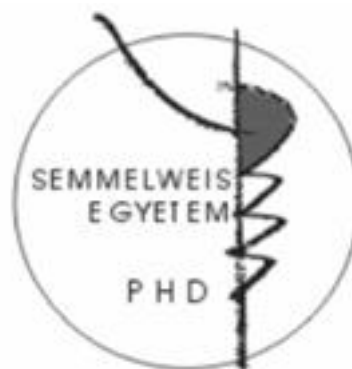


Bioaktív molekulák alapvető sejtélettani folyamatokra kifejtett hatásának vizsgálata emlős és egysejtű rendszerben

Doktori tézisek

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.
Dr. Szabó Gábor tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest

2013

BEVEZETÉS

A sejt környezetében jelenlévő kémiai, időbeli és térbeli információt hordozó bioaktív molekulák – szecernált endogén hírvivők (hormonok), vagy szintetikus gyógyszervegyületek – a sejtek élettani folyamatainak egész sorát képesek befolyásolni. A sejtfiziológiai reakciók közül a kemotaxis, a sejtek irányított vektoriális mozgása, a hozzá kötődő jelenségekkel (adhéziós készség, parakrin/autokrin kommunikáció, proliferáció) a filogenezis alacsonyabb és magasabb szintjét képviselő szervezetekben fontos reguláló és végrehajtó mechanizmusok résztvevői. Az evolúció alacsonyabb szintjén az egysejtű túlélését befolyásolják, a szöveti rendszerbe szerveződött sejtek esetén az adhézió, a migráció és a proliferáció összerendezett működése számos normál élettani folyamat (pl. immunvédekezés, ivaros szaporodás, differenciálódás) alapját képezik, míg működésük, vagy szabályozásuk zavara betegségek megjelenéséhez, többek között neurodegeneratív és gyulladással autoimmun kórképek, valamint daganatok kialakulásához vezethet. A sejtek megváltozott adhéziós-, migrációs, és osztódási képessége ígéretes terápiás célpontnak számít és gyógyszeres befolyásolása eredményes lehet a fent említett kórfolyamatok megelőzésében és kezelésében.

A gyógyszerek célsejt szelektivitásának növelésével nagymértékben javítható a terápia hatékonysága. Ez különösen a tumorerő kezelésében vált egyre fontosabbá, ahol az alacsony terápiás indexű tumorelleses hatóanyagok alkalmazásának legfőbb korlátját az egészséges sejtek károsodásából adódó súlyos mellékhatások kialakulása jelenti. A célzott daganatterápia (i) a malignus transzformációban kritikus szerepet játszó, rendszerint túlműködő biokémiai folyamatok gátlásán, vagy (ii) az egészséges sejtekhez képest nagyobb mértékben kifejeződő hormon receptorok elérésén alapul. Az egyik ilyen azonosított molekuláris célpont a monoamin-oxidáz enzim (MAO), melynek túltermelését több tumortípusban (vese-, prosztata-, agydaganat) kimutatták; valamint gátlásával *in vitro* és *in vivo* modellben egyaránt szignifikáns tumorelleses hatást sikerült elérni. A monoamin-oxidáz B (MAO-B) szelektív gátlószereként ismert *R*-deprenyl a Parkinson-kór kezelésében alkalmazott gyógyszer, összetett hatásprofilja (pl. antiapoptotikus, tumorelleses, antioxidáns) révén azonban egyéb idegrendszeren kívüli betegség, mint például az ateroszklerózis, vagy a daganatok megelőzéséhez és kezeléséhez is hozzájárulhat. Az *R*-deprenyl farmakológiai hatásai sztereoszelektívnek bizonyultak, és azok elérésében a citokróm P450 és a flavin-tartalmú oxigenáz enzimek által keletkező metabolitoknak is fontos szerepet tulajdonítanak.

A célzott tumorterápia megvalósítására egy másik lehetőség különböző hatóanyag szállító rendszerek alkalmazása. Ebben az esetben a gyógyszer olyan hordozóhoz/irányítóhoz van kapcsolva, amelyek képesek a tumorsejtekben fokozott expressziót mutató receptorokhoz kötődni és ezáltal a kapcsolt hatóanyagot szelektíven, a hatáshoz szükséges koncentrációban a

célsejtekhez jutatni (gyógyszer-célbajuttatás). A gonadotropin-releasing hormon receptor (GnRH-R) egy, a tumor sejteken nagyszámban kifejeződő, míg az egészséges sejtekből gyakorlatilag hiányzó fehérjecélpontok közül. A természetes GnRH hormonok elsősorban a nemi hormon szintézis és a gametogenezis szabályozásáért felelősek. A célzott kemoterápia, előnyben részesíti azokat a GnRH származékokat – pl. GnRH-III – amelyek gyakorlatilag endokrin mellékhatások fellépése nélkül, közvetlenül képesek gátolni a GnRH-R pozitív tumorok növekedését. Az egyes GnRH-III származékok a célzott tumorterápiás felhasználásra szánt hatóanyag-tartalmú konjugátumok részeként, mint irányító hatású hordozók hivatottak biztosítani a hozzájuk kapcsolt hatóanyag(ok) szelektív célbajuttatását.

A tumorsejtek szóródása a daganatprogresszió folyamatának fontos mozzanata, amely többek között a célzott terápia sikerességét is 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. 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 alapú hordozó rendszerek és konjugátumok felhasználásával nyilvánvaló fontossággal bír a metasztázisok kialakulásának megelőzése szempontjából.

Munkánk a célzott terápia kidolgozására lehetőséget adó molekuláris célpontokon (MAO vagy GnRH-R) ható két vegyület csoport – a MAO-szubsztrát szerotonin, MAO-bénítő *R*-deprenyl származékok, valamint a natív GnRH analógok, a GnRH-III szintetikus származékai és hatóanyag-tartalmú konjugátumai – sejtfiziológiai folyamatokra kifejtett hatásának tanulmányozását tűzte ki célul az evolúció alacsonyabb és magasabb szintjét képviselő modell-rendszerekben, keresve olyan ligandokat, amelyek egyszerre képesek lehetnek gátolni a daganatok növekedését és szóródását.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Munkám első fázisában a deprenyl származékok antimetasztatikus hatását, a tumorprogresszióban betöltött szerepét, és sejtleletani 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, és a deprenyl származékok képesek-e kiváltani a modell-sejt kemotaktikus reakcióját?
- Az *R*-deprenyl és származékai rendelkeznek-e adhéziót befolyásoló, kemotaktikus és antiproliferatív hatással eltérő malignitású tumor sejtvonalakon, és ezek a hatások hozzájárulhatnak-e a tumorok növekedésének és szóródásának megakadályozásához?

2. Munkám folytatásában, a különböző GnRH peptidek sejtfiziológiai folyamatokra kifejtett hatását először Tetrahymena modell-sejten tanulmányoztuk, majd a GnRH-III származékok és hatóanyag-tartalmú konjugátumaik magasabb rendű sejtvonalon végzett, részletesebb in vitro vizsgálatával a következő kérdésekre kerestem a választ.

- 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 hormontermelésére és kemokinetikus aktivitására, összehasonlítva más magasabb rendűekre jellemző hormonok hatásaival?
- 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 gyógyszer-molekulára 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 antimetsztatikus ágensek?

MÓDSZEREK

Vizsgált anyagok

A vizsgált 10 deprenyl származékot a Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára / Sanofi-Aventis Zrt. (Budapest, Magyarország) ingyen bocsájtotta rendelkezésünkre.

Tetrahymena modell-sejten végzett kísérletek során alkalmazott hormonok a Sigma-Aldrich Kft.-től vagy a Human Gyógyszergyártó Rt.-től kerültek beszerzésre.

A disszertációban szereplő összes GnRH származék szintézise, tisztítása és analitikai vizsgálata az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport és a Konstanzi Egyetem, Analitikai Kémiai és Biopolimer Szerkezetanalitikai Laboratórium közreműködésével történt.

Modell-sejtek

A MAO enzimen és a GnRH receptoron ható természetes és szintetikus ligandok sejtélettani hatásának bevezető vizsgálatai *Tetrahymena pyriformis* GL modell-sejten történtek. Modell-sejt választásunkat a laborgyakorlati előnyökön (egyszerű feltételek mellett tenyészhető, 150 perces generációs időjéből adódóan sokadik - 1000. - utódgeneráció is vizsgálható) túl az indokolja, hogy sejtélettani reakciói (érzékeny kemotaktikus és kemokinetikus aktivitás), szabályozó folyamatai (membrán receptorok, parakrin/autokrin hatások) nagyfokú homológiját mutat a magasabb rendűekre jellemző mechanizmusokkal.

A deprenyl derivátumok, valamint a GnRH-III peptid variánsok és konjugátumaik antimetasztatikus hatásának elemzésére vállalkozva, sejtélettani hatásaik vizsgálatát kiértékelését magasabb rendű – akut mieloid leukémiai eredetű Mono Mac 6 (MM6) humán monocita, és LM2 egér emlő adenokarcinóma – sejtvonalakon is elvégeztük.

Kemotaxis mérőmódszer

Tetrahymena modell-sejten végzett kemotaxis vizsgálatainkhoz két-kamrás kapilláris kemotaxis assayt alkalmaztuk.

A MM6 sejtek kemotaktikus válaszkészségének mérése módosított Boyden-kamrás eljárással (NeuroProbe® kamrában) történt. A kemotaktikus reakciót mutató sejtek számát MTT-teszt segítségével állapítottuk meg.

Úszási paraméterek vizsgálata (tracking analízis)

A *Tetrahymena* úszási viselkedésének elemzése során a sejtek random mozgásáról Axio Observer inverz mikroszkóp felhasználásával, az AxioVision Rel 4.7.1 program Time Lapse üzemmódjával készítettünk felvételeket, amit a Cell Tracker modul segítségével értékeltünk ki. Meghatároztuk a sejtek átlagsebességét és a megtett út tekervényességét (tortuosity).

Jelátviteli útvonalak vizsgálata

A kemoattraktáns GnRH származékok indukálta szignalizáció vizsgálata során a foszfolipáz C- γ aktivációját az enzim foszforilált formáját felismerő PLC anti-phospho-PLC γ 1 (Alexa 647) ellenanyaggal történő jelölést követően áramlási citométerben határoztuk meg. A foszfatidil-inozitol 3-kináz szerepét specifikus gátlószerek (wortmannin és LY294002) felhasználásával jellemeztük.

Impedimetrián alapuló adhézió mérőmódszer

Az impedancia valós idejű regisztrálásán alapuló xCELLigence és ECIS (Electrical Cell-substrate Impedance Sensing) rendszerek közös jellemzője, hogy a sejtek, a szigetelő tulajdonságú sejtmembránjuknak köszönhetően, az alkalmazott elektródok felszínére történő kitapadásuk során impedancia emelkedést okoznak, amely arányos a kitapadt sejtek számával

és az adhézió mértékével. A MM6 sejtek adhéziós viselkedését és az egyes kezelések hatását xCELLigence rendszerben vizsgáltuk. LM2 sejtek esetén az ECIS technika lehetőséget adott a deprenyl származékok adhézióra és migrációra kifejtett egyidejű hatásának vizsgálatára is.

Proliferáció és citotoxicitás vizsgálata

Munkánk során a szerotonin kezelés (imprinting) hatását tanulmányoztuk a *Tetrahymena pyriformis* proliferációjára az idő függvényében (az inkubáció 6, 18, 24, 48. órájában).

A deprenyl származékok és a hatóanyag-tartalmú GnRH-III konjugátumok direkt tumorelles aktivitását, 24, 48, 72 órás inkubációt követően a vegyületek antiproliferatív és citotoxikus hatásának vizsgálatával kívántuk igazolni MM6 sejteken. Mindkét kísérleti rendszerben a sejtszámváltozások mennyiségi jellemzésére az impedimetria elvén működő CASY TT sejtszámláló készüléket használtuk, amely a sejtszám mellett a sejtméret eloszlás meghatározására és az élő-halott sejtek elkülönítésére is lehetőséget adott.

Hormontartalom meghatározás Tetrahymena sejtekben

A magasabb rendűekre jellemző szignálmolekulák a Tetrahymena intracelluláris hormon tartalmára kifejtett hatását indirekt immuncitokémiai jelölést (anti-szerotonin, anti-hisztamin, anti-T3, anti-endorfin, anti-ACTH, anti-adrenalin primer antitest + FITC anti-nyúl IgG másodlagos antitest) követően áramlási citometriás mérés során tanulmányoztuk.

Hormonális imprinting vizsgálatok

A szerotoninnal kiváltott imprinting hosszú távú hatását Tetrahymena sejteken, sorozatos (heti kétszer) átoltást (60 és 120 napon keresztül) követően, az előkezelést követő 500. és 1000. utódgenerációk funkcionális vizsgálatával elemeztük. Az 500. és 1000. generációban négy index mérésére került sor: a (i) hormon szintézis és (ii) sejtosztódás vizsgálata során nem alkalmaztunk újbóli kezelést, míg (iii) a kemotaktikus aktivitás és (iv) az úszási viselkedés meghatározásánál ismételt kezelésben is részesítettük az imprintált sejteket.

Statisztikai analízis

A vizsgálati eredmények – kontrollra normalizált párhuzamos mérések átlaga \pm SD – statisztikai kiértékelése Origin Pro 8.0 program segítségével történt. A kemotaxis és sejtadhézióról nyert adatok szignifikancia analíziséhez az ANOVA módszert használtuk, az áramlási citometria és a CASY TT által szolgáltatott hisztogramok szignifikancia vizsgálatához Kolmogorov-Smirnov tesztet alkalmaztunk. A szignifikancia szintek jelölése a következő módon történt: x – $p < 0,05$; y – $p < 0,01$; z – $p < 0,001$.

EREDMÉNYEK

R-deprenyl és származékai

Szerotonin rövid és hosszú távú hatásai Tetrahymena modell-sejten

A MAO gátló R-deprenyl és származékainak a Tetrahymena sejtfiziológiai paramétereire (hormontartalom, kemotaktikus aktivitás) kifejtett hatásai mellett vizsgáltuk a MAO természetes szubsztrátjának számító szerotonin rövid és hosszú távú hatását.

Korábbi vizsgálatokban igazolták, hogy Tetrahymena csillós egysejtűben a magasabb rendűekre jellemző hormonális szabályozás számos eleme – gerincesekre jellemző hormonok, felismerésükre képes receptorok, jelátviteli mechanizmusok – jelen van. A sejt édesvízi közegében a hormonális interakciók sejtélettani hatását a hormonok nagymértékű kihígulása, a környezetben oldott tápanyag molekulák mennyisége és az expozíció ideje is befolyásolhatja. A szerotonin a Tetrahymena sejtek endogén hormon tartalmára kifejtett hatása is eltért attól függően, hogy milyen közegben történt a kezelés. Kizárólag, inorganikus sókat tartalmazó Losina-Losinsky oldatban tudtunk szignifikáns hisztamin és ACTH szint emelkedést kimutatni, ami már femtomoláris és az alatti koncentrációkban is megnyilvánult. Megfigyelésünk szerint a hatások előidézésében az időtényező is fontos szerepet játszik. Eredményeink jelentőségét az adhatja, hogy a sejt normál közegét a tenyésztéshez használt tápanyagdús médiumhoz képest a Losina-oldat jobban modellezi, és hormonok a nagyfokú kihígulásuk ellenére, a Tetrahymena kellően érzékeny receptorkészletének köszönhetően, koncentrációfüggő módon befolyásolhatják a sejtek fiziológiás folyamatait.

