

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

Rózsa Bernadett

**Humán Luteinizáló hormon-releasing hormon receptor-I,
Luteinizáló hormon-releasing hormon receptor-I transzkript
variánsok és a Luteinizáló hormon-releasing hormon-I
expressziója humán benignus prosztata hiperpláziában**

Témavezető: Prof. Dr. Halmos Gábor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2010

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	1
A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke	5
Technikai megjegyzések	7
Köszönetnyilvánítás	8
Ábrák jegyzéke és magyarázata	10
Táblázatok jegyzéke	12
Összefoglalás (magyar)	13
Abstract (angol)	15
I. Bevezetés	17
II. Irodalmi áttekintés	19
1.1. A benignus prosztata hiperplázia (BPH)	19
1.1.1. A BPH definíciója, terminológiája	19
1.1.2. A BPH tünetei	19
1.1.3. A BPH epidemiológiája, prognosztikai faktorok	20
1.1.4. A BPH diagnosztikája	20
1.2. A BPH kezelése	21
1.2.1. A BPH nem sebészeti kezelése	21
1.2.1.1. Gondos követés (Watchfull waiting WW)	21
1.2.1.2. Fitoterapeutikumok	21
1.2.1.3. Gyógyszeres kezelés	22
1.2.2. A BPH sebészi kezelése	22
1.3. A Luteinizáló hormon – releasing hormon agonista és antagonistá analógok szerepe a BPH kezelésében	23
2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon (LHRH– I)	24
Kémiai szerkezete, szintézise (LHRH– I térbeli modellje. Az 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand és az 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor között kialakult komplex (az LHRH– I ligand és az LHRH– R– I között kialakult komplex) térbeli elrendeződése.	
Forrás: http://www.ncbi.nlm.nih.gov	

3. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R– I) (Ábra: ligandkötés, aktiváció)	29
3.1. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R– I) jelátviteli mechanizmusai	30
3.2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R– I) transzkript variánsai és izoformái	33
III. Célkitűzések	35
A. mRNS expressziós mérések reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval (RT–PCR-rel)	35
B. Fehérje expressziós mérések Immunohisztokémiával (IHC)	36
C. Az LHRH–R–I funkcióképességének vizsgálata humán BPH-ban Ligand kötési assay-vel (LBA)	37
IV. Módszerek	38
1. Mintagyűjtés	38
2. Alkalmazott módszerek	38
2.1. Homogenizálás és teljes RNS izolálás	38
2.2. Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT – PCR)	39
2.2.1. Reverz transzkripció ellenőrzése – a humán beta-aktin (bACT) mRNS expressziójának mérésével	39
2.2.2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) mRNS expressziójának mérése PCR-rel	40
2.2.2.1. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) gén 1. exonjára tervezett specifikus primerpárral mért LHRH–R–I mRNS expresszió mérése PCR-rel	42
2.2.2.2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) gén 2. és 3. exonjára tervezett specifikus primerpárral mért LHRH–R–I mRNS expresszió mérése PCR-rel	43
2.2.2.3. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) gén 1. és 2. exonjára kutatócsoportunk által tervezett primerpárral mért LHRH–R–I mRNS expresszió mérése PCR-rel	44

2.2.3. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon (LHRH–I) mRNS expressziójának mérése PCR-rel	46
2.3. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) expressziójának mérése Immunohisztokémiával (IHC)	46
2.4. Ligand kötési assay (LBA)	49
2.4.1. Kísérleti preparátumok – Membránpreparálás	49
2.4.2. Ligand kompetíciós vizsgálatok	49
2.4.3. A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorok ligand kötési tulajdonságainak vizsgálatai radioaktívan jódozott LHRH analóg ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) alkalmazásával direkt leszorítási vizsgálatok során	49
2.4.4. Matematikai analízis	50
V. Eredmények	52
1. A reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT – PCR) mRNS expressziós eredmények	52
1.1. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand (LHRH–I) mRNS expressziója humán hipofízisben és BPH-ban	52
1.2. Az 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) mRNS expresszió humán hipofízisben és BPH-ban	53
1.2.1. LHRH–R–I F1/R1 primerpárral mért mRNS expresszió humán hipofízisben és BPH-ban	53
1.2.2. LHRH–R–I F2/R3 primerpárral mért mRNS expresszió humán hipofízisben és BPH-ban	54
1.2.3. LHRH–R–I F1'/R2' saját tervezésű primerpárral mért mRNS expresszió humán hipofízisben és BPH-ban	54
2. Immunhisztokémiai eredmények	59
2.1. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) immunreakció kvalitatív értékelése humán hipofízisben	59
2.2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) immunreakció kvalitatív értékelése humán BPH szövetmintában	61
3. A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorok ligand kötési tulajdonságai radioaktívan jódozott LHRH analóg ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) alkalmazásával ligand kompetíciós assay során	62

VI. Diskusszió	67
VII. Következtetések	73
VIII. Irodalomjegyzék	74
Az értekezést megalapozó saját impakt faktorral rendelkező közlemények időrendben	82
Egyéb saját impakt faktorral rendelkező közlemények	
Angol nyelvű publikációk	
Egyéb saját impakt faktorral rendelkező közlemények	
A disszertáció témájához kapcsolódó, fel nem használt magyar nyelvű publikációk	
A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb magyar nyelvű publikációk	
A disszertáció témájához kapcsolódó konferenciák és posztterek	
A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb konferenciák és posztterek	
Tudományos paraméterek	

A dolgozatban használt rövidítések jegyzéke

aa: aminosav

AC: adenilát cikláz

APES: 3-amino-propil-treitoxi-szilán

bACT (actin – β): humán beta – aktin

Bmax: a receptor maximális ligandkötési kapacitása

β -ME: β – mercaptoetanol

BOO: Húgyhólyag kimeneti elzáródás (Benign outlet obstruction)

bp: bázispár

BPE: Jóindulatú prosztata megnagyobbodás (Benign prostatic enlargement)

BPH: Benignus prosztata hiperplázia (Benign prostatic hyperplasia)

BPO: Jóindulatú, prosztata által okozott elzáródás – BPE által okozott BOO (Benign prostatic obstruction)

BPS: Jóindulatú prosztata tünetegyüttes, megfelel a korábbi BPH megjelölésnek (Benign prostatic syndrome)

BSA: marha szérum albumin (Bovine serum albumin)

cAMP: ciklikus adenilát monofoszfát

– COOH: karboxi terminális

cpm: percenkénti beütésszám (counts per minute)

DAB: 3,3' – diaminobenzidin

DAG: diacil-glicerol

dATP: dezoxi – adenzin – trifoszfát

dCTP: dezoxi – citozin – trifoszfát

dGTP: dezoxi – guanozin – trifoszfát

dNTP: dezoxi – nukleotid – trifoszfát

dTTP: dezoxi – timidin – trifoszfát

EGF: epidermális növekedési faktor (Epidermal Growth Factor)

F: forward (sense) primer

FSH: Follikulusz stimuláló hormon

gDNS: genomi dezoxiribonukleinsav

GH-RH: növekedési hormon – releasing hormon (Growth Hormone – Releasing Hormone)

GnRH-I: Gonadotropin hormon – releasing hormon-I

GnRH-II: Gonadotropin hormon – releasing hormon-II

GPCR: G – protein kapcsolt receptor (G – protein coupled receptor)

G_s: stimulátorikus/stimuláló G – protein

G_i: inhibitorikus/gátló G-protein

HPLC: nagy teljesítményű folyadékkromatográfia (High performance/pressure liquid chromatography)

HRP: torma peroxidáz (horseradish peroxidáz)

IC₅₀: a receptoriális kötés 50%-os gátlásához szükséges ligand koncentráció

IGF-I: inzulinszerű növekedési faktor – I (Insulin like Growth Factor – I)

IHC: immunhisztokémia

IP₃: inozitol-trifoszfát

IPSS: Nemzetközi Prosztata Tünet Pontrendszer (International Prostate Symptom Score)

K_d: disszociációs konstans

LH: Luteinizáló hormon

LHRH-I: Luteinizáló hormon – releasing hormon – I

LHRH-II: Luteinizáló hormon – releasing hormon – II

LHRH-R-I: Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor – I

LUTS: alsó húgyuti traktus tünetei (Lower urinary tract symptoms)

mRNS: messenger ribonukleinsav

– NH₂: N – terminális

PIP₂: foszfatidil-4,5-biszfoszfát

PKC: protein kináz C

PLC – β: foszfolipáz C – β

Q_{max}: a vizelet maximális áramlási sebessége

R: reverse (antisense) primer

RT – PCR: reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció

se DHT: szérumszékélytesztoszteron

TM: transzmembrán domén

TRDV: transzrektális digitális vizsgálat

TURP: transzuretrális rezekció

UH: ultrahang

Technikai megjegyzések

A dolgozat megírásához az Orvosi helyesírási szótárat (Akadémia kiadó, 1992) és az Angol-Magyar Orvosi szótárat (ZAFIR PRESS 1. magyar kiadás, 2008) vettem alapul.

A gyakran előforduló, rendszeresen használt rövidítések megtalálhatóak a rövidítések jegyzékében.

Az első előfordulás szerint növekvő számozással kerültek jelzésre az irodalmi hivatkozások, így az irodalomjegyzék is előfordulás szerinti és nem alfabetikus sorrendben olvasható.

Times New Roman 12 pontos méretében írtam a szövegtörzset és az irodalomjegyzéket is.

Az értekezésben saját eredményeimet részletezem és a diszkusszió alapjául is ezek szolgálnak. A kollaborációs kísérletek eredményeit az Anyag és módszer részben és az Eredmények részben is megjelöltem.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Gyógyszerésztudományi Kar Biofarmácia Tanszék munkatársainak, kiemelten témavezetőmnek, Prof. Dr. Halmos Gábornak, hogy a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Doktori Iskolájának keretein belül lehetővé tette, motiválta és mindenben támogatta munkámat.

Külön köszönetet mondok Juhász Aliz, Dr. Treszl Andrea és Dr. Márka Marietta molekuláris biológusoknak, akik kiemelkedően fontos szerepet játszottak PhD munkám elindításában.

Megköszönöm Dr. Dezső Balázs egyetemi docensnek és Bessenyei Máriának a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Patológiai Intézet munkatársainak, hogy bevezettek az immunhisztokémiai kutatások világába és segítségemre voltak a szövettani metszetek elkészítésében valamint az immunhisztokémiai reakciók eredményeinek kiértékelésében.

Köszönetet mondok szerzőtársaimnak a Miami Egyetem (Florida, U.S.A.) és a Veterans Medical Center (Miami, Florida, U.S.A.) munkatársainak Andrew V. Schallynek, Mehrdad Nadjinak és Norman L. Blocknak a kollaborációs munkák során nyújtott segítségükért.

Köszönöm Dr. Tóth Györgynek és Dr. Flaskó Tibornak a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Urológiai Klinika munkatársainak a mintagyűjtésben való aktív részvételüket, illetve, hogy klinikus szemszögéből hasznos tanácsokkal láttak el. Az értekezésben szereplő betegek többségét ők operálták.

Köszönettel tartozom, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Kórélettani és Gerontológiai Intézet vezetőjének Prof. Dr. Koller Ákosnak és közvetlen kollégáimnak, hogy támogatták és segítették a doktori értekezésem megírását.

Köszönöm a Karolinska Intézet Mikrobiológiai, Tumor-, és Sejtbiológiai Tanszék professzorának Székely Lászlónak, hogy a stockholmi munkám ideje alatt támogatta a PhD védésemre történő felkészülést.

Ezúton szeretném megköszönni befektetett energiáját és rengeteg türelmét legjobb barátomnak, Kovács Mihálynak, technikai segítségei nélkül nem született volna meg ez az értekezés.

Ábrák jegyzéke és magyarázata

1.Ábra: Az LHRH agonista és az LHRH antagonisták hatása a szérumban a szérumban lévő LH, FSH, tesztoszteron, ösztrogén szintre).

2.Ábra: Az emlős LHRH-I ligand „hajlott” konformációjának sematikus ábrázolása.

3. Ábra: A humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand és a humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-I és LHRH-R-I) komplex térbeli modellje.

4. Ábra: A klinikai gyakorlatban/terápiában alkalmazott vagy fejlesztés alatt álló LHRH (GnRH) agonista és antagonisták analógok.

5. Ábra: A humán LHRH receptor-I kétdimenziós ábrázolása – jelölve a 7 transzmembrán doméneket, az extracelluláris és az intracelluláris loopokat.

6. Ábra: A humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) ligand kötés során aktivált G – protein vezérelt szignál transzdukciós útvonalai.

7. Ábra: A humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) transzkript variánsainak és izoformáinak sematikus ábrázolása.

8. Ábra: A humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) mRNS expressziójának méréséhez használt specifikus primerpárok szekvenciája.

9. Ábra: Az LHRH-R-I immunreakcióhoz használt kit működésének alapelve.

10. Ábra: A humán aktin – β (bACT) (1. panel) és az 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand (LHRH-I) (2. panel) specifikus primerpárokkal mért reprezentatív RT – PCR analízise humán hipofízisben és BPH-ban.

11. Ábra: A humán bACT (1. panel) és az LHRH-R-I F1/R1 (2. panel), LHRH-R-I F2/R3 (3. panel) és LHRH-R-I F1'/R2' (4. panel) specifikus primerpárokkal mért reprezentatív RT – PCR analízis humán hipofízisben és BPH-ban.

12. Ábra: A humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH – R–I) expressziója humán hipofízisben.

13. Ábra: Két reprezentáns humán BPH szövetmintában mért humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) expressziójának kvalitatív immunreakciója 20X nagyításban.

14. Ábra: A radioaktívan jelölt LHRH–I analóg ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6] - \text{LHRH}$), mint radioligand direkt leszorítási vizsgálata a BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorok kötési helyeiről.

Táblázatok jