

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**Dr. Juhász Éva**

**A növekedési hormon-releasing hormon (GHRH) és GHRH-  
Receptorok (GHRH-R) expressziójának vizsgálata humán  
endometrium carcinómában és gyermekkori onkohematológiai  
mintákban**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA  
Debrecen, 2024.**

# **DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**A növekedési hormon-releasing hormon (GHRH) és GHRH-  
Receptorok (GHRH-R) expressziójának vizsgálata humán  
endometrium carcinómában és gyermekkori onkohematológiai  
mintákban**

**Dr. Juhász Éva**

**Témavezető: Prof. Dr. Kiss Csongor**



**DEBRECENI EGYETEM**

**EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

**Debrecen, 2024.**

# Tartalomjegyzék

<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>4</b>
1.1. A HYPOTHALAMUS-HYPOPHYSIS RENDSZER ANATÓMIÁJA .....	4
1.2. A GHRH MOLEKULA .....	6
1.3. A GHRH SZEREPE .....	8
1.4. A GHRH GÉN.....	10
.....	11
1.5. A GHRH RECEPTOR (GHRH-R) ÉS GÉNJE .....	11
1.6. SZIGNÁL TRANSDUKCIÓ.....	12
1.7. A GHRH, A GHRH-R ÉS A SZINTETIZÁLT GHRH ANALÓGOK POTENCIÁLIS SZEREPE DAGANATOS KÖRKÉPEKBEN .....	15
1.8. ENDOMETRIUM CARCINOMA IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓJA.....	18
1.9. GYERMEKGYÓGYÁSZATI MINTÁK ELMÉLETI HÁTTERÉNEK IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓJA .....	19
<b>2. CÉLKITŰZÉS .....</b>	<b>28</b>
<b>3. ANYAGOK.....</b>	<b>29</b>
3.1. ENDOMETRIUM CARCINOMA MINTÁK.....	29
3.2. GYERMEKGYÓGYÁSZATI MINTÁK.....	30
<b>4. MÓDSZEREK .....</b>	<b>32</b>
4.1. RNS IZOLÁLÁS.....	32
4.2.1. RT-PCR AZ EC MINTÁKON.....	32
4.2.2. RT-PCR A GYERMEKGYÓGYÁSZATI MINTÁKON .....	34
4.3. A GHRH-R FEHÉRJE VIZSGÁLATA WESTERN BLOT TECHIKÁVAL A VIZSGÁLATAINKBAN HASZNÁLT GYERMEKGYÓGYÁSZATI MINTÁKON .....	35
4.4.1. MEMBRÁN - ÉS RADIOLIGAND KÖTÉSI VIZSGÁLATOK EC MINTÁKON .....	37
4.4.2. MEMBRÁN - ÉS RADIOLIGAND KÖTÉSI VIZSGÁLATOK GYERMEKGYÓGYÁSZATI MINTÁKON.....	38
<b>5. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>40</b>
5.1. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATAINK EREDMÉNYEI AZ EC MINTÁKON .....	40
5.1.1. PCR, RT-PCR.....	40
5.1.2. RADIOLIGAND KÖTÉSI VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI EC MINTÁKON.....	44
5.2. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATAINK EREDMÉNYEI A GYERMEK HEMATO-ONKOLÓGIAI MINTÁKON .....	46
5.2.1. A GHRH ÉS A GHRH-R SV1 EXPRESSZIÓJÁNAK RT-PCR VIZSGÁLATA.....	46
5.2.2. GYERMEKGYÓGYÁSZATI MINTÁK GHRH-R FEHÉRJE WESTERN BLOT ANALÍZISE .....	49
5.2.3. GHRH RECEPTOR KÖTÉSI ANALÍZISE GYERMEKGYÓGYÁSZATI MINTÁKON.....	51
<b>6. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>52</b>
6.1. ENDOMETRIUM CARCINOMA MINTÁKON KAPOTT EREDMÉNYEINK MEGBESZÉLÉSE .....	53
6.2. GYERMEKGYÓGYÁSZATI MINTÁKON KAPOTT EREDMÉNYEINK MEGBESZÉLÉSE .....	58
6.3. A DISSZERTÁCIÓ LEGFONTOSABB EREDMÉNYEINEK ÖSSZEGZÉSE ÉS KONKLÚZIÓJA .....	60
<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>61</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>63</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>65</b>
<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>66</b>

## Rövidítések jegyzéke

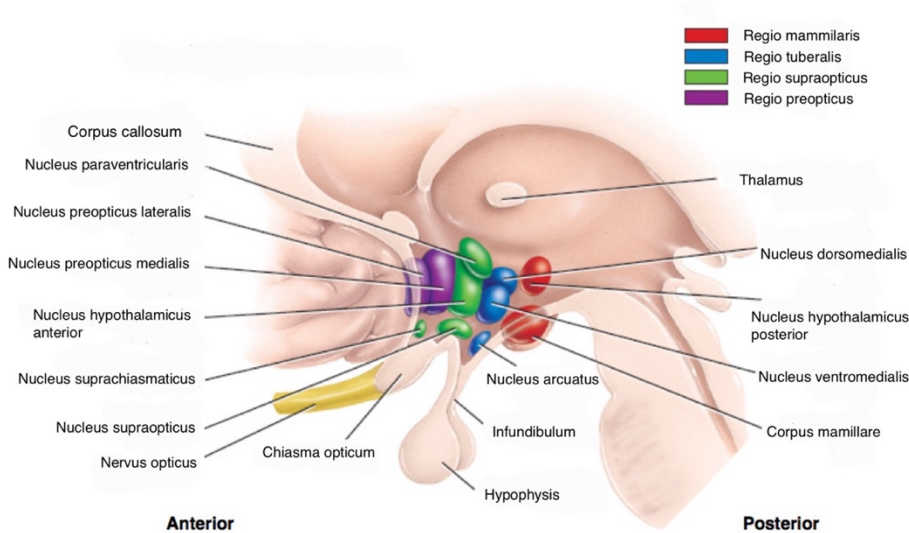
EC	endometrium carcinoma
GCT	germ cell tumor
GHRH	growth hormone - releasing hormon
GHRH-R	growth hormone - releasing hormone receptor
GHRH-RP	GHRH-related peptid
GPCR	G - protein coupled receptor, G-protein receptor
GTP	guanozin-50-triphosphate
IGF- I	inzulin like growth factor 1
PACAP	pituitary adenilate cyclase activating polypeptide
pGHRH-R	pituitary type GHRH receptor
SCLC	small cell lung cancer
SV	splice variant
VIP	vasoactive intestinalis polypeptide

# 1. Bevezetés

## 1.1. A hypothalamus-hypophysis rendszer anatómiája

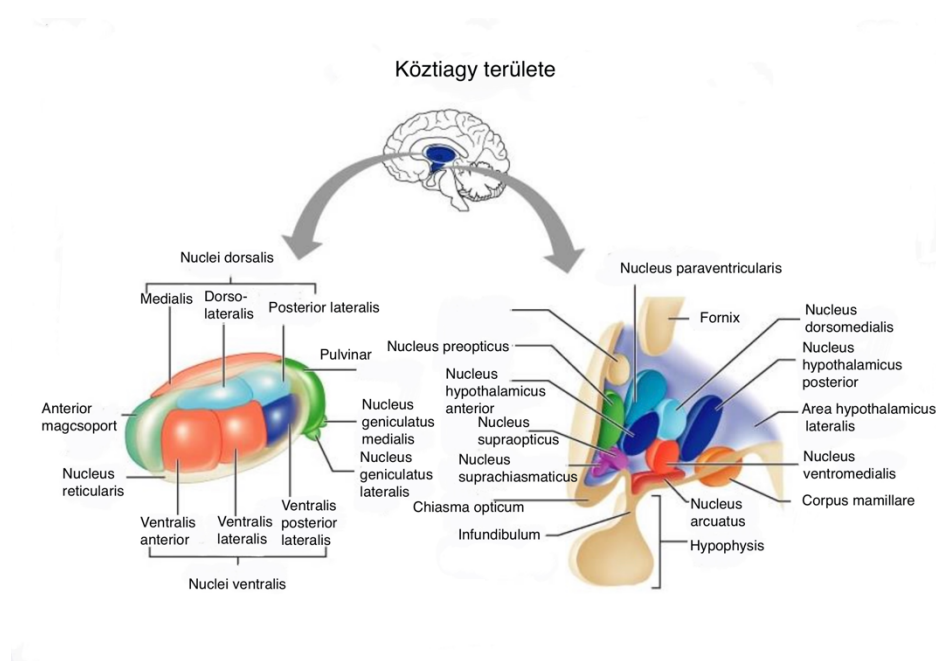
Az emberi test homeosztázisa az endokrin és az idegrendszer szabályozása alatt áll. A két rendszer egymással szoros együttműködésben, egymásra oda-vissza hat, és mindezen szabályozó kapcsolatokon túl az immunrendszer is részt vesz a szervezetünk homeosztázisának kialakításában. A hypophysis - hypothalamus tengely működése a hypothalamusban termelődő neurohormonok, melyek a hypophysis működését szabályozzák és az ezen hypothalamicus neurohormonok szintézisét és felszabadulását (release) szabályozó idegi struktúrák révén valósul meg.

A hypothalamus periventricularis és mediális területén helyezkednek el az endokrin szabályozásban részt vevő sejtcsoportok. A hypophyseotrop hormonokat az alábbi hypothalamicus magok termelik: a nucleus arcuatus, dorso- és ventromedialis, a paraventricularis nucleus pars parvocellularisa, a nucleus supraopticus neuronjainak kisebb része és a periventricularis mag neuronjai (1. ábra).



**1.ábra.** A diencephalon anatómiája (internetes forrás alapján módosítva, letöltés: 2024 10.24., <https://images.app.goo.gl/e8soHjJdaDNNzxi6>)

A GHRH-t termelő idegsejtek elsősorban a nucleus arcuatusból származnak, de a laterális hypothalamusban és a mediális perifornicalis areában is megtalálhatóak, továbbá kisebb számban a nucleus dorso - és ventromedialisban és a basolateralis hypothalamusban is megtalálhatóak. A nucleus suprachiasmaticus, mely a hypothalamus rostrális részén helyezkedik el, nem vesz részt közvetlenül az adenohipophysis hormonjainak szekréciójának szabályozásában, azonban a hormonszekréció pulztilis jellegének és napi ritmusának kialakításában részt vesz (2.ábra).



**2.ábra.** A hypothalamus - hypophysis rendszer anatómiája, a hypothalamicus magvak részletes bemutatásával (internetes forrás alapján módosítva, letöltés: 2024 10.24. , <https://images.app.goo.gl/g3jNfJ2RLAYvXCFs8>)

## 1.2. A GHRH molekula

A GHRH egy hypothalamicus polipeptid hormon, melyet maga a hypothalamus szekretál. Stimulálja a növekedési hormon szintézist és release-t a hypophysiból. GHRH szintén stimulálja a hypophysis somatotroph sejtjeinek a szintézisét és proliferációját. Elsődlegesen a GHRH mint egy nagyobb, 108 aminosavból álló preprohormon prekursor molekula szekretálódik, melynek az N-terminális végén levő szignál szekvencia ezután enzimatikusan leszakad, hogy létrehozza az érett 44 aminosavból álló formáját és egy C-terminális GHRH-related peptidet (GHRH-RP) [1].

A GHRH termelés jelentősen függ az életkortól, a nemtől és az anyagcsere állapottól, valamint szerepet játszik az alvás és a táplálkozás szabályozásában is. A GHRH/GHRH-R hibái súlyosan megváltoztatják a somatotroph funkciót és a GH termelést, ezáltal rendellenes növekedést okoznak [2].

GHRH a brain-gut (agy-bél) peptidek szupercsaládjának tagja, amely magában foglalja többek között a hypophysis adenilát-cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP), a glükagont, a szekretint és a VIP-t. A GHRH-t tartalmazó neuroszekréciós sejtek elsősorban a hypothalamus nucleus arcuatusában helyezkednek el, ezeknek a GHRH neuronoknak az axonjai a mesencephalon, a középagy felé nyúlnak, és a hypophysealis portális rendszer kapillárisain végződnek és stimulálják a GH felszabadulását. A GHRH-t szintén megtalálták a limbikus rendszer struktúráiban, továbbá az agykéregben, a hátsó agyban, valamint a perifériás idegrendszerben, a gyomor-bél traktusban, az agyalapi mirigyben, a gonádokban, a mellékvesében, a pajzsmirigyben, a tüdőben és a vesében is [3].

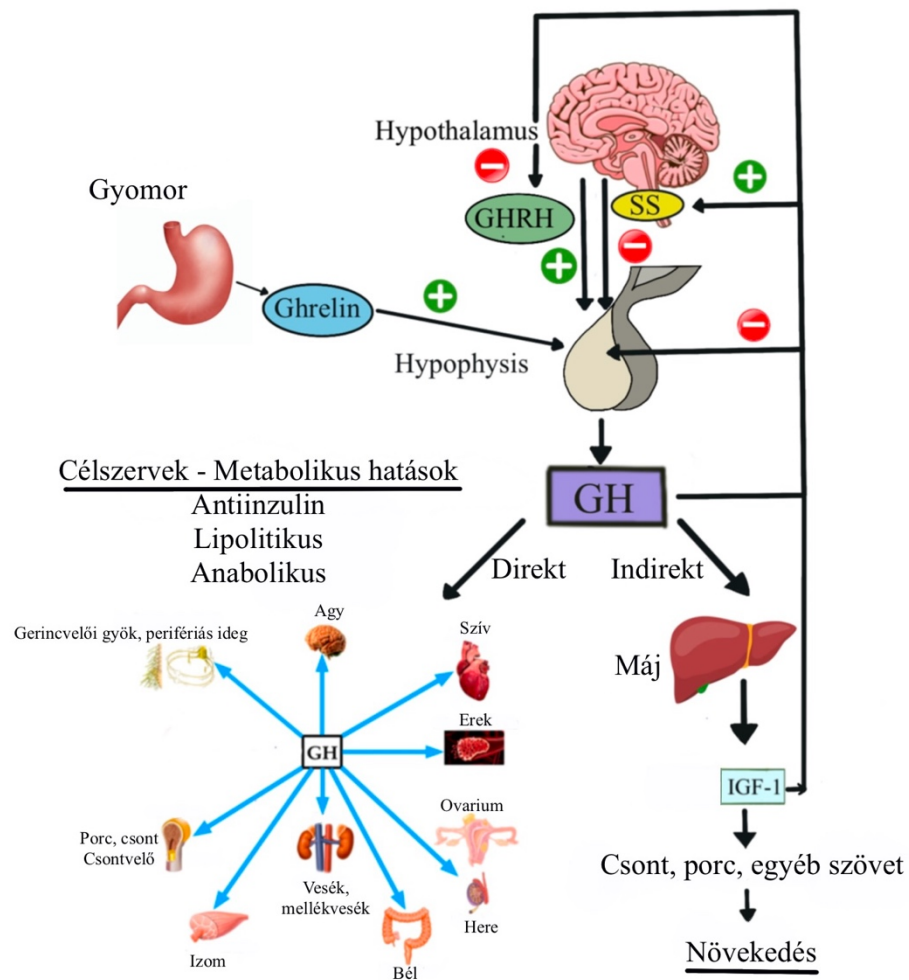
A GHRH, a GHRH-R-k és a GHRH gén különféle extrahypothalamicus szövetekben is jelen vannak, beleértve a gyomor-bélrendszert, a placentát, a petefészket, a herét és számos daganatot. [4, 5, 6, 7, 8].

Frohman és Szabó 1981-ben elsőként írta le acromegalia klinikai képében jelentkező hasnyálmirigyrákban az ektópiás GHRH elválasztást [9]. Ezt követően a 44 és 40 aminosavból álló GHRH formát is izolálták és azonosították humán carcinoid és pancreas tumorokban [5, 10-12] és csak később izolálták hypothalamusból [4, 5, 7, 8, 12]. Ezt követően a GHRH cDNS-ét és/vagy génjét izolálták és vizsgálták patkányokban, egerekben és más emlősökben, valamint madarakban, kételtűekben és halakban [4, 5, 8]. A teljes biológiai aktivitást az N-terminális 29 aminosav szekvencia is képviseli [GHRH(1-29)NH<sub>2</sub>] [4, 5, 7, 8]. A GHRH elválasztása körülbelül 3 óránként pulzatis módon történik, alvás közben pedig még ennél is gyakrabban. A GHRH pulzatis felszabadulása életkorfüggő és van egy úgynevezett szexuális dimorf mintázat is, különösen a pubertás korban, amikor a GHRH funkció kevésbé reagál a tesztoszteronra. Emellett a GH visszacsatolása a GHRH neuronokra szintén jelentősen csökken az öregedéssel. A GHRH szabályozza az alvást is; megnövelheti a lassú hullámú alvás időtartamát, miközben gátolja az ACTH és a kortizol szekrécióját [13, 14].

A GHRH egy gyors enzimatis lebomláson megy keresztül a vérben, és a dipeptidilpeptidáz IV inaktíválja az N-terminális peptid (Try-Ala) eltávolításával és a GHRH 2. és 3. pozícióban történő hasításával, ami inaktívvá teszi a lehasított GHRH fragmentumot (3-44)-NH<sub>2</sub> [15].

### 1.3. A GHRH szerepe

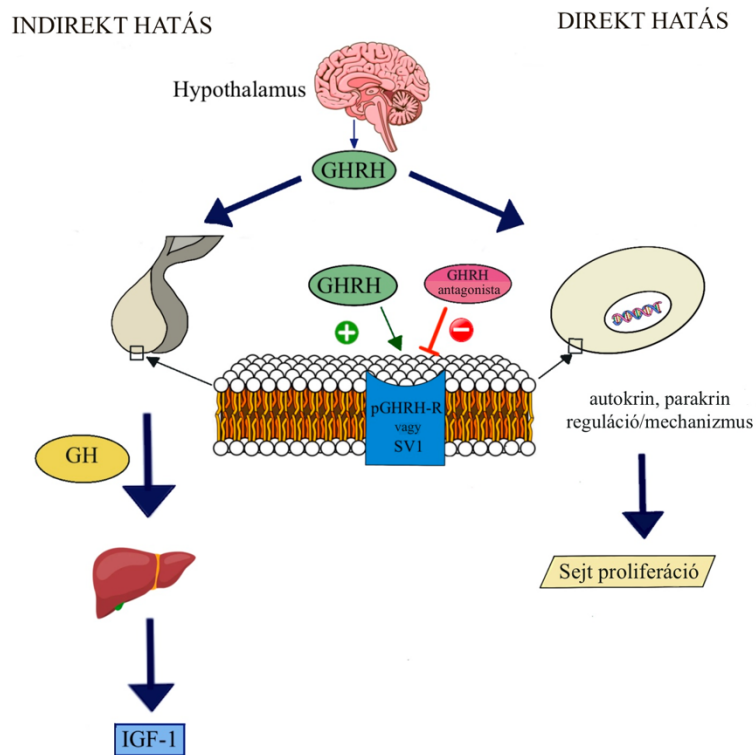
Kezdetben úgy gondolták, hogy a GHRH szerepe csupán a növekedési hormon és az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1) fiziológias szintjének szabályozása az agyalapi mirigy GH/hepatikus IGF-1 tengelyén keresztül (3. ábra).



**3.ábra.** A hypothalamus-hypophysis rendszer és a GHRH-GH-IGF-1 tengely szabályozása

A GH-t a hypophysis elülső lebenyének somatotroph sejtjei termelik és választják ki két hypothalamicus hormon hatására. A GHRH serkenti a GH elválasztást, a somatostatin (SS) pedig gátolja a GH-szekrúciót. A ghrelin saját receptorán keresztül serkenti a GH-szekrúciót is hypophysis elülső lebenyéből. A GH közvetlen metabolikus hatást fejt ki a célszervekre/szövetekre, növekedési hatásait pedig az IGF-I-en keresztül fejt ki, amelyet elsősorban a máj termel. A GH-szekrúció további szabályozása az IGF-I és a GH által az agyalapi mirigyben és a hypothalamusban visszacsatolási szabályozás révén valósul meg.

Az azóta összegyűlt bizonyítékok arra is utalnak, hogy a GHRH neuroendokrin hatása mellett számos perifériás hatásban is szerepet játszik az autokrin/parakrin mechanizmusokon keresztül. (4. ábra).



**4. ábra.** A GHRH direkt és indirekt hatásai

*Forrás: Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemény (Juhász et al. Int J Mol Sci. 2024.)*

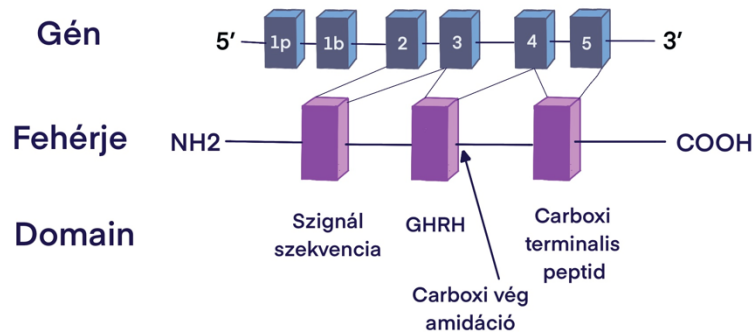
A GHRH és agonistái szabályozzák a sejtproliferációt, a sejttúlélést, a sebgyógyulást, a szívizom regenerációját, a szívműködést, a diabéteszes retinopátiát, az 1-es típusú cukorbetegséget, az apoptózist és a differenciálódást számos szövetben és sejttípusban, amint arról különböző tanulmányok korábban beszámoltak [3, 8, 16, 17, 18, 19, 20]. Napjainkra a GHRH mRNS expresszióját és a biológiailag vagy immunológiailag aktív GHRH jelenlétét különböző humán daganatokban is kimutatták, mint például az emlő-, méhnyálkahártya-, petefészek-, prosztatata-, tüdő-, hasnyálmirigy-, gyomor-, vastagbél daganatokban és uvealis melanomában is [4,5,7,8].

A GHRH a G-fehérjéhez kapcsolt receptorához (GHRH-R) kötődik, hogy aktiválja a különböző jelátviteli útvonalakat, amelyek túlnyomórészt a cAMP-t és a  $Ca^{2+}$ -t foglalják magukban, és ezáltal serkenti a GH-szekrúciót, a GH-gén-transzkripciót és a somatotroph proliferációt. A pulzatilis GH szekrúció hátterében a hypothalamicus GHRH-nak a szomatosztatint és ghrelint termelő neuronokkal való kölcsönhatása áll. A GHRH/GHRH-R hibái súlyosan megváltoztatják a somatotroph funkciót és a GH termelést, ezáltal rendellenes növekedést okoznak.

#### **1.4. A GHRH gén**

Mayo és munkatársai 1985-ben izolálták és írták le a GHRH-t kódoló gén teljes szerkezetét [21]. A GHRH gén a 20. kromoszómán található és több mint 10 kilobázis nagyságú, valamint a génnek öt exonja és négy intronja van. A GHRH szekvencia terminális végén egy arginin (Arg) maradékot tartalmaz, amely a proteolitikus feldolgozás jeleként szolgál [8,21] (5.ábra).

# GHRH



**5. ábra.** A GHRH gén

*Forrás: Lin-Su, K., et al Rev. Endocr. Metab. Disord. 2002 ábrája alapján módosítva*

## 1.5. A GHRH receptor (GHRH-R) és génje

A hypophysis típusú GHRH-R egy hét transzmembrán domaint tartalmazó G-protein receptor (GPCR), amely patkányban és emberben 423 aminosav hosszúságú. A GHRH-R gén a humán 7p14-15 kromoszómán és a patkány 4p24 kromoszómán található, és a GPCR II B osztályának tagja, amely magában foglalja a szekretin/glükagon/VIP/PACAP peptid receptorokat. A GPCR-ekben az alternatív splicing egyike a sok kialakuló mechanizmusnak, amellyel a receptorok ezen osztálya diverzifikálja tevékenységét. [22, 23, 24]. A genomiai szekvencia jellemzése feltárta, hogy a humán GHRH-R gén 13 exonból áll, és 15 kilobázist ölel fel [23].

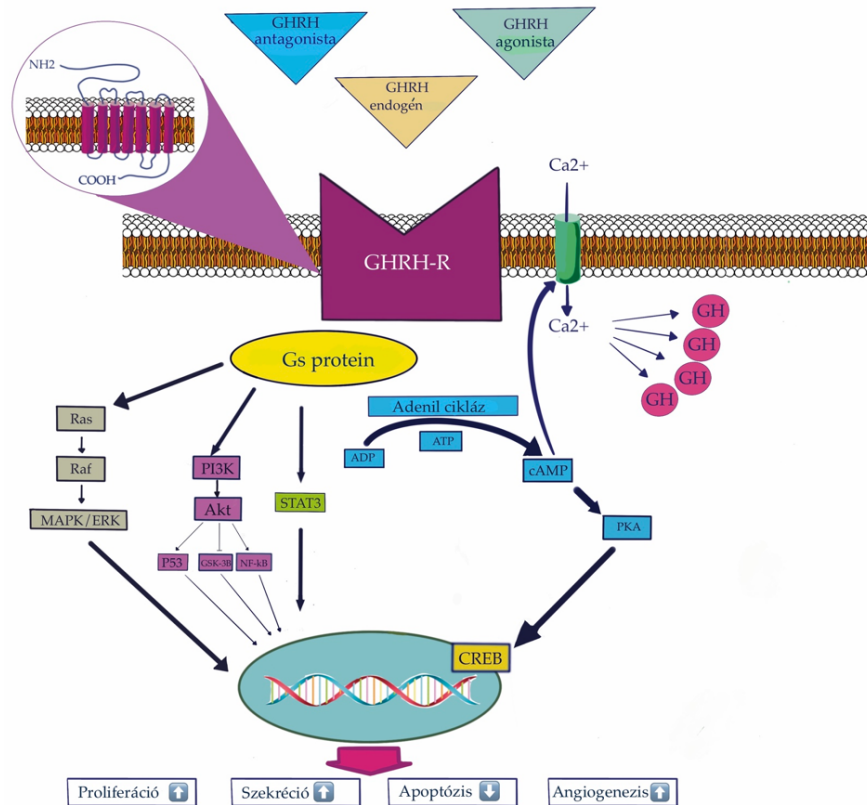
A GHRH-R-k elsősorban az agyalapi mirigyben expresszálódnak. Korábbi tanulmányok alapján *in situ* hibridizációt alkalmazva az agyalapi mirigy elülső részében lokalizálódnak [23]. A GHRH-

R expresszió szintje az agyalapi mirigyben a különböző fejlődési szakaszoktól függően változik. A GHRH-R-k expressziója csökken az öregedés során. A GHRH-R-k számos más emberi szövetben is jelen vannak, mint például a szívizomban, a lymphocytákban, a herékben, a petefészekben, a bőrben és a hasnyálmirigyben, és számos fiziológiai és patofiziológiai hatásban és biológiai folyamatban vesznek részt [8,17]. GHRH-R mRNS-ét szintén kimutatták a placenta és vese szövetben [8,23]. A GHRH és analógjai hormonális aktivitását az agyalapi mirigy típusú GHRH receptor (pGHRH-R) közvetíti [5, 8, 23].

## **1.6. Szignál transzdukció**

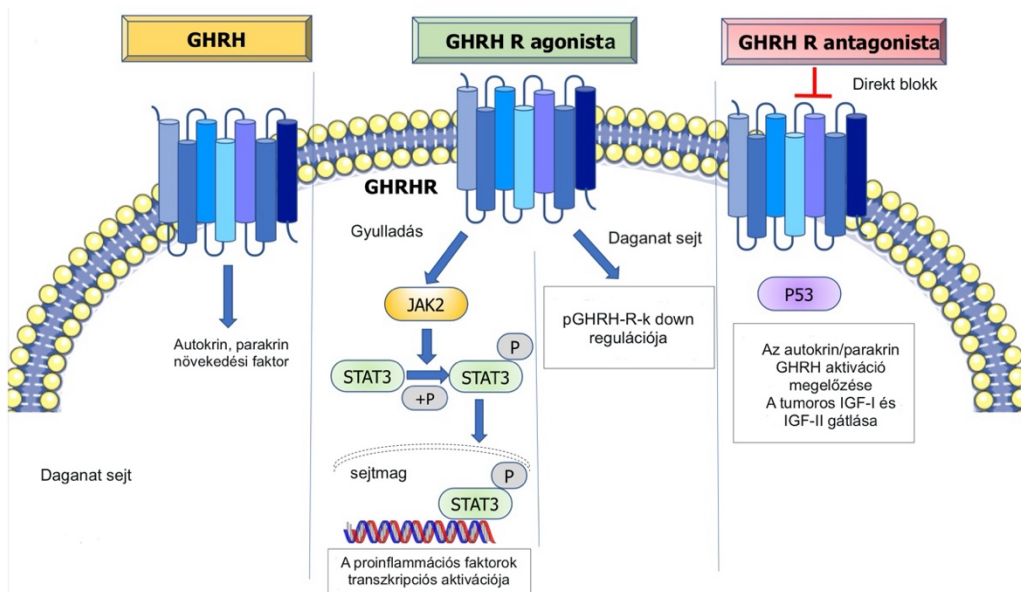
Miután a GHRH kötődik a GHRH-R-hoz, a ligand-kötött GHRH-R aktivál egy G-proteint azáltal, hogy katalizálja a guanozin-50-trifoszfát (GTP) kötődését az alfa-alegységhez az intracelluláris oldalon. Ezen receptorok aktiválása megnövekedett GH termelést eredményez, főként az intracelluláris ciklikus 3',5'-adenozin-monofoszfát (cAMP) függő útvonalon, valamint a foszfolipáz C útvonalon (IP3/DAG útvonal) és néhány más kisebb útvonalon keresztül. Ez stimulálja a membránhoz kötött adenil-cikláz és megnövekedett cAMP-szintet eredményez, mely egy protein-kináz aktiválásán keresztül idézi elő a további történéseket. Az ezt követő folyamat során megnyílik egy nátriumcsatorna, ami annak depolarizációjához vezet. Az intracelluláris feszültség ebből eredő változása viszont egy feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornát nyit meg, lehetővé téve a kalcium beáramlását, ami közvetlenül kiváltja a szekrécións granulátumokban raktározott GH felszabadulását [22, 23, 25]. A cAMP a protein kináz A (PKA) szabályozó alegységeihez is kötődik, és aktiválja azokat, lehetővé téve a szabad katalitikus alegységeknek a sejtmagba való

transzlokációját, valamint a CREB (cAMP response element binding protein) transzkripciós faktor fehérje foszforilációját és aktiválását. A foszforilált CREB koaktivátoraival, a p300-zal és a CREB-kötő fehérjével együtt fokozza a GH transzkripcióját azáltal, hogy a CREB-k megfelelő kötőhelyeihez kötődik a GH gén promoter régiójában. A CREB a GHRH receptor gén transzkripcióját is serkenti. A foszfolipáz C útvonalon a GHRH stimulálja a foszfolipáz C-t (PLC) a heterotrimer G fehérjék  $\beta\gamma$ -komplexén keresztül. A PLC aktiválása diacilglicerint (DAG) és inozit-trifoszfátot (IP3) is termel, az IP3 indukálja az intracelluláris  $Ca^{2+}$  felszabadulását az endoplazmatikus retikulumból, növeli a citoszol  $Ca^{2+}$  koncentrációját, ami vezikulák fúzióját és az előre elkészített GH-t tartalmazó szekréciós vezikulák felszabadulását eredményezi (6.ábra).



6. ábra. Szignáltranszdukció [26].

Bizonyos  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást a cAMP közvetlen hatása is előidéz, ami különbözik a protein kináz A cAMP-függő aktiválási útvonalától. A GHRH ligand GHRH-R-hoz való kötődésekor az aktivált másodlagos hírvivők nem csak az adenilát cikláz cAMP - PKA és a  $\text{Ca}^{2+}$  -kalmodulin, de az inozitol-foszfát-diacil-glicerolprotein-kináz C (PKC), az L-típusú kalciumcsatornák és az arachidonsav-ikozános útvonalakat is érintik. A végeredmény a GH termelésének és szekréciójának stimulálása. A MAP kináz és az ERK foszforiláció aktiválódásáról az agyalapi mirigyben is beszámoltak cAMP/PKA/PKC-függő módon. A GHRH stimulálhatja a Ras/MAPK-t a  $\beta\gamma$ -alegységeken keresztül, hogy elősegítse a sejtnövekedést. Egyes tanulmányok azt is kimutatták, hogy a szívizomban az apoptózis GHRH-receptor által közvetített gátlása magában foglalja az ERK1 és ERK2, valamint a PI3KAkt jelátvitel modulálását. Ez azért vált nyilvánvalóvá, mert az ERK1/2- és PI3K/Akt-specifikus gátlók megszüntetik ezeket a hatásokat. [22, 23] (7.ábra).



7. ábra. Szignáltranszdukció daganatsejten [26].

## 1.7. A GHRH, a GHRH-R és a szintetizált GHRH analógok potenciális szerepe daganatos kórképekben

Schally professzor és munkatársai azonosították a GHRH-R-k splice variánsait (SV) humán daganatokban és más extrapituiter szövetekben, amelyek közvetíthetik a GHRH és GHRH agonista és GHRH antagonistáknak hatásait. [7, 8, 27]. A tumoros GHRH-R-kat kódoló cDNS-ek izolálása és szekvenálása a pGHRH-R számos splice variánsát tárta fel [27].

A splice variáns 1 (SV1) cDNS-szekvenciájának nagy része azonos a pGHRH-R megfelelő cDNS-szekvenciájával, de az SV1 és SV2 gének első 334 nukleotidja eltér a pGHRH-R génjétől.

Az SV1 fehérjeszekvenciája csak az N-terminális extracelluláris doménben tér el a pGHRH-R fehérjeszekvenciájától, a pGHRH-R első 89 aminosavát egy 25 aminosavból álló szekvencia helyettesíti. Azt is közölték, hogy az SV1 funkcionális GPCR-t kódol hét transzmembrán domainnel, melyből a harmadik intracelluláris hurokkal pedig a G-fehérjével való kölcsönhatásban játszik szerepet. Az SV2 egy olyan GHRH-R izoformát kódol, amely a második transzmembrán domain után csonkolt [8, 27].

E vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy az SV1 kódolja a GHRH-R-k fő izoformáját. A későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy az SV1 funkcionális receptort kódol. Mind a pGHRH-R-t, mind az SV1-et normál és daganatos emberi szövetekben azonosították, ahol GHRH jelátvitelt közvetítenek. Így a GHRH-R-k expresszióját megtalálták primer humán prosztatata-, emlő-, méhnyálkahártya-, tüdő- és mellékvese karcinómákban és uvealis melanómákban, valamint a rosszindulatú daganatok gyakorlatilag minden fő típusának kísérleti humán sejtvonalaiiban is megtalálták, beleértve a prosztatata-, petefészek- és emlőrákot is, méhnyálkahártya, tüdő (SCLC és nem SCLC), vastagbél-, gyomor-, hasnyálmirigy-, vese daganatokat, glioblastomát és Ewing-sarcomat, lymphomat és uvealis melanómákat [5, 7, 8, 17].

Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy különböző humán daganatokban a GHRH és tumoros receptorai autokrin/parakrin mitogén hurkot képezhetnek, amely részt vesz a rosszindulatú folyamatok növekedésének szabályozásában.

Mindezen eredmények birtokában a rosszindulatú daganatok kezelésére szolgáló potenciális új terápiás lehetőség érdekében a GHRH számos hatékony analógját tervezték és szintetizálták meg. Az elmúlt két évtizedben a GHRH számos hatékony agonistáját és antagonistáját fejlesztették ki nagy receptoraffinitással [4, 5, 7, 8, 16, 28]. GHRH-R antagonisták jelentősen fokozzák az apoptózist és csökkentik többféle daganatos sejt proliferációját *in vitro* és *in vivo*. A GHRH antagonisták daganatgátló hatása 16 különböző típusú humán daganat esetében, amelyeket közel 50 experimentális humán daganatmodell képvisel - beleértve a prosztatata-, emlő-, petefészek-, vese-, gyomor-, hasnyálmirigy-, tüdő carcinomákat és a közelmúltban publikált eredmények alapján az akut myeloid leukémiát - , részben úgy tűnik, a lokális autokrin módon stimuláló GHRH rendszerrel történő interferenciáján alapul. Így a GHRH antagonisták közvetlenül blokkolhatják a tumor GHRH-R-t és megakadályozhatják az autokrin/parakrin GHRH aktiválódását daganatos megbetegedések esetén. Ezenkívül úgy tűnik, hogy a tumoros IGF-I és IGF-II termelődését közvetlenül gátolják a GHRH antagonisták. A GHRH antagonisták daganatellenes hatása közvetett is lehet, és az agyalapi mirigy GH szekréciójának gátlásán keresztül érvényesülhet. Ez a mechanizmus az agyalapi mirigy GH/hepatikus IGF-I tengelyének gátlását okozza [4, 5, 7, 8].

További ígéretes terápiás lehetőségre utal, hogy az Alzheimer-kór legfejlettebb transzgenikus egérmodelljében a GHRH-antagonisták jótékony hatással vannak a kognitív funkciókra, az amiloid plakkok és Tau filamentumok csökkentésére és a gyulladásra is [29]. Ezenkívül Romero

és munkatársai beszámoltak a dyslipidaemia csökkenéséről patkányokban a MIA-602 kódjelű GHRH-antagonista alkalmazásával [30].

Ígéretes és figyelemre méltó eredményekről számoltak be a GHRH agonistáival kapcsolatban is. Az új GHRH agonisták terápiás hatásai közé tartozik a kardioprotektív hatás, a szív regenerációja infarktus után, a vaszkuláris meszesedés csökkentése és a sebgyógyulás [7, 16, 17, 18, 19, 25].

Nemrég arról is beszámoltak, hogy a GHRH és agonista analógjai csökkenthetik a szívizomhipertrófiát, és képesek javítani a szívműködést nyomástúlterhelés okozta szívelégtelenségben [31]. A GHRH agonisták jótékony hatásai közé tartoznak a cukorbetegségben a hasnyálmirigy-szigetek működésének és az inzulintermelésnek a serkentése, valamint a korai kísérleti diabéteszes retinopátia kivédésében is szerepet játszhatnak [3, 32]. Az eddigi vizsgálatok alapján úgy tűnik, hogy a GHRH agonistái és antagonistái egyaránt jelentősen kisebb mellékhatás profilt mutatnak.

Az eddig említettek alapján számos human daganat típusban vizsgálták és mutatták ki a GHRH és GHRH-R-k expresszióját, azonban bizonyos daganatok és kórképek esetén köztük a humán endometrium és a gyermekkori hematoonkológiai kórképek esetén nem állnak rendelkezésünkre ilyen eredmények vagy csak limitált adatok érhetőek el.

Az alábbiakban a jelen kutatás tárgyát képező kórképek rövid bemutatását tesszük meg.

Elsőként említve a humán endometrium carcinomát, majd a gyermekkori hematoonkológiai malignus illetve benignus kórképeket, mindkettő esetében előbb a szolid majd a csontvelőt érintő betegségeket.

## 1.8. Endometrium carcinoma irodalmi összefoglalója

A méhnyálkahártya rákja világszerte a nők morbiditásának és halálozásának egyik fő oka, és a nők körében a hatodik leggyakoribb rosszindulatú daganat [33, 34]. A korai stádiumú EC prognózisa általában kedvező, de néhány nőben agresszív rosszindulatú daganatok fordulnak elő, mivel daganataik magas gradusúak, invazívak, vagy nem endometrioid sejtekből (clear-cell vagy papilláris serosus sejtekből) állnak, és magas a recidiva és a halálozás lehetősége. Az EC-s eseteket általában két altípusba sorolják. Bokhman publikációja alapján az EC két fő típusát különböztetjük meg: I. típusú és II. típusú [35]. Az I-es típusú endometrioid rákok ösztrogénfüggőek, és atípusos endometriális hiperpláziából alakulnak ki. Így az excesszív exogén és endogén ösztrogéneknek fontos szerepe van az I. típusú endometrium adenocarcinoma patogenezisében. A II-es típusú endometrioid rákok kevésbé gyakoriak, agresszívebb szövettani variánsokból állnak (clear-cell, serous carcinoma és adenocarcinosarcoma), általában posztmenopauzális korban fordulnak elő, és magas mortalitással járnak [36], továbbá nem mutatnak összefüggést a hosszan tartó ösztrogénexpozícióval. Másrészt az EC molekuláris biológiája világosabbá vált az elmúlt évtizedben, ami kevésbé morbid és minimálisan invazív sebészeti megközelítésekhez és a kemoterápia rutinszerűbb alkalmazásához vezetett, amelyek mind javították az EC-ban szenvedő nők eredményeit. Azonban hatékonyabb kezelési módokra van szükség, amelyek tovább javítják a túlélést és az életminőséget. Folyamatban vannak az immunkontroll-gátlók klinikai vizsgálatai előrehaladott és visszatérő endometriumrák kezelésére [37, 38, 39]. Ha sikerül kapcsolatot találni a kezelt populáció genetikai hátterével, és jó válaszarányt érünk el, új kezelési lehetőségeket lehet bevezetni a standard kezelési megközelítések helyett [37, 38, 39]. 2018 óta az FDA által jóváhagyott immun check-point inhibitor, a pembrolizumab (anti-PD-1, (programozott sejthalál

fehérje-Ligand 1)) alkalmazása lehetséges minden olyan solid daganat esetén, ahol hibás a DNS mismatched repair. Az előrehaladott EC-ban szenvedő betegek körülbelül 20-30%-a részesül ezen kezelésben [40, 41]. Számos tanulmány utalt arra, hogy a kemoterápia nemcsak az immunrendszert aktiválhatja, hanem PD-L1 expressziót is indukál a daganat sejteken, ami sikeresebb immunterápiát eredményezhet [37, 41]. A folyamatban lévő megfigyeléses vizsgálatok az immunterápiás (avelumab, atezolizumab és durvalumab) stratégiák hatását próbálják javítani a klasszikus kemoterápia kombinációjával vagy anélkül [41]. Más genomiális változások és molekuláris markerek az EC-ban, mint például a hormonreceptor-státusz, személyre szabottabb terápiát eredményezhetnek a jövőben. A célzott terápiákkal kapcsolatos preklinikai és klinikai vizsgálatok azt sugallják, hogy egyes szerek hatékonyak az EC kezelésében [37].

## **1.9. Gyermekgyógyászati minták elméleti háttérének irodalmi összefoglalója**

A *Hodgkin-lymphoma* (HL) meglehetősen ritka rosszindulatú daganat a gyermekpopulációban, azonban a gyermekkorban előforduló lymphomák körülbelül 40%-át teszi ki, és a serdülők és fiatal felnőttek leggyakoribb rosszindulatú daganata. A HL életkor szerinti előfordulása bimodális megoszlást mutat. A fejlett országokban az első csúcs körülbelül 20 éves korban, a második csúcs pedig az 55 éves vagy idősebb betegeknél figyelhető meg. A HL 5 éves kor előtt nem gyakori. A fejlődő országokban azonban az első csúcs a gyermekkorra tolódik, általában a serdülőkor előtt. A 15 évnél fiatalabb gyermekek és serdülők esetében az incidencia 5,5 eset/millió. A 15-20 éves egyéneknél az előfordulási gyakoriság 12,1 eset/millió lakos [42-45].

A 10 évnél fiatalabb gyermekeknél jelentős, 3:1 arányú férfi-nő arány figyelhető meg. Idősebb gyermekeknél és felnőtteknél a férfi-nő arány körülbelül 1:1.

A Hodgkin-lymphoma a B-sejtes rosszindulatú lymphoid daganatok heterogén csoportja, amelyet szövettanilag az esetek túlnyomó részében Hodgkin és Reed-Sternberg sejtek jelenléte jellemez. Az 5 éves túlélési arány a kezelést követően 81-98% között van, attól függően, hogy a daganat milyen stádiumban van és milyen kiterjedtséggel rendelkezik a diagnózis felállításakor [42,43,44]. A gyermekkori esetek 5 éves túlélési aránya meghaladja a 95%-ot [42-45]. Valójában a gyermekkori HL az első és egyetlen neoplasztikus egyedi entitás Magyarországon, amelynél az 5 éves túlélési arány 100%-os az Országos Gyermekrákregiszter legfrissebb adatai szerint [46].

A HL minden korcsoportban nagyon érzékeny a kemoterápiára és a besugárzásra. A HL volt az első olyan tumor, amelyet önmagában sugárterápiával vagy több kemoterápiás szer kombinációjával gyógyítottak. A HL-ban szenvedő gyermekek és serdülők gyógyulási aránya az évek során folyamatosan javult, különösen a kombinált sugárkezelés és többszeres kemoterápia bevezetésével [42-45].

A **Rhabdomyosarcoma** (RMS) a lágyszövet-szarkómák leggyakoribb formája (~19%) a gyermekpopulációban, a gyermekkori rákos megbetegedések 5-8%-át teszik ki, a harmadik leggyakoribb extracranialis solid daganat a gyermekkorban a neuroblastoma és a Wilms-tumor után [47]. Az RMS leggyakrabban gyermekeknél és fiatal felnőtteknél (45 év alatt) fordul elő, enyhe férfidominanciával, és gyakrabban fordul elő a kaukázusi rasszhoz tartozó betegeknél [44]. Az RMS kemoterápia - és sugárérzékeny; az eddig azonosított molekuláris léziók azonban nagyon korlátozott számban kínálnak hatásos terápiás szereket [46].

A **teratomák** (TR) veleszületett, csírasejtes daganatok, viszonylag gyakori szolid daganatok gyermekkorban. Természetüket tekintve általában jóindulatúak (nem rákosak és nem terjednek), és meglehetősen gyorsan növekedhetnek (néha rosszindulatúak és terjedhetnek) [48, 49].

A teratomák etiológiája nem teljesen ismert; feltételezik, hogy a korai embrionális fejlődés szakaszában (4-5. hét) a prekursor, totipotencialis primordiális csírasejtek nem teljes differenciálódása vagy aberráns migrációja felelős a kialakulásukért. Eddigi ismereteink alapján a lokalizáció korfüggő, az extragonadális daganatok elsősorban újszülötteknél és kisgyermeknél fordulnak elő, míg a testicularis és ovarialis lokalizációk gyakoribbak a serdülőknél. A betegek 60%-ánál a sacrococcygealis régió az elsődleges hely, és az összes teratoma közel 80%-a nőknél fordul elő. A teratomák előfordulási gyakorisága 1:4000 élveszületésre vonatkoztatva [48, 49].

Morfológiailag a teratomák lehetnek solid, cysticus vagy vegyes morfológiájúak. Különböző mértékben differenciálódott szövetekből állhatnak, besorolás szerint lehetnek érett vagy éretlen (potenciálisan rosszindulatú), a legtöbb gyermekkori daganat érett. Az érett teratomák általában jóindulatúak, azonban az éretlen germinális sejtekből álló tumorok (GCT: germ cell tumor) tartalmazhatnak rosszindulatú komponenseket, amelyeket gyors terjedés jellemez, amely nem respektálja a szervek határát, és metasztatikus elváltozásokat képezhet. A daganat klinikai viselkedése jelentősen eltérő a lokalizációtól és a mérettől függően. Az éretlen vagy premalignus elemek jelenléte befolyásolhatja a terápiát és a hosszú távú eredményt. A korai definitív teljes eltávolítás, a premalignus vagy rosszindulatú elváltozások alapos patológiai vizsgálata és a hosszan tartó gondos nyomonkövetés kritikus fontosságúak a kedvező kimenetel biztosításához [48, 49].

Az *akut lymphoblastos leukaemia* (ALL) a leggyakoribb gyermekkori rosszindulatú vérképzőszervi megbetegedés, amelyet a csontvelőben, a perifériás vérben és más szervekben transzformált lymphoid sejtek szaporodása jellemez, és a 15 évesnél fiatalabb gyermekek körében előforduló rákos megbetegedések akár 25%-át is kiteheti (leggyakrabban 0 és 5 év között fordul

elő), továbbá egyben a leggyakoribb hematológiai daganatos megbetegedés gyermekeknél, amelyet a csontvelőben, a perifériás vérben és más szervekben transzformált lymphoid sejtek proliferációja jellemez. Az ALL-re az éretlen fehérvérsejtek, úgynevezett lymphoblastok vagy leukémiás blastok túltermelése jellemző. A transzformált sejtek a lymphoid vonalhoz tartoznak, beszivárognak a csontvelőbe, és beszivároghatnak különböző extramedulláris szervekbe, például lépbe, májba, nyirokcsomókba, bőrbe, csontokba, petefészkekbe, herékbe és a központi idegrendszerbe. Az 5 éves túlélési arány megközelíti a 90%-ot a gyermekeknél (<15 éves korig), és meghaladja a 75%-ot a serdülőknél (15 és 18 év között) [46,50-52]. A jelen alkalmazott kezelések jó esélyt adnak a gyógyulásra [46, 50,51,52].

A **mesenchymális hamartoma** egy jóindulatú, mesenchymalis eredetű, leggyakrabban a májat érintő daganat, amelynek patogenezeise nem teljes egészében ismert. Az esetek több mint kétharmada 2 évesnél fiatalabb gyermekeknél fordul elő, ezen életkort követően előfordulása kifejezetten ritka [53,54]. Az irodalomban először Edmondson írta le 1956-ban [55]. Ez a gyermekkori hemangioma után a második leggyakoribb jóindulatú májdaganat. Általában mesenchymális szöveti komponensekből származik [56]. A legtöbb ilyen daganat a máj jobb lebenyében található, bár néhány esetet a bal lebenyben is leírtak [57, 58]. Ennek a daganatnak a diagnózisa igen nehéz a nem specifikus klinikai tünetek és specifikus laboratóriumi vizsgálatok hiánya miatt; a radiológiai, képalkotó vizsgálat kulcsfontosságú a diagnózishoz [59].

A **Fibrosus dysplasia** (FD) egy nem öröklődő, általában sporadikus, de veleszületett, ritka jóindulatú csontbetegség, amely az oszteoblasztos differenciálódás és érés lokalizált hibájaként nyilvánul meg, a normál csontszövet helyén nagy rostos stromával és éretlen csontszigetekkel való megjelenéssel. Különböző fajtáit különböztetjük meg: monostoticus, polyostoticus, craniofacialis

fibrous dysplasia és cherubismus formákban fordul elő. A cherubismus esetén a mandibula és a maxilla érintett csupán és valójában nem is igazi FD-ról van szó ezen esetben. Az FD egy csontfejlődési betegség, amelyben a normál spongiosa helyét és az érintett csontok velőüregét rendellenes rostos szövet tölti fel, amelyet a csontmetaplasia részeként kialakult gyengén calcifikált primitív csont trabekulákat tartalmaz. Az FD elsősorban gyermekeknél és fiatal felnőtteknél fordul elő. Az FD legmagasabb előfordulási gyakorisága 3 és 15 éves életkor között van [34,62]. A monostoticus forma gyakrabban fordul elő, és a 20-30 éves korosztályt érinti: a polyostoticus FD főként 10 évesnél fiatalabb gyermekeknél jelentkezik, az elváltozások a gyermekkel együtt nőnek, pubertás után stabilizálódnak, és leggyakrabban koponyacsontokat, bordákat érintenek, valamint a combcsont proximális részét vagy sípcsont metaphysisét vagy diaphysisét. A polyostoticus és monostoticus FD előfordulási aránya 3:7 [60, 61]. Nincs ismert nemi predilectio [62]. A WHO a lágyszövet- és csontdaganatok legújabb 2020-as osztályozása óta (5. kiadás) a FD-t a jóindulatú csontdaganatok közé sorolja. A betegséget gyakran véletlenszerűen fedezik fel és általában fájdalommentes, máskor a csont kiszélesedésével, átalakulással vagy fájdalommal jelentkezhet. A felismerése patológiás törés vagy a szomszédos struktúrák összenyomódása és elmozdulása kapcsán történhet. Ez utóbbi különösen igaz a craniofacialis fibrosus dysplasiára, ahol az orbitában szereplő képletek vagy az agyidegek összenyomódása révén látás- vagy hallásvesztést okozhat [63]. Az FD egy olyan genetikailag nem öröklődő állapot, amelyet a 20. kromoszómán található GNAS1 gén missense mutációja okoz, amely a stimuláló G-fehérjéhez kapcsolt receptor, a G $\alpha$  alfa-alegységét kódolja. Az aktiváló mutációk posztzigotikusan mennek végbe, az arginin aminosavát ciszteinre vagy hisztidinre cserélve. A mutáció szelektíven gátolja a GTPáz aktivitást, ami az AMP-protein kináz A intracelluláris jelátviteli útvonalak konstitutív stimulációját eredményezi [64,65].

Az *infantilis myofibromatosis* (IM) egy ritka, mesenchymalis rendellenesség, amelyet a bőr, a csont, az izom és a zsigerek nem rákos (jóindulatú) daganat növekedése jellemez.

Egyaránt érinti mindkét nemet. A pontos előfordulási gyakoriság nem ismert, de becslések szerint 1:150 000 – 1: 400 000 élveszületés között van. Bár ritka kórképről van szó, az IM a leggyakoribb kötőszöveti tumor csecsemő - és koragyermekkorban. A súlyosság és a specifikus tünetek, beleértve a daganatok lokalizációját és számát, személyenként nagyon eltérőek lehetnek. Ezek a daganatok nem képeznek áttétet, de gyors növekedést mutathatnak, kezdetben komoly fájdalom nélkül, és elég nagyra nőhetnek ahhoz, hogy a közeli szervek összenyomásával vagy károsításával tüneteket okozzanak. Az esetek több mint 90%-a csecsemőknél vagy kisgyermeknél jelentkezik, de az irodalomban felnőttkori eseteket is leírtak, az ismert esetek átlagéletkora 7 év. Az IM-t először 1954-ben Dr. A.P. Stout [66] írta le külön entitásként az orvosi irodalomban. Majd 1981-ben dr. Chung és Enzinger részletes áttekintést nyújtott a rendellenességről, és bevezették az infantilis myofibromatosis nevet [67].

Szövettanilag az elváltozás egy vagy több jóindulatú mesenchymalis tumorként definiálható, amely leggyakrabban a törzs és a végtagok kötőszövetét érinti. Ezenkívül a fej-nyaki régió és a csontok vagy kisebb mértékben a tüdő és a gyomor-bél traktus is érintettek lehetnek.

Az IM vagy amennyiben későbbi gyermekkorban jelenik meg, a juvenilis myofibromatosis (JM) agresszív lefolyást is mutathat, ami a beteg halálához vezethet. Az agresszív gyermekkori myofibromatosis egy ritka, jóindulatú mesenchymális daganat, amelyet a jóindulatú rostos szövet proliferációja jellemez, amely egyenletes, megnyúlt, fusiform vagy orsó alakú sejtekből áll, amelyeket bőséges kollagén vesz körül és választ el [68-72].

Az IM az alábbi típusokra osztható, soliter, multicentrikus és multicentrikus zsigeri érintettséggel. A *soliter* a leggyakoribb, az IM eseteinek körülbelül 75%-át teszi ki. Ez a forma túlnyomórészt

férfiaknál fordul elő, és egy csomó vagy elváltozás jellemzi, amely leggyakrabban a bőrben fordul elő, gyakran a bőr alatti szövetekbe és/vagy izomszövetekbe is kiterjed. A csomó általában a fej, a nyak vagy a törzs területén található. A csont soliter csomója is előfordulhat, de rendkívül ritka. A *multicentrikus* formák gyakoribbak a nőknél. A *zsigeri érintettség nélküli multicentrikus formát* több csomó megjelenése jellemzi, amelyek a bőr, a subcutis vagy az izom különböző területein keletkezhetnek. A *zsigeri érintettséggel járó multicentrikus forma* a rendellenesség legsúlyosabb formája, és a bőr, az izmok és a csontok többszörös érintettsége, valamint a belszervek, például a tüdő, a szív és a gyomor-bél traktus érintettsége jellemzi. Egyes esetekben csak egy szerv érintett; más esetekben kiterjedt zsigeri érintettség van jelen; az IM ezen formája súlyos, életveszélyes szövődeményeket okozhat a lézió pontos helyétől és az érintett szervektől függően. A IM legtöbb esete spontán alakul ki, ilyenkor a kiváltó oka ismeretlen [68-70]. Az IM ritka eseteit azonosították, amelyek családi halmozódást mutatnak, ezeket eddig két gén mutációival hozták összefüggésbe. Ezek a gének a thrombocytá eredetű növekedési faktor receptor béta (PDGFRB) gén és a neurogenic locus notch homolog protein 3 (NOTCH3) génje. A PDGFRB gén mutációi által okozott IM autoszomális domináns módon öröklődik. A NOTCH3 gén mutációját mindössze egy családban írták le, ahol az öröklődés autoszomális recesszív volt [71].

A kezelési lehetőség jellemzően konzervatív sebészeti kimetszés; azonban az esetek kb 10 %-ában korai relapszusokról számoltak be.

A ***granulocitopénia*** a rendellenességek heterogén csoportja, amelyet a perifériás vér granulocitáinak számának a normál tartomány alsó határa alá ( $< 0,5 \times 10^9/l$ , azaz kevesebb mint  $500 \text{ sejt/mm}^3$ ) való csökkenése jellemez. A csontvelő-termelés csökkenése vagy a sejtek autoantitestek vagy a retikuloendoteliális rendszer általi perifériás pusztulása okozhatja a GP-t [49,

50]. A krónikus jóindulatú neutropenia (CBN: chronic benign neutropenia) a leggyakoribb gyermekkori neutropenia, mely krónikusnak tekinthető, ha legalább két hónapig tart, azonban a gyermekek több mint felénél akár 18-20 hónapig tart, de akár néhány évig is fennállhat, majd spontán megszűnik. A betegség már 6-12 hónapos korban megjelenhet gyakori középfülgyulladással, torokfájással, hasmenéssel és kisebb fertőzésekkel, de előfordulhat, hogy véletlenszerűen ismerik fel. A vérkép többi eleme normál tartományban van, és a gyermek egyebekben egészségesnek tűnik, a fizikális vizsgálat során semmi kóros nincs. Az abszolút neutrophil szám (ANC)  $0-500/\text{mm}^3$  között van. A CBN-ben szenvedő gyermekeknél ritkán alakulnak ki életveszélyes fertőzések, és általában 3-5 éves korukra kinövök a betegséget amikor az ANC emelkedni kezd. A CBN leukémiás transzformációja ritka [42, 49, 50, 73, 74].

Az **herediter spherocytosis** (HS) a leggyakoribb veleszületett vörösvérsejt-membrán defektus, amelyben a vörösvértestek szerkezeti fehérjéinek rendellenességei a vörösvértest-membrán felületének elvesztéséhez vezetnek, ami gömb alakú, hiperdenz, rosszul deformálódó vörösvértesteket eredményez hemolízissel. Ezen hemolitikus rendellenességet a lépben a vörösvértestek elpusztulása és a véráramból való eltávolítása (hemolitikus anémia), icterus és következményes splenomegalia jellemzi. A HS incidenciája 1/5000 az európai származásúak körében és az Egyesült Államokban [42,44].

Az **immunthrombocytopenia (ITP)** egy gyakori autoimmun vérzési rendellenesség gyermekkorban. Az Egyesült Államokban a becslések szerint a gyermekek éves prevalenciája 5,3/100 000 [75]. Az ITP során a thrombocytá antigének elleni autoantitestek képződése fokozza a vérlemezkék kiürülését a keringésből, ami izolált thrombocytopeniát eredményez. A spontán

gyógyulási arány magas (~80% gyermekeknél és 50% felnőtteknél), rosszindulatú átalakulás nem fordul elő. Az ITP-ben szenvedő gyermekek 80 százalékának önkorlátozó formája van, amely kezeléssel vagy anélkül (azaz spontán módon) 12 hónapon belül, de gyakran hamarabb is megszűnik.

A betegek azonban gyakran kezelést igényelnek a thrombocytopeniás vérzéses események morbiditásának csökkentése és az életminőség javítása érdekében [75].

## 2. Célkitűzés

Jelen kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a GHRH, GHRH-R-k expresszióját eddig még nem vizsgált daganat típusokon, kiemelt hangsúlyt fektetve a humán endometrium carcinomára és gyermekkori hematológiai kórképekre.

- Tanulmányozni kívántuk a fent említett kórképek klinikai mintáiban a GHRH expresszióját mRNS szinten RT-PCR módszer alkalmazásával
- Vizsgáltuk a GHRH-R-k jelenlétét mRNS szinten RT-PCR és fehérje szinten Western-blot és ligand kompetíciós assay alkalmazásával
- A receptor pozitív minták esetén meg kívántuk állapítani a receptorok kötési karakterisztikáit (receptor koncentráció, kötési affinitás, specificitás)
- Molekulár biológiai módszerekkel a különböző receptor SV-k expresszióját is tanulmányoztuk
- Elemeztük a korrelációt a receptorok expressziós mintázata és a vizsgált betegek klinikopatológiai jellemzői között
- Gyermekgyógyászati betegek mintái esetén tanulmányoztuk a jó és rosszindulatú kórképek fennállása és a GHRH-R-k jelenléte közötti összefüggéseket

### **3. Anyagok**

#### **3.1. Endometrium carcinoma minták**

A Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján 39 beteg (átlagéletkor 62 év; 28-82 év közötti) endometrium carcinoma mintáját vizsgáltuk meg. A vizsgálatokhoz körülbelül 5-20 mm<sup>3</sup> uterus szövetmintát használtunk, amelyet a staging műtét során eltávolítottak. A molekuláris biológiai vizsgálatok előtt minden mintán kórszövetteni vizsgálatot végeztek az endometrium carcinoma jelenlétének megerősítésére. 28 endometrioid (71,8%) és 11 papilláris serosus (28,2%) adenocarcinoma volt. Az endometrioid adenocarcinomában szenvedő betegek közül öt betegnek Grade 1., húsznak Grade 2. és háromnak Grade 3. betegsége volt. A papilláris serosus adenocarcinoma altípusú betegek közül háromnak Grade 1., ötnek Grade 2. fokozatú és háromnak Grade 3. daganata volt (1.táblázat). Hét esetben állt rendelkezésre normál endometrium szövet. A szövetmintákat lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk a teljes RNS izolálás és a membrán preparálásig. Ezen minták és normál emberi hypophysis minták gyűjtése és felhasználása vizsgálatainkban a Helsinkai Nyilatkozatnak megfelelően történt, és a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális Intézmény Etikai Bizottsága (DERKEB/IKEB 2284-004) jóváhagyta. Minden tájékoztatott betegől beleegyezést kaptunk. Öt darab, pozitív kontrollként használt, normál, humán hypophysis referenciamintát anonim módon gyűjtöttünk a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Patológiai Intézet boncolási eseteinek paraffin szövettan tárából.

**1.Táblázat.** A vizsgált 39 endometrium carcinomás páciens klinikopatológiai jellemzői (FIGO stádium, grade és szövettani szubtípus)

FIGO stádium	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Összesen
IA	0	4	1	5
IB	6	9	2	17
IC	0	3	1	4
Összes stage I	6	16	4	26
IIA	0	3	0	3
IIB	2	2	1	5
Összes stage II	2	5	1	8
IIIA	0	2	0	2
IIIC	0	2	1	3
Összes stage III	0	4	1	5
Total	8	25	6	39
Endometrioid szubtípus	5	20	3	28
Papillaris-serous adenoc. szubtípus	3	5	3	11

39 endometrium carcinomás beteg klinikai adatainak összefoglalója (endometrioid,  $n = 28$ ; papillaris-serous,  $n = 11$ ). A endometrioid adenocarcinomás betegektől származó minták osztályozva lettek: jól differenciált (grade 1), közepesen differenciált (grade 2), vagy gyengén differenciált (grade 3).

### 3.2. Gyermekgyógyászati minták

Tizenöt (15) gyermekbetegből származó hematológiai és onkológiai mintát vizsgáltunk meg. Az összes rendelkezésre álló klinikopatológiai adatot, beleértve a diagnózis időpontját, a nemet, a daganat vagy a hematológiai rendellenesség típusát a kórszövettani vizsgálat alapján, a minta típusát és a túlélést a 2. táblázat tartalmazza. A betegek átlagéletkora 8,03 év volt (9 hónap és 15 év közötti betegek). A humán minták a Debreceni Egyetem Gyermekgyógyászati Intézetének Gyermekhematológiai-Onkológiai részlegén kezelt betegektől származtak. Hét betegnek volt solid daganata, nyolc gyermeknek rosszindulatú vagy jóindulatú hematológiai elváltozása volt. Hét minta csontvelői aspirátum volt, egy hematológiai minta perifériás vérből származott (2.táblázat).

A solid tumorszöveteket az elsődleges műtét idején vettük. Valamennyi minta esetében rutin kórszövettani vizsgálat is történt, a kórismét a Debreceni Egyetem Patológia Intézetéből helyi patológus igazolta. Kutatómunkánkat a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük, a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális Intézmény Etikai Bizottsága (DERKEB/IKEB 2284-004) jóváhagyta. Minden tájékoztatott gyermek esetén szülői beleegyezést kaptunk. A daganatszöveteket azonnal folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és a további feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. Valamennyi diagnosztikai beavatkozást neoplasztikus állapotok gyanúja alapján végeztünk.

**2. Táblázat.** *Klinikopatológiai adatok, 15 gyermekgyógyászati hemato-onkoológiai minta esetén*

Sorszám	Tumor típus	nem	Minta típusa	Életkor a mintagyűjtés-kor	5 éves túlélés
1	Hodgkin lymphoma	lány	nyirokcsomó	15 év	él
2	Rhabdomyosarcoma	fiú	medence tumor szövet	12.5 év	† elhunyt
3	Rhabdomyosarcoma	lány	nyaki térfoglalás biopsia	8 év	† elhunyt
4	Teratoma/adenoc. komponenssel	fiú	Mediastinalis tumor szövet	14.5 év	† elhunyt
5	Akut lymphoblastos leukemia	lány	csontvelő	5 év	él
6	Akut lymphoblastos leukemia	fiú	csontvelő	13 év	él
7	Akut lymphoblastos leukemia	fiú	csontvelő	9.5 év	† elhunyt
8	Akut lymphoblastos leukemia	fiú	csontvelő	6.5 év	él
9	Akut lymphoblastos leukemia	fiú	perifériás vér	15 év	† elhunyt
10	Benignus mesenchymalis hamartoma	fiú	Mediastinalis térfoglalás	4 év	él
11	Fibrous dysplasia	lány	csont tumor szövet	10.5 év	él
12	Juvenilis myofibromatosis	fiú	jobb csípő csont tumor szövet	2 év	él
13	Krónikus benignus neutropenia	fiú	csontvelő	12.5 hónap	él
14	Hereditær spherocytosis	lány	csontvelő	9 hónap	él
15	Immun thrombocytopenia	fiú	csontvelő	10 hónap	él

## 4. Módszerek

### 4.1. RNS izolálás

Az *EC szövetmintákat* Mikro-Dismembrator-U-val (SartoriusB. Braun Biotech, Melsungen, Németország) homogenizáltuk, és az RNS extrakcióhoz Nucleospin Total RNA Isolation Kit-et (Macherey-Nagel, Düren, Németország) használtunk. Az RNS koncentrációját és tisztaságát Nanodrop ND-1000 UV spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg.

Minden gyermekgyógyászati mintából és humán hypophysis mintából RNS izolációs kittel (Macherey-Nagel, Düren, Németország) teljes RNS izolálást végeztünk. Az RNS koncentrációt és tisztaságot NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA) határoztuk meg. Amennyiben a OD260/280 arány több volt mint 1,8 azt jó RNS tisztaságnak fogadtuk el, ezáltal alkalmasnak tekintettük a génexpresszió mérésére. A további molekuláris biológiai analízis megtörténteig az RNS mintákat – 80 °C-on tároltuk.

#### 4.2.1. RT-PCR az EC mintákon

A teljes RNS-t ( 200 ng / $\mu$ l) MMLV Reverz Transzkriptázzal és oligo(dT)15-tel (Promega Co, Madison, WI, USA) cDNS-sé írtuk át a gyártó utasításai szerint. A GHRH-R-al kapcsolatos vizsgálatainkhoz használt primereket a primer3\_www.cgi v 0.2 software segítségével terveztük [76] (3. táblázat).

### 3. Táblázat. A *B-aktin (ACTB)*, a *GHRH-R* és az *SV1* primerek szekvenciái

Primerek	Forward szekvencia	Reverse szekvencia
ACTB	5'-GGCATCCTCACCCCTGAAGTA-3'	5'-GGGGTGAAGGTCTCAA-3'
GHRH-R	5'-CACGTCTTCTGCGTGTTGAG-3' (exon 1)	5'-GCATCTCCTCTGCTGCTTGT-3' (exon 2)
SV1	5'-GGAAGGAGTTGTGGCTAGAGAG-3' (intron 3)	5'-GTCATGGTGGCGAAATGG-3' (exon 7)

A primerek specifikitásának megerősítéséhez a PCR reakció során kapott PCR-termékeket az ABI-PRISM 3130 Genetic Analyzer segítségével (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) mindkét irányban megszekvenáltuk.

A  $\beta$ -aktin housekeeping gén, a GHRH ligand, az SV2, SV3 és SV4 splice variánsokhoz is génspecifikus primereket használtunk [76,77].

A  $\beta$ -aktin, GHRH-R, GHRH és SV1 gének esetében a PCR reakciókeverék 1  $\times$  PCR puffert, 1 U Taq polimerázt (Invitrogen, NY, USA), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>-ot, 0,3  $\mu$ M primert (Invitrogen) és 200  $\mu$ M-nak megfelelő dNTP-eket tartalmazott (Fermentas, Leon-Rot, Németország). A templátnak megfelelő cDNS-ből 1,0  $\mu$ L-t használtunk 25  $\mu$ l végtérfogatban.

Denaturálás után (3 perc 94 °C-on) a cDNS-t 45 cikluson keresztül amplifikáltuk (45 másodperc 94 °C-on; 30 másodperc 62 °C-on és 90 másodperc 72 °C-on). A  $\beta$ -aktint 30 ciklussal amplifikáltuk. Ezt követően egy utolsó, 72 °C-on kivitelezhető, 10 perces elongációs lépést alkalmaztunk, majd a mintákat 4 °C-ra hűtöttük le.

Az SV2, SV3 és SV4 splice variánsok esetében a PCR reakciókeverék 1  $\times$  PCR puffert, 1,25 U TruStart Taq polimerázt (Fermentas, Leon-Rot, Németország), 3 mM (SV2, SV4) vagy 4 mM (SV3) MgCl<sub>2</sub>-t, 0,4  $\mu$ M (SV2, SV4) vagy 0,5  $\mu$ M (SV3) tartalmazott mindegyik primerből; 300  $\mu$ M (SV2) vagy 200  $\mu$ M (SV3, SV4) minden dNTP-ből; és 1,5  $\mu$ L cDNS volt 25  $\mu$ l végső térfogatban.

Denaturáció és enzimaktiválás után (3 perc 95 °C-on) a cDNS-t 45 cikluson keresztül amplifikáltuk (30 sec 95 °C-on; 30 sec 63 °C-on és 60 sec 72 °C-on). Ezután egy utolsó 72 °C-on történő 5 perces elongációs lépést alkalmaztunk, majd a mintákat lehűtöttük 4 °C-ra. A PCR-termékeket elektroforézissel választottuk el etidium-bromiddal festett 2%-os agarózgélén.

#### 4.2.2. RT- PCR a gyermekgyógyászati mintákon

250 ng izolált RNS minden egyes gyermekgyógyászati mintából reverse-transzkripcióval cDNS-sé lett átírva a Touch Thermal Cycler PCR készülékben (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA) a Tetro cDNA Synthesis Kit (BIO-65043, Bioline, London, Egyesült Királyság) segítségével.

A RT-PCR reakciót a gyártó útmutatásai szerint, 20 µl térfogatban, random hexamerek alkalmazásával végeztük. Az RT-PCR reakcióhoz használt komponensek összetétele a gyártó útmutatásának megfelelően a 4. táblázatban bemutatott módon alakult.

**4. Táblázat.** RT- PCR reakció elegye gyermekgyógyászati minták esetén

Total RNA	n µL (minden mintánál más) *
<b>Primer: Random Hexamer</b>	1 µl
<b>10mM dNTP mix</b>	1 µl
<b>5x RT puffer</b>	4 µl
<b>RiboSafe RNáz Inhibitor</b>	1 µl
<b>Tetro Reverz Transzkriptáz</b>	1 µl
<b>DEPC-kezelt víz</b>	20 - (n+8) µl

n\*: A reakcióban felhasznált teljes RNS mennyiségét a minták mért RNS-koncentrációja alapján számítottuk ki.

A PCR reakció 35 ciklusból állt (95 °C 15 másodpercig, 60 °C 30 másodpercig, 72 °C 10 másodpercig és 72 °C két percig). A szennyeződés tesztelésére RT-NTC-t is beiktattunk.

Az RT-PCR reakciót a GHRH és az SV1 kimutatására gyermekgyógyászati mintákban 25 µl végső reakciótérfogatban végeztük génspecifikus primerekkel. A GHRH és az SV1 primer szekvenciáit a 4. táblázat tartalmazza. Pozitív kontrollként normál humán agyalapi mirigyét, háztartási génként β-aktint használtunk. Az RT-PCR reakció 35 ciklusból állt (95 °C 15 másodpercig, 60-67 °C (T<sub>m</sub> annealing lásd a 5. táblázatot) 30 másodpercig, 72 °C 10 másodpercig), és a végső amplifikálás 72 °C-on 2 percig tartott. A PCR-termékeket 1,5%-os GelRed-et (Bioline, London, Egyesült Királyság) tartalmazó agaróz gélen választottuk el, és UV-fényben detektáltuk, majd AlphaDigiDoc™ RT-vel (Alpha Innotech, Santa Clara, CA, USA) digitalizáltuk. A DNS méretének meghatározásához 25 vagy 50 bp DNS-markert (Bioline, London, Egyesült Királyság) használtunk.

**5. Táblázat.** A β-aktin (*ACTB*), a *GHRH* és az *SV1* primerek szekvenciái és az RT-PCR vizsgálathoz használt egyéb paraméterek

Primerek	Forward szekvencia	Reverse szekvencia	T <sub>m</sub> (°C) Annealing Hőmérséklet	Termék méret bp)
ACTB	5'-GGCATCCTCACCCCCTGAAGTA-3'	5'-GGGGTGAAGGTCTCAA-3'	60 °C	203 bp
GHRH	5'-GGAGTTGTGGCTAGAGAG-3'	5'-TGTCTGTCTACCTGACGACCAA-3'	64 °C	150 bp
SV1	5'-GGAGTTGTGGCTAGAGAG-3'	5'-GCATAGAACAGTGGAGAAG-3'	67 °C	373 bp

#### 4.3. A GHRH-R fehérje vizsgálata Western Blot technikával a vizsgálatunkban használt gyermekgyógyászati mintákon

A szöveti lizátum készítéséhez a gyermekgyógyászati mintákat homogenizáltuk és jéghideg fehérje lízis pufferben (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) proteáz - és foszfatázgátlókkal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) kiegészítve lizáltuk. A szöveti lizátum

fehérje mennyiségi meghatározását Bradford reagenssel végeztük. Az izolált fehérjéket a Western blot előtt 4× Laemmli pufferrel (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA) hígítottuk, majd minden fehérjemintából 40 µg egyenlő térfogatú mintát 95 °C-on 8 percig forraltuk. A lizátumokat a célfehérje molekulatömegének megfelelően 10%-os nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélen választottuk el elektroforézissel (SDS-PAGE). Az elválasztott fehérjék méretének meghatározásához egy molekulatömeg-markert (Precision Plus Dual Color Protein Standard, Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA, USA) is futtattunk a SDS-PAGE-en.

A fehérjéket polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra vittük át (Millipore, Burlington, MA, USA). 5%-os tej-TBS-Tweennel való blokkolásakor a membránokat elsődleges antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át, 4 °C-on (anti-GHRH-R, 1:1000 hígítás (GHRH-R poliklonális antitest: PA3-117, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), anti-HPRT, 1:2000 hígítás (POO492 nyúl monoklonális; Biol. Technology, CA, USA).

A HPRT-t, mint housekeeping azaz „háztartási” fehérjét alkalmaztuk. A TBS-Tweennel végzett mosási lépések után a membránokat anti-nyúl IgG másodlagos antitesttel (1:5000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) inkubáltuk két órán át szobahőmérsékleten. Ezután a membránok TBS-Tweennel történő többszöri mosása után a jelet kemilumineszcenciával detektáltuk Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) alkalmazásával. Az egyes sávok intenzitását HPRT-re normalizáltuk. A mennyiségi meghatározást a Bio-Rad Image Lab 5.2.1 szoftverrel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) végeztük.

#### 4.4.1. Membrán - és radioligand kötési vizsgálatok EC mintákon

A GHRH antagonistista JV-1-42 radioaktív jódozott származékait a korábban leírtak szerint [27, 78,79] klóramin-T módszerrel állítottuk elő, néhány kisebb módosítással. Humán EC mintákból tumorsejt membránokat állítottunk elő a receptorkötési vizsgálatokhoz mely a korábbi tanulmányokban már leírtak szerint történt [27, 78, 79]. Röviden, a humán tumor mintákat 50 mmol/l Tris-HCl pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk, és proteázgátlók (0,25 mmol/l fenil-metil-szulfonil-fluorid, 2 µg/ml pepsztatin A és 0,4% aprotinin (Merck, Darmstadt, Germany) hozzáadásával Ultra-Turrax szövethomogenizátor (IKA Works, Wilmington, NC, USA) segítségével; majd a nyers membránfrakciót a leírtak szerint [78] elkészítettük, és -70 °C-on tároltuk az in vitro vizsgálatig. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerével határoztuk meg. A GHRH-R kötődési vizsgálatokat, amint arról részletesen beszámoltunk, in vitro ligand-kompetíciós vizsgálatokat alkalmaztunk, amelyek a [<sup>125</sup>I]JV-1-42 mint radioligandum kötődésén alapultak humán endometrium carcinoma minták membránfrakcióihoz [78]. A GHRH antagonistista JV-1-42-t és [<sup>125</sup>I]JV-1-42-t, mint radioligandumot, korábban már jellemezték, miszerint nagy affinitású kötődést mutattak patkány és emberi agyalapi mirigyhez, valamint emberi vese-, prosztata-, emlő- és egyéb daganatokhoz [5, 78, 80, 81]. A radiojóddal kezelt JV-1-42 nagy affinitású kötődését az SV1-hez szintén kimutatták és korábban már közölték [78].

Röviden, az 50-160 µg fehérjét tartalmazó membrán homogenizátumokat két vagy három párhuzamosban inkubáltuk 60 000-80 000 cpm [<sup>125</sup>I]JV-1-42 és növekvő koncentrációjú (10<sup>-12</sup> - 10<sup>-6</sup> mol/l) nem radioaktív peptidekkel (szomatosztatin, luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH), epidermális növekedési faktor (EGF), [Tyr<sup>4</sup>] bombesin és inzulinszerű növekedési faktor I (IGF-I)), mint kompetitorokkal 300 µl osztófogatú kötőpufferben (50 mmol/L Tris-HCl, 5

mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1% BSA és 30 µg/mL bacitracin, pH 7,4) proteázgátlókkal kiegészítve. Egy órás inkubálás és elválasztás után a receptorhoz kötött frakciót tartalmazó végső pelletet  $\gamma$ -számlálóban megszámláltuk [78]. Munson és Rodbard LIGAND-PC számítógépes görbeillesztő szoftverével meghatároztuk a receptorkötés típusát, a disszociációs állandót (K<sub>d</sub>) és a receptorok maximális kötőképességét (B<sub>max</sub>). A membránfehérje frakciók korlátozott mennyisége miatt a GHRH-R kötődését 11 darab EC mintában tudtuk megvizsgálni.

#### **4.4.2. Membrán - és radioligand kötési vizsgálatok gyermekgyógyászati mintákon**

A GHRH antagonistá JV-1-42 radioaktív jódozott származékait klór-ramin-T módszerrel állítottuk elő, amint azt korábban közöltük [27, 78, 79], néhány kisebb módosítással, és HPLC-vel tisztítottuk [27, 78, 79].

A humán gyermekgyógyászati szilárd tumor mintákból elállított sejtmembrán preparátumokon a receptorkötési vizsgálatokat a korábban leírt radioligand kompetíciós assayk szerint végeztük [27, 78, 79]. Röviden összefoglalva, a humán gyermekgyógyászati mintákat felolvasztottuk, majd 50 mmol/l Tris-HCl pufferben (pH 7,4) homogenizáltuk Ultra-Turrax szövethomogenizátorral (IKA Works, Wilmington, NC, USA), és proteáz inhibitorok (0,25 mmol/l fenilmetil-szulfonilfluorid, 2 µg/ml pepsztatin A és 0,4% aprotinin) (Merck, Darmstadt, Germany)) hozzáadásával. A végső nyers membránfrakciókat a leírtak szerint készítettük [27, 78, 79] és -80 °C-on tároltuk az *in vitro* vizsgálatig. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerével határoztuk meg. A GHRH-R kötődési vizsgálatokat a korábban részletesen leírtak szerint végeztük, *in vitro* ligand-kompetíciós vizsgálatot alkalmazva, amelyek a [<sup>125</sup>I]JV-1-42 radioligandumként való

kötődésén alapultak a humán gyermekminták membránfrakcióihoz. A [<sup>125</sup>I]JV-1-42 jelölt GHRH antagonistá radioligandum korábbi tanulmányok szerint nagy affinitású kötődést mutatott a patkány és az emberi agyalapi mirigyhez, valamint az emberi vese-, méhnyálkahártya-, prosztatata, emlő - és egyéb daganatokhoz. [4, 27, 79, 80, 81, 82]. A radioaktívan jelölt JV-1-42 specifikus, nagy affinitású kötődését az SV1 receptorhoz korábban is kimutatták és közölték [5]. Röviden, a membrán homogenizátumokat [<sup>125</sup>I]JV-1-42 radioligandummal és növekvő koncentrációjú ( $10^{-12}$ - $10^{-6}$  mol/l) nem radioaktív kompetíciós peptidekkel (szomatosztatin, luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH), epidermális növekedési faktor (EGF), [Tyr<sup>4</sup>] bombesin és inzulinszerű növekedési faktor I (IGF-I)) inkubáltuk kötőpufferben, 300 µl össztérfogatú volt (50 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1% BSA és 30 µg/ml bacitracin, pH 7,4), a leírás szerint proteázgátlókkal kiegészítve. Egy órás inkubálás és elválasztás után a receptorhoz kötött frakciót tartalmazó végső pelletet γ-számlálóban megszámláltuk.

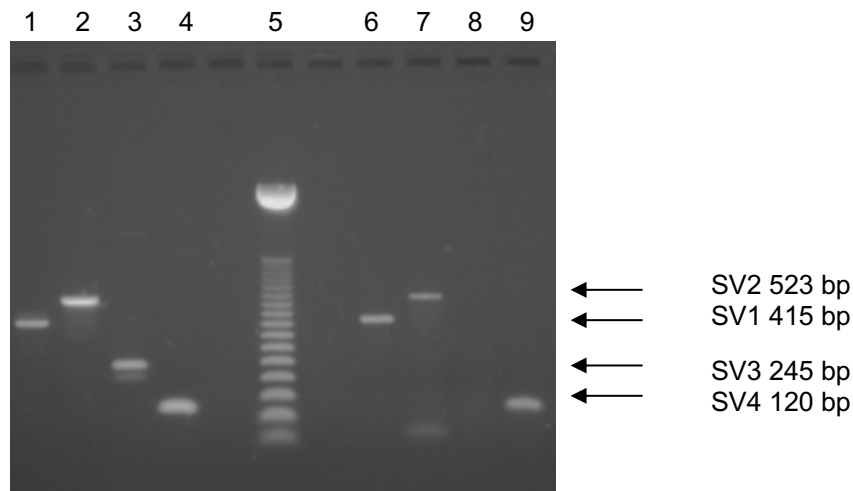
Munson és Rodbard görbeillesztő számítógépes programját (LIGAND-PC) használtuk a GHRH-k kötődési jellemzőinek ( $K_d$ =disszociációs állandó és  $B_{max}$  = receptorok maximális kötőképessége) kiszámításához. A nagyon kis mintaszám és a membránfrakciók korlátozott mennyisége miatt a GHRH ligandum kompetíciós vizsgálatát mindössze 7 mintában tudtuk elvégezni.

## **5. Eredmények**

### **5.1. Molekuláris biológiai vizsgálataink eredményei az EC mintákon**

#### **5.1.1. PCR, RT-PCR**

Új primereket terveztünk a GHRH-R és az SV1 PCR amplifikálására. A PCR-termékeket mindkét irányban szekvenáltuk, és megerősítettük a primerek specificitását. A GHRH-R esetében egy 121 bázispár hosszúságú terméket amplifikáltunk az 1. exonról a 2. exonra, amely csak a teljes hosszúságú receptor mRNS-ben van jelen, és nincs jelen a splice variánsokban. Ez a termék egyetlen EC tumormintában vagy normál endometrium szövetben sem volt kimutatható. Azonban, ahogy az várható volt, a teljes hosszúságú GHRH-R mRNS expresszióját mind az öt, pozitív kontrollként használt hypophysis mintában megtaláltuk (az adatokat gélfotók formájában itt nem mutatjuk be). Ennek megfelelően csak az ezekből a mintákból nyert GHRH-R PCR-terméket használtuk a szekvenációhoz. Az SV1 receptor variáns esetében a 415 bp hosszúságú PCR termékek (a 3. introntól = hiányzik a teljes hosszúságú receptorban; a 7. exonig = csak az SV1-ben és a teljes hosszúságú receptorban van jelen, a többi változatban nem) az endometrium tumormintákban azonosak voltak az agyalapi mirigy mintáival. Az SV2, SV3 és SV4 splice variánsok 523, 245 és 120 bp hosszú PCR termékek voltak [83,84]. A 8. ábra a splice variánsok reprezentatív RT-PCR analízisét mutatja.

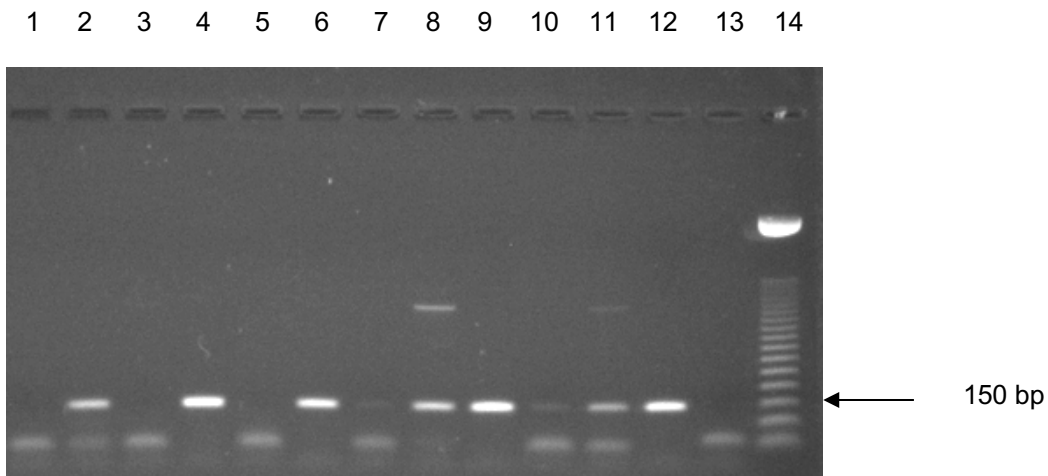


**8. Ábra.** *A GHRH-R splice variánsainak reprezentatív RT-PCR analízise*

A PCR-hez pozitív kontrollként humán hypophysis mintát használtunk: (1-4. sáv), a 29. számú beteg endometrium carcinoma mintája (6-9. sáv) és az 5. sáv, 50 bp DNS létra szerepel a gélfotón. A PCR termékek a várt méretűek voltak, az SV1 415 bp, SV2 523 bp, SV3 245 bp (csak az agyalapi mirigyben van jelen) és az SV4 120 bp hosszúak. A PCR-termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk el, és etidium-bromiddal festettük.

Pozitív kontrollként emberi agyalapi mirigy szöveteket vizsgáltunk, melyek mindegyikben mind a négy splice variáns és a teljes hosszúságú GHRH-R is expresszáldott.

A GHRH ligandot a 39 vizsgált daganatmintából huszonnégyben (61,5%) és a 7 normál endometrium mintából háromban (42,9%) kimutattuk. A GHRH mRNS expresszióját az öt vizsgált humán agyalapi mirigy szövetben is sikerült kimutatnunk (9. ábra).



**9. Ábra.** Az *mRNS* expressziójának reprezentatív RT-PCR analízise *GHRH* ligandumra  
 1-11. sáv: reprezentatív endometrium tumorszövetek, 12. sáv: pozitív kontroll (humán hypophysis), 13. sáv: templát nélküli kontroll és 14. sáv: 50 bp DNS-létra. A PCR termékek a várt 150 bázispár méretűek voltak. Alacsony vagy egyáltalán nem expresszálódó primer dimert is kimutattunk.

Az endometrium carcinomában szenvedő betegeknél az SV1 a leginkább funkcionális forma a lehetséges rákterápia szempontjából és kilenc EC mintában (23%) tudtuk kimutatni. (9. ábra, 6. táblázat). A második leggyakoribb variáns az SV4 volt, amelyet 39 rosszindulatú daganatból 8-ban (20,5%) mutattak ki. Az SV2 előfordulását csak három tumor mintában lehetett megfigyelni (7,7%), és az SV3 variáns expressziója nem volt jelen a tumormintákban (9. ábra, 5. táblázat). A teljes *GHRH-R* és a splice variánsok jelenléte egyik vizsgált nem tumoros endometrium szövetben sem volt kimutatható (5. táblázat).

**6.Táblázat.** *A teljes hosszúságú GHRH-R mRNS expressziója, splice variánsai és a GHRH ligandum 39 de novo humán endometrium carcinoma mintában és 7 normál humán endometrium szövetmintában.*

Gén	Pozitív /össz vizsgált minta (EC, tumor)	%
GHRH	24/39	61,5
pGHRH-R	0/39	0
SV1	9/39	23,0
SV2	3/39	7,7
SV3	0/39	0
SV4	8/39	20,5

Gén	Pozitív /össz vizsgált minta (normál endometrium)	%
GHRH	3/7	42,9
pGHRH-R	0/7	0
SV1	0/7	0
SV2	0/7	0
SV3	0/7	0
SV4	0/7	0

Összességében a 39 EC minta közül tizennégyben (35,9%) tudtuk kimutatni a GHRH-R-k splice variánsait (7.táblázat).

A GHRH ligandum mRNS és a GHRH-R splice variánsok együttes expresszióját a 39 beteg közül tizennégyben (35,9%) találtuk meg (6.táblázat).

Eredményeink azt mutatják, hogy minden GHRH-R splice variánsra pozitív minta expresszálta a GHRH ligandum mRNS-ét. A 39 EC minta közül 10 mutatott mRNS-expressziót a GHRH-ra, de nem a GHRH-R-k splice variánsaira. Öt esetben csak az SV1 vagy az SV4 expresszálódott a GHRH-R 4 splice variánsa közül. Egy esetben SV1 és SV2 vagy SV1 és SV4 koexpressziót, másik két esetben SV1, SV2 és SV4 koexpressziót figyeltünk meg. (7. táblázat).

**7.Táblázat.** *Klinikopatológiai jellemzők és GHRH ligand, GHRH-R illetve annak splice variánsainak mRNS expressziója endometrium carcinoma mintákon*

Sorszám	Életkor a	Szövettan*	Grade	Stádium	GHRH-R	GHRH	SV1	SV2	SV3	SV4
6.	52	E	2	I/b	-	+	+	+	-	-
8.	49	P-S	1	I/b	-	+	+	-	-	-
9.	65	E	2	I/a	-	+	-	-	-	+
12.	67	E	1	I/a	-	+	+	+	-	+
13.	76	E	1	I/b	-	+	-	-	-	+
14.	66	E	2	I/b	-	+	-	-	-	+
16.	67	P-S	1	I/b	-	+	+	-	-	+
20.	72	E	2	I/b	-	+	-	-	-	+
24.	53	P-S	1	II/b	-	+	+	-	-	-
29.	48	E	2	III/c	-	+	+	+	-	+
30.	43	P-S	3	III/c	-	+	-	-	-	+
32.	70	E	2	II/a	-	+	+	-	-	-
36.	63	E	2	III/c	-	+	+	-	-	-
37.	48	P-S	2	II/a	-	+	+	-	-	-

\* P-S: papillaris serous adenocarcinoma; E: endometrioid endometrium carcinoma

### 5.1.2. Radioligand kötési vizsgálatok eredményei EC mintákon

A GHRH-R-k jelenlétét és kötődési jellemzőit, valamint a radiojódozott GHRH analóg JV-1-42 specifikus kötődését humán EC-minták membrán homogenizátumaihoz radioreceptor assay segítségével határoztuk meg. A ligand-kompetíciós vizsgálatokkal vizsgált tizenegy tumormintából kilenc minta (81,8%) mutatott GHRH-kötést (8. táblázat).

**8. Táblázat.** Az SV1 mRNS expressziója és a GHRH-R kötési jellemzői 11 humán endometrium carcinoma mintában

Beteg sorszám	SV1 mRNS	Kd (nM)	Bmax (fmol/mg protein)
6	+	8,81	509,5
7	-	-	-
8	+	4,02	297,9
12	+	4,78	276,0
16	+	2,17	474,7
24	+	8,74	486,9
29	+	4,77	415,3
32	+	1,63	482,2
34	-	-	-
36	+	5,77	249,5
37	+	6,86	273,0

Vizsgáltuk a GHRH-R-k koncentrációját és kötődési affinitását EC membránokban is. A [<sup>125</sup>I]JV-1-42 kötési görbéinek és a specifikus kötődési adatok Scatchard-analízisének elemzése 9 receptor pozitív tumormintában azt mutatta, hogy a GHRH-R-k átlagos disszociációs állandója (Kd) 5,28 nM (tartomány: 1,63-8,81 nM). A GHRH-R-k átlagos koncentrációja (maximális kötési kapacitás, Bmax) 385,0 fmol/mg membránfehérje volt humán EC-ból származó membránokban (tartomány: 249,5-509,5 fmol/mg fehérje). Receptorkötési eredményeink alapján a one-site azaz egy-kötőhelyes modell biztosította a legjobb görbeillesztést, amely a nagy affinitású GHRH-R-k egyetlen homogén egy-kötőhelyes osztályát képviseli humán EC-mintákban. Meghatároztuk a specifikus kötőhelyek jellemzéséhez elengedhetetlen biokémiai specifikációkat és paramétereket is. Így kimutattuk, hogy a [<sup>125</sup>I]JV-1-42 *in vitro* receptorkötődése specifikus, reverzibilis, hőmérséklet- és időfüggő, és lineáris a fehérjekoncentrációkkal a vizsgált humán endometrium tumormintákban (az adatokat itt nem mutatjuk be). A radioaktívan jelölt JV-1-42 kötődését a hGHRH(1-44) vagy a hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> koncentrációjának (10<sup>-12</sup>-10<sup>-6</sup> M) növelése kiszorította a GHRH-R kötőhelyekről, miközben a szerkezetileg és funkcionálisan nem rokon peptidek, mint

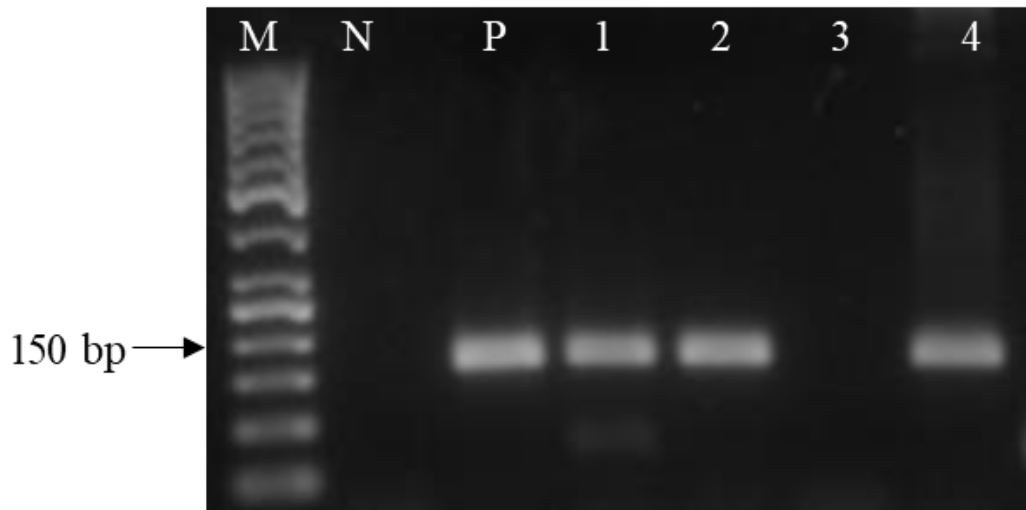
például a szomatosztatin, a luteinizáló hormon-felszabadító hormon (LHRH), az epidermális növekedési faktor (EGF), a [Tyr<sup>4</sup>] bombesin és az inzulinszerű növekedési faktor I (IGF-I) nem gátolták a radiojódosított JV-1-42 kötődését 1 µM koncentrációban sem (itt ezen adatokat sem mutatjuk be). Eredményeink azt is mutatják, hogy a ligandumkötést a GHRH-R-k SV1 altípusának mRNS expressziója kísérte minden vizsgált endometriumrák mintában. A radioreceptor vizsgálatok és az SV1 altípusú mRNS vizsgálatok eredményeinek összehasonlító elemzése kimutatta, hogy az SV1 altípus expressziója 100%-ban összhangban van a GHRH antagonistá [125I]JV-1-42 specifikus kötőhelyeinek jelenlétével (8. táblázat).

Vizsgálatunkban nem találtunk összefüggést a klinikopatológiai jellemzők és a receptorális eredmények között.

## **5.2. Molekuláris biológiai vizsgálataink eredményei a gyermek hemato-onkológiai mintákon**

### **5.2.1. A GHRH és a GHRH-R SV1 expressziójának RT-PCR vizsgálata**

Az RT-PCR analízisek kimutatták a GHRH peptid ligandumnak megfelelő 150 bp termék jelenlétét a vizsgált gyermekmintákban (10. ábra). A 15 vizsgált minta közül 11 gyermekekből származó minta (73%) mutatott mRNS expressziót GHRH-ra (9. táblázat). A CBN, HS, ITP és egy ALL mintán nem mutattunk ki GHRH expressziót (9. táblázat).



**10.ábra.** Gyermek hematoonkológiai minták GHRH mRNS expressziójának reprezentatív RT-PCR analízise

A PCR-termékek a GHRH ligand esetében a várt 150 bp méretűek voltak; M sáv, molekuláris marker (50 bp DNS-létra); N sáv, negatív templát kontroll; P sáv, pozitív kontroll (humán agyalapi mirigy szövet); 1. sáv: RMS, 2. sáv: ALL, 3. sáv: CBN, 4. sáv: HL

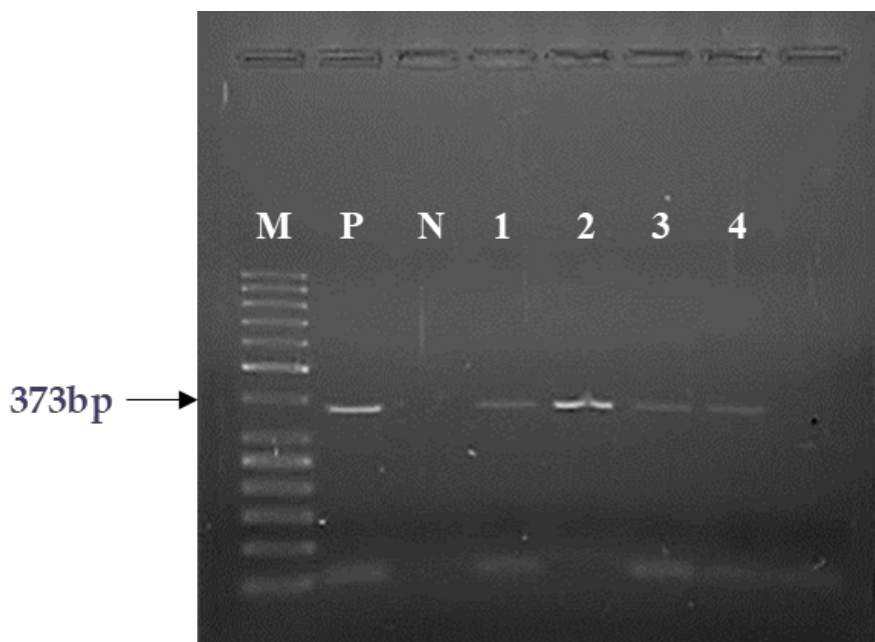
**9.Táblázat.** A GHRH és annak SV1 receptorának mRNS expressziója gyermekgyógyászati mintákon

Minta	Klinikai diagnózis	GHRH mRNS	SV1 mRNS
1	HL	+	+
2	RMS	+	+
3	RMS	+	+
4	TR/ adenocarcinoma komponenssel	+	+
5	ALL	+	+
6	ALL	+	+
7	ALL	+	+
8	ALL	-	-
9	ALL	+	+
10	BMH	+	+
11	FD	+	+
12	JM	+	+
13	CBN	-	-
14	HS	-	-
15	ITP	-	-

HL: Hodgkin lymphoma, RMS: rhabdomyosarcoma, TR: teratoma adenocarcinoma komponenssel, ALL: akut lymphoblastos leukemia, BMH: benignus mesenchymalis hamartoma, FD: fibrous dysplasia, JM: juvenilis myofibromatosis, CBN: chronicus benignus neutropenia, HS: hereditær spherocytosis, ITP: immun thrombocytopenia.

Annak vizsgálatára, hogy a humán gyermekgyógyászati hemato-onkológiai minták membránfrakcióiban jelenlévő receptorfehérje és specifikus, nagy affinitású GHRH kötőhelyek vajon a GHRH-R-k mRNS expressziójának termékei-e, RT-PCR vizsgálatot végeztünk. Az RNS reverz transzkripciója, majd PCR amplifikációja specifikus primerekkel amplifikált 373 bp-os PCR termékeket (11.ábra) adott, amely megfelelt a korábban leírt GHRH-R SV1-nek [26, 85].

A negatív kontrollok nem adtak kimutatható jelet, ami arra utal, hogy a PCR-termékek cDNS-ből, nem pedig genomiális DNS-ből vagy más szennyeződésekből keletkeztek. Hasonlóan a GHRH ligand mRNS expressziós eredményeihez a 15 vizsgált gyermekgyógyászati mintából 11 esetén (73%) tudtuk kimutatni az SV1 mRNS expresszióját. CBN, HS, ITP és mindössze egy ALL minta nem expresszálta az SV1 mRNS-ét (9.táblázat).

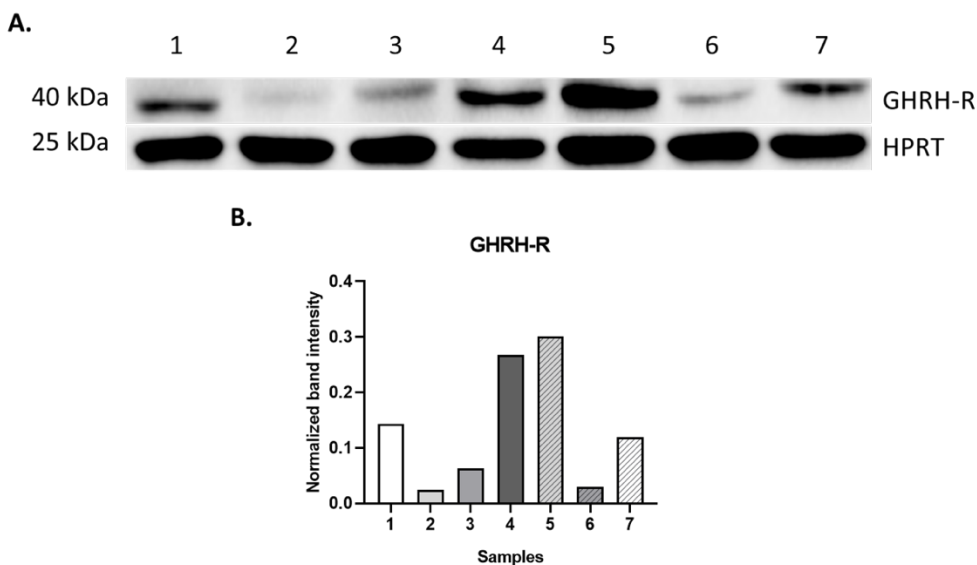


**11.ábra.** *Gyermek onkohematológiai minták GHRH-R SV1 mRNS-ének reprezentatív RT-PCR analízise*

A PCR-termékek a GHRH-R SV1-re meghatározott 373 bp méretűek voltak; M sáv, molekuláris marker (50 bp DNS-létra); P sáv, pozitív kontroll (humán agyalapi mirigy szövet); N sáv, negatív templát kontroll; 1.sáv: RMS, 2.sáv: TR, 3.sáv: HL, 4.sáv: FD.

### 5.2.2. Gyermekgyógyászati minták GHRH-R fehérje Western blot analízise

Western blot analízis alapján a GHRH-R fehérje mind a hét (7) vizsgált humán gyermekkori solid tumormintában expresszáldott (12. ábra, 10. táblázat). Western blot analíziseink során anti-GHRH-R antitesttel (GHRH-R poliklonális antitest: PA3-117, Life Technology) 40 kD molekulatömegű sávokat tudtunk kimutatni, amelyek a szakirodalom szerint megfelelnek a GHRH-R SV1-nek a vizsgált gyermekgyógyászati mintákban (12. ábra) [26, 85, 86]. A vizsgált minták egymástól eltérő erősségű receptorfehérje-expressziót mutattak.



**12.ábra.** *GHRH-receptor fehérje Western blot elemzése gyermekgyógyászati hematoonkológiai mintákon*

A molekula súly markernek a Precision Plus Dual Color Protein Standardot használtuk (Bio-Rad). Háztartási fehérjének HPRT- t (25 kDa) (hypoxanthin phosphoribosyl transferáz) alkalmaztunk, valamint a minták kvantifikálására, kiértékelésre a Bio-Rad Image Lab 5.2.1 software alkalmaztuk. A Western blot foltok denzitási eredményeinek (A) szemléletesebb bemutatására a fent említett software alkalmazásával készült oszlopdiagramok (B) szolgálnak.

Sávok: 1: HL, 2 és 3: RMS, 4: TR, 5: BMH, 6: FD, 7: JM

**10. Táblázat.** A GHRH ligand és a SV1 mRNS expressziója, valamint a GHRH-R fehérje jelenléte és kötődési jellemzői gyermekgyógyászati mintákban

Minta	Tumor típus	GHRH mRNS	SV1 mRNS	GHRH-R fehérje	GHRH-R kötés	
					Kd (nM)	Bmax (fmol/mg prot.)
1	Hodgkin lymphoma	+	+	+	1,37	398,7
2	Rhabdomyosarcoma	+	+	+	3.84	222,1
3	Rhabdomyosarcoma	+	+	+	4,38	245,0
4	Teratoma/adenoc. komponensesel	+	+	+	8.99	475,0
5	Akut lymphoblastos leukemia	+	+	N/A	N/A	
6	Akut lymphoblastos leukemia	+	+	N/A	N/A	
7	Akut lymphoblastos leukemia	+	+	N/A	N/A	
8	Akut lymphoblastos leukemia	-	-	N/A	N/A	
9	Akut lymphoblastos leukemia	+	+	N/A	N/A	
10	Beningnus mesenchymalis hamartoma	+	+	+	7,27	733,0
11	Fibrous dysplasia	+	+	+	4,81	261,4
12	Juvenilis myofibromatosis	+	+	+	1,35	294,6
13	Krónikus benignus neutropenia	-	-	N/A	N/A	
14	Hereditær spherocytosis	-	-	N/A	N/A	
15	Immun thrombocytopenia	-	-	N/A	N/A	

N/A: nem analizált

### 5.2.3. GHRH receptor kötési analízise gyermekgyógyászati mintákon

A specifikus GHRH-R kötőhelyek jelenlétét és a  $^{125}\text{I}$ -vel jelölt GHRH antagonistá JV-1-42 membránreceptorokhoz való kötődésének jellemzőit gyermekkori szolid tumormintákon ligand kompetíciós tesztekkel vizsgáltuk. 7 mintát tudtunk megvizsgálni, és eredményeink azt mutatták, hogy minden tanulmányozott minta, beleértve két jóindulatú daganatot és öt rosszindulatú daganatot specifikus GHRH-R kötődést mutatott (9. táblázat). A kizorítási vizsgálatok és a Scatchard-analízisek elemzése azt mutatta, hogy az egy-kötőhelyes modell biztosította a legjobb görbeillesztést, jelezve a nagy affinitású GHRH-R-k egyetlen homogén osztályának expresszióját humán gyermekminták sejtmembránjaiban. A GHRH-R kötődés számítógépes kiértékelése a hét gyermekgyógyászati mintában azt mutatta, hogy a GHRH-R-k átlagos disszociációs állandója ( $K_d$ ) 4,57 nM (tartomány: 1,35-8,99 nM) volt. A GHRH-R-k átlagos receptorkoncentrációja ( $B_{max}$ , maximális kötőképesség) 375,7 fmol/mg membránfehérje volt (tartomány: 222,1-733,0 fmol/mg membránfehérje) (9. táblázat). Radioreceptor vizsgálataink alapján a [ $^{125}\text{I}$ ]JV-1-42 GHRH antagonistá analóg kötődése specifikus, idő- és hőmérsékletfüggő és reverzibilis volt, ami alapvető biokémiai paramétereket és specifikációkat mutat be a receptorkötés azonosításához a vizsgált humán mintákban. A ligand-kompetíciós vizsgálatok eredményei jól korreláltak a Western blot eredménnyel, amely azt mutatja, hogy a GHRH-R fehérje jelenléte 100%-ban összhangban van, vagyis szoros korrelációban van a  $^{125}\text{I}$ -vel jelölt JV-1-42 GHRH analógot kötő specifikus kötőhelyek expressziójával (9. táblázat).

Nemcsak a GHRH-R-k SV1 altípusának az mRNS-ét azonosítottuk, hanem Western blot és ligandumkötési vizsgálattal a receptorfehérje is azonosításra került minden vizsgált gyermekmintában. A GHRH-R fehérje analízis és az SV1 altípusú mRNS vizsgálatok eredményeinek összehasonlító elemzése alapján hét mintát vizsgálva találtunk szoros

összefüggést. Ezek az eredmények azt mutatták, hogy az SV1 altípus expressziója 100%-ban konzisztens volt a Western-blottal vizsgált GHRH-R fehérjék jelenlétével és a GHRH antagonistá [125I]JV-1-42 specifikus kötődésével, amelyeket radioreceptor vizsgálatokkal vizsgáltunk.

## 6. Megbeszélés

Ahogy az korábban említésre került az elmúlt két évtizedben a GHRH és daganatokban expresszáldó receptorainak funkcióját, azok lehetséges szerepét és mintázatát már vizsgálták különböző humán tumoros megbetegedésekben (4, 5, 26, 87, 88).

A GHRH-R-k expresszióját mutató eredmények mellett számos tanulmány vizsgálta és bizonyította különböző kísérleti modelleken (11.táblázat), hogy számos GHRH antagonistá hatékony terápiás ágensként funkcionál.

**11.Táblázat.** *Experimentalis daganat modellek és rosszindulatú, neoplasticus hematológiai kórképek ahol a különböző GHRH antagonisták hatását vizsgálták*

Vizsgált modellek	
Emlő	Vese
Ovarium	Osteosarcoma
Endometrium	Ewing sarcoma
Prosztata	Glioblastoma
Tüdő	Oesophagus squamous cell carcinoma
Pancreas	Pleuralis mesothelioma
Colorectalis	Acut myeloid leukemia

Jelen munkánk két eddig kevésbé vagy egyáltalán nem tanulmányozott területre fókuszált, melyek a következők voltak: endometrium carcinoma illetve gyermekkori hemato-onkológiai betegségek.

## 6.1. Endometrium carcinoma mintákon kapott eredményeink megbeszélése

Az endometrium carcinoma világszerte a nők morbiditásának és halálozásának egyik jelentős oka, és a nők körében a hatodik leggyakoribb rosszindulatú daganat [33, 34]. A korai stádiumú EC prognózisa általában kedvező, de számos nőbetegben agresszív rosszindulatú daganat formájában fordulhat elő. Mivel ezen daganataik magas grádusúak, invazívak, vagy nem endometrioid sejtekből (clear-cell vagy papilláris serosus sejtekből) állnak, erős a kiújulás és a mortalitás kockázata. Az EC-s eseteket általában két altípusba sorolják. Bokhman publikációja alapján az EC két fő típusát különböztetjük meg: I. típusú és II. típusú [35]. Az I-es típusú endometrioid rákok ösztrogénfüggőek, és atípusos endometriális hyperplasiából erednek. Így az exogén és endogén ösztrogének feleslegének fontos szerepe van az I. típusú endometrium adenocarcinóma patogenezisében. A II-es típusú endometrioid rákok kevésbé gyakoriak, agresszívebb szövettani variánsokból állnak (clear-cell azaz „tisztá” sejtes és serosus carcinoma és méh adenocarcinosarcoma), általában posztmenopauzális korban fordulnak elő, és magas mortalitással járnak [36], továbbá nem mutatnak összefüggést a hosszan tartó ösztrogénexpozícióval. Másrészt az EC molekuláris biológiája világosabbá vált az elmúlt évtizedben, ami kevésbé morbid és minimálisan invazív sebészeti megközelítésekhez és a kemoterápia rutinszerűbb alkalmazásához vezetett, amelyek mind javították az EC-ban szenvedő nők eredményeit. Hatékonyabb kezelési módokra van szükség, amelyek tovább javítják a túlélést és az életminőséget. Folyamatban vannak az immunkontroll-gátlók („immune check-point inhibitors”) klinikai vizsgálatai előrehaladott és recidív endometriumrák kezelésére. Ha sikerül kapcsolatot találni a kezelt populáció genetikai hátterével és jó válaszarányt érünk el, új kezelési lehetőségeket lehet bevezetni a standard kezelési megközelítések helyett [37,38,39]. 2018 óta az FDA jóváhagyta az immun check-point inhibitor, a pembrolizumab (anti-PD-1, (programozott sejthalál fehérje-Ligand 1)) alkalmazását

minden olyan solid daganat esetén, ahol hibás a DNS mismatched repair. Az előrehaladott EC-ban szenvedő betegek körülbelül 20-30%-a részesül ezen kezelésben [40,41]. Számos tanulmány utalt arra, hogy a kemoterápia nemcsak az immunrendszert aktiválhatja, hanem PD-L1 expressziót is indukál a daganat sejteken, ami sikeresebb immunterápiát eredményezhet [37, 41]. A folyamatban lévő megfigyeléses vizsgálatok az immunterápiás (PD-L1 elleni monoklonális ellenanyagok: avelumab, atezolizumab és durvalumab) stratégiák hatását próbálják javítani a klasszikus kemoterápia kombinációjával vagy anélkül [41]. Más genomiai változások és molekuláris markerek az EC-ban, mint például a hormonreceptor-státusz, személyre szabottabb terápiát eredményezhetnek a jövőben. A célzott terápiákkal kapcsolatos preklinikai és klinikai vizsgálatok azt sugallják, hogy egyes szerek hatékonyak az EC kezelésében [37].

Széles körben elfogadott tény, hogy a GHRH autokrin/parakrin szabályozóként működik a rákos sejtek proliferációjában [88, 5]. A GHRH-R számos splice variánsát (SV-t) izolálták nemcsak az agyalapi mirigyből, hanem az extrapituiter szövetekből is, beleértve a humán daganatokat is [5, 78, 85, 88-91].

Rékási és munkatársai azt találták, hogy a fő splice variáns, az SV1 szekvenciája majdnem azonos a teljes hosszúságú (hypophysis típusú) GHRH-R szekvenciájával [27]. Az agyalapi mirigy típusú GHRH-R-rel szemben az első három exont a megtartott 3-as intron egy fragmense, darabja váltotta fel, amely egy új feltételezett kereten belüli startkodonnal rendelkezik az SV1-ben, ami csak a hypophysis típusú GHRH-R fehérje extracelluláris részének részleges elvesztését eredményezte [27]. A splice variánsok feltételezett fehérjeszerkezete alapján az SV1 tűnik a legvalószínűbb funkcionális receptornak. Ezenkívül kimutatták, hogy az SV1 nagy affinitással köti a GHRH-t és antagonistáit, és közvetíti a GHRH-ra adott válaszokat [27]. Jelen munkánkban RT-PCR segítségével kimutattuk, hogy a GHRH

és az SV mRNS-ei, de nem a hypophysis típusú GHRH-R-k, is expresszálódnak a humán EC szövetekben, ami egy autokrin/parakrin GHRH hurok létezésére utalhat.

Munkánk során azt találtuk, hogy az EC minták körülbelül egyharmada (35,9%) volt pozitív a GHRH-R egy vagy több splice variánsára (SV1-4), de a normál endometriumszövetek egyike sem és 23%-ban mutattuk ki az SV1 mRNS expresszióját. Egy korábbi tanulmányban az endometrium rákos szöveteinek 43%-a pozitívnak bizonyult az SV1 fehérje expressziójára immunhisztokémiával [92]. Ez az enyhe eltérés azzal magyarázható, hogy ebben a vizsgálatban az SV1 fehérje kimutatására használt antiszérumok az SV1 fehérje N-terminálisán lévő első 25 aminosavra specifikusak, amely az SV2 és SV4 altípusokban is jelen van.

Míg az SV1, SV2 és SV4 mRNS-ek méret alapján megkülönböztethetők, a Western blot és az immunhisztokémia alkalmazásával mindhárom GHRH-R fehérje izoforma pozitív jelet ad. Ezenkívül pozitív immunhisztokémiai jeleket csak az endometrium adenocarcinomák mirigyének hámsajtjeinek citoplazmájában mutattak ki, a sejt felszínén azonban nem. Azt találtuk, hogy szövetsorozatunk második leggyakrabban kifejezett splice variánsa az SV4 volt (20,5%). A fennmaradó két splice variáns; az SV2 jelenléte csak három mintában volt kimutatható, az SV3 azonban egyik mintában sem. Az SV3-ból és SV4-ből származó GHRH-R izoformák azt sugallják, hogy valószínűleg nem képviselnek érett receptorfehérjéket, amelyek a sejtfelszínen megnyilvánulnának. Az SV2, amely rendelkezik az SV1 csonkolt N-terminális extracelluláris doménjével, de csak két transzmembrán domént tartalmaz, a sejtfelszínre kerülhet [27].

Az agyalapi mirigy típusú GHRH-R mRNS-eit nem tudtuk kimutatni sem endometrium carcinómában, sem normál endometrium szövetekben. Korábbi vizsgálatokban a hypophysis típusú GHRH-R expresszióját valós idejű kvantitatív PCR-rel kimutatták különböző daganatos sejtvonalakban, beleértve a non-Hodgkin lymphomát, a hasnyálmirigyrákot, a glioblasztómát és a kissejtes tüdőcarcinómát, de az expresszió mértéke alacsony az extrapituiter normál

szövetekben [85]. Eredményeink egybevágóak azokkal a korábbi eredményekkel, amelyekben a klasszikus hypophysis típusú GHRH-R expressziója különböző humán tumorszöveteken nem volt kimutatható, vagy ritkábban volt jelen, mint az SV1 [90-94].

Tizenegy esetben tudunk membránfehérje frakciókat előállítani radio-diolidand kötési vizsgálatokhoz, hogy igazoljuk a specifikus GHRH kötőhelyek jelenlétét. Ligand-kompetíciós vizsgálatokkal kimutattuk a GHRH-ra specifikus, nagy affinitású receptorok jelenlétét. Molekuláris biológiai elemzések és radioligandumkötési vizsgálatok egyértelműen kimutatták, hogy a GHRH-R-k SV1 altípusának mRNS-expressziója 100%-ban összhangban van a radioaktívan jelölt JV-1-42 GHRH analóg specifikus receptorainak jelenlétével. Az agyalapi mirigy típusú GHRH-R-k mRNS-expresszióját azonban nem mutatták ki. Fontos megjegyezni azt is, hogy a ligand kompetíciós vizsgálattal vizsgált összes receptor-pozitív humán EC minta jól kimutatható mennyiségben expresszálta az SV1 típusú GHRH-R gént. Ezenkívül a GHRH ligandum PCR-termékeit a 39 humán EC minta közül 24-ben (61,5%) találtuk meg. 14 mintában (35,9%) mind a GHRH, mind a GHRH-R splice variánsok mRNS-ét kimutattuk. Míg a legvalószínűbb funkcionális receptor splice variáns, az SV1 a vizsgált EC-minták mindössze 23%-ában volt jelen, a GHRH ligandum a tumoros szövetek több mint 60%-ában és a normál endometrium szövetek 40%-ában volt kimutatható. Egy korábbi tanulmányban a GHRH mRNS kimutatható volt normál endometriumban és EC-ban; az endometrium GHRH mRNS-ében azonban nem mutattak ki változást az ugyanattól a betegtől származó normál és neoplasztikus szövetek között. A szintek azonban magasabbak voltak, mint a jóindulatú nőgyógyászati betegségekben szenvedő más betegek myometriumszöveteiben [95]. Ezért felmerült, hogy a GHRH elősegítheti az endometrium proliferációját, és részt vehet az EC és az endometriózis patogenezisében [95]. Egy másik tanulmányban, amely a GHRH és az SV1 jelenlétét vizsgálta különböző normál egérszövetekben, beleértve a méhnyálkahártyát is, a GHRH expressziót kimutatták, de ennek SV1 receptorát azonban nem. [96]. A szerzők azt feltételezték, hogy a

GHRH jelenléte ezekben a szövetekben nem véletlen, hanem fiziológiailag fontos, és összhangban lehet a neurohormonok parakrin/endokrin hatásával és a GHRH extrapituiter hatásaival, amelyeket nemcsak az SV1, hanem más receptor(ok) közvetít [96]. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a GHRH antagonisták, mint például az MZ-J-7-118, MZ-5-156 és JMR-132, gátolják a humán kísérleti EC-k növekedését mind in vitro, mind in vivo. [97-99]. Ezen antagonisták jótékony onkológiai hatásai a kísérleti rákkezelésben az agyalapi mirigy-máj IGF-I tengely szuppressziójának, valamint a GHRH antagonistáknak az agyalapi mirigy GHRH-R-hoz és/vagy tumorokon jelenlévő splice variánsaihoz való kötődése révén történő közvetlen gátlásának tulajdoníthatók [5, 100, 101]. Egy közelmúltbeli tanulmány egy olyan mechanizmust is bemutatott, amellyel a GHRH-R antagonisták, például a MIA-602 esetén az SV1-et célozzák meg, és gátolják az SV1 által közvetített tumornövekedését oesophagus squamosus cell carcinoma esetén [91]. Eredményeik arra utalnak, hogy az SV1 egy hypoxia által kiváltott onkogén promoter, amely a GHRH-R antagonisták potenciális célpontja lehet [91]. Mindazon eredmények alapján, hogy a GHRH antagonisták képesek voltak gátolni a kísérleti daganat modellek tumornövekedését és hogy a EC minták egy része expresszálta a GHRH-R-t a hatékony új GHRH antagonisták alkalmazása alkalmas lehet az ilyen típusú rosszindulatú daganatok kezelésében. Ennek a feltételezésnek az igazolására azonban további vizsgálatokra van szükség.

A jövőben szeretnénk kiterjeszteni vizsgálatainkat és megpróbálni még nagyobb számú humán EC-mintát gyűjteni, hogy tovább tanulmányozzuk és elemezzük a GHRH-R-k expresszióját az ilyen humán tumorszövetekben. Ezek a vizsgálatok új kvantitatív adatokat is szolgáltathatnak a GHRH-R-k és splice variánsaik mRNS- és fehérjeszintjéről. Ezekből az eredményekből feltehetően meg tudjuk jósolni a betegek potenciális válaszát a GHRH-R alapú terápiára.

## 6.2. Gyermekgyógyászati mintáinkon kapott eredményeink megbeszélése

A GHRH-ról és a GHRH-R-k splice variánsairól a gyermekkori rákos megbetegedések esetén nagyon korlátozottak a közzétett adatok. Jelen tanulmányunkban magának a GHRH valamint a GHRH-R-k mRNS-expresszióját és a GHRH-R-k SV-jeinek expresszióját vizsgáltuk RT-PCR-rel, a GHRH-R fehérje jelenlétét Western-blottal, valamint a GHRH-R SV1 kötési jellemzőit radioreceptor-vizsgálattal számos humán gyermekgyógyászati hematológiai és onkológiai betegségben, beleértve a Hodgkin lymphomát (HL), a rhabdomyosarcomát (RMS), a teratomát (TR), az akut lymphoblastos leukémiát (ALL), a fibrosus dysplasiát (FD), a mesenchymalis hamartómát (MH), az infantilis myofibromatosis (IM), a krónikus jóindulatú neutropeniát (CBN), a hereditær spherocytosis (HS) és az immunthrombocytopeniát (ITP).

A kísérleteinkben vizsgált 15 humán minta közül 11 gyermekgyógyászati mintán (73%) tudtuk kimutatni a GHRH mRNS expresszióját. Ez a 11 minta a GHRH-R SV1 mRNS-ét is expresszálta. A GHRH-R fehérjét két jóindulatú daganatmintában és öt rosszindulatú daganatban tudtuk igazolni Western blottal. A specifikus, nagy affinitású GHRH-R kötőhelyek jelenlétét mind a hét vizsgált humán gyermekgyógyászati solid tumormintában kimutattuk. A neoplastikus eltérésekből származó mintákkal szemben a nem neoplastikus eredetű mintákban lényegesen kisebb arányban volt kimutatható GHRH-R kifejeződés. A gyermekmintákon kapott eredményeink részben összhangban vannak Jimenez és munkatársai [103] közelmúltbeli publikációjával, akik kimutatták a GHRH-R jelenlétét 3 humán akut myeloid leukémia (AML) sejtvonalban (KG-1a, K-562 és THP-1), valamint 9 AML-ben szenvedő betegről származó mintában. A GHRH antagonistá MIA-602-vel végzett kezelést követően *in vitro* e sejtvonalak sejtproliferációjának jelentős gátlását találták. Ezenkívül a három humán AML-modell tumorxenograftját hordozó egerek MIA-602-vel történő kezelése hatékony tumornövekedésgátlást eredményezett [103]. Legjobb tudomásunk szerint ez az egyetlen publikáció a GHRH-

R expressziójáról és a GHRH-R jelátvitel lehetséges szerepéről egy hematológiai rendellenesség, az AML patofiziológiájában.

Eredményeink azt mutatják, hogy a GHRH és a GHRH SV1 gyakori előfordulása a gyermekek hematológiai és onkológiai rendellenességeiben alátámasztja a GHRH-R-k további vizsgálatának szükségességét, mint a diagnózis és a terápia lehetséges molekuláris célpontjait. Ezek az új eredmények potenciálisan újszerű terápiás megközelítést kínálhatnak ezekre a rosszindulatú daganatokra.

Esetükben a hatékony, újonnan szintetizált GHRH receptor antagonisták, mint lehetséges terápiás ágensek jöhetnek szóba, valamint jelen új eredményeink a GHRH-R jelátvitel lehetséges funkciójára utalhatnak különböző gyermekkori hematológiai és onkológiai rendellenességek patológiájában.

Legjobb tudomásunk szerint munkánk az első olyan kutatás, amely a GHRH és GHRH-R SV-k expresszióját vizsgálta különböző gyermekkori daganatokban és más neoplasztikus állapotokban.

Összességében elmondható, hogy eredményeink nemcsak a gyermekkorrákkutatás horizontját tágíthatják, hanem hozzájárulnak további célok eléréséhez, például az új, hatékony erős GHRH peptid analógok potenciális diagnosztikai és terápiás alkalmazásainak kifejlesztéséhez és létrehozásához a gyermekonkológiában és hematológiában.

Eredményeink megnyithatják az utat a GHRH-R alapú célzott daganatterápia új, rendkívül potens GHRH peptid analógjainak további fejlesztése előtt, amelyek a jelenlegi kezelési stratégiák érvényes alternatívájaként szolgálhatnak.

### **6.3. A disszertáció legfontosabb eredményeinek összegzése és konklúziója**

1. Kimutattuk, hogy a GHRH, valamint a GHRH-R SV-k mRNS-einek, de nem a hypophysis típusú GHRH-R mRNS-einek az expresszióját humán EC szövetekben, ami egy autokrin/parakrin GHRH hurok létezésére utalhat. Az endometrium carcinoma minták mintegy harmada expresszálja a GHRH receptor valamely variánsát, leggyakrabban a legnagyobb jelentőséggel bíró SV1 variánst.
2. Az EC minták egy részéből radioligand technikával mutatunk ki GHRH-ra specifikus, nagy affinitás receptorokat, valamint meghatároztuk a kötődésre jellemző paramétereket.
3. Munkánk az első olyan kutatás, amely a GHRH és GHRH-R SV-k expresszióját különböző gyermekkori daganatokban és más neoplasztikus állapotokban is vizsgálta klinikai minták felhasználásával.
4. A vizsgált gyermekonkológiai és hematológiai szövetminták 73%-ban expresszáltak GHRH-t és a GHRH-R SV1 variánsát. Eredményeink azt mutatják, hogy a GHRH és a GHRH-R SV1 előfordulása a gyermekek hematológiai és onkológiai rendellenességeiben gyakori.
5. A radioreceptor vizsgálatra alkalmas gyermek hematoonkológiai szövetminták egy részében szintén kimutathatók voltak a nagy affinitású és specifikus GHRH kötőhelyek.
6. Eredményeink összességében arra utalnak, hogy az SV1 feltehetően egy hypoxia által kiváltott onkogén promotor, amely a GHRH-R antagonisták potenciális célpontja lehet.

## Összefoglalás

A GHRH egy hypothalamicus neurohormon, mely neuroendokrin hatása mellett számos perifériás hatásban is szerepet játszik az autokrin/parakrin mechanizmusokon keresztül. Számos tanulmány számolt be arról, hogy a GHRH és analógjai szabályozzák a sejtproliferációt, a sejtülélést, a sebgyógyulást, a szívizom regenerációját, a szív működést, a diabéteszes retinopátiát, az 1-es típusú cukorbetegséget, az apoptózist és a differenciálódást számos szövetben és sejt típusban. Napjainkra a GHRH mRNS expresszióját és a biológiailag vagy immunológiailag aktív GHRH jelenlétét különböző humán daganatokban is kimutatták és vizsgálták a GHRH és GHRH-R-k expresszióját, azonban bizonyos daganatok és kórképek esetén köztük a humán endometrium és a gyermekkori hematológiai és onkológiai kórképek esetén nem állnak rendelkezésünkre ilyen eredmények, vagy csak limitált adatok érhetőek el. Így jelen kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a GHRH, GHRH-R-k expresszióját eddig még nem vizsgált daganat típusokon. Tanulmányozni kívántuk a fent említett kórképek klinikai mintáiban a GHRH és GHRH-R expresszióját mRNS szinten RT-PCR módszer alkalmazásával, és a GHRH-R-k fehérje szintű vizsgálatát Western-blot és ligand kompetíciós assay alkalmazásával. Elemeztük a korrelációt a receptorok expressziós mintázata és a vizsgált betegek klinikopatológiai jellemzői között.

Kimutattuk, hogy a GHRH, valamint a GHRH-R SV-k mRNS-einek, de nem a hypophysis típusú GHRH-R mRNS-einek az expresszióját humán EC szövetekben, ami egy autokrin/parakrin GHRH hurok létezésére utalhat. Az endometrium carcinoma minták mintegy harmada expresszálja a GHRH receptor valamely variánsát, leggyakrabban a legnagyobb jelentőséggel bíró SV1 variánst. Az EC minták egy részéből radioligand technikával mutatunk ki GHRH-ra specifikus, nagy affinitás receptorokat, valamint meghatároztuk a kötődésre jellemző paramétereket. Munkánk az első olyan kutatás, amely a GHRH és GHRH-R SV-k expresszióját különböző gyermekkori daganatokban és más neoplasztikus állapotokban is vizsgálta klinikai

minták felhasználásával. A vizsgált gyermekonkológiai és hematológiai szövetminták 73%-ban expresszáltak GHRH-t és a GHRH-R SV1 variánsát. Eredményeink azt mutatják, hogy a GHRH és a GHRH-R SV1 előfordulása a gyermekek hematológiai és onkológiai rendellenességeiben gyakori. A radioreceptor vizsgálatra alkalmas gyermek hematoonkológiai szövetminták egy részében szintén kimutathatók voltak a nagy affinitású és specifikus GHRH kötőhelyek.

Eredményeink nemcsak a gyermekrákkutatás horizontját tágíthatják, hanem hozzájárulnak további célok eléréséhez, például az új, hatékony erős GHRH peptid analógok potenciális diagnosztikai és terápiás alkalmazásainak kifejlesztéséhez és létrehozásához a gyermekonkológiában és hematológiában.

Kulcsszavak: GHRH, GHRH-Receptor, splice variáns (SV), humán endometrium carcinoma, gyermek hemato-onkológiai betegségek

## Summary

The presence of the mRNA of GHRH was detected in human prostate, breast, ovarian, endometrial, pancreatic and adrenal cancers and cancer cell lines derived from breast, endometrial, ovarian, prostatic, pancreatic, gastric, colorectal, lung and brain tissues, and bone sarcomas, lymphomas and renal-cell carcinomas. The hormonal activities of GHRH and its analogs are mediated by the pituitary type GHRH receptor (pGHRH-R) however splice variants (SVs) were also detected in various human tissues including cancers.

Although the expression of GHRH, GHRH-Rs and their SVs have previously been demonstrated in various human tumors and disorders to the best of our knowledge there is no, or only very limited, existing information about the presence and gene expression of GHRH and its receptors and binding characteristics of GHRH-R SVs in human endometrial cancer (EC) and pediatric hematological and oncological diseases, including various neoplastic conditions.

The aim of the present study was to investigate the expression of GHRH and its tumoral receptors and the presence of GHRH-R SVs in primary human EC samples and in corresponding benign endometrial tissues and in various pediatric hemato-oncological diseases. In our study the expression of mRNA for GHRH and GHRH-R SVs were investigated by RT-PCR. The presence of GHRH-R protein were also analyzed using Western blot and ligand competition assay. We also studied the correlation between the expression pattern of the receptors and the clinicopathological characteristics of the examined patients.

We demonstrated the expression of mRNA for GHRH and GHRH-R SVs, but the mRNA for the pituitary type of GHRH-R was not expressed in human EC tissues. This may indicate the existence of an autocrine/paracrine GHRH regulatory loop. 23 % of the endometrial carcinoma samples expressed mRNA for GHRH-R SV1. Specific, high-affinity GHRH-R were detected by radioligand assay in a cohort of EC samples and the binding characteristics of the GHRH

receptors were also determined. Based on our knowledge this is the first study demonstrating the expression of mRNA for GHRH and GHRH-R SV1 in various childhood tumors and other neoplastic conditions. Expression of mRNA for GHRH and GHRH-R SV1 was found in 73% of the pediatric hemato-oncology tissue samples examined. Our results show that the occurrence of GHRH and GHRH-R SV1 is frequent in malignant hemato-oncology disorders in children. GHRH-R protein and high-affinity, specific GHRH binding sites were also detected in pediatric hemato-oncology tissue samples examined by Western blot and radioreceptor assay. Overall, our results suggest that SV1 can function as a hypoxia-induced oncogenic promoter that can serve a potential therapeutic target for GHRH-R antagonists.

These new findings may offer a novel innovative therapeutic approach for these malignancies including EC and pediatric hematological and oncological disorders based on potent GHRH receptor antagonists and suggest a possible function of GHRH-R signaling in the pathology of various pediatric oncohematological and proliferative disorders and also in human endometrial cancer.

Key words: GHRH, GHRH-Receptor, splice variant (SV), human endometrial carcinoma, pediatric hemato-oncological diseases

## Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Kiss Congor** professzor úrnak, hogy már orvostanhallgató, majd kezdő orvos korom óta figyelemmel kísérte pályámat és támogatta nemcsak a mindennapi gyermekgyógyászként végzett, hanem a tudományos munkámat is. Köszönettel tartozom neki, azért, hogy a felmerülő problémákat sajátjaként kezelte, mindig rendelkezésemre állt, hasznos tanácsaival, értékes javaslataival támogatott.

Köszönettel tartozok mindazon gyermekendokrinologus, endokrinológus és gyermekgyógyász elődeimnek, tanítómestereimnek, akik megismertették velem az endokrinológia és a gyógyítás szépségét.

Köszönöm minden eddigi munkahelyi vezetőmnek, hogy lehetővé tette számomra a munkavégzést az általuk vezetett debreceni Gyermekgyógyászati Klinikán.

Hálásan köszönöm **Dr. Szabó Zsuzsannának**, hogy a molekuláris biológiai módszerek rejtelseibe, a kísérleti labormunkába bevezetett, és tanított, továbbá mindazt a segítséget melyet a publikációk elkészítésében tőle is kaptam.

Köszönet illeti **Dr. Harda Kristófot** és **Király Józsefet** a molekuláris biológiai vizsgálatok elsajátításában és elvégzésében nyújtott sok segítségükért.

Köszönöm minden társszerző munkáját, külön megtiszteltetés számomra, hogy az általam nagyrabecsült **Professzor Andrew V. Schally**<sup>†</sup> Nobel díjas kutatóval együttműködésben volt szerencsém dolgozni ezen tudományterületen, illetve a közlemények megírása kapcsán.

Köszönet illeti Barátaimat, akik e hosszú úton támogattak, hittek bennem, és mindvégig mellettem álltak.

Hálával tartozom családomnak támogatásukért, kitüntetően férjemnek soha véget nem érő türelméért és támogató szeretetéért, hogy bevezetett a tudományos kutatás világába, illetve hogy biztosítja a szerető, békés otthoni légkört számomra.

### **Köszönettel tartozunk pályázati támogatóinknak a munka anyagi támogatásáért:**

- OTKA K143021 (K.C.)
- Leukémiás gyermekekért alapítvány (K.C.)
- “GINOP-2.3.2-15-2016-0004” (H.G)
- TKP2021- EGA-20 (H.G.) Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program, Debreceni Egyetem Biotechnológiai tématerületi Programja

A projektek az Európai Unió támogatásával, a Magyar Állam és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósultak meg.

## Irodalomjegyzék

1. Alba, M., & Salvatori, R. (2004). A mouse with targeted ablation of the growth hormone-releasing hormone gene: a new model of isolated growth hormone deficiency. *Endocrinology*, 145(9), 4134–4143. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0119>
2. Maria M. Malagon, Rafael Vazquez-Martinez, Antonio J. Martinez-Fuentes, Francisco Gracia-Navarro and Justo P. Castaño (2013) GHRH, in Handbook of Biologically Active Peptides. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385095-9.00105-6> Chapter 105, Copyright © Elsevier Inc <https://www.sciencedirect.com/sdfe/pdf/download/eid/3-s2.0-B9780123850959001056/first-page-pdf>
3. Fridlyand, L. E., Tamarina, N. A., Schally, A. V., & Philipson, L. H. (2016). Growth Hormone-Releasing Hormone in Diabetes. *Frontiers in endocrinology*, 7, 129. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00129>
4. Schally, A. V., Comaru-Schally, A. M., Nagy, A., Kovacs, M., Szepeshazi, K., Plonowski, A., Varga, J. L., & Halmos, G. (2001). Hypothalamic hormones and cancer. *Frontiers in neuroendocrinology*, 22(4), 248–291. <https://doi.org/10.1006/frne.2001.0217>
5. Schally, A. V., Varga, J. L., & Engel, J. B. (2008). Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: an emerging new therapy for cancer. *Nature clinical practice. Endocrinology & metabolism*, 4(1), 33–43. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0677>
6. Schally, A. V., & Varga, J. L. (2006). Antagonists of growth hormone-releasing hormone in oncology. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 9(3), 163–170. <https://doi.org/10.2174/138620706776055449>
7. Barabutis, N., & Schally, A. V. (2010). Growth hormone-releasing hormone: extrapituitary effects in physiology and pathology. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(20), 4110–4116. <https://doi.org/10.4161/cc.9.20.13787>
8. Schally, A.V., & Halmos, G. (2012) Targeting to Peptide Receptors. In F. Kratz, P. Senter, H. Steinhagen (Eds.), *Drug Delivery in Oncology: From Basic Research to Cancer Therapy*. Wiley-VCH, Weinheim, 1219-1262, ISBN: 9783527328239 <https://doi.org/10.1002/9783527634057.ch38>
9. Frohman, L. A., & Szabo, M. (1981). Ectopic production of growth hormone-releasing factor by carcinoid and pancreatic islet tumors associated with acromegaly. *Progress in clinical and biological research*, 74, 259–271.
10. Guillemin, R., Brazeau, P., Böhlen, P., Esch, F., Ling, N., & Wehrenberg, W. B. (1982). Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science (New York, N.Y.)*, 218(4572), 585–587. <https://doi.org/10.1126/science.6812220>
11. Rivier, J., Spiess, J., Thorner, M., & Vale, W. (1982). Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature*, 300(5889), 276–278. <https://doi.org/10.1038/300276a0>
12. Schally, A.V., Comaru-Schally, A.M., (2003.) Hypothalamic and Other Peptide Hormones. In: Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., et al. (Eds.), *Holland-Frei Cancer Medicine*, 6th edition. BC Decker, Hamilton (ON). Chapter 61. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK14041/>.
13. Mayo K. E. (1992). Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 6(10), 1734–1744. <https://doi.org/10.1210/mend.6.10.1333056>
14. Lin-Su, K., & Wajnrach, M. P. (2002). Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) and the GHRH Receptor. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 3(4), 313–323. <https://doi.org/10.1023/a:1020949507265>
15. Frohman, L. A., Downs, T. R., Heimer, E. P., & Felix, A. M. (1989). Dipeptidylpeptidase IV and trypsin-like enzymatic degradation of human growth hormone-releasing hormone in plasma. *The Journal of clinical investigation*, 83(5), 1533–1540. <https://doi.org/10.1172/JCI114049>
16. Cai, R., Schally, A. V., Cui, T., Szalontay, L., Halmos, G., Sha, W., Kovacs, M., Jaszberenyi, M., He, J., Rick, F. G., Popovics, P., Kanashiro-Takeuchi, R., Hare, J. M., Block, N. L., & Zarandi, M. (2014). Synthesis of new potent agonistic analogs of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and evaluation of their endocrine and cardiac activities. *Peptides*, 52, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.12.010>

17. Kiaris, H., Chatzistamou, I., Papavassiliou, A. G., & Schally, A. V. (2011). Growth hormone-releasing hormone: not only a neurohormone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 22(8), 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.03.006>
18. Gesmundo, I., Miragoli, M., Carullo, P., Trovato, L., Larcher, V., Di Pasquale, E., Brancaccio, M., Mazzola, M., Villanova, T., Sorge, M., Taliano, M., Gallo, M. P., Alloatti, G., Penna, C., Hare, J. M., Ghigo, E., Schally, A. V., Condorelli, G., & Granata, R. (2017). Growth hormone-releasing hormone attenuates cardiac hypertrophy and improves heart function in pressure overload-induced heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(45), 12033–12038. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712612114>
19. Kanashiro-Takeuchi, R. M., Takeuchi, L. M., Rick, F. G., Dulce, R., Treuer, A. V., Florea, V., Rodrigues, C. O., Paulino, E. C., Hatzistergos, K. E., Selem, S. M., Gonzalez, D. R., Block, N. L., Schally, A. V., & Hare, J. M. (2012). Activation of growth hormone releasing hormone (GHRH) receptor stimulates cardiac reverse remodeling after myocardial infarction (MI). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(2), 559–563. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119203109>
20. Zhang, X., Cui, T., He, J., Wang, H., Cai, R., Popovics, P., Vidaurre, I., Sha, W., Schmid, J., Ludwig, B., Block, N. L., Bornstein, S. R., & Schally, A. V. (2015). Beneficial effects of growth hormone-releasing hormone agonists on rat INS-1 cells and on streptozotocin-induced NOD/SCID mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44), 13651–13656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518540112>
21. Mayo, K. E., Cerelli, G. M., Lebo, R. V., Bruce, B. D., Rosenfeld, M. G., & Evans, R. M. (1985). Gene encoding human growth hormone-releasing factor precursor: structure, sequence, and chromosomal assignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(1), 63–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.1.63>
22. Fridlyand, L. E., Tamarina, N. A., Schally, A. V., & Philipson, L. H. (2016). Growth Hormone-Releasing Hormone in Diabetes. *Frontiers in endocrinology*, 7, 129. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00129>
23. Lin-Su, K., & Wajnrajch, M. P. (2002). Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) and the GHRH Receptor. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 3(4), 313–323. <https://doi.org/10.1023/a:1020949507265>
24. Gaylinn, B., (2006.) Current research on the structure and function of the growth hormone releasing hormone receptor. *Journal of Korean Endocrine Society* 21, 173- 183.
25. Cui, T., Jimenez, J. J., Block, N. L., Badiavas, E. V., Rodriguez-Menocal, L., Vila Granda, A., Cai, R., Sha, W., Zarandi, M., Perez, R., & Schally, A. V. (2016). Agonistic analogs of growth hormone releasing hormone (GHRH) promote wound healing by stimulating the proliferation and survival of human dermal fibroblasts through ERK and AKT pathways. *Oncotarget*, 7(33), 52661–52672. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11024>
26. Halmos, G., Szabo, Z., Juhasz, E., & Schally, A. V. (2023). Signaling mechanism of growth hormone-releasing hormone receptor. *Vitamins and hormones*, 123, 1–26. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2023.06.004>
27. Rekasi, Z., Czompoly, T., Schally, A. V., & Halmos, G. (2000). Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10561–10566. <https://doi.org/10.1073/pnas.180313297>
28. Zarandi, M., Cai, R., Kovacs, M., Popovics, P., Szalontay, L., Cui, T., Sha, W., Jaszberenyi, M., Varga, J., Zhang, X., Block, N. L., Rick, F. G., Halmos, G., & Schally, A. V. (2017). Synthesis and structure-activity studies on novel analogs of human growth hormone releasing hormone (GHRH) with enhanced inhibitory activities on tumor growth. *Peptides*, 89, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.01.009>
29. Jaszberenyi, M., Rick, F. G., Szalontay, L., Block, N. L., Zarandi, M., Cai, R. Z., & Schally, A. V. (2012). Beneficial effects of novel antagonists of GHRH in different models of Alzheimer's disease. *Aging*, 4(11), 755–767. <https://doi.org/10.18632/aging.100504>
30. Romero, M. J., Lucas, R., Dou, H., Sridhar, S., Czikora, I., Mosieri, E. M., Rick, F. G., Block, N. L., Sridhar, S., Fulton, D., Weintraub, N. L., Bagi, Z., & Schally, A. V. (2016). Role of growth hormone-

- releasing hormone in dyslipidemia associated with experimental type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7), 1895–1900. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525520113>
31. Gesmundo, I., Miragoli, M., Carullo, P., Trovato, L., Larcher, V., Di Pasquale, E., Brancaccio, M., Mazzola, M., Villanova, T., Sorge, M., Taliano, M., Gallo, M. P., Alloatti, G., Penna, C., Hare, J. M., Ghigo, E., Schally, A. V., Condorelli, G., & Granata, R. (2017). Growth hormone-releasing hormone attenuates cardiac hypertrophy and improves heart function in pressure overload-induced heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(45), 12033–12038. <https://doi.org/10.1073/pnas.1712612114>
  32. Zhang, X., Cui, T., He, J., Wang, H., Cai, R., Popovics, P., Vidaurre, I., Sha, W., Schmid, J., Ludwig, B., Block, N. L., Bornstein, S. R., & Schally, A. V. (2015). Beneficial effects of growth hormone-releasing hormone agonists on rat INS-1 cells and on streptozotocin-induced NOD/SCID mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44), 13651–13656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518540112>
  33. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
  34. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
  35. Bokhman J. V. (1983). Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic oncology*, 15(1), 10–17. [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(83\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0090-8258(83)90111-7)
  36. Wright, J. D., Barrena Medel, N. I., Sehouli, J., Fujiwara, K., & Herzog, T. J. (2012). Contemporary management of endometrial cancer. *Lancet (London, England)*, 379(9823), 1352–1360. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60442-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60442-5)
  37. Arend, R. C., Jones, B. A., Martinez, A., & Goodfellow, P. (2018). Endometrial cancer: Molecular markers and management of advanced stage disease. *Gynecologic oncology*, 150(3), 569–580. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2018.05.015>
  38. Mitamura, T., Dong, P., Ihira, K., Kudo, M., & Watari, H. (2019). Molecular-targeted therapies and precision medicine for endometrial cancer. *Japanese journal of clinical oncology*, 49(2), 108–120. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy159>
  39. Aoki, Y., Kanao, H., Wang, X., Yunokawa, M., Omatsu, K., Fusegi, A., & Takeshima, N. (2020). Adjuvant treatment of endometrial cancer today. *Japanese journal of clinical oncology*, 50(7), 753–765. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyaa071>
  40. Lu, K. H., & Broaddus, R. R. (2020). Endometrial Cancer. *The New England journal of medicine*, 383(21), 2053–2064. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514010>
  41. Paleari, L., Pesce, S., Rutigliani, M., Greppi, M., Obino, V., Gorlero, F., Vellone, V. G., & Marcenaro, E. (2021). New Insights into Endometrial Cancer. *Cancers*, 13(7), 1496. <https://doi.org/10.3390/cancers13071496>
  42. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians*, 72(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
  43. Siegel, D. A., King, J. B., Lupo, P. J., Durbin, E. B., Tai, E., Mills, K., Van Dyne, E., Buchanan Lunsford, N., Henley, S. J., & Wilson, R. J. (2023). Counts, incidence rates, and trends of pediatric cancer in the United States, 2003-2019. *Journal of the National Cancer Institute*, 115(11), 1337–1354. <https://doi.org/10.1093/jnci/djad115>
  44. Agarwal S. (2023). Pediatric Cancers: Insights and Novel Therapeutic Approaches. *Cancers*, 15(14), 3537. <https://doi.org/10.3390/cancers15143537>
  45. Munir, F., Hardit, V., Sheikh, I. N., AlQahtani, S., He, J., Cuglievan, B., Hosing, C., Tewari, P., & Khazal, S. (2023). Classical Hodgkin Lymphoma: From Past to Future-A Comprehensive Review of Pathophysiology and Therapeutic Advances. *International journal of molecular sciences*, 24(12), 10095. <https://doi.org/10.3390/ijms241210095>
  46. Garami, M.; Schuler, D.; Jakab, Z. (2014). Importance of the National Childhood Cancer Registry in the field of paediatric oncology care in Hungary]. *Orvosi Hetilap* 155 (19), 732-739.

47. Ognjanovic, S., Linabery, A. M., Charbonneau, B., & Ross, J. A. (2009). Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer*, 115(18), 4218–4226. <https://doi.org/10.1002/cncr.24465>
48. Barksdale, E. M., Jr, & Obokhare, I. (2009). Teratomas in infants and children. *Current opinion in pediatrics*, 21(3), 344–349. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e32832b41ee>
49. Coppit, G. L., 3rd, Perkins, J. A., & Manning, S. C. (2000). Nasopharyngeal teratomas and dermoids: a review of the literature and case series. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 52(3), 219–227. [https://doi.org/10.1016/s0165-5876\(00\)00288-3](https://doi.org/10.1016/s0165-5876(00)00288-3)
50. Brown, P., Inaba, H., Annesley, C., Beck, J., Colace, S., Dallas, M., DeSantes, K., Kelly, K., Kitko, C., Lacayo, N., Larrier, N., Maese, L., Mahadeo, K., Nanda, R., Nardi, V., Rodriguez, V., Rossoff, J., Schuettpelz, L., Silverman, L., Sun, J., ... Ogburn, N. (2020). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2020, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*, 18(1), 81–112. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2020.0001>
51. Esparza, S. D., & Sakamoto, K. M. (2005). Topics in pediatric leukemia--acute lymphoblastic leukemia. *MedGenMed : Medscape general medicine*, 7(1), 23.
52. Bernt, K. M., & Hunger, S. P. (2014). Current concepts in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in oncology*, 4, 54. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00054>
53. Meyers R. L. (2007). Tumors of the liver in children. *Surgical oncology*, 16(3), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2007.07.002>
54. Isaacs H., Jr (2007). Fetal and neonatal hepatic tumors. *Journal of pediatric surgery*, 42(11), 1797–1803. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2007.07.047>
55. Edmondson H. A. (1956). Differential diagnosis of tumors and tumor-like lesions of liver in infancy and childhood. *A.M.A. journal of diseases of children*, 91(2), 168–186. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1956.02060020170015>
56. Siddiqui, M. A., & McKenna, B. J. (2006). Hepatic mesenchymal hamartoma: a short review. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 130(10), 1567–1569. <https://doi.org/10.5858/2006-130-1567-HMHASR>
57. Stringer, M. D., & Alizai, N. K. (2005). Mesenchymal hamartoma of the liver: a systematic review. *Journal of pediatric surgery*, 40(11), 1681–1690. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2005.07.052>
58. Liao, W., Zhang, B., Zhang, W., Chen, L., Zhang, W., Zhang, B., & Chen, X. (2017). A 4 and a half years old boy with mesenchymal hamartomas in the left lateral lobe of the liver: A case report and literature review. *Medicine*, 96(31), e7281. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000007281>
59. Khan, M. R., Binkovitz, L. A., Smyrk, T. C., Potter, D. D., Jr, & Furuya, K. N. (2019). Mesenchymal Hamartoma in Children: A Diagnostic Challenge. *Case reports in pediatrics*, 2019, 4132842. <https://doi.org/10.1155/2019/4132842>
60. Alam Wg, Cdr A, Chander Gp, Capt BN.(2003) Craniofacial fibrous dysplasia presenting with visual impairment. *MJAFI*. 59:342–343.
61. Yetiser, S., Gonul, E., Tosun, F., Tasar, M., & Hidir, Y. (2006). Monostotic craniofacial fibrous dysplasia: the Turkish experience. *The Journal of craniofacial surgery*, 17(1), 62–67. <https://doi.org/10.1097/01.scs.0000186459.29967.e7>
62. Feller, L., Wood, N. H., Khammissa, R. A., Lemmer, J., & Raubenheimer, E. J. (2009). The nature of fibrous dysplasia. *Head & face medicine*, 5, 22. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-5-22>
63. <https://radiopedia.org/articles/fibrosus-dysplasia>
64. Riminucci, M., Saggio, I., Robey, P. G., & Bianco, P. (2006). Fibrous dysplasia as a stem cell disease. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21 Suppl 2, P125–P131. <https://doi.org/10.1359/jbmr.06s224>
65. Riminucci, M., Kuznetsov, S. A., Cherman, N., Corsi, A., Bianco, P., & Gehron Robey, P. (2003). Osteoclastogenesis in fibrous dysplasia of bone: in situ and in vitro analysis of IL-6 expression. *Bone*, 33(3), 434–442. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(03\)00064-4](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(03)00064-4)
66. Stout AP. (1954). Juvenile fibromatoses. *Cancer*, 7(5), 953–978. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(195409\)7:5<953::aid-cncr2820070520>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0142(195409)7:5<953::aid-cncr2820070520>3.0.co;2-w).
67. Chung EB, Enzinger FM. Infantile myofibromatosis. *Cancer*. 1981 Oct 15;48(8):1807-18. doi: 10.1002/1097-0142(19811015)48:8<1807::aid-cncr2820480818>3.0.co;2-g. PMID: 7284977.

68. Wu, W., Chen, J., Cao, X., Yang, M., Zhu, J., & Zhao, G. (2013). Solitary infantile myofibromatosis in the bones of the upper extremities: Two rare cases and a review of the literature. *Oncology letters*, 6(5), 1406–1408. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1584>
69. Mashiah, J., Hadj-Rabia, S., Dompmartin, A., Harroche, A., Laloum-Grynberg, E., Wolter, M., Amoric, J. C., Hamel-Teillac, D., Guero, S., Fraitag, S., & Bodemer, C. (2014). Infantile myofibromatosis: a series of 28 cases. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 71(2), 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.03.035>
70. Letelier, C., Gunther, M., Alarcon, A., Vera, P., Kakarieka, E., & Pantoja, R. (2018). Aggressive pediatric myofibromatosis in a two-year-old child. *Journal of stomatology, oral and maxillofacial surgery*, 119(3), 216–219. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2017.11.018>
71. Wu, D., Wang, S., Oliveira, D. V., Del Gaudio, F., Vanlandewijck, M., Lebouvier, T., Betsholtz, C., Zhao, J., Jin, S., Lendahl, U., & Karlström, H. (2021). The infantile myofibromatosis NOTCH3 L1519P mutation leads to hyperactivated ligand-independent Notch signaling and increased PDGFRB expression. *Disease models & mechanisms*, 14(2), dmm046300. Advance online publication. <https://doi.org/10.1242/dmm.046300>
72. Larralde, M., Ferrari, B., Martinez, J. P., Barbieri, M. A. F., Méndez, J. H., & Casas, J. (2017). Infantile myofibromatosis. *Anais brasileiros de dermatologia*, 92(6), 854–857. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175001>
73. James, R. M., & Kinsey, S. E. (2006). The investigation and management of chronic neutropenia in children. *Archives of disease in childhood*, 91(10), 852–858. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.094706>
74. Dale D. C. (2017). How I manage children with neutropenia. *British journal of haematology*, 178(3), 351–363. <https://doi.org/10.1111/bjh.14677>
75. Terrell, D. R., Beebe, L. A., Vesely, S. K., Neas, B. R., Segal, J. B., & George, J. N. (2010). The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. *American journal of hematology*, 85(3), 174–180. <https://doi.org/10.1002/ajh.21616>
76. Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 132, 365–386. <https://doi.org/10.1385/1-59259-192-2:365>
77. Øvstebø, R., Haug, K. B., Lande, K., & Kierulf, P. (2003). PCR-based calibration curves for studies of quantitative gene expression in human monocytes: development and evaluation. *Clinical chemistry*, 49(3), 425–432. <https://doi.org/10.1373/49.3.425>
78. Halmos, G., Schally, A. V., Czompoly, T., Krupa, M., Varga, J. L., & Rekasi, Z. (2002). Expression of growth hormone-releasing hormone and its receptor splice variants in human prostate cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 87(10), 4707–4714. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020347>
79. Ranke, M. B., & Wit, J. M. (2018). Growth hormone - past, present and future. *Nature reviews. Endocrinology*, 14(5), 285–300. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.22>
80. Rekasi, Z., Varga, J. L., Schally, A. V., Halmos, G., Armatis, P., Groot, K., & Czompoly, T. (2000). Antagonists of growth hormone-releasing hormone and vasoactive intestinal peptide inhibit tumor proliferation by different mechanisms: evidence from in vitro studies on human prostatic and pancreatic cancers. *Endocrinology*, 141(6), 2120–2128. <https://doi.org/10.1210/endo.141.6.7511>
81. Kahán, Z., Varga, J. L., Schally, A. V., Rékási, Z., Armatis, P., Chatzistamou, L., Czömpöly, T., & Halmos, G. (2000). Antagonists of growth hormone-releasing hormone arrest the growth of MDA-MB-468 estrogen-independent human breast cancers in nude mice. *Breast cancer research and treatment*, 60(1), 71–79. <https://doi.org/10.1023/a:1006363230990>
82. Cong, Z., Zhou, F., Zhang, C., Zou, X., Zhang, H., Wang, Y., Zhou, Q., Cai, X., Liu, Q., Li, J., Shao, L., Mao, C., Wang, X., Wu, J., Xia, T., Zhao, L. H., Jiang, H., Zhang, Y., Xu, H. E., Cheng, X., ... Wang, M. W. (2021). Constitutive signal bias mediated by the human GHRHR splice variant 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(40), e2106606118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2106606118>
83. Szabo, Z., Juhasz, E., Schally, A. V., Dezso, B., Huga, S., Hernadi, Z., Halmos, G., & Kiss, C. (2022). Expression of Growth Hormone-Releasing Hormone and Its Receptor Splice Variants in Primary Human Endometrial Carcinomas: Novel Therapeutic Approaches. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(9), 2671. <https://doi.org/10.3390/molecules27092671>

84. Barabutis, N., Tsellou, E., Schally, A. V., Kouloheri, S., Kalofoutis, A., & Kiaris, H. (2007). Stimulation of proliferation of MCF-7 breast cancer cells by a transfected splice variant of growth hormone-releasing hormone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5575–5579. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700407104>
85. Havt, A., Schally, A. V., Halmos, G., Varga, J. L., Toller, G. L., Horvath, J. E., Szepeshazi, K., Köster, F., Kovitz, K., Groot, K., Zarandi, M., & Kanashiro, C. A. (2005). The expression of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its splice variants in normal and neoplastic human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48), 17424–17429. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506844102>
86. Dubovy, S. R., Fernandez, M. P., Echeagaray, J. J., Block, N. L., Unoki, N., Perez, R., Vidaurre, I., Lee, R. K., Nadji, M., & Schally, A. V. (2017). Expression of hypothalamic neurohormones and their receptors in the human eye. *Oncotarget*, 8(40), 66796–66814. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18358>
87. Vélez, E. J., & Unniappan, S. (2021). A Comparative Update on the Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone in Vertebrates. *Frontiers in endocrinology*, 11, 614981. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.614981>
88. Schally, A. V., Zhang, X., Cai, R., Hare, J. M., Granata, R., & Bartoli, M. (2019). Actions and Potential Therapeutic Applications of Growth Hormone-Releasing Hormone Agonists. *Endocrinology*, 160(7), 1600–1612. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00111>
89. Freddi, S., Arnaldi, G., Fazioli, F., Scarpelli, M., Appolloni, G., Mancini, T., Kola, B., Bertagna, X., Mantero, F., Collu, R., & Boscaro, M. (2005). Expression of growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants in human primary adrenocortical tumours. *Clinical endocrinology*, 62(5), 533–538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2005.02253.x>
90. Mezey, G., Treszl, A., Schally, A. V., Block, N. L., Vízkeleti, L., Juhász, A., Klekner, A., Nagy, J., Balázs, M., Halmos, G., & Bognár, L. (2014). Prognosis in human glioblastoma based on expression of ligand growth hormone-releasing hormone, pituitary-type growth hormone-releasing hormone receptor, its splicing variant receptors, EGF receptor and PTEN genes. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 140(10), 1641–1649. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1716-1>
91. Xiong, X., Ke, X., Wang, L., Yao, Z., Guo, Y., Zhang, X., Chen, Y., Pang, C. P., Schally, A. V., & Zhang, H. (2020). Splice variant of growth hormone-releasing hormone receptor drives esophageal squamous cell carcinoma conferring a therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(12), 6726–6732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913433117>
92. Chatzistamou, I., Schally, A. V., Pafiti, A., Kiaris, H., & Koutselini, H. (2002). Expression of growth hormone-releasing hormone in human primary endometrial carcinomas. *European journal of endocrinology*, 147(3), 381–386. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1470381>
93. Kiaris, H., Chatzistamou, I., Schally, A. V., Halmos, G., Varga, J. L., Koutselini, H., & Kalofoutis, A. (2003). Ligand-dependent and -independent effects of splice variant 1 of growth hormone-releasing hormone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), 9512–9517. <https://doi.org/10.1073/pnas.1533185100>
94. Köster, F., Engel, J. B., Schally, A. V., Hönig, A., Schröer, A., Seitz, S., Hohla, F., Ortmann, O., Diedrich, K., & Buchholz, S. (2009). Triple-negative breast cancers express receptors for growth hormone-releasing hormone (GHRH) and respond to GHRH antagonists with growth inhibition. *Breast cancer research and treatment*, 116(2), 273–279. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0120-4>
95. Khorram, O., Garthwaite, M., Grosen, E., & Golos, T. (2001). Human uterine and ovarian expression of growth hormone-releasing hormone messenger RNA in benign and malignant gynecologic conditions. *Fertility and sterility*, 75(1), 174–179. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01658-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01658-7)
96. Christodoulou, C., Schally, A. V., Chatzistamou, I., Kondi-Pafiti, A., Lammissou, K., Kouloheri, S., Kalofoutis, A., & Kiaris, H. (2006). Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variant of GHRH receptors in normal mouse tissues. *Regulatory peptides*, 136(1-3), 105–108. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2006.05.001>
97. Engel, J. B., Keller, G., Schally, A. V., Toller, G. L., Groot, K., Havt, A., Armatis, P., Zarandi, M., Varga, J. L., & Halmos, G. (2005). Inhibition of growth of experimental human endometrial cancer by an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(6), 3614–3621. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2179>

98. Zhao, L., Yano, T., Osuga, Y., Nakagawa, S., Oishi, H., Wada-Hiraike, O., Tang, X., Yano, N., Kugu, K., Schally, A. V., & Taketani, Y. (2008). Cellular mechanisms of growth inhibition of human endometrial cancer cell line by an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *International journal of oncology*, 32(3), 593–601.
99. Wu, H. M., Schally, A. V., Cheng, J. C., Zarandi, M., Varga, J., & Leung, P. C. (2010). Growth hormone-releasing hormone antagonist induces apoptosis of human endometrial cancer cells through PKC $\delta$ -mediated activation of p53/p21. *Cancer letters*, 298(1), 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.05.022>
100. Schally, A. V., Wang, H., He, J., Cai, R., Sha, W., Popovics, P., Perez, R., Vidaurre, I., & Zhang, X. (2018). Agonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) inhibit human experimental cancers in vivo by down-regulating receptors for GHRH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(47), 12028–12033. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813375115>
101. Kovács, M., Schally, A. V., Varga, J. L., & Zarándi, M. (2008). Endocrine and antineoplastic actions of growth hormone-releasing hormone antagonists. *Current medicinal chemistry*, 15(4), 314–321. <https://doi.org/10.2174/092986708783497355>
102. Vélez, E. J., & Unniappan, S. (2021). A Comparative Update on the Neuroendocrine Regulation of Growth Hormone in Vertebrates. *Frontiers in endocrinology*, 11, 614981. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.614981>
103. Jimenez, J. J., DelCanto, G. M., Popovics, P., Perez, A., Vila Granda, A., Vidaurre, I., Cai, R. Z., Rick, F. G., Swords, R. T., & Schally, A. V. (2018). A new approach to the treatment of acute myeloid leukaemia targeting the receptor for growth hormone-releasing hormone. *British journal of haematology*, 181(4), 476–485. <https://doi.org/10.1111/bjh.15207>



Nyilvántartási szám: DEENK/477/2024.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Juhász Éva

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Juhász, É.**, Szabó, Z., Schally, A. V., Király, J., Fodor, P., Kónya, G., Dezső, B., Szabó, E., Halmos, G., Kiss, C.: Expression of Growth Hormone-Releasing Hormone and Its Receptor Splice Variants in a Cohort of Hungarian Pediatric Patients with Hematological and Oncological Disorders: a Pilot Study.  
*Int. J. Mol. Sci.* 25 (16), 1-12, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25168831>  
IF: 4.9 (2023)
2. Szabó, Z., **Juhász, É.**, Schally, A. V., Dezső, B., Huga, S., Hernádi, Z., Halmos, G., Kiss, C.: Expression of Growth Hormone-Releasing Hormone and Its Receptor Splice Variants in Primary Human Endometrial Carcinomas: novel Therapeutic Approaches.  
*Molecules.* 27 (9), 1-13, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27092671>  
IF: 4.6

### További közlemények

3. Gomena, J., Modena, D., Cordella, P., Vári, B., Randelović, I., Borbély, A., Bottani, M., Vári-Mező, D., Halmos, G., **Juhász, É.**, Steinkühler, C., Tóvári, J., Mező, G.: In vitro and in vivo evaluation of Bombesin-MMAE conjugates for targeted tumour therapy.  
*Eur. J. Med. Chem.* 277, 1-13, 2024.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116767>  
IF: 6 (2023)
4. Szabó, I., Biri-Kovács, B., Vári, B., Randelović, I., Vári-Mező, D., **Juhász, É.**, Halmos, G., Bősze, S., Tóvári, J., Mező, G.: Targeting the Melanocortin 1 Receptor in Melanoma: biological Activity of alpha-MSH-Peptide Conjugates.  
*Int. J. Mol. Sci.* 25 (2), 1-21, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25021095>  
IF: 4.9 (2023)





5. Szegedi, K., Szabó, Z., Kállai, J., Király, J., Szabó, E., Bereczky, Z., **Juhász, É.**, Dezső, B., Szász, C., Zsebik, B., Flaskó, T., Halmos, G.: Potential Role of VHL, PTEN, and BAP1 Mutations in Renal Tumors.  
*J Clin Med.* 12 (13), 1-18, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12134538>  
IF: 3
6. Király, J., Szabó, E., Fodor, P., Fejes, Z., Nagy, B. J., **Juhász, É.**, Vass, A., Choudhury, M., Kónya, G., Halmos, G., Szabó, Z.: Shikonin Causes an Apoptotic Effect on Human Kidney Cancer Cells through Ras/MAPK and PI3K/AKT Pathways.  
*Molecules.* 28 (18), 1-22, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28186725>  
IF: 4.2
7. Halmos, G., Szabó, Z., **Juhász, É.**, Schally, A. V.: Signaling mechanism of growth hormone-releasing hormone receptor.  
In: *Hormone Receptors: Structures and Functions* / Gerald Litwack, Academic Press Inc Elsevier Science, San Diego, 1-26, 2023, (Vitamins and Hormones, ISSN 0083-6729 ; 123.)
8. Schuster, S., **Juhász, É.**, Halmos, G., Neundorf, I., Gennari, C., Mező, G.: Development and Biochemical Characterization of Self-Immolative Linker Containing GnRH-III-Drug Conjugates.  
*Int. J. Mol. Sci.* 23 (9), 1-18, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23095071>  
IF: 5.6
9. Harda, K. M., Szabó, Z., **Juhász, É.**, Dezső, B., Kiss, C., Schally, A. V., Halmos, G.: Expression of Somatostatin Receptor Subtypes (SSTR-1-SSTR-5) in Pediatric Hematological and Oncological Disorders.  
*Molecules.* 25 (23), 1-14, 2020.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25235775>  
IF: 4.411
10. Soltész, G., Kozári, A., Cvenitsné Árkus, Á., Stomfai, S., Erhardt, É., Rózsai, B., Bokor, S., **Magyar Gyermekdiabetes Epidemiológiai Munkacsoport**: A gyermekkori (0-14 év) 1-es típusú diabetes incidenciájának alakulása Magyarországon (2014-2018): 30 éves a Magyar Gyermekdiabetes Epidemiológiai Hálózat.  
*Diabetol. Hung.* 27 (4), 221-226, 2019.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.24121/dh.2019.17>
11. Halmos, G., Dobos, N., **Juhász, É.**, Szabó, Z., Schally, A. V.: Hypothalamic Releasing Hormones.  
In: *Hormonal signaling in biology and medicine : comprehensive modern endocrinology*. Ed.: by Gerald Litwack, Academic Press, London, 43-68, 2019.





12. Ilyés, I., Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**: Az inzulinrezisztencia gyermek- és serdülőkorban I.  
*Gyermekgyógyászat. 65 (4), 265-268, 2014.*
13. Ilyés, I., Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**: Az inzulinrezisztencia gyermek- és serdülőkorban II.  
*Gyermekgyógyászat. 65 (5), 339-342, 2014.*
14. Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**, Káposzta, R., Ilyés, I.: A gyermek- és serdülőkori elhízás  
következményei: a metabolikus szindróma és további következmények.  
*Gyermekgyógyászat. 63 (4), 157-162, 2012.*
15. Ilyés, I., **Juhász, É.**: Gyermekkori endokrin hypertoniák.  
*Gyermekgy. Továbbk. Szle. 16 (5), 203-206, 2011.*
16. **Juhász, É.**, Kondás, J., Ságodi, L., Fodor, B., Kiss-Tóth, E., Barkai, L.: Alacsony  
cardiorespiratoricus teljesítőképesség metabolikus szindrómás serdülőkben.  
*Diabetol. Hung. 18 (4), 303-309, 2010.*
17. Felszeghy, E. N., Káposzta, R., **Juhász, É.**, Kardos, L., Ilyés, I.: Alterations of carbohydrate and  
lipoprotein metabolism in childhood obesity: impact insulin resistance and acanthosis  
nigricans.  
*J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 22 (12), 1117-1126, 2009.*  
IF: 0.738
18. Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**, Káposzta, R., Ilyés, I.: A glükoreguláció zavarai gyermekkori  
elhízásban: összefüggés az inzulinrezisztenciával és a hyperinsulinaemiával.  
*Metabolizmus. 6 (4), 234-238, 2008.*
19. Felszeghy, E. N., **Juhász, É.**, Káposzta, R., Ilyés, I.: Alterations of glucoregulation in childhood  
obesity: association with insulin resistance and hyperinsulinemia.  
*J. Pediatr. Endocrinol. Metab. 21 (9), 847-853, 2008.*  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/JPEM.2008.21.9.847>  
IF: 0.938
20. **Juhász, É.**, Felszeghy, E. N., Ilyés, I.: A hashitoxicosisról gyermek- és serdülőkorban.  
*Gyermekgyógyászat. 57 (4), 489-492, 2006.*
21. **Juhász, É.**, Majnik, J., Felszeghy, E. N., Ilyés, I., Rácz, K.: PROP-1 mutáció következtében  
létrejött multiplex hypophysishormon-hiány.  
*Gyermekgyógyászat. 56 (5), 570-574, 2005.*





22. **Juhász, É.**, Felszeghy, E. N., Ilyés, I.: A szénhidrát-anyagcsere vizsgálata serdülőkorú elhízott gyermekekben.

*Diabetol. Hung.* 12 (4), 281-286, 2004.

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 39,287**

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

**9,5**

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

Debrecen, 2024.09.13.