A kezelések egy speciális típusát jelenti a hormonnal történő első találkozás alkalmával lezajló élettani jelenség, a hormonális imprinting, ami a sejtek tartósan – utódsejtjeire is továbbadott – módosult funkcióit eredményezi. A kiváltó hormonnal való többszöri találkozás alkalmával a Tetrahymena sejtek reakciói eltérnek az első stimulus hatásától, általában sokkal intenzívebbé válnak. Munkánk során a 10^{-6} és 10^{-15} M szerotonin kiváltotta imprinting megtartottságát hosszú távon az imprintinget követő 500. (~60 nap) és 1000. (~120 nap) utódgenerációban tanulmányoztuk négy sejtélettani index: (1) szerotonin tartalom, (2) osztódási képesség, (3) kemotaktikus válaszkészség és (4) az úszási viselkedés vizsgálatával.

Mindegyik vizsgált jelenség, az 500. és 1000. generációban mérve, kvantitatív eltérést mutatott a nem imprintált kontroll sejtekhez képest. (1) A szerotonin imprinting a sejtek szerotonin tartalmára kifejtett hatásának irányát és tartósságát az imprintáló koncentráció jelentős mértékben befolyásolta. Az 500. generációban mindkét koncentráció negatív imprintinget, intracelluláris hormon szint csökkenést váltott ki. Az 1000. generációban a 10^{-6} M-os előkezelés hatása lecsengett, míg az alacsonyabb koncentráció éppen ellenkezőleg,

pozitívan hatott. (2) Az 500. és 1000. utódgeneráció sejtjeinek emelkedett osztódási aktivitása arra utal, hogy a 10^{-6} M szerotonin előkezelés tartós funkcionális változást idézett, és az imprinting formájában átvitt információ akár 1000 generáción keresztül is továbbadódik. (3) A szerotonin következetes kemorepellens hatása az előkezelés imprintáló hatását és a hosszú távú memóriát kialakító képességét jelzi. Az egyszeri behatás, 500. és 1000. generációban, a sejtek negatív kemotaktikus reakcióját indukálta, míg az ismételt szerotonin kezelés kismértékben tovább erősítette ezt a profilt. (4) Ha a sejtek úszási viselkedésén keresztül vizsgáljuk a szerotoninnal kiváltott imprinting hosszú távú hatását, akkor látható, hogy a hormon negatív – lassú, körkörös mozgást előidéző – hatása csak a másodszori expozíció alkalmával jelentkezett. A szerotonin előkezelés 1000 generáció múltán is érvényesülő hatásai a kiváltott imprinting információjának generációról generációra történő továbbadását, epigenetikus öröklődését valószínűsítik.

R-deprenyl és származékainak alapvető sejtélettani hatásai Tetrahymena modell-sejten

A MAO enzim a szerotonin, mint intracelluláris szabályozó molekula, széleskörű sejtélettani hatásait a hormon lebontásán keresztül képes befolyásolni. A MAO-A és -B szelektív gátlószerek (chlorgylin, *R*-deprenyl) vizsgálata során nyert eredményeink arra utalnak, hogy az emlős sejtekkel ellentétben, Tetrahymenában valószínűleg a B izoforma felelős a szerotonin lebontásáért. A MAO-B bénító *R*-deprenyl, vélhetően a hormon metabolizmusának gátlásán keresztül, képes volt fokozni az endogén szerotonin szintjét. Az *R*-deprenyl közvetlen, a szerotonin mennyiségének szabályozásától független kemotaktikus aktivitását is sikerült kimutatnunk. Sztereoselektív attraktáns hatása a MAO-B gátláshoz szükséges koncentrációnál több nagyságrenddel kisebb tartományban jelentkezett. Az *R*-deprenyl különböző szerkezeti módosításai, beleértve a metabolikus átalakulását is (dezalkiláció és N-oxidáció), döntően repellens vagy neutrális hatást eredményeztek. Egyedül a propargil-csoportot tartalmazó vegyületeknél (*R*-dezmetildeprenyl, *R*-deprenyl-N-oxid) volt megfigyelhető az alacsony koncentrációban egy pozitív kemotaktikus trend. A Tetrahymena sejten kapott, az irodalomban már definiált szerkezet-hatás összefüggésekkel (*R*-deprenyl hatásának feltétele a propargil-csoport megléte, és a C1 oldallánc módosítása lerontja aktivitását) jórészt egyező eredményeink megerősítik a modell-sejt korábbi munkáinkban is tapasztalt diszkriminációs képességét és egyben alkalmasságát is a gyógyszer-csoport vizsgálatára.

R-deprenyl és derivátumainak sejtbiológiai hatása magasabb rendű modell-sejteken

A *R*-deprenyl derivátumok sejtbiológiai hatásvizsgálatát a Tetrahymena modellt követően, a célzott tumorterápiában történő felhasználásuk lehetőségének értékeléséhez, az

alkalmazásuk szempontjából ígéretesnek tűnő MM6 humán leukémia és LM2 emlő adenokarcinóma sejteken is elvégeztük.

A két eltérő tumor modellen nagy százalékban egyező válaszokat kaptunk, azonban egyes esetben a két sejttípus eltérő érzékenysége volt jellemző. Az alapvegyületek és metabolitok közel egyforma adhéziós és kemotaktikus aktivitást mutattak a két sejttípusban, míg a szintetikus származékok adhéziós viselkedésében találtunk jelentősebb, a hatások előjelében, vagy mértékében megmutatkozó eltéréseket.

Az áttétképzés egyik első meghatározó lépés a daganatsejtek adhéziós kapcsolatainak meggyengülése, és ezzel párhuzamosan 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 deprenyl származékok antimetasztatikus hatásának értékelése a vegyületek sejtadhézióra és kemotaxis/migrációra kifejtett hatásának viszonyán alapul. Ennek jellemzésére szolgál a kemotaxis-adhéziós arány ($CAR = \text{kemotaxis [Ktx. ind.] / adhézió [Slope]}$), ami egy ideális antimetasztatikus ágens esetén, amely primer tumor szintjén hatva fokozni tudja a sejtek adhézióját és ezzel párhuzamosan kemorepellens/migrációt csökkentő hatású, egynél jóval kisebb szám ($CAR < 0,8$). Az *R*-deprenyl MAO-B gátláshoz szükséges koncentrációja esetén ez a CAR érték egynél kisebbnek adódott mindkét modell-sejten. Az antiproliferatív hatását is figyelembe véve elmondható, hogy az *R*-deprenyl a klinikai szempontból elérendő célkoncentrációban képes lehet gátolni a tumorsejtek osztódását és szóródását. Leukémia modellen az *R*-deprenyl alacsonyabb koncentrációiban a kemotaktikus aktivitás a domináló (magas CAR érték). 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 koncentrációtartományra kiterjedő alacsony CAR értékek arról tanúskodnak, hogy az antimetasztatikus hatás szempontjából hatékonyabb, mint az *R*-módosulat. Vélhetően az *R*-deprenyl hatásának nem feltétele a metabolikus átalakulása, azonban a keletkező metabolitok összességében hozzájárulhatnak az alapvegyület tumorelles hatáshoz: (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. A para-fluoro származékok hatása ellentmondásos, aktivitásuk az áttétképzés gátlása szempontjából elmarad

a referencia vegyületekétől (*R*- és *S*-deprenyl). Kiemelendő azonban, hogy az antiproliferatív hatás tekintetében ez a szerkezeti módosítás hatékonynak bizonyult, mindkét izomer képes volt gátolni a monocita sejtek osztódását.

GnRH peptidek és különböző magasabb rendűekre jellemző hormonok

Tetrahymena modell-sejten kifejtett hatások

A magasabb rendűekre jellemző hormonok, mint azt a szerotonin példáján is láttuk, képesek befolyásolni a *Tetrahymena* élettani folyamatait, például mozgási viselkedését – vektoriális irányú elmozdulását, azaz kemotaxisát, vagy random jellegű kemokinetikus aktivitását –, endogén anyagainak szintézisét, szekrécióját.

A GnRH peptidek kemotaktikus hatása kimutatható volt *Tetrahymena pyriformis* sejteken, annak ellenére, hogy ezek a hormonok a magasabb rendűekben elsődlegesen nem rendelkeznek ilyen aktivitással. Az egysejtű modell kemotaktikus válaszával széles skálán képes volt különbséget tenni a vizsgált, kisebb-nagyobb szerkezeti eltérést mutató GnRH származékok között. A *Tetrahymena* szekvenciafüggő kemotaktikus reakciója alapján a natív GnRH hormonok (GnRH-I, GnRH-II, GnRH-III) és a GnRH-III fragmens származékok (Ac-HWSHDWKPG-NH₂, Ac-WSHDWKPG-NH₂, Ac-SHDWKPG-NH₂) kemotaktikus hatását, a centrális régió (5.-8. pozíció) aminosav összetétele és az N-terminális aminosav kémiai karaktere alapvetően meghatározza. A különböző összetételű monomer és dimer származékok eredményei azt jelzik, hogy a Lys⁸ oldalláncának módosítása a GnRH-III kemotaktikus hatását az oldallánc méretének ([GnRH-III(Ac-C), GnRH-III(Ac-CGFLG)], valamint dimer származékok esetén a kapcsoló régió hosszának ([GnRH-III(C)]₂, [GnRH-III(CGFLG)]₂) és kémiai módosításának (acetilálás) ([GnRH-III(Ac-C)]₂, [GnRH-III(Ac-CGFLG)]₂) függvényében képes befolyásolni.

A GnRH származékok indukálta specifikus válaszreakciók egyben a sejt receptoriális érzékenységre és a jelátviteli útvonalak indukálódására utalnak. A GnRH származékok hatására aktiválódó intracelluláris hírvivők közé tartozik a *Tetrahymena*ban is kimutatott PLC és a PI3K enzim. A GnRH-III származékok kemotaktikus hatásának kiváltásában a PLC aktiválódása nem volt kimutatható, míg a PI3K inhibitorai szignifikáns módon gátolták a sejtek kemoattraktáns válaszát. A GnRH-III peptidek nem csupán a *Tetrahymena* kemotaxisát képesek kiváltani, hanem a folyamat szignalizációja is a magasabb rendű (tumor)sejtekben már ismert útvonalon halad.

A GnRH származékok gradiens mentén hatva a *Tetrahymena* kemotaxisát indukálták, míg ha egyöntetű koncentrációban voltak jelen a sejtek kemokinetikus aktivitását

befolyásolták. A sejtek úszási sebessége és az általuk megtett útvonal kanyarulatossága döntően ellentétesen változott. A sejtek nagyobb átlagsebessége mellett az egyenes vonalú előrehaladás (alacsony tekervényesség) volt megfigyelhető. A kemorepellens anyagok egységesen, az irodalmi adatokkal összhangban, a sejtek lassú, kanyargós úszását eredményezték. Az attraktáns anyagok hatása azonban nem bizonyult ennyire konzekvensnek, inkább a sejtek egyenes előrehaladását váltották ki. A kemotaktikus és kemokinetikus hatások közötti korreláció általános jellegére utal, hogy a különböző szerkezetű ligandok – a peptidok közé sorolt GnRH származékok és glikoprotein típusú tróphormonok – kemotaktikus tulajdonságuknak megfelelően, azonos módon hatottak a sejtek úszási viselkedésére (pl. kemorepellens – lassú, kanyarulatós úzás).

A GnRH ligandok a sejtek mozgásállapotára kifejtett közvetlen hatása mellett közvetve a sejtek hormon termelésének és szekréciójának szabályozásán keresztül is befolyásolhatják a sejtek kemotaktikus/kemokinetikus választ. Ez annak köszönhető, hogy a felszabaduló szignál molekulák önmagukban is rendelkeznek ilyen aktivitásokkal. A vizsgált ligandok kemotaktikus és hormontartalomra kifejtett hatásai között egyértelmű korreláció nem volt megfigyelhető. A GnRH-III dimer ($[\text{GnRH-III(C)}]_2$, $[\text{GnRH-III(CGFLG)}]_2$) és fragmens (Ac-SHDWKPG-NH₂) származékai, kemotaktikus karakterüktől függetlenül a hisztamin mennyiségét pozitívan az adrenalinét negatívan befolyásolták. A kemoattraktáns és repellens anyagok között az endorfin és szerotonin tartalomra kifejtett hatásukban mutatkozott különbség. Általánosságban elmondható, hogy a kemoattraktáns anyagok úszási viselkedésre kifejtett hatásában tapasztalt különbségek háttérében részben az állhat, hogy fokozva az attraktáns endorfin és csökkentve a repellens szerotonin szintjét közvetett módon is befolyásolhatják a *Tetrahymena* migrációs reakcióját.

GnRH-III származékok hatása magasabb rendű (MM6) modell-sejt

Az 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 tumorellenes 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.

Irányító hatású GnRH-III származékok hatása MM6 modell-sejten

Az irányító hatással rendelkező GnRH-III származékok sejtdhézióra kifejtett hatása egy általános, a hormonok szekvenciájában kódolt 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 az N-terminális felől rövidített GnRH-III fragmensek valamint a Lys⁸ oldallánc módosításával kialakított monomer és dimer származékok, a Tetrahymena esetén tapasztalt szerkezet-hatás összefüggésekhez hasonló, karakterisztikus változást eredményeztek a MM6 sejtek kemotaktikus reakciójában. 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 leukémia modell esetén, és csak a nagy koncentrációkra korlátozódott. A 'GFLG' távtartót tartalmazó peptidek MM6 sejtek esetén is ellenkező kemotaktikus választ indukáltak, mint a rövid oldalláncot/linker régiót hordozó származékok. A [GnRH-III(C)]₂ és [GnRH-III(Ac-C)]₂ dimer kemotaktikus hatásában mutatkozó, a GnRH-III hormon aktivitásához hasonló bifázisos (alacsony koncentráción repellens, magas koncentráción attraktáns) jelleg arra enged következtetni, hogy maga a GnRH-III hormonrész lehet felelős a dimerek receptorkötéséért és kemotaktikus viselkedéséért.

A PLC és PI3K egyrészt a GnRH származékok hatásának közvetítésében másrészt a monocita sejtek kemotaktikus reakciójának kiváltásában is kulcsszerepet játszik. Így fontosnak éreztük e két enzim részvételét megvizsgálni a GnRH-III származékok MM6 sejtekre kifejtett kemotaktikus hatásában is. A PI3K szerepét csak a natív hormonok és egyes dimer származékok ([GnRH-III(C)]₂) által kiváltott kemotaktikus hatások továbbításában sikerült igazolni, míg a PLC aktiválódását egyetlen származék esetén sem tudtuk kimutatni. Az acetyl csoportot és a 'GFLG' távtartót tartalmazó származékok, mindkét modell-rendszerben megnyilvánuló kemoattraktáns jellegét egyik inhibitor sem befolyásolta, így esetükben egy PI3K (és PLC) független jelátviteli út indukciója feltételezhető.

