifejezetten alacsony CAR értékek a peptidek alacsonyabb koncentrációira voltak jellemzőek. Irodalmi adatok szerint a GnRH-III származékok osztódást gátló hatása magas (mikromólos) koncentrációban dominál. Tehát abban a koncentrációban, ahol ezek a molekulák már nem rendelkeznek antiproliferatív hatással, az antimetasztatikus hatásuk révén, önmagukban, vagy egy gyógyszer-szállító rendszer részeként még képesek lehetnek gátolni a tumorsejtek szóródását. Bár a peptidek egy része nem rendelkezett a kívánt hatás kombinációval (kemorepellens és adhéziót fokozó hatás), az esetükben számolt alacsony CAR indexek

vagy tisztán az erős repellens jellegükből (pl. Ac-HWSHDWKPG-NH₂), vagy a kemotaktikus hatásukhoz képest kifejezettebb adhéziót fokozó hatásukból (pl. [GnRH-III(CGFLG)]₂) adódik. Ezek az eredmények is arra engednek következtetni, hogy a primer tumor szintjén inkább a tumorsejtek helyben tartását segíthetik elő. A GnRH-III Lys⁸ oldalláncának módosítása az antimetasztatikus hatás szempontjából is előnyösnek bizonyult. Az így kialakított monomer és dimer származékok hatékonyabbak voltak, mint maga a natív hormon. A csoportból kiemelendők, a két monomer forma (GnRH-III(Ac-C); GnRH-III(Ac-CGFLG)) mellett, egyes dimer vegyületek is ([GnRH-III(C)]₂, [GnRH-III(Ac-CGFLG)]₂), amelyek kedvező hatásprofiljuknak köszönhetően ideális jelöltek lehetnek a gyógyszer-célbajuttatásban történő felhasználásra, mint antimetasztatikus hatású hatóanyag-szállító egységek.

5.2.2.2. GnRH-III alapú, tumorelleses hatóanyagot tartalmazó konjugátumok hatása MM6-modell sejteken

A gyógyszer-célbajuttatásra tervezett peptid konjugátumok általában három – esetünkben két – fő részből tevődnek össze: az irányító egység(ek)ből, a hordozó molekulából (e két funkció kombinálódik a GnRH-III és származékai esetén), valamint a célbajuttatandó hatóanyagból. Vizsgálatainkban, a GnRH-III alapú célbajuttató rendszerek harmadik elemeként leggyakrabban a daunorubicin és doxorubicin szerepelt. A konjugátumok tumorelleses és antimetasztatikus hatásának optimalizálása végett különböző szerkezeti és konjugálási módosítások – (i) különböző hatóanyag, valamint több hatóanyag együttes jelenléte, (ii) enzimlabilis távtartó szekvencia megléte; (iii) a GnRH-III alapvázát érintő szubsztitúció; (iv) dimerré kapcsolás – hatását vizsgáltuk, és az így előállított biokonjugátumok aktivitását hasonlítottuk össze a klinikai kipróbálás alatt álló AN-152 referencia konjugátum, valamint a szabad hatóanyagok hatásával.

A GnRH-III alapú konjugátumok hatásának vizsgálata és elemzése során azt tartottuk szem előtt, hogy a kapcsolt hatóanyag a tumorsejtekehez jutva képes legyen kifejteni a szabad formára jellemző tumorelleses hatást és maga a konjugátum a tumorsejtek kemotaktikus és adhéziós viselkedésének befolyásolásán keresztül képes legyen megakadályozni a tumorsejtek leválását és szóródását. Így a konjugátumok tumorelleses és antimetasztatikus hatékonyságát az adhézió, a kemotaxis és a sejtsztódás funkcionális egységére kifejtett hatásuk alapján értékeltük.

Eredményeinkből általános következtetésként levonható, hogy az irányító/hordozó rész és a hatóanyag – beleértve a konjugálás módját is – együttesen alakítja ki a konjugátum sejtleletani hatásait. A célbavívó egység kemotaxisra és adhéziora kifejtett hatását a hatóanyag, illetve ugyanazon hatóanyag esetén önmagában a kapcsolás módja is jelentős mértékben befolyásolta.

20. táblázat: GnRH-III konjugátumok CAR értékei MM6 sejteken

GnRH-III konjugátumok	Kemotaxis-adhézió arány (CAR)						
	10^{-12} M	10^{-11} M	10^{-10} M	10^{-9} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
AN-152	0,80	0,64	0,81	0,73	0,61	0,77	0,52
GnRH-III(Dox-észter)	0,67	0,59	0,62	0,56	0,48	0,49	0,49
GnRH-III(Dau)	0,87	1,19	1,44	1,28	1,16	1,31	0,78
GnRH-III(Dox-oxim-GFLG)	1,05	0,87	1,46	0,81	1,06	1,79	1,67
GnRH-III(Dox-amid-GFLG)	1,21	0,87	0,86	0,71	0,74	0,92	0,53
GnRH-III(Dau-GFLG)	0,84	0,68	0,72	0,88	1,30	0,93	0,82
GnRH-III(Dau-YRRL)	1,21	0,65	1,11	0,78	1,13	1,18	1,24
(N-MeSer) ⁴ GnRH-III(Dau)	0,74	0,62	0,60	0,84	1,11	0,72	0,62
(Lys(Ac)) ⁴ GnRH-III(Dau)	0,75	0,62	0,60	0,58	0,36	1,27	0,51
(Lys) ⁴ GnRH-III(Dau ⁴ -Dau ⁸)	1,53	0,63	0,59	0,69	0,98	1,31	1,11
(Lys) ⁴ GnRH-III(Mtx ⁴ -Dau ⁸)	0,79	0,96	0,91	0,56	0,81	0,60	0,74
GnRH-III(Dau ⁸ -Dau ⁸)	0,70	0,68	1,20	1,06	1,15	0,48	0,58
GnRH-III(Mtx ⁸ -Dau ⁸)	1,00	1,43	1,32	1,09	1,05	1,21	1,25
[GnRH-III(Dau)] ₂	0,49	0,46	0,79	0,99	1,18	0,51	0,54
[GnRH-III(Dau-YRRL)] ₂	0,94	0,78	1,01	0,65	0,72	0,71	0,47
[(N-MeSer) ⁴ GnRH-III(Dau)] ₂	1,00	0,97	0,91	0,92	0,83	0,85	0,54

adhéziót fokozó hatás, kemorepellens hatás

A szürke kiemelés az antimetasztatikus hatás szempontjából kedvező hatás kombinációt jelöli.

Az AN-152 modell-rendszerünkben is igen hatékonynak bizonyult, citotoxikus karakterét egyik GnRH-III bázisú konjugátum sem haladta meg., Amint az a 20. táblázat CAR index értékeiből (10^{-8} - 10^{-6} M: 0,61 - 0,52) is kiderül, esetében az adhéziót fokozó és a kemorepellens jelleg kedvező kombinációja volt megfigyelhető. Így a daganatellenes hatásán túl képes lehet gátolni a tumorsejtek szóródását is. A GnRH-III konjugátumai közül a citotoxikus, adhéziót fokozó és kemorepellens hatás legszebben az AN-152 analógiájára felépülő, doxorubicint észterkötésben tartalmazó konjugátumban (GnRH-III(Dox-észter)) ötvöződött. Ez a konjugátum a citotoxikus hatás tekintetében lényegesen nem tért el az AN-152 és a szabad doxorubicin hatásától (40. ábra), azonban az adhéziora és kemotaxisra kifejtett aktivitása, mint ahogy azt az alacsony CAR értékek (10^{-9} - 10^{-6} M: 0,56 - 0,49) is mutatják, meghaladta a referencia

konjugátumét (20. táblázat). Az észterkötésű származékok tumorellenes hatékonysága azzal magyarázható, hogy ezekből a konjugátumokból képes a hatóanyag a legkönnyebben felszabadulni a citoplazmatikus észterázok hatására. Azonban, ami az előnyük egyben a hátrányuk is. Az észterkötés kevésbé stabil, így a hatóanyag korai felszabadulásával is számolni kell [137]. Az AN-152 esetén a célzó egység egy szuperagonista GnRH-I analóg ([D-Lys]⁶GnRH-I), ami ily módon felszabadulva a konjugátumból endokrin mellékhatásokat idézhet elő [65]. A GnRH-III(Dox-észter) esetén, hasonló mellékhatás valószínűleg nem alakulna ki, mivel a GnRH-III gyakorlatilag nem rendelkezik ilyen aktivitással.

A stabilabb oximkötésű daunorubicint tartalmazó konjugátum (GnRH-III(Dau) esetén azonban csak kismértékű antiproliferatív hatás volt kimutatható. Ez az alacsony aktivitás a kötés túlzott stabilitásából adódhatott. A daunorubicin vélhetően nem tudott a citotoxikus hatás kiváltásához kellő mértékben felszabadulni. A lizoszómális enzimekre (pl. katepszin B) érzékeny GFLG távtartó szekvencia beépítése, a vártak megfelelően, javította valamelyest a daunorubicin-tartalmú konjugátum antiproliferatív hatását. A doxorubicin-távtartó-GnRH-III összetételű konjugátumok közül, az amidkötésű forma továbbra is rendelkezett a hatóanyagra jellemző citotoxikus aktivitással. Ezzel egyidőben, amellet hogy kemorepellens hatást indukált, képes volt fokozni a sejtek adhézióját is (10^{-6} M: CAR=0,53) (20. táblázat). A doxorubicin-tartalmú származékok közül, az enzimatis hasításra érzékeny észterkötésű forma mellett, az amidkötés jóvoltából viszonylag stabilabb GnRH-III(Dox-amid-GFLG) is kielégítő hatékonysággal gátolhatja a tumorsejtek osztódását és leválását is.

Korábbi eredményeket is figyelembe véve elmondható, hogy a fent említett konjugátumok, szerkezeti különbségeikből adódóan, eltérő aktivitással képesek gátolni a különböző daganattípusok osztódását. A kötéstípusok, MCF-7 humán emlő-, és HT-29 humán vastagbél tumor eredetű sejtvonalakon történő összehasonlításában is az észterkötésű konjugátum (GnRH-III(Dox-észter) bizonyult a leghatékonyabbnak. Egyedül ennél a konjugátumnál lehetett a szabad drog hatásával közel egyenértékű aktivitást kimutatni [137]. Az amidkötésű GnRH-III(Dox-amid-GFLG) hatására a MM6 modell-sejtünk azonban érzékenyebben reagált; MCF-7 és HT-29 sejteken a konjugátum citosztatikus hatása csak két nagyságrenddel nagyobb koncentrációban jelentkezett [137]. Ezek az eltérések többek között azzal magyarázhatók, hogy a

hatóanyag felszabadulását biztosító enzimek, köztük a tumorokban rendszerint túltermelődő katepszin B, szintje tumor típustól függően eltérő lehet [240, 241].

A daunorubicin, egy hidroxil (C14) csoport hiányából adódóan (33. *ábra*), a doxorubicinhez képest kevésbé hajlamos szabadgyök-képzésre és ennek köszönhetően kardiotoxicitása is kisebb. A GnRH-III(Dau) és GnRH-III(Dau-GFLG) konjugátumok azonban nem rendelkeztek a GnRH-III–doxorubicin konjugátumok esetén megfigyelt kedvező hármas hatáskombinációval. Így a daunorubicin tartalmú konjugátumok hatékonyságának javítása érdekében, különböző GnRH-III agonista monomer és dimer alapú konjugátumok szintézise és vizsgálata vált szükségessé. A konjugátumok orális adagolhatóságát a proteolitikus enzimekkel szemben mutatott stabilitásuk határozza meg. Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy a GnRH-III Trp³-Ser⁴ kötés helyén a legérzékenyebb a kimotripszin enzim hatásával szemben. A 4-es pozícióban módosított (N-MeSer)⁴GnRH-III vagy (Lys(Ac))⁴GnRH-III irányító egység alkalmazásával fokozni lehetett a konjugátum stabilitását, és egyben a sejtbejutási képességét is [144, 145, 147]. Az (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau), (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) konjugátumok vizsgálata e kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően került előtérbe. Az Lys(Ac)⁴ beépítése a molekulába nemcsak a konjugátum citotoxikus hatását javította, hanem, a kemorepellens hatású (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) a legjelentősebb adhéziót fokozó hatással is rendelkezett, ami egyben antimetasztatikus képességét is előre vetíti. Ezzel szemben N-MeSer⁴ jelenléte nem bizonyult ennyire hatékonynak. A kemotaxis-adhéziós arányt ugyan a kedvező irányba (10^{-12} - 10^{-6} M: CAR = 0,74 - 0,62) befolyásolta (20. *táblázat*) – ami inkább repellens karakteréből, mintsem adhéziót fokozó hatásából következett –, azonban 72 óra elteltével sem mutatott sejtosztódást gátló hatást. Hasonló aktivitás különbség volt megfigyelhető e két konjugátum MCF-7, HT-29, és LNCap (humán prosztatata) sejtvonalakon mutatott tumorellenes hatásában is. A (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) fokozta, míg az (N-MeSer)⁴GnRH-III(Dau) lerontotta a referencia konjugátum (GnRH-III(Dau)) esetén mért citosztatikus hatást [147].

A GnRH alapú gyógyszer-célbajuttatás hatékonyságát nagymértékben befolyásolja, hogy a tumorsejteken milyen mértékben expresszálódnak a GnRH receptorok és milyen ütemben következik be a konjugátum-receptor komplex internalizációja. Továbbá, ezek a receptorok hormon jelenlétében képesek deszenzitizálódni, ami végeredményben

rezisztencia kialakulásához vezethet [148, 242]. A GnRH-III konjugátumok hatékonyságának fejlesztésére és a fenti limitáló tényezők kiküszöbölésére kézenfekvő lehetőség két hatóanyagot hordozó, más néven bifunkciós konjugátumok előállítása. A $(\text{Lys}(\text{Ac}))^4\text{GnRH-III}$ peptid használata ebből a szempontból is jó választás, mert a Lys^8 mellett a Lys^4 oldalláncán keresztül is lehetőség nyílt egy újabb hatóanyag – daunorubicin vagy metotrexát – konjugálására. A bifunkciós konjugátumok másik csoportját azok a konjugátumok alkották, ahol mindkét hatóanyag egy lizin aminosav közbeiktatásával a Lys^8 oldalláncához volt kapcsolva [148, 195], míg a harmadik csoportba a dimer alapú konjugátumok tartoztak.

Vizsgálataink során a bifunkciós, monomer konjugátumok nem eredményeztek egyértelmű hatásjavulást. Ennek az oka feltételezhetően a hatóanyagok hozzáférhetőségében vagy a konjugátumok térbeli elrendeződésében keresendő. A két konjugálási stratégia közül a $(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}$ hordozó alkalmazásával előállított konjugátumok ($(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Dau}^4\text{-Dau}^8)$, $(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Mtx}^4\text{-Dau}^8)$) mutattak kedvezőbb hatásprofil, a tumorelles és az antimetasztatikus hatás szempontjából is. A 4. pozícióban is daunorubicint tartalmazó konjugátum ($(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Dau}^4\text{-Dau}^8)$), a vártak megfelelően, erőteljesebb tumorelles hatást váltott ki, míg az ugyanitt metotrexátot hordozó származék, $(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Mtx}^4\text{-Dau}^8)$ sejtosztódást gátló aktivitása elmaradt még az egyszeresen konjugált formához ($(\text{Ac-Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Dau}^8)$) képest is. A $(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Dau}^4\text{-Dau}^8)$ konjugátum hatásprofiljában, a tumorelles jelleg dominált az antimetasztatikus karakterével szemben (10^{-10} M: CAR = 0,59; 10^{-9} - 10^{-6} M: CAR = 0,69 – 1,11) (20. táblázat). Ezzel szemben a gyenge antiproliferatív aktivitással rendelkező $(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Mtx}^4\text{-Dau}^8)$ konjugátum, az alacsony CAR index értékek alapján (10^{-9} - 10^{-6} M: 0,56 - 0,74), inkább antimetasztatikus potenciálja révén, lehet eredményes az irányított tumorterápiában. A másik konjugálási módszerrel (8-as pozíción keresztül) előállított $\text{GnRH-III}(\text{Mtx}^8\text{-Dau}^8)$ esetén az erőteljes antiproliferatív hatás mellé egy, az antimetasztatikus jelleg szempontjából kedvezőtlenebb, attraktáns és gyenge adhéziót csökkentő hatás (10^{-12} - 10^{-6} M: CAR = 1,00 - 1,25) társult (20. táblázat).

Amint az látható volt, a két hatóanyag együttes jelenléte nemcsak additív hatást eredményezett, hanem antagonisták kölcsönhatások is megfigyelhetők voltak. Korábbi adatok [148] és saját eredmények [195] szerint, a két kapcsolási stratégiával előállított

bifunkciós konjugátum párok MCF-7, HT-29 modell-sejteken mutatott citosztatikus hatásában nem volt lényeges eltérés. A daunorubicin-daunorubicin és metotrexát-daunorubicin tartalmú konjugátumok hatékonyságában, függetlenül a kapcsolás módjától, egyedül az LNCaP sejtvonal esetén mutatkozott különbség. A két daunorubicint tartalmazó konjugátumok egyértelműen hatékonyabbnak bizonyultak a tumorelles hatás tekintetében. A kétféle, hatóanyag-összetételű konjugátum között leukémia modell esetén is megfigyelhető volt ez az aktivitásbeli különbség, bár nem ennyire konzekvensen. Az eltérő kísérleti körülmények mellett (pl. eltérő kezelési idő: MM6 – 24, 48, 72 h, MCF-7, HT-29, LNCap – 6h), a sejtek ligand iránti szelektivitásában, a konjugátumok sejtfelvételében (pl. MCF-7 sejteken: $(\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{Dau}^4\text{-Dau}^8) > \text{GnRH-III}(\text{Dau}) > \text{GnRH-III}(\text{Dau}^8\text{-Dau}^8)$), a lizoszómális emésztés során keletkező fragmensek minőségében ($((\text{Lys})^4\text{GnRH-III}(\text{X}^4\text{-Dau}^8))$: H-Lys(Dau=Aoa)-OH, <EHWK(Mtx)HDWK(Dau=Aoa)-OH fragmensek; GnRH-III($\text{X}^8\text{-Dau}^8$): H-Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))-OH, H-Lys(Mtx-Lys(Dau=Aoa))P-OH fragmensek) és a fragmensek által közvetített hatás mechanizmusában (pl. DNS-kötő képesség) is mutatkozhatnak olyan eltérések, amelyek felelősek lehetnek a konjugátumok intenzitásában tapasztalt különbségekért [148, 195]. Arról sem szabad megfeledkezni, hogy a konjugálás helye és – ahogy azt az előzőekben bemutatott eredményekből láthattuk – a kialakított kötés típusa (metotrexát esetén amidkötés, daunorubicin esetén oximkötés) is jelentősen módosíthatja a konjugátum hatását, valószínűleg a hatóanyag felszabadulásának befolyásolásán keresztül.

Előzetes méréseinkben kimutattuk, hogy az oldalláncban módosított GnRH-III származékok mellett egyes dimer formák is alkalmas jelöltek, mint potenciális antimetasztatikus célzó egységek egy kérdéses hatóanyag célbajuttatására. A tumorelles hatás tekintetében, mindegyik általunk vizsgált dimer származék esetén a monomer formához képest legalább kétszeres aktivitásfokozódás volt megfigyelhető. Ez természetesen egyrészt abból adódik, hogy a dimer-konjugátumokban a hatóanyag eleve kétszeres dózisban van jelen, másrészt az is hozzájárulhat az aktivitás növekedéséhez, hogy maguk a dimer-hordozók is gátolhatják a monocita sejtek osztódását. A spacer szekvenciát tartalmazó $[\text{GnRH-III}(\text{Dau-YRRL})]_2$ konjugátum nagyobb mértékű antiproliferatív/citotoxikus hatása, a távtartó nélküli $[\text{GnRH-III}(\text{Dau})]_2$ formához képest, vélhetően azzal magyarázható, hogy az enzimlabilis távtartó segíti a daunorubicin

(illetve aktív metabolitjának) felszabadulását. Feltételezések szerint a dimerek mindkét monomer alegysége képes külön-külön kötődni egy-egy receptorhoz elősegítve a receptorok mikroaggregációját és jobb ligand-telítettségét. Ez elősegítheti a konjugátumok hatékonyabb sejtbejutását és fokozottabb tumorelles hatást eredményezhet [133, 137]. A receptorok összekapcsolásának szterikus feltételei lehetnek. Ez alapján a spacer tartalmazó dimer-konjugátum esetén javulhat a hatékonyság. A dimerek esetén kapott egynél kisebb CAR értékek (20. táblázat) pedig arra engednek következtetni, hogy a dimer-hatóanyag konjugátumok nemcsak a tumorok növekedését gátolhatják eredményesen, hanem az antiproliferatív/citotoxikus hatásuk szempontjából releváns koncentráción (10^{-6}M) jelentkező kemorepellens és adhéziót fokozó hatásuknak köszönhetően a daganatsejtek leválását és szóródását is.

Az antiproliferatív/citotoxicitási méréseinkből látható volt, hogy a daunorubicin tartalmú konjugátumok hatása nem érte el a szabad gyógyszermolekula hatékonyságát. A korábban már említett vizsgálatokban, az MCF-7, a HT-29, az LNCaP sejteken is hasonló aktivitásbeli különbségek voltak megfigyelhetők a konjugátumok és a szabad hatóanyagok hatásai között [137, 144, 147, 148, 195]. Ennek az általánosnak tekinthető jelenségnek a hátterében az állhat, hogy a szabad hatóanyagok passzív diffúzióval szállítódnak be a sejtbe és hatáshoz további átalakulásuk nem szükséges. A konjugátumok viszont, kötődve a sejteken található GnRH receptorokhoz, lassabban, receptor mediált endocitózis révén jutnak be a sejtbe, ahol a konjugátumból a hatóanyagnak még fel is kell tudnia szabadulni ahhoz, hogy kifejthesse tumorelles hatását [145, 147, 148]. Mindezek ellenére a GnRH-III alapú konjugátumok számos előnnyel rendelkeznek a szabad hatóanyaghoz viszonyítva, képesek lehetnek a gyógyszermolekulát szelektíven, a normál sejtek károsítása nélkül, a GnRH-R-t expresszáló tumorsejtekhez juttatni. A daganatok növekedésének gátlásán túl, komplex, kemorepellens és adhéziót fokozó hatásuknak köszönhetően megakadályozhatják a tumorsejtek leválását és ezáltal csökkenthetik a távoli áttétek kialakulásának esélyét.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk a célzott terápia kidolgozására lehetőséget adó, molekuláris célpontokon (MAO-B vagy GnRH-R) ható vegyület csoportok – a MAO-szubsztrát szerotonin és MAO-bénító *R*-deprenyl származékai, valamint a GnRH természetes analógok, GnRH-III szintetikus származékai és hatóanyag-tartalmú konjugátumaik – sejtfiziológiai folyamatokra kifejtett hatásának tanulmányozását tűzte ki célul, keresve olyan ligandokat, amelyek önmagukban, vagy hatóanyag-szállító rendszerként képesek lehetnek gátolni a daganatok növekedését és szóródását. A kérdéskör első, Tetrahymena sejten végzett vizsgálatai során, a MAO-enzimen/GnRH-receptoron ható természetes szubsztrátok/ligandok és a fent említett két gyógyszercsoport hatásainak párhuzamos elemzésére vállalkoztunk. A továbbiakban a két anyag csoport kiértékelését, a célzott daganatterápiás felhasználásban gondolkodva, különböző malignitású tumoros sejtvonalakon is elvégeztük.

A Célkitűzések fejezetben felvetett kérdésekre vonatkozó megfigyeléseink az alábbiakban foglalhatók össze.

***R*-deprenyl és származékai**

1. *A MAO szubsztrátok közül a szerotonin képes-e befolyásolni a Tetrahymena endogén hormon tartalmát, valamint előkezelés formájában alkalmazva (szerotonin imprinting) képes-e hosszútávon megváltoztatni a modell-sejt fiziológiai reakcióit?*

Megállapítottuk, hogy a szerotonin koncentráció- és időfüggő módon növelte a Tetrahymena intracelluláris hormon tartalmát. Ez a hatás a sejtek természetes közegét jobban modellező, tápanyagszegény oldatban volt kifejezettebb, és kiváltásához már a femtomoláris és az alatti koncentrációk is elegendőek voltak.

A szerotoninnal kiváltott imprinting hatására 500. és 1000. generációt követően, a sejtek fokozott (hormontartalom, osztódási képesség, kemokinetikus aktivitás) vagy csökkent reakciója (kemotaktikus válaszkészség) volt megfigyelhető a nem-imprintált sejtekhez képest, ami a hormonális imprinting hosszú távú hatását (memória kialakulását) jelzi, és felveti az epigenetikus öröklődés lehetőségét.

2. *A MAO-B gátló R-deprenyl milyen hatást fejt ki a Tetrahymena szerotonin tartalmára?*

Eredményeink azt valószínűsítik, hogy a Tetrahymena a korábban már kimutatott MAO enzim B izotípusával (MAO-B) rendelkezik. Ez az izoenzim lehet felelős a szerotonin metabolizmusáért, és gátlásán keresztül az R-deprenyl a sejtek élettani reakciójának széles skáláját befolyásolhatja.

3. *Az R-deprenyl származékok képesek-e kiváltani a Tetrahymena kemotaktikus válaszát?*

Kimutattuk, hogy az R-deprenyl és további 9 derivátuma képes a Tetrahymena kemotaktikus válaszára kiváltására. Az R-deprenyl kemoattraktáns hatása, sztereoszelektívnek bizonyult, és a különböző szerkezeti módosítások döntően repellens vagy neutrális hatást eredményeztek. A kemotaktikus hatások koncentrációfüggése egy MAO-B gátlástól független aktivitást jelez.

4. *Az R-deprenyl és származékai rendelkeznek-e adhéziót befolyásoló, kemotaktikus és antiproliferatív hatással, eltérő malignitású tumorsejtvonalakon? Ezek a hatások hozzájárulhatnak-e a tumorok növekedésének és szóródásának megakadályozásához?*

Magasabb rendű modell-sejteken végzett vizsgálatokban azt találtuk, hogy az R-deprenyl és derivátumainak a kérdésben jelzett folyamatokra kifejtett hatásai nagy százalékban, jó egyezést mutatnak a két sejtvonalon (MM6 és LM2). Az R-deprenyl a MAO-B gátláshoz szükséges koncentrációban, direkt antiproliferatív hatása révén a tumorsejtek osztódását, míg adhéziót fokozó és repellens/migrációt csökkentő hatásának köszönhetően a tumorsejtek szóródását gátolhatja (45. ábra). Az adhézióra és kemotaxisra kifejtett hatása alapján az S-deprenyl a hatékonyabb származék az antimetasztatikus hatás tekintetében. Az R-deprenyl antimetasztatikus hatásához a keletkező metabolitok is hozzájárulhatnak, adhéziót csökkentő és kemorepellens hatásuk révén a keringő tumorsejtek megtapadását és extravazációját gátolhatják.

GnRH-III peptid-származékok

5. *Milyen kemotaktikus hatást fejtenek ki a GnRH származékok Tetrahymena sejteken és milyen szerkezet-hatás összefüggések mutathatóak ki?*

A GnRH peptid-származékok kemotaktikus hatása és a PI3K aktivációja a kemoattraktáns reakció szignalizációjában igazolható volt a csillós modellen. A

Tetrahymena szekvencia- és szerkezetfüggő reakciója a N-terminális aminosav kémiai karakterének (aromás vs. poláris oldallánc) és GnRH-III Lys⁸ oldalláncát érintő módosításoknak a meghatározó szerepére utal a kemotaxis kiváltásában.

6. *A természetes GnRH izoformák és szintetikus származékok milyen hatással vannak a csillós protozoon hormontermelésére és kemokinetikus aktivitására, összehasonlítva más magasabb rendűekre jellemző hormonok hatásaival?*

A különböző szerkezetű GnRH-III peptidek és glikoprotein típusú hormonok karakterizálásával kimutattuk, hogy a repellens derivátumok egységesen a sejtek lassú körkörös mozgását, míg az attraktáns hatásúak döntően egyenes vonalú haladást váltották ki. Ezek a kemotaktikus ligandok hormonszint befolyásoló hatásuk révén is – parakrin/autokrin módon – hozzájárulhatnak migrációs aktivitásuk kialakulásához.

7. *Rendelkeznek-e adhéziót befolyásoló és kemotaktikus hatással az egyes GnRH-III származékok és konjugátumok magasabb rendű modell-sejten?*

A gyógyszer-célbajuttatásra tervezett GnRH-III származékok és hatóanyag-tartalmú konjugátumaik sejtadhézióra és kemotaxisra kifejtett hatása igazolható volt akut mieloid leukémia (MM6) modellen. MM6 sejtvonalon is sikerült megerősíteni a célzó egységként szereplő GnRH-III származékok Tetrahymena sejteken történő vizsgálatakor már tapasztalt szerkezet-hatás összefüggéseket. A konjugátum kemotaktikus aktivitását és adhézióra kifejtett hatását nem egyedül az irányító hatású hordozónak választott GnRH-III peptidek határozzák meg, hanem szignifikáns mértékben befolyásolhatja maga a hatóanyag és a kapcsolás módja (kialakított kötés típusa, vagy a távtartó szekvencia jelenléte és kémiai karaktere) is. A doxorubicin-tartalmú konjugátumok a daunorubicin-tartalmúakkal összehasonlítva hatékonyabbnak bizonyultak, mint ahogyan a 4-es pozícióban módosított konjugátumok (pl. (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau)) adhéziót fokozó és repellens hatása is előnyösebb volt a megfelelő GnRH-III alapú párjaikhoz (pl. GnRH-III(Dau)) képest.

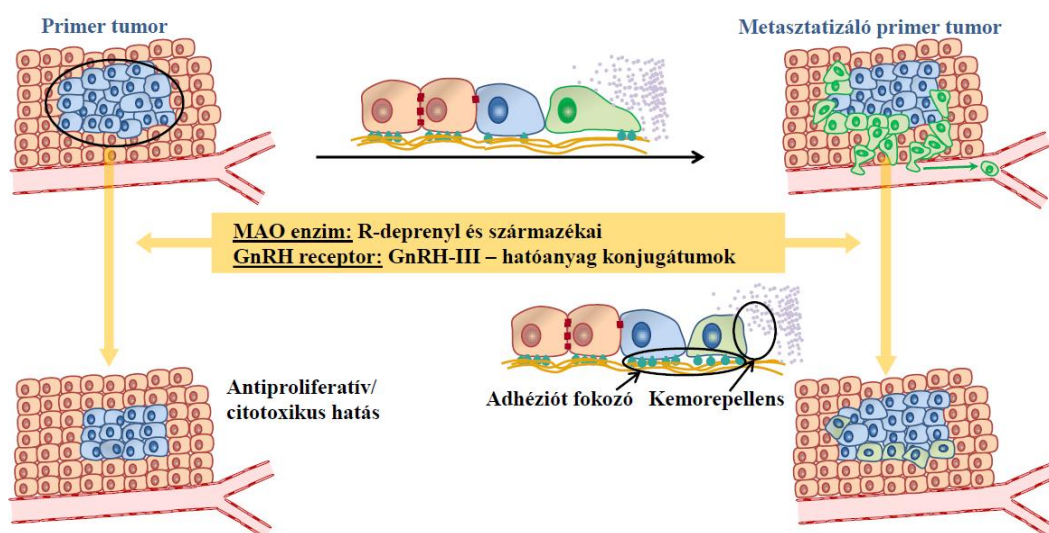
8. *A tumorelles-hatóanyag-tartalmú konjugátumok megtartják-e a szabad gyógyszer-molekulára jellemző antiproliferatív hatásukat?*

Az antiproliferatív/citotoxicitási méréseinkben kimutattuk, hogy a GnRH-III alapú konjugátumok többsége rendelkezett a szabad hatóanyagra jellemző hatással. A

doxorubicin-tartalmú konjugátumok bizonyultak a leghatékonyabbnak, a citotoxikus hatásuk összemérhető volt a referencia molekula (AN-152) és a szabad citosztatikum aktivitásával, míg a daunorubicin-kapcsolt konjugátumok citotoxikus potenciálját a dimerképzés és (Lys)⁴GnRH-III hordozó alkalmazása szignifikánsan javította.

9. *A gyógyszer-célbajuttatására tervezett GnRH-III hordozók és konjugátumaik komplex hatásprofiljuk alapján alkalmasak-e az irányított tumorterápiában történő felhasználásra, mint tumorelles és antimetasztatikus ágensek?*

A hatóanyag-GnRH-III konjugátumok antiproliferatív/citotoxikus hatása alapján feltételezzük, hogy a célzó egységként szolgáló GnRH-III származékok képesek biztosítani a hatóanyag célsejthez jutását, felszabadulását és tumorelles aktivitását. A hordozókra és egyben a konjugátumaikra jellemző adhézión fokozó és kemorepellens hatásegységes viszont már azt valószínűsíti, hogy a primer tumor szintjén hatva, képesek lehetnek megakadályozni a tumorsejtek leválását, invázióját és csökkenteni a távoli áttétek kialakulásának esélyét (45. ábra). Ezek az adatok végeredményben előrevetítik az egyes doxorubicin-szállító rendszerek és daunorubicin-tartalmú dimer és a (Lys)⁴GnRH-III alapú konjugátumok alkalmazásának lehetőségét a célzott daganatterápiában, mint komplex, tumorelles és antimetasztatikus hatású terapeutikumok.



45. ábra: A vizsgált gyógyszer csoportok tumorelles és antimetasztatikus hatása

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A környezetben jelenlévő endogén vagy szintetikus eredetű bioaktív anyagok hatására kialakuló sejtélettani reakciók (adhézió, kemotaxis, proliferáció) az egysejtűek szintjén alapvetően meghatározzák a sejt sorsát, míg magasabb rendűek esetén számos klinikai szempontból (pl. tumorgenezis, áttétképzés) is fontos folyamat kulcsszereplői. A célzott gyógyszeres befolyásolásuk például új perspektívát jelenthet a tumorelles hatás szelektivitásának növelésére, a metasztatizáció kialakulásának megakadályozására.

A célzott tumorterápiás eljárásra szánt MAO-B gátló *R*-deprenyl és derivátumainak, valamint a GnRH receptor-agonista GnRH-III peptid-származékok sejtélettani hatásait először Tetrahymena modellen vizsgáltuk, értékelve azokat a természetes ligandok (szerotonin, hipotalamo-hipofízisális hormonok) aktivitásának tükrében. Ezt követően magasabb rendű sejteken definiáltuk, a tumorelles és antimetasztatikus hatás tekintetében fontos szerkezet-hatás összefüggéseket, keresve az irányított tumorterápiában eredményesen alkalmazható gyógyszereket, peptid alapú hatóanyag-szállító rendszereket.

Egysejtűekben kimutattuk a MAO-szubsztrát szerotonin hatására kialakuló akut hormonszint változások koncentráció-, idő-, és tápanyagellátottságtól való függését, valamint a hosszú távú, sejt szintű memória (imprinting) kialakulására utaló, az 500./1000. generációban is megnyilvánuló funkcionális változásokat. A MAO-B bénító *R*-deprenyl intracelluláris szerotoninszint emelő hatása az enzimgátló aktivitásának tulajdonítható, míg a deprenyl származékok kemotaktikus karaktere attól független jelenség lehet. A különböző szerkezetű GnRH-III származékok, és tróphormonok vizsgálata során jó összefüggést találtunk a ligandok által indukált, vélhetően autokrin/ parakrin szabályozás alatt álló, kemotaktikus és kemokinetikus válaszreakciók között.

Munkánk folytatásában, döntően leukémia modellen, igazoltuk, hogy az *R*-deprenyl – a klinikailag releváns célkoncentrációban – és egyes derivátumai (pl. *S*-deprenyl, *p*-fluoro-*S*-deprenyl) antiproliferatív, adhéziót fokozó és kemorepellens hatásuk révén, képesek lehetnek a daganatok növekedésének és szóródásának célzott gátlására. A kemotaktikus és adhéziót fokozó hatással rendelkező GnRH-III származékokhoz konjugált gyógyszer-molekulák alkalmazásával kialakított hatóanyag-szállító rendszerek (pl. GnRH-III(Dox-észter), Lys(Ac)⁴GnRH-III(Dau)) kielégítő hatékonysággal gátolták a tumorsejtek osztódását. Adhéziót fokozó, kemorepellens hatásuknak köszönhetően alkalmas jelöltek lehetnek a célzott antimetasztatikus tumorterápiára.

8. SUMMARY

The cell physiological activities (adhesion, chemotaxis, proliferation) induced by endogenous or synthetic bioactive compounds fundamentally determine the cell fate in unicellular level and have pivotal roles in many clinically relevant processes (e.g., formation of tumor and metastasis) in mammals. Furthermore targeted therapy for the influence of these activities represents a new way for example to increase the selectivity of antitumoral effect, and to prevent the formation of metastasis.

The cell physiological effects of *R*-deprenyl and its derivatives that target the MAO-B, as well as GnRH-III, an agonist of GnRH receptor, and related peptides designed for drug delivery were first investigated on *Tetrahymena* and elucidated in respect of effects induced by native ligands (serotonin, hypothalamo-hypophyseal hormones). Then, in higher ranked cells in point of antitumoral and antimetastatic effects important structure-function relations were described to find small drugs and peptide based drug delivery systems for targeted tumor therapy.

In *Tetrahymena* the acute effects of serotonin (substrate of MAO) on the intracellular hormone contents proved to depend on concentration, time of treatment and nutritive conditions, while the enhanced or decreased reactions of the cells in progeny generations 500. and 1000. after serotonin imprinting indicated the development of a durable and heritable imprinting. The elevation in the serotonin level caused by *R*-deprenyl appeared to be due to MAO-B inhibition, while chemotactic effects of deprenyl derivatives were rather MAO-B independent actions. By screening different types of GnRH-III derivatives and trophomones good correlation was found between their chemotactic and chemokinetic reactions regulated by endogenous autocrine/paracrine signal molecules.

In different types of cancer cells, the adhesion inducer, chemorepellent and antiproliferative effects of *R*-deprenyl in the clinically relevant concentration and for some derivatives (e.g. *S*-deprenyl, *p*-fluoro-*S*-deprenyl) indicate that these molecules might have targeted inhibitory effects in tumor growth and in metastasis formation at primary tumors. The drug-targeting conjugates (e.g. GnRH-III(Dox-ester), Lys(Ac)⁴GnRH-III(Dau)) containing chemotherapeutic agents coupled to GnRH-III targeting moiety or its analogues with chemotactic and adhesion modulator potency could trigger efficient toxic effects and their adhesion enhancer and chemorepellent effects confirmed the feasibility of the GnRH-III-based conjugates as antimetastatic drug delivery systems for targeted tumor therapy.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Lenhoff HM. On the mechanism of action and evolution of receptors associated with feeding and digestion. In: Muscatine L, Lenhoff HM. (szerk.), *Coelenterate Biology*. Academic Press, New York, 1974: p. 238.
- [2] Berrier AL, Yamada KM. (2007) Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol*, 213: 565-573.
- [3] Pettit EJ, Fay FS. (1998) Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev*, 78: 949-967.
- [4] Schmidt S, Friedl P. (2010) Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. *Cell Tissue Res*, 339: 83-92.
- [5] Lock JG, Wehrle-Haller B, Stromblad S. (2008) Cell-matrix adhesion complexes: master control machinery of cell migration. *Semin Cancer Biol*, 18: 65-76.
- [6] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. Garland Science, New York 2008.
- [7] Gomez-Mouton C, Manes S. (2007) Establishment and maintenance of cell polarity during leukocyte chemotaxis. *Cell Adh Migr*, 1: 69-76.
- [8] McCarthy JB, Palm SL, Furcht LT. (1983) Migration by haptotaxis of a Schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. *J Cell Biol*, 97: 772-777.
- [9] Kőhidai L, Szabó L, Láng O. A kemotaxis mérése prokaryota és eukaryota sejtekben In: Kőhidai L, Dul C (szerk.), *Fókuszban a Kemotaxis*. Biomedica Hungaria, Budapest, 2007.
- [10] Caterina MJ, Devreotes PN. (1991) Molecular insights into eukaryotic chemotaxis. *FASEB J*, 5: 3078-3085.
- [11] Manes S, Mira E, Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Martinez C. (2000) Cells on the move: a dialogue between polarization and motility. *IUBMB Life*, 49: 89-96.
- [12] Friedl P. (2004) Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 16: 14-23.
- [13] Pals ST, de Gorter DJ, Spaargaren M. (2007) Lymphoma dissemination: the other face of lymphocyte homing. *Blood*, 110: 3102-3111.
- [14] Kay RR, Langridge P, Traynor D, Hoeller O. (2008) Changing directions in the study of chemotaxis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9: 455-463.
- [15] Giaever I, Keese CR. (1991) Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 7896-7900.

- [16] Lovelady DC, Friedman J, Patel S, Rabson DA, Lo CM. (2009) Detecting effects of low levels of cytochalasin B in 3T3 fibroblast cultures by analysis of electrical noise obtained from cellular micromotion. *Biosens Bioelectron*, 24: 2250-2254.
- [17] Lowell CA, Mayadas TN. (2012) Overview: studying integrins in vivo. *Methods Mol Biol*, 757: 369-397.
- [18] Friedl P, Weigelin B. (2008) Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol*, 9: 960-969.
- [19] Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Imhof BA. (2002) The last molecular fortress in leukocyte trans-endothelial migration. *Nat Immunol*, 3: 116-118.
- [20] Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7: 678-689.
- [21] Yadav R, Larbi KY, Young RE, Nourshargh S. (2003) Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond. *Thromb Haemost*, 90: 598-606.
- [22] Mackay CR. (2008) Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol*, 9: 988-998.
- [23] Jenei V, Zor K, Magyar K, Jakus J. (2005) Increased cell-cell adhesion, a novel effect of R-(-)-deprenyl. *J Neural Transm*, 112: 1433-1445.
- [24] Jin T, Xu X, Hereld D. (2008) Chemotaxis, chemokine receptors and human disease. *Cytokine*, 44: 1-8.
- [25] Rezai-Zadeh K, Gate D, Gowing G, Town T. (2011) How to get from here to there: macrophage recruitment in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 8: 156-163.
- [26] Cavallaro U, Christofori G. (2001) Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta*, 1552: 39-45.
- [27] Palmer TD, Ashby WJ, Lewis JD, Zijlstra A. (2011) Targeting tumor cell motility to prevent metastasis. *Adv Drug Deliv Rev*, 63: 568-581.
- [28] van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. (2011) Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res*, 728: 23-34.
- [29] Friedl P, Wolf K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer*, 3: 362-374.
- [30] Berzat A, Hall A. (2010) Cellular responses to extracellular guidance cues. *EMBO J*, 29: 2734-2745.

- [31] Muller P, Schier AF. (2011) Extracellular movement of signaling molecules. *Dev Cell*, 21: 145-158.
- [32] Stoka AM. (1999) Phylogeny and evolution of chemical communication: an endocrine approach. *J Mol Endocrinol*, 22: 207-225.
- [33] Christopher GK, Sundermann CA. (1995) Isolation and partial characterization of the insulin binding sites of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 212: 515-523.
- [34] Csaba G, Lantos T. (1975) Effect of insulin on the glucose uptake of protozoa. *Experientia*, 31: 1097-1098.
- [35] Le Roith D, Shiloach J, Roth J, Lesniak MA. (1980) Evolutionary origins of vertebrate hormones: substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 6184-6188.
- [36] Jin T, Hereld D. (2006) Moving toward understanding eukaryotic chemotaxis. *Eur J Cell Biol*, 85: 905-913.
- [37] Csaba G. (1985) The unicellular *Tetrahymena* as a model cell for receptor research. *Int Rev Cytol*, 95: 327-377.
- [38] Zipser B, Ruff MR, O'Neill JB, Smith CC, Higgins WJ, Pert CB. (1988) The opiate receptor: a single 110 kDa recognition molecule appears to be conserved in *Tetrahymena*, leech, and rat. *Brain Res*, 463: 296-304.
- [39] Csaba G, Nagy U. (1976) Effect of vertebrate hormones on the cyclic AMP level in *Tetrahymena*. *Acta Biol Med Ger*, 35: 1399-1401.
- [40] Jamieson GA, Jr., Vanaman TC, Blum JJ. (1979) Presence of calmodulin in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76: 6471-6475.
- [41] Kőhidai L, Bársony J, Roth J, Marx SJ. (1992) Rapid effects of insulin on cyclic GMP location in an intact protozoan. *Experientia*, 48: 476-481.
- [42] Kovács P, Csaba G. (1990) Involvement of the phosphoinositol (PI) system in the mechanism of hormonal imprinting *Biochem Biophys Res Commun*, 170: 119-126.
- [43] Csaba G, Kovács P, Pállinger E. (2004) Presence and localization of epidermal growth factor (EGF)- and EGF-receptor-like immunoreactivity in *Tetrahymena*. *Cell Biol Int*, 28: 491-496.

- [44] Darvas Z, Csaba G. (1990) Dose-dependent impact of pretreatment (imprinting) with histamine and serotonin on the phagocytic activity of *Tetrahymena*. *Acta Microbiol Hung*, 37: 285-287.
- [45] Hegyesi H, Kovács P, Falus A, Csaba G. (1998) Presence and localization of histidine decarboxylase enzyme (HDC) and histamine in *Tetrahymena pyriformis*. *Cell Biol Int*, 22: 493-497.
- [46] Le Roith D, Liotta AS, Roth J, Shiloach J, Lewis ME, Pert CB, Krieger DT. (1982) Corticotropin and beta-endorphin-like materials are native to unicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 2086-2090.
- [47] Csaba G, Pállinger E. (2008) Is there a hormonal network in *Tetrahymena*? A systematic investigation of hormonal effects on the hormone content. *Cell Biochem Funct*, 26: 303-308.
- [48] Kőhidai L, Csaba G. (1998) Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF- α) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Cytokine*, 10: 481-486.
- [49] Kőhidai L, Csaba G. (1996) Different and selective chemotactic responses of *Tetrahymena pyriformis* to two families of signal molecules: lectins and peptide hormones. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 43: 83-91.
- [50] Csaba G, Kovács P, Kőhidai L. (1994) *Tetrahymena* cells distinguish insulins according to their amorphous and crystalline condition or their bovine and porcine origin. Study of imprinting in aspects of hormone binding and chemotaxis. *Microbios*, 80: 215-222.
- [51] Schneider DJ. (2011) Anti-platelet therapy: glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Br J Clin Pharmacol*, 72: 672-682.
- [52] Moh MC, Shen S. (2009) The roles of cell adhesion molecules in tumor suppression and cell migration: a new paradox. *Cell Adh Migr*, 3: 334-336.
- [53] Kirman I. (2006) Drug evaluation: IGN-101--an anti-EpCAM murine antibody vaccine for cancer. *Curr Opin Mol Ther*, 8: 358-365.
- [54] Shabbir SH, Eisenberg JL, Mrksich M. (2010) An inhibitor of a cell adhesion receptor stimulates cell migration. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49: 7706-7709.
- [55] Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, Keller M, Forster R, Critchley DR, Fassler R, Sixt M. (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453: 51-55.

- [56] Lauffenburger DA, Horwitz AF. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84: 359-369.
- [57] Hudecz F, Reményi J, Szabó R, Kóczán G, Mező G, Kovács P, Gaál D. (2003) Drug targeting by macromolecules without recognition unit? *J Mol Recognit*, 16: 288-298.
- [58] Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I. (2005) Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg Med Chem*, 13: 5043-5054.
- [59] Torchilin VP. (2000) Drug targeting. *Eur J Pharm Sci*, 11 Suppl 2: S81-91.
- [60] Wu H, Chang D, Huang C. (2006) Targeted therapy for cancer. *J Cancer Mol*, 2: 57-66.
- [61] Klein S, Levitzki A. (2007) Targeted cancer therapy: promise and reality. *Adv Cancer Res*, 97: 295-319.
- [62] Flamand V, Zhao H, Peehl DM. (2010) Targeting monoamine oxidase A in advanced prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136: 1761-1771.
- [63] Sarabia SF, Liehr JG. (1998) Induction of monoamine oxidase B by 17 beta-estradiol in the hamster kidney preceding carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 355: 249-253.
- [64] Toninello A, Pietrangeli P, De Marchi U, Salvi M, Mondovi B. (2006) Amine oxidases in apoptosis and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1765: 1-13.
- [65] Nagy A, Schally AV. (2005) Targeting cytotoxic conjugates of somatostatin, luteinizing hormone-releasing hormone and bombesin to cancers expressing their receptors: a "smarter" chemotherapy. *Curr Pharm Des*, 11: 1167-1180.
- [66] Mező G, Manea M. (2010) Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones. *Expert Opin Drug Deliv*, 7: 79-96.
- [67] Haviv F, Fitzpatrick TD, Swenson RE, Nichols CJ, Mort NA, Bush EN, Diaz G, Bammert G, Nguyen A, Rhutasel NS, et al. (1993) Effect of N-methyl substitution of the peptide bonds in luteinizing hormone-releasing hormone agonists. *J Med Chem*, 36: 363-369.
- [68] Birkmayer W, Knoll J, Riederer P, Youdim MB, Hars V, Marton J. (1985) Increased life expectancy resulting from addition of L-deprenyl to Madopar treatment in Parkinson's disease: a longterm study. *J Neural Transm*, 64: 113-127.
- [69] Knoll J, Ecseri Z, Kelemen K, Nievel J, Knoll B. (1965) Phenylisopropylmethylpropinylamine (E-250), a new spectrum psychic energizer. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 155: 154-164.
- [70] Knoll J, Magyar K. (1972) Some puzzling pharmacological effects of monoamine oxidase inhibitors. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 5: 393-408.

- [71] Magyar K, Vizi ES, Ecseri Z, Knoll J. (1967) Comparative pharmacological analysis of the optical isomers of phenyl-isopropyl-methyl-propinylamine (E-250). *Acta Physiol Acad Sci Hung*, 32: 377-387.
- [72] Farlow MR, Miller ML, Pejovic V. (2008) Treatment options in Alzheimer's disease: maximizing benefit, managing expectations. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 25: 408-422.
- [73] Tatton WG, Ju WY, Holland DP, Tai C, Kwan M. (1994) (-)-Deprenyl reduces PC12 cell apoptosis by inducing new protein synthesis. *J Neurochem*, 63: 1572-1575.
- [74] Qin F, Shite J, Mao W, Liang CS. (2003) Selegiline attenuates cardiac oxidative stress and apoptosis in heart failure: association with improvement of cardiac function. *Eur J Pharmacol*, 461: 149-158.
- [75] Thomas T, Bhavnani BR, Thomas P. (2002) Inhibition of human LDL oxidation by the neuroprotective drug l-deprenyl. *Neurol Res*, 24: 169-173.
- [76] Agostinelli E, Tempera G, Viceconte N, Saccoccio S, Battaglia V, Grancara S, Toninello A, Stevanato R. (2010) Potential anticancer application of polyamine oxidation products formed by amine oxidase: a new therapeutic approach. *Amino Acids*, 38: 353-368.
- [77] Magyar K, Pálfi M, Tábi T, Kalász H, Szende B, Szökő E. (2004) Pharmacological aspects of (-)-deprenyl. *Curr Med Chem*, 11: 2017-2031.
- [78] Riederer P, Youdim MB. (1986) Monoamine oxidase activity and monoamine metabolism in brains of parkinsonian patients treated with l-deprenyl. *J Neurochem*, 46: 1359-1365.
- [79] Ebadi M, Sharma S, Shavali S, El Refaey H. (2002) Neuroprotective actions of selegiline. *J Neurosci Res*, 67: 285-289.
- [80] Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Logan J, Pappas N, Shea C, MacGregor R. (1997) Age-related increases in brain monoamine oxidase B in living healthy human subjects. *Neurobiol Aging*, 18: 431-435.
- [81] Lamensdorf I, Youdim MB, Finberg JP. (1996) Effect of long-term treatment with selective monoamine oxidase A and B inhibitors on dopamine release from rat striatum in vivo. *J Neurochem*, 67: 1532-1539.
- [82] Carrillo MC, Kanai S, Nokubo M, Kitani K. (1991) (-) deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life Sci*, 48: 517-521.

- [83] Tatton WG, Chalmers-Redman RM. (1996) Modulation of gene expression rather than monoamine oxidase inhibition: (-)-deprenyl-related compounds in controlling neurodegeneration. *Neurology*, 47: S171-183.
- [84] Buu NT, Angers M, Duhaime J, Kuchel O. (1987) Modification of dopamine and norepinephrine metabolism in the rat brain by monoamine oxidase inhibitors. *J Neural Transm*, 70: 39-50.
- [85] Magyar K, Szende B, Jenei V, Tábi T, Pálfi M, Szökő E. (2010) R-deprenyl: pharmacological spectrum of its activity. *Neurochem Res*, 35: 1922-1932.
- [86] Szende B, Bökönyi G, Bocsi J, Kéri G, Timár F, Magyar K. (2001) Anti-apoptotic and apoptotic action of (-)-deprenyl and its metabolites. *J Neural Transm*, 108: 25-33.
- [87] Toronyi E, Hamar J, Magyar K, Szende B. (2002) Antiapoptotic effect of (-)-deprenyl in rat kidney after ischemia-reperfusion. *Med Sci Monit*, 8: BR65-68.
- [88] Thomas T. (2000) Monoamine oxidase-B inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 21: 343-348.
- [89] ThyagaRajan S, Madden KS, Kalvass JC, Dimitrova SS, Felten SY, Felten DL. (1998) L-deprenyl-induced increase in IL-2 and NK cell activity accompanies restoration of noradrenergic nerve fibers in the spleens of old F344 rats. *J Neuroimmunol*, 92: 9-21.
- [90] ThyagaRajan S, Madden KS, Stevens SY, Felten DL. (2000) Anti-tumor effect of L-deprenyl is associated with enhanced central and peripheral neurotransmission and immune reactivity in rats with carcinogen-induced mammary tumors. *J Neuroimmunol*, 109: 95-104.
- [91] Wersinger C, Prou D, Vernier P, Sidhu A. (2003) Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. *FASEB J*, 17: 2151-2153.
- [92] Jenei V, Zor K, Magyar K, Jakus J. (2005) [Role of R-(-)-deprenyl in adhesion of neuronal and non-neuronal cells]. *Orv Hetil*, 146: 601-606.
- [93] Heinonen EH, Myllyla V, Sotaniemi K, Lamintausta R, Salonen JS, Anttila M, Savijarvi M, Kotila M, Rinne UK. (1989) Pharmacokinetics and metabolism of selegiline. *Acta Neurol Scand Suppl*, 126: 93-99.
- [94] Reynolds GP, Elsworth JD, Blau K, Sandler M, Lees AJ, Stern GM. (1978) Deprenyl is metabolized to methamphetamine and amphetamine in man. *Br J Clin Pharmacol*, 6:542-544.
- [95] Shin HS. (1997) Metabolism of selegiline in humans. Identification, excretion, and stereochemistry of urine metabolites. *Drug Metab Dispos*, 25: 657-662.

- [96] Wu RF, Ichikawa Y. (1995) Inhibition of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine metabolic activity of porcine FAD-containing monooxygenase by selective monoamine oxidase-B inhibitors. *FEBS Lett*, 358: 145-148.
- [97] Haberle D, Szökő E, Magyar K. (2002) The influence of metabolism on the MAO-B inhibitory potency of selegiline. *Curr Med Chem*, 9: 47-51.
- [98] Magyar K, Pálfi M, Jenei V, Szökő E. (2006) Deprenyl: from chemical synthesis to neuroprotection. *J Neural Transm Suppl*: 143-156.
- [99] Szende B, Barna G, Magyar K. (2010) Cytoprotective effect of (-)-deprenyl, (-)-desmethyl-deprenyl and (-)-deprenyl-N-oxide on glutathione depleted A-2058 melanoma cells. *J Neural Transm*, 117: 695-698.
- [100] Szilágyi G, Simon L, Wappler E, Magyar K, Nagy Z. (2009) (-)-Deprenyl-N-oxide, a (-)-deprenyl metabolite, is cytoprotective after hypoxic injury in PC12 cells, or after transient brain ischemia in gerbils. *J Neurol Sci*, 283: 182-186.
- [101] Youdim MB, Wadia A, Tatton W, Weinstock M. (2001) The anti-Parkinson drug rasagiline and its cholinesterase inhibitor derivatives exert neuroprotection unrelated to MAO inhibition in cell culture and in vivo. *Ann N Y Acad Sci*, 939: 450-458.
- [102] Magyar K. (1994) Behaviour of (-)-deprenyl and its analogues. *J Neural Transm Suppl*, 41: 167-175.
- [103] Magyar K, Ecseri Z, Bernáth G, Satory É, Knoll J. Structure-activity relationship of selective inhibitors of MAO-B. In: Magyar K (szerk.), *Advances in pharmacological research and practice, proceedings of the 3rd congress of the Hungarian Pharmacological Society, Monoamine oxidases and their selective inhibition*. Pergamon Press, Akadémiai Kiadó, Budapest 1979: p. 11-21.
- [104] Yasar S, Gaal J, Justinova Z, Bergman J. (2005) Discriminative stimulus and reinforcing effects of p-fluoro-L-deprenyl in monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, 182: 95-103.
- [105] Erdő F, Baranyi A, Takács J, Arányi P. (2000) Different neurorescue profiles of selegiline and p-fluoro-selegiline in gerbils. *Neuroreport*, 11: 2597-2600.
- [106] Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Motta M. (2003) The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol*, 24: 279-295.
- [107] Schneider F, Tomek W, Grundker C. (2006) Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. *Theriogenology*, 66: 691-709.

- [108] Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. (2004) Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocr Rev*, 25: 235-275.
- [109] Sower SA, Chiang YC, Lovas S, Conlon JM. (1993) Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology*, 132: 1125-1131.
- [110] Cheng CK, Leung PCK. (2005) Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-1I, and their receptors in humans. *Endocr Rev*, 26: 283-306.
- [111] Hapgood JP, Sadie H, van Biljon W, Ronacher K. (2005) Regulation of expression of mammalian gonadotrophin-releasing hormone receptor genes. *J Neuroendocrinol*, 17: 619-638.
- [112] Rahimipour S, Ben-Aroya N, Fridkin M, Koch Y. (2001) Design, synthesis, and evaluation of a long-acting, potent analogue of gonadotropin-releasing hormone. *J Med Chem*, 44: 3645-3652.
- [113] Millar RP, Pawson AJ, Morgan K, Rissman EF, Lu ZL. (2008) Diversity of actions of GnRHs mediated by ligand-induced selective signaling. *Front Neuroendocrinol*, 29: 17-35.
- [114] Chen A, Ganor Y, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Koch Y, Levite M. (2002) The neuropeptides GnRH-II and GnRH-I are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nat Med*, 8: 1421-1426.
- [115] Emons G, Grundker C, Gunthert AR, Westphalen S, Kavanagh J, Verschraegen C. (2003) GnRH antagonists in the treatment of gynecological and breast cancers. *Endocr Relat Cancer*, 10: 291-299.
- [116] Grundker C, Gunthert AR, Westphalen S, Emons G. (2002) Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol*, 146:1-14
- [117] Keller G, Schally AV, Gaiser T, Nagy A, Baker B, Halmos G, Engel JB. (2005) Receptors for luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) expressed in human non-Hodgkin's lymphomas can be targeted for therapy with the cytotoxic LHRH analogue AN-207. *Eur J Cancer*, 41: 2196-2202.
- [118] Moretti RM, Montagnani Marelli M, Van Groeninghen JC, Limonta P. (2002) Locally expressed LHRH receptors mediate the oncostatic and antimetastatic activity of LHRH agonists on melanoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3791-3797.

- [119] Szepesházi K, Schally AV, Halmos G. (2007) LH-RH receptors in human colorectal cancers: unexpected molecular targets for experimental therapy. *Int J Oncol*, 30: 1485-1492.
- [120] Aguilar-Rojas A, Huerta-Reyes M. (2009) Human gonadotropin-releasing hormone receptor-activated cellular functions and signaling pathways in extra-pituitary tissues and cancer cells (Review). *Oncol Rep*, 22: 981-990.
- [121] Cheung LW, Wong AS. (2008) Gonadotropin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS J*, 275: 5479-5495.
- [122] Kraus S, Naor Z, Seger R. (2001) Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Arch Med Res*, 32: 499-509.
- [123] Moretti RM, Mai S, Montagnani Marelli M, Bani MR, Ghilardi C, Giavazzi R, Taylor DM, Martini PG, Limonta P. (2010) Dual targeting of tumor and endothelial cells by gonadotropin-releasing hormone agonists to reduce melanoma angiogenesis. *Endocrinology*, 151: 4643-4653.
- [124] Moretti RM, Montagnani Marelli M, Mai S, Limonta P. (2008) Gonadotropin-releasing hormone agonists suppress melanoma cell motility and invasiveness through the inhibition of $\alpha 3$ integrin and MMP-2 expression and activity. *Int J Oncol*, 33: 405-413.
- [125] Dondi D, Festuccia C, Piccolella M, Bologna M, Motta M. (2006) GnRH agonists and antagonists decrease the metastatic progression of human prostate cancer cell lines by inhibiting the plasminogen activator system. *Oncol Rep*, 15: 393-400.
- [126] Enomoto M, Utsumi M, Park MK. (2006) Gonadotropin-releasing hormone induces actin cytoskeleton remodeling and affects cell migration in a cell-type-specific manner in TSU-Pr1 and DU145 cells. *Endocrinology*, 147: 530-542.
- [127] Yates C, Wells A, Turner T. (2005) Luteinising hormone-releasing hormone analogue reverses the cell adhesion profile of EGFR overexpressing DU-145 human prostate carcinoma subline. *Br J Cancer*, 92: 366-375.
- [128] Schubert A, Hawighorst T, Emons G, Grundker C. (2011) Agonists and antagonists of GnRH-I and -II reduce metastasis formation by triple-negative human breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat*, 130: 783-790.
- [129] von Alten J, Fister S, Schulz H, Viereck V, Frosch KH, Emons G, Grundker C. (2006) GnRH analogs reduce invasiveness of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 100: 13-21.

- [130] Pályi I, Vincze B, Lovas S, Mező I, Pató J, Kalnáy A, Turi G, Gaál D, Mihalik R, Péter I, Teplán I, Murphy RF. (1999) Gonadotropin-releasing hormone analogue conjugates with strong selective antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 2361-2366.
- [131] Herédi-Szabó K, Lubke J, Tóth G, Murphy RF, Lovas S. (2005) Importance of the central region of lamprey gonadotropin-releasing hormone III in the inhibition of breast cancer cell growth. *Peptides*, 26: 419-422.
- [132] Herédi-Szabó K, Murphy RF, Lovas S. (2006) Is IGnRH-III the most potent GnRH analog containing only natural amino acids that specifically inhibits the growth of human breast cancer cells? *J Pept Sci*, 12: 714-720.
- [133] Mező G, Czajlik A, Manea M, Jakab A, Farkas V, Majer Z, Vass E, Bodor A, Kapuvári B, Boldizsár M, Vincze B, Csuka O, Kovács M, Przybylski M, Perczel A, Hudecz F. (2007) Structure, enzymatic stability and antitumor activity of sea lamprey GnRH-III and its dimer derivatives. *Peptides*, 28: 806-820.
- [134] Mező I, Lovas S, Pályi I, Vincze B, Kalnáy A, Turi G, Vadász Z, Seprődi J, Idei M, Tóth G, Gulyás E, Ötvös F, Mák M, Horváth JE, Teplán I, Murphy RF. (1997) Synthesis of gonadotropin-releasing hormone III analogs. Structure-antitumor activity relationships. *J Med Chem*, 40: 3353-3358.
- [135] Kovács M, Vincze B, Horváth JE, Seprődi J. (2007) Structure-activity study on the LH- and FSH-releasing and anticancer effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-III analogs. *Peptides*, 28: 821-829.
- [136] Mező G, Mező I, Pimm MV, Kajtár J, Seprődi J, Teplán I, Kovács M, Vincze B, Pályi I, Idei M, Szekerke M, Hudecz F. (1996) Synthesis, conformation, biodistribution, and hormone-related in vitro antitumor activity of a gonadotropin-releasing hormone antagonist-branched polypeptide conjugate. *Bioconjug Chem*, 7: 642-650.
- [137] Mező G, Manea M, Szabó I, Vincze B, Kovács M. (2008) New derivatives of GnRH as potential anticancer therapeutic agents. *Curr Med Chem*, 15: 2366-2379.
- [138] Bajusz S, Janáky T, Csernus VJ, Bokser L, Fekete M, Srkalovic G, Redding TW, Schally AV. (1989) Highly potent metallopeptide analogues of luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 6313-6317.
- [139] Bajusz S, Janáky T, Csernus VJ, Bokser L, Fekete M, Srkalovic G, Redding TW, Schally AV. (1989) Highly potent analogues of luteinizing hormone-releasing hormone

containing D-phenylalanine nitrogen mustard in position 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 6318-6322.

[140] Szepesházi K, Schally AV, Juhasz A, Nagy A, Janaky T. (1992) Effect of luteinizing hormone-releasing hormone analogs containing cytotoxic radicals on growth of estrogen-independent MXT mouse mammary carcinoma in vivo. *Anticancer Drugs*, 3: 109-116.

[141] Keller G, Schally AV, Gaiser T, Nagy A, Baker B, Westphal G, Halmos G, Engel JB. (2005) Human malignant melanomas express receptors for luteinizing hormone releasing hormone allowing targeted therapy with cytotoxic luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Cancer Res*, 65: 5857-5863.

[142] Nagy A, Schally AV, Armatís P, Szepeshazi K, Halmos G, Kovacs M, Zarandi M, Groot K, Miyazaki M, Jungwirth A, Horvath J. (1996) Cytotoxic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing doxorubicin or 2-pyrrolinodoxorubicin, a derivative 500-1000 times more potent. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 7269-7273.

[143] Janáky T, Juhász A, Rékási Z, Serfőző P, Pinski J, Bokser L, Srkalovic G, Milovanovic S, Redding TW, Halmos G, et al. (1992) Short-chain analogs of luteinizing hormone-releasing hormone containing cytotoxic moieties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10203-10207.

[144] Szabó I, Manea M, Orbán E, Csampai A, Bősze S, Szabó R, Tejeda M, Gaál D, Kapuvári B, Przybylski M, Hudecz F, Mező G. (2009) Development of an oxime bond containing daunorubicin-gonadotropin-releasing hormone-III conjugate as a potential anticancer drug. *Bioconjug Chem*, 20: 656-665.

[145] Orbán E, Mező G, Schlage P, Csík G, Kulic Z, Ansorge P, Feller E, Moller HM, Manea M. (2011) In vitro degradation and antitumor activity of oxime bond-linked daunorubicin-GnRH-III bioconjugates and DNA-binding properties of daunorubicin-amino acid metabolites. *Amino Acids*, 41: 469-483.

[146] Manea M, Továri J, Tejeda M, Schulcz A, Kapuvári B, Vincze B, Mező G. (2012) In-vivo antitumour effect of daunorubicin-GnRH-III derivative conjugates on colon carcinoma-bearing mice. *Anticancer Drugs*, 23: 90-97.

[147] Manea M, Leurs U, Orbán E, Baranyai Z, Ohlschlager P, Marquardt A, Schulcz A, Tejeda M, Kapuvári B, Továri J, Mező G. (2011) Enhanced enzymatic stability and antitumor activity of daunorubicin-GnRH-III bioconjugates modified in position 4. *Bioconjug Chem*, 22: 1320-1329.

- [148] Leurs U, Mező G, Orbán E, Ohlschlager P, Marquardt A, Manea M. (2011) Design, synthesis, in vitro stability and cytostatic effect of multifunctional anticancer drug-bioconjugates containing GnRH-III as a targeting moiety. *Biopolymers*.
- [149] Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G. (1988) Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*, 41: 456-461.
- [150] Richardson VJ. (2010) Divergent and synergistic regulation of matrix metalloprotease production by cytokines in combination with C-C chemokines. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 23: 715-726.
- [151] Smith DF, Galkina E, Ley K, Huo Y. (2005) GRO family chemokines are specialized for monocyte arrest from flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289: H1976-1984.
- [152] Davel LE, Rimmaudo L, Espanol A, de la Torre E, Jasnias MA, Ribeiro ML, Gotoh T, de Lustig ES, Sales ME. (2004) Different mechanisms lead to the angiogenic process induced by three adenocarcinoma cell lines. *Angiogenesis*, 7: 45-51.
- [153] Galli S, Colombo L, Vanzuli S, Daroqui MC, del Carmen Vidal M, Jasnias MA, Sacerdote de Lustig E, Eiján AM. (2000) Characterization of a fibroblastoid mammary carcinoma cell line (LM2) originated from a mouse adenocarcinoma. *Int J Oncol*, 17: 1259-1265.
- [154] Leick V, Helle J. (1983) A quantitative assay for ciliate chemotaxis. *Anal Biochem*, 135: 466-469.
- [155] Kőhidai L, Lemberkovics E, Csaba G. (1995) Molecule dependent chemotactic responses of *Tetrahymena pyriformis* elicited by volatile oils. *Acta Protozool*, 34: 181-185.
- [156] Sáfár O, Kőhidai L, Hegedűs A. (2011) Time-delayed model of the unbiased movement of *Tetrahymena Pyriformis*. *Period Math Hung*, 63: 215-225.
- [157] Kovács P, Lovas G, Csaba G. (1994) Influence of insulin on the movement of *Tetrahymena pyriformis*. Hormonal imprinting alters the velocity. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol*, 107: 375-379.
- [158] Arcaro A, Wymann MP. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J*, 296: 297-301.
- [159] Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem*, 269: 5241-5248.

- [160] Harakawa N, Sasada M, Maeda A, Asagoe K, Nohgawa M, Takano K, Matsuda Y, Yamamoto K, Okuma M. (1997) Random migration of polymorphonuclear leukocytes induced by GM-CSF involving a signal transduction pathway different from that of fMLP. *J Leukoc Biol*, 61: 500-506.
- [161] Thelen M, Uguccioni M, Bosiger J. (1995) PI 3-kinase-dependent and independent chemotaxis of human neutrophil leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 217: 1255-1262.
- [162] Atienza JM, Yu N, Kirstein SL, Xi B, Wang X, Xu X, Abassi YA. (2006) Dynamic and label-free cell-based assays using the real-time cell electronic sensing system. *Assay Drug Dev Technol*, 4: 597-607.
- [163] Giaever I, Keese CR, Wegener J. (1984) Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field
Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 3761-3764.
- [164] Wegener J, Keese CR, Giaever I. (2000) Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res*, 259: 158-166.
- [165] Xiao C, Luong JH. (2010) A simple mathematical model for electric cell-substrate impedance sensing with extended applications. *Biosens Bioelectron*, 25: 1774-1780.
- [166] Essman EJ. (1987) The serotonergic system in *Tetrahymena pyriformis*. *Ric Clin Lab*, 17: 77-82.
- [167] Csaba G. (1993) Presence in and effects of pineal indoleamines at very low level of phylogeny. *Experientia*, 49: 627-634.
- [168] Kőhidai L, Karsa J, Csaba G. (1994) Effects of hormones on the chemotaxis in *Tetrahymena* - Investigations on receptor memory. *Microbios*, 77: 75-85.
- [169] Csaba G, Pállinger E. (2009) How applicable is the general adaptation syndrome to the unicellular *Tetrahymena*? *Cell Biochem Funct*, 27: 12-15.
- [170] Iwata H, Kariya K, Okamoto H. (1971) Amine oxidative system in *Tetrahymena pyriformis* W. *Experientia*, 27: 388-389.
- [171] Csaba G, Kovács P, Pállinger E. (2007) How does the unicellular *Tetrahymena* utilise the hormones that it produces? Paying a visit to the realm of atto-and zeptomolar concentrations. *Cell Tissue Res*, 327: 199-203.

- [172] Csaba G, Pállinger E. (2008) A general response to stressors by the unicellular *Tetrahymena*: effect of stress on the hormone levels. *Cell Biochem Funct*, 26: 797-800.
- [173] Csaba G, Kovács P, Pállinger E. (2008) Effect of femtomolar concentrations of hormones on insulin binding by *Tetrahymena*, as a function of time. *Cell Biochem Funct*, 26: 205-209.
- [174] Csaba G, Kovács P, Tóthfalusi L, Pállinger E. (2006) Effects of extremely low concentrations of hormones on the insulin binding of *Tetrahymena*. *Cell Biol Int*, 30:957-962.
- [175] Csaba G. (2012) The hormonal system of the unicellular *Tetrahymena*: A review with evolutionary aspects. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 59: 131-156.
- [176] Csaba G, Pállinger E. (2011) Thyrotropin (TSH) regulates triiodothyronine (T3) production in the unicellular *Tetrahymena*. *Acta Biol Hung*, 62: 228-234.
- [177] Csaba G. (2008) Hormonal imprinting: phylogeny, ontogeny, diseases and possible role in present-day human evolution. *Cell Biochem Funct*, 26: 1-10.
- [178] Csaba G, Németh G, Vargha P. (1982) Development and persistence of receptor 'memory' in a unicellular model system. *Exp Cell Biol*, 50: 291-294.
- [179] Csaba G, Kovács P. (1995) Insulin treatment (hormonal imprinting) increases the insulin production of the unicellular *tetrahymena* long term. Is there a simultaneous formation of hormone receptor and hormone? *Cell Biol Int*, 19: 1011-1014.
- [180] Csaba G. (1980) Phylogeny and ontogeny of hormone receptors: the selection theory of receptor formation and hormonal imprinting. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 55: 47-63.
- [181] Csaba G, Kőhidai L. (1989) Interrelationship of hormone concentration, hormonal imprinting and receptor down-regulation in *Tetrahymena*. *Acta Protozool*, 28: 183-186.
- [182] Feldman JM, Roche JM, Blum JJ. (1977) Monoamine oxidase and catechol-O-methyl transferase activity in *Tetrahymena*. *J Protozool*, 24: 459-462.
- [183] Carpené C, Collon P, Remaury A, Cordi A, Hudson A, Nutt D, Lafontan M. (1995) Inhibition of amine oxidase activity by derivatives that recognize imidazoline I2 sites. *J Pharmacol Exp Ther*, 272: 681-688.
- [184] Wilfried K, Muller T, Kruger R, Horst P. (1996) Selegiline stimulates biosynthesis of cytokines interleukin-1 beta and interleukin-6. *Neuroreport*, 7: 2847-2848.
- [185] Klegeris A, McGeer PL. (2000) R-(-)-Deprenyl inhibits monocytic THP-1 cell neurotoxicity independently of monoamine oxidase inhibition. *Exp Neurol*, 166: 458-464.

- [186] Fabian I, Aronson M. (1978) Monoamine oxidase activity of macrophages at rest and during phagocytosis. *Biochem Pharmacol*, 27: 1909-1911.
- [187] Herédi-Szabó K, Murphy RF, Lovas S. (2006) Different signal responses to Lamprey GnRH-III in human cancer cells. *Int J Pept Res Ther*, 12: 359-364.
- [188] Kovács P, Csaba G. (1999) Fluorimetric analysis of phospholipase activity in *Tetrahymena pyriformis* GL. *Biosci Rep*, 19: 81-87.
- [189] Kovács P, Pállinger E. (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase-like activity in *Tetrahymena*. Effects of wortmannin and LY294002. *Acta Protozool*, 42: 277-285.
- [190] Ricci N, Russo A, Banchetti R, Kovacs P. (1995) The ethograms of *Tetrahymena pyriformis* GL and *T. malaccensis*. *Cytobios*, 83: 139-158.
- [191] Fürst Z. *Farmakológia. Medicina Kiadó, Budapest*, 2004.
- [192] Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa MC. (2010) New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food Chem Toxicol*, 48: 1425-1438.
- [193] Simunek T, Sterba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R, Gersl V. (2009) Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep*, 61: 154-171.
- [194] Rihova B. (1995) Antibody-targeted polymer-bound drugs. *Folia Microbiol (Praha)*, 40: 367-384.
- [195] Leurs U, Lajko E, Mezo G, Orban E, Ohlschlager P, Marquardt A, Kohidai L, Manea M. (2012) GnRH-III based multifunctional drug delivery systems containing daunorubicin and methotrexate. *Eur J Med Chem*, 52: 173-183.
- [196] Reddig PJ, Juliano RL. (2005) Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev*, 24: 425-439.
- [197] Mező G, Láng O, Jakab A, Bai KB, Szabó I, Schlosser G, Láng J, Kőhidai L, Hudecz F. (2006) Synthesis of oligotuftsin-based branched oligopeptide conjugates for chemotactic drug targeting. *J Pept Sci*, 12: 328-336.
- [198] Bogason A, Masquelier M, Lafolie P, Skogastierna C, Paul C, Gruber A, Vitols S. (2010) Daunorubicin metabolism in leukemic cells isolated from patients with acute myeloid leukemia. *Drug Metab Lett*, 4: 228-232.
- [199] Lofgren C, Lehmann S, Jonsson-Videsater K, Mollgard L, Linder O, Tidefelt U, Hassan M, Paul C. (2007) Higher plasma but not intracellular concentrations after infusion

with liposomal daunorubicin compared with conventional daunorubicin in adult acute myeloid leukemia. *Ther Drug Monit*, 29: 626-631.

[200] Kőhidai L, Csaba G, László V. (1990) Persistence of receptor "memory" induced in *Tetrahymena* by insulin imprinting. *Acta Microbiol Hung*, 37: 269-275.

[201] Csaba G. (2011) The biological basis and clinical significance of hormonal imprinting, an epigenetic process. *Clin Epigenetics*, 2: 187-196.

[202] Kovacs P, Csaba G, Torok O. (1989) Interrelationships between the imprinting potential and biological activity of insulin derivatives: studies on *Tetrahymena* and Chang liver cells. *Cytobios*, 60: 97-101.

[203] Bai KB, Láng O, Orbán E, Szabó R, Kőhidai L, Hudecz F, Mező G. (2008) Design, synthesis, and in vitro activity of novel drug delivery systems containing tuftsin derivatives and methotrexate. *Bioconjug Chem*, 19: 2260-2269.

[204] Casanova I, Bosch R, Lasa A, Parreno M, Cespedes MV, Brunet S, Nomdedeu JF, Mangués MA, Sierra J, Mangués R. (2008) A celecoxib derivative inhibits focal adhesion signaling and induces caspase-8-dependent apoptosis in human acute myeloid leukemia cells. *Int J Cancer*, 123: 217-226.

[205] Konopleva M, Tabe Y, Zeng Z, Andreeff M. (2009) Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. *Drug Resist Updat*, 12: 103-113.

[206] Luesink M, Jansen JH. (2010) Advances in understanding the pulmonary infiltration in acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 151: 209-220.

[207] Montuori N, Selleri C, Risitano AM, Raiola AM, Ragno P, Del Vecchio L, Rotoli B, Rossi G. (1999) Expression of the 67-kDa laminin receptor in acute myeloid leukemia cells mediates adhesion to laminin and is frequently associated with monocytic differentiation. *Clin Cancer Res*, 5: 1465-1472.

[208] Iwata H, Kariya K. (1973) Adrenergic mechanism in *Tetrahymena*. I. Changes in monoamine oxidase activity during growth. *Experientia*, 29: 265-266.

[209] Kőhidai L, Darvas Z, Csaba G. (1987) The effect of varying illumination on imprinting of *Tetrahymena* by insulin. *Acta Microbiol Hung*, 34: 179-185.

[210] Wang S, Nakashima S, Sakai H, Numata O, Fujiu K, Nozawa Y. (1998) Molecular cloning and cell-cycle-dependent expression of a novel NIMA (never-in-mitosis in

- Aspergillus nidulans*)-related protein kinase (TpNrk) in *Tetrahymena* cells. *Biochem J*, 334: 197-203.
- [211] Csaba G, Kovács P, Pállinger E. (2007) Increased hormone levels in *Tetrahymena* after long-lasting starvation. *Cell Biol Int*, 31: 924-928.
- [212] Kőhidai L, Thomka M, Csaba G. (1986) Age of the cell culture: a factor influencing hormonal imprinting of *Tetrahymena*. *Acta Microbiol Hung*, 33: 295-300.
- [213] Csaba G, Lajko E, Pallinger E. (2010) Hormonal effects on *Tetrahymena*: change in case of combined treatment. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 57: 393-399.
- [214] Csaba G, Németh G, Vargha P. (1982) Influence of hormone concentration and time factor on development of receptor memory in a unicellular (*Tetrahymena*) model system. *Comp Biochem Physiol B*, 73: 357-360.
- [215] Kőhidai L, Csaba G. (1990) Impact of length of exposure of different molecular mass on the establishment of imprinting in *Tetrahymena*. *Acta Protozool*, 29: 315-319.
- [216] Muto Y, Tanabe Y, Kawai K, Okano Y, Lio H. (2010) Climacostol inhibits *Tetrahymena* motility and mitochondrial respiration. *Cent Eur J Biol*, 6: 99-104.
- [217] Csaba G, Kovács P. (1990) Impact of 5-azacytidine on insulin binding and insulin-induced receptor formation in *tetrahymena*. *Biochem Biophys Res Commun*, 168: 709-713.
- [218] Haberle D, Szökő E, Halász AS, Magyar K. (2001) The effect of low oral doses of (-)-deprenyl and its metabolites on DSP-4 toxicity. *J Neural Transm*, 108: 1239-1247.
- [219] Miller HH, Shore PA, Clarke DE. (1980) In vivo monoamine oxidase inhibition by d-amphetamine. *Biochem Pharmacol*, 29: 1347-1354.
- [220] Kőhidai L. (1999) Chemotaxis: The proper physiological response to evaluate phylogeny of signal molecules. *Acta Biol Hung*, 50: 375-394.
- [221] Kőhidai L, Láng O, Csaba G. (2003) Chemotactic-range-fitting of amino acids and its correlations to physicochemical parameters in *Tetrahymena pyriformis*--evolutionary consequences. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 49 Online Pub: OL487-495.
- [222] Clement B, Behrens D, Moller W, Cashman JR. (2000) Reduction of amphetamine hydroxylamine and other aliphatic hydroxylamines by benzamidoxime reductase and human liver microsomes. *Chem Res Toxicol*, 13: 1037-1045.
- [223] Palecek SP, Loftus JC, Ginsberg MH, Lauffenburger DA, Horwitz AF. (1997) Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385: 537-540.

- [224] Kun L, Mihala N, Tóth M, Süliné Varga H, Kőhidai L. Extracelluláris mátrix szekvenciák kemotaktikus és adhéziónak hatása monocita sejtvonalakban. Angiotenzinnel történő előkezelés hatása. Szeged, Magyarország 2004.
- [225] Reed JC. (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, 17: 2941-2953.
- [226] Leick V, Hellung-Larsen P. (1992) Chemosensory behaviour of *Tetrahymena*. *Bioessays*, 14: 61-66.
- [227] Muto Y, Kőhidai L. (1999) Image analysis for recording cell locomotion. *Bull Coll Gifu Univ* 5: 87-93.
- [228] Romanelli RG, Barni T, Maggi M, Luconi M, Failli P, Pezzatini A, Pelo E, Torricelli F, Crescioli C, Ferruzzi P, Salerno R, Marini M, Rotella CM, Vannelli GB. (2004) Expression and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in human olfactory GnRH-secreting neurons: an autocrine GnRH loop underlies neuronal migration. *J Biol Chem*, 279: 117-126.
- [229] Kőhidai L, Kovacs K, Csaba G. (2002) Direct chemotactic effect of bradykinin and related peptides-significance of amino- and carboxyterminal character of oligopeptides in chemotaxis of *tetrahymena pyriformis*. *Cell Biol Int*, 26: 55-62.
- [230] Kőhidai L, Tóth K, Ruskoaho H, Csaba G. (2001) Effect of vasoactive peptides in *Tetrahymena* – Chemotactic properties of endothelins (ET-1, ET-2, ET-3, fragment 11-21 of ET-1 and big endothelin) – a short-term inducible signaling mechanism of chemotaxis. *Cell Biol Int*, 25: 1173-1177.
- [231] Láng O, Illyés E, Menyhárd DK, Láng J, Sebestyén F, Hudecz F, Kőhidai L. (2012) Chemotaxis induced by SXWS tetrapeptides in *Tetrahymena*--overlapping chemotactic effects of SXWS sequences and their identical amino acids. *J Mol Recognit*, 25: 24-31.
- [232] Illyés E, Bősze S, Láng O, Sebestyén F, Kőhidai L, Hudecz F. (2002) A new class of chemotactic peptides containing EWS motif: A mini-review. *Chim Oggi*, 20: 55-61.
- [233] Nam SW, Kim ST, Lee KM, Kim SH, Kou S, Lim J, Hwang H, Joo MK, Jeong B, Yoo SH, Park S. (2009) N-Methyl-D-aspartate receptor-mediated chemotaxis and Ca(2+) signaling in *Tetrahymena pyriformis*. *Protist*, 160: 331-342.
- [234] O'Neill JB, Pert CB, Ruff MR, Smith CC, Higgins WJ, Zipser B. (1988) Identification and characterization of the opiate receptor in the ciliated protozoan, *Tetrahymena*. *Brain Res*, 450: 303-315.

- [235] Mező G, Manea M, Jakab A, Kapuvári B, Bősze S, Schlosser G, Przybylski M, Hudecz F. (2004) Synthesis and structural characterization of bioactive peptide conjugates using thioether linkage approaches. *J Pept Sci*, 10: 701-713.
- [236] Mező G, Szabó I, Bősze S, Szabó R, Jakab A, Bai KB, Kapuvári B, Vincze B, Boldizsár M, Csuka O, Kovács M, Hudecz F. Drug delivery based on GnRH-III as targeting moiety. In: Rolka K, Rekowski P, Stilberring J (szerk.), *Peptides 2006*. Kenes International, Geneva, Switzerland, 2006: p. 558-559.
- [237] Mező G, Kalászi A, Reményi J, Majer Z, Hilbert A, Láng O, Kőhidai L, Barna K, Gaál D, Hudecz F. (2004) Synthesis, conformation, and immunoreactivity of new carrier molecules based on repeated tuftsin-like sequence. *Biopolymers*, 73: 645-656.
- [238] Kőhidai L, Tóth K, Ruskoaho H, Csaba G. (2001) Effect of vasoactive peptides on *Tetrahymena*. chemotactic properties of endothelins (ET-1, ET-2, ET-3, fragment 11-21 of ET-1 and big endothelin-1): a short-term inducible signalling mechanism of chemotaxis. *Cell Biol Int*, 25: 1173-1177.
- [239] Krsmanovic LZ, Mores N, Navarro CE, Arora KK, Catt KJ. (2003) An agonist-induced switch in G protein coupling of the gonadotropin-releasing hormone receptor regulates pulsatile neuropeptide secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 2969-2974.
- [240] Jain M, Bakhshi S, Shukla AA, Chauhan SS. (2010) Cathepsins B and L in peripheral blood mononuclear cells of pediatric acute myeloid leukemia: potential poor prognostic markers. *Ann Hematol*, 89: 1223-1232.
- [241] Podgorski I, Sloane BF. (2003) Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem Soc Symp*: 263-276.
- [242] Finch AR, Green L, Hislop JN, Kelly E, McArdle CA. (2004) Signaling and antiproliferative effects of type I and II gonadotropin-releasing hormone receptors in breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 89: 1823-1832.

10. SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Csaba G, **Lajkó E**, Pállinger É. (2010) Serotonin in Tetrahymena. How does it work? Acta Protozool 49: 133-138.
IF: 0,881
2. Csaba G, **Lajkó E**, Pállinger É. (2010) Comparison of effect of hormones (histamine, serotonin, insulin) on the hormone (serotonin, histamine, triiodothyronine, ACTH) synthesis of Tetrahymeny in medium or salt solution. Cell Biol Int. 34: 1095-1098.
IF: 1,747
3. **Lajkó E**, Csaba G, Pállinger É. (2011) Investigations on the triiodothyronine (T3)-specificity of thyrotropic (TSH) and gonadotropic (HCG) hormone in the unicellular Tetrahymena. Acta Microbiol Immunol Hung. 58: 85-91
IF: 0,787
4. Csaba G, **Lajkó E**, Pállinger É. (2011) Effect of different concentrations of hormones on the hormone production of Tetrahymena in nutrient-free physiological milieu. Exp Parasitol. 129: 179-182.
IF: 2,122
5. **Lajkó E**, Polgár L, Lengyel J, Láng O, Kőhidai L, Magyar K. (2012) Basic cell physiological activities (cell adhesion, chemotaxis, proliferation) induced by deprenyl and its derivatives in Mono Mac 6 human monocytes. J Neural Transm. 119: 545-556
IF: 2,730
6. Leurs U, **Lajkó E***, Mező G, Orbán E, Öhlschläger P, Marquardt A, Kőhidai L, Manea M. (2012) GnRH-III based multifunctional drug delivery systems containing both daunorubicin and methotrexate. Eur J Med Chem. 52:173-183
*IF: 3,346 *(Megosztott első szerző)*
7. Kőhidai L, **Lajkó E**, Pállinger É, Csaba G. (2012) Verification of epigenetic inheritance in a unicellular model system. Multigenerational effects of hormonal imprinting. Cell Biol Int. 36: 951-959
IF: 1,482

8. **Lajkó E**, Szabó I, Andódy K, Pungor A, Mező G, Kőhidai L. (2013) Investigation on chemotactic drug targeting (chemotaxis and adhesion) inducer effect of GnRH-III derivatives in Tetrahymena and human leukemia cell line. J Pept Sci. 19: 46-58.

IF: 1,799

Egyéb közlemények

1. Csaba G, **Lajkó E**, Pállinger É. (2010) Hormonal effects on Tetrahymena: change in case of combined treatment. Acta Microbiol Immunol Hung. 57: 393-3999

IF: 0,625

2. **Lajkó E**, Csaba G, Pállinger É. (2012) Durable effect of heat-stress on the hormone production of Tetrahymena. Effect of insulin on the consequences of stress. Acta Microbiol Immunol Hung. 59: 249-256.

IF: 0,787

3. **Lajkó E**, Pállinger É, Csaba G. (2012) Effect of glucose on the insulin production and insulin binding of Tetrahymena. Acta Microbiol Immunol Hung. 59: 461-468.

IF: 0.787

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik a doktori munkám során szakmai segítségükkel és baráti támogatásukkal mindvégig mellettem álltak.

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek **Dr. Kőhidai Lászlónak**, hogy szakmai tanácsaival, észrevételeivel éveken át irányította munkámat, és bátorításával, türelmével segített átjutnom a nehézségeken.

Köszönöm **Dr. Falus András** Professzor Úrnak és **Dr. Buzás Edit** Professzorasszonynak, a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet volt és jelenlegi igazgatójának, hogy biztosították munkám elvégzéséhez szükséges intézeti feltételeket.

Köszönettel tartozom **Dr. Csaba György** Professzor Úrnak a Tetrahymena modellen végzett közös munkákért és az irántam tanúsított figyelméért.

Köszönöm **Dr. Láng Orsolyának** és **Dr. Pállinger Évának**, hogy szakmai tanácsaikkal segítették a kísérletes munkák gyakorlati elsajátítását és értékelését.

Külön köszönet illeti **Dr. Mező Gábort** és **Dr. Szabó Ildikót** az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport tagjait, **Marilena Manea-t** és **Ulrike Leurs-t** a Konstanz Egyetem, Analitikai Kémiai és Biopolimer Szerkezetanalitikai Laboratórium munkatársait, hogy biztosították munkámhoz az általuk szintetizált GnRH-III peptid-származékokat.

Köszönetet mondok **Dr. Magyar Kálmán** Professzor Úrnak a Semmelweis Egyetem Gyógyszerhatástani Intézetéből, hogy az *R*-deprenylt és derivátumait rendelkezésemre bocsájtotta, és szakmai tudásával segítette az eredmények értelmezését.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Kemotaxis Munkacsoport tagjainak, elsősorban **Dr. Polgár Líviának** és **Láng Júliának**, hogy szakmai segítségükkel és baráti támogatásukkal hozzájárultak munkám elkészültéhez.

Köszönöm a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet munkatársainak, a munkám során nyújtott technikai és baráti segítséget.

Köszönöm az **AESCULAP a Gyógyszerésztudományért és Oktatásért Alapítvány Kuratóriumának** a doktori munkám befejezéséhez nyújtott anyagi segítséget.

Szeretném megköszönni Páromnak, a statisztikai kérdések megoldásában nyújtott segítségén túl, mindazt a szeretetet és megértést, amivel bátorított és mellettem állt.

Hálával tartozom Szüleimnek és Öcsémnek, hogy feltétlen szeretetükkel és támogatásukkal eljuthattam idáig, és elviselték a munkámmal járó nehézségeket.