A célzó egységnek számító GnRH-III származékok antimetasztatikus hatásának értékelése a CAR index kiszámítása alapján történt. Az alacsonyabb koncentrációkban tapasztalt, nem egy esetben kifejezetten alacsony CAR értékek arra utalnak, hogy ezek a peptidek önmagukban, vagy egy gyógyszer-szállító rendszer részeként a primer tumor szintjén hatva a tumorsejtek helyben tartását segíthetik elő. Az antimetasztatikus hatás tekintetében a GnRH-III monomer és dimer származékai hatékonyabbak voltak, mint maga a natív hormon. A csoportból kiemelendő, 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 az irányított tumor-terápiában történő felhasználásra, mint a hatóanyag szállító rendszerek targetáló egységei.

Hatóanyag-tartalmú GnRH-III konjugátumok hatása MM6 modell-sejten

A gyógyszer-célbajuttatásra tervezett GnRH-III alapú peptid konjugátumok másik fontos elemét maga a hatóanyag – jelen esetben a doxorubicin vagy daunorubicin – jelenti. A GnRH-III alapú konjugátumok hatásának vizsgálata és elemzése során azt tartottuk szem előtt, hogy a kapcsolt hatóanyag a célsejthez jutva képes legyen kifejteni a szabad formára jellemző tumorelles hatást, és maga a konjugátum a tumorsejtek kemotaktikus és adhézios viselkedésének befolyásolásán keresztül képes legyen megakadályozni a tumorsejtek leválását és szóródását. Eredményeinkből általános következtetésként levonható, hogy az irányító/hordozó rész és a hatóanyag – beleértve a konjugálás módját is – együttesen alakítja ki a konjugátum sejtelettani hatásait. A célbavivő egység kemotaxisra és adhéziora kifejtett hatását a hatóanyag, illetve ugyanazon hatóanyag esetén önmagában a kapcsolás módja is jelentős mértékben képes volt befolyásolni.

A GnRH-III konjugátumai közül a citotoxikus, adhézios fokozó és kemorepellens hatás legszebben az AN-152 analógiájára felépülő, doxorubicint észterkötésben tartalmazó konjugátumban (GnRH-III(Dox-észter)) ötvöződött. Az irodalomból ismert AN-152 már klinikai kipróbálás alatt álló konjugátum, amiben a hatóanyag egy észterkötésen keresztül kapcsolódik a GnRH-I agonista származékához ([D-Lys⁶]-GnRH-I). Így vizsgálatainkban az AN-152 referencia konjugátumként szerepelt. A GnRH-III(Dox-észter) citotoxikus hatása lényegesen nem tért el az AN-152 és a szabad doxorubicin hatásától, azonban az antimetasztatikus potenciál tekintetében meghaladta a referencia konjugátum hatékonyságát. Az észterkötés enzimikus érzékenységéből adódó esetleges mellékhatások kiküszöbölésére stabilabb kötést tartalmazó konjugátumokat is vizsgáltunk. Ezekben a gyógyszermolekula megfelelő felszabadulása érdekében a hatóanyag és a GnRH-III közé lizoszómális enzimekre érzékeny távtartó szekvencia (GFLG, YRRL) került beépítésre. Az amidkötés jóvoltából viszonylag stabilabb GnRH-III(Dox-amid-GFLG) konjugátum is rendelkezett a tumorelles és az antimetasztatikus hatás szempontjából kedvező hatáskombinációval.

A daunorubicint oximkötésben tartalmazó GnRH-III(Dau) és GnRH-III(Dau-GFLG) konjugátumok azonban nem rendelkeztek hasonló aktivitással. Így eltérő felépítésű, daunorubicin-tartalmú konjugátumok vizsgálata vált szükségessé. Az acetyl-lizin (Lys(Ac)) beépítése a molekulába nemcsak a konjugátum citotoxikus hatását javította, hanem a (Lys(Ac))⁴GnRH-III(Dau) konjugátum a kemorepellens hatása mellett a legjelentősebb adhézios fokozó hatással is rendelkezett, ami egyben antimetasztatikus képességét is előre vetíti.

A GnRH-III konjugátumok hatékonyságának fejlesztésére, az alacsony GnRH-R expresszió és downreguláció okozta hatáscsökkenés kiküszöbölésére előállított, két

hatóanyagot (daunorubicint és metotrexatot) hordozó, ún. bifunkciós konjugátumokat is vizsgáltunk. Ezek a bifunkciós konjugátumok nem eredményeztek azonban egyértelmű citotoxikus hatásjavulást, aminek az oka feltételezhetően a hatóanyagok hozzáférhetőségében vagy a konjugátumok térbeli elrendeződésében keresendő. Az (Lys)⁴GnRH-III hordozó alkalmazásával előállított, a 4. és 8. pozícióban is egy-egy hatóanyagot tartalmazó (Lys)⁴GnRH-III(Dau⁴-Dau⁸), (Lys)⁴GnRH-III(Mtx⁴-Dau⁸) mutattak kedvezőbb hatásprofil, mind a tumorelles, mind az antimetasztatikus hatás szempontjából, összehasonlítva azokkal, ahol a hatóanyagok egy lizin aminosav közbeiktatásával a Lys⁸ oldalláncához volt kapcsolva (GnRH-III(Dau⁸-Dau⁸), GnRH-III(Mtx⁸-Dau⁸)).

A dimer alapú konjugátumok, monomer egységenként egy-egy hatóanyagot tartalmaztak, és a monomer konjugátumokhoz képest a vártnak megfelelően, legalább kétszer nagyobb citotoxikus aktivitással rendelkeztek. A CAR értékeik (CAR \ll 1) pedig arra engednek következtetni, hogy kemorepellens és adhéziót fokozó hatásuknak köszönhetően a daganatsejtek leválását és szóródását is eredményesen gátolhatják.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Megállapítottuk, hogy a szerotonin koncentráció- és idő-függő módon fokozta a *Tetrahymena* endogén hormon tartalmát a sejt természetes közegét jobban modellező tápanyag szegény oldatban. Ennek a hatásnak a kiváltásához már a femtomoláris és az alatti koncentrációk is elegendőek voltak, ami a sejtek receptív érzékenységére utal. A szerotoninnal kiváltott imprinting hatására 500. és 1000. generációt követően, a sejtek fokozott (hormontartalom, osztódási képesség, kemokinetikus aktivitás) vagy csökkent reakciója (kemotaktikus válasz-készség) volt megfigyelhető a nem-imprintált sejtekhez képest, ami a hormonális imprinting hosszú távú hatását (memória kialakulását) jelzi, és felveti epigenetikus öröklődés lehetőségét.
2. Eredményeink azt valószínűsítik, hogy a *Tetrahymena* a korábban már kimutatott MAO enzim B izotípusával rendelkezik. A MAO-B lehet felelős a szerotonin metabolizmusáért, és gátlásán keresztül az *R*-deprenyl a sejtek élettani reakciójának széles skáláját befolyásolhatja.
3. Kimutattuk, hogy az *R*-deprenyl és további 9 derivátuma képes a *Tetrahymena* kemotaktikus válaszára kiváltására. Az *R*-deprenyl attraktáns hatása, sztereoszelektívnek bizonyult. A különböző szerkezeti módosítások döntően repellens vagy neutrális hatást eredményeztek. A kemotaktikus hatások koncentrációfüggése egy MAO-B gátlástól független aktivitást jelez.

4. Magasabb rendű modellen végzett vizsgálatokban azt találtuk, hogy az *R*-deprenyl és származékainak adhéziót befolyásoló és kemotaktikus hatási 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 tumorsejtek szóródását gátolhatja. Az adhézióra és kemotaxisra kifejtett hatása alapján az *S*-deprenyl a hatékonyabb származék az antimetasztatikus hatás tekintetében. Az *R*-deprenyl antimetasztatikus hatásához a metabolitjai is hozzájárulhatnak; adhéziót csökkentő és repellens hatásuk révén a keringő tumorsejtek megtapadását és extravazációját gátolhatják.
5. A GnRH peptid-származékok kemotaktikus hatása és a kemoattraktáns jelátvitelben a PI3K aktivációja igazolható volt a csillós modellen. A Tetrahymena szekvencia- és szerkezetfüggő reakciója az N-terminális aminosav kémiai karakterének és GnRH-III Lys⁸ oldalláncát érintő módosítások meghatározó szerepére utal a kemotaxis kiváltásában.
6. 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 a hormonszint befolyásoló hatásuk révén is – parakrin/autokrin módon – hozzájárulhatnak migrációs aktivitásuk kialakulásához.
7. A gyógyszer-célbajuttatásra tervezett GnRH-III származékok és hatóanyag-tartalmú konjugátumaik sejtadhézióra és kemotaxisra kifejtett hatása igazolható volt leukémia modellen. MM6 sejtvonalon is sikerült megerősíteni a célzó egységként szereplő GnRH-III származékok Tetrahymena sejteken történő vizsgálatokor tapasztalt szerkezet-hatás összefüggéseket.

A konjugátum kemotaktikus és adhézióra kifejtett hatását nem egyedül az irányító hatású hordozónak választott GnRH-III ill. származékai 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. 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. A daunorubicin kapcsolt konjugátumok citotoxikus hatását a dimerképzés és (Lys(Ac))⁴GnRH-III hordozó alkalmazása szignifikánsan javította.

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

ÖSSZEFOGLALÁS

A környezetben jelenlévő endogén vagy szintetikus eredetű bioaktív anyagok hatására kialakuló sejtleletani 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 metasztatikus kialakulásának megakadályozására.

A célzott tumorterápiás eljárásra szánt MAO-B gátló *R*-deprenyl és derivátumainak, valamint a GnRH receptor-agonista GnRH-III peptid-származékok sejtleletani hatásait először *Tetrahymena* modellen vizsgáltuk, értékelve azokat a természetes ligandok (szerotonin, hipotalamo-hipofizeális 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.

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.

SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Csaba G, **Lajkó E**, Pállinger É. (2011) 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 elsőszerző)
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*

Megjelent egyéb közlemények

9. 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*
10. **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*
11. **Lajkó E**, Pállinger É, Csaba G (2013) Effect of glucose on the insulin production and insulin binding of Tetrahymena. Acta Microbiol Immunol Hung. 59: 461-468. *IF: 0.787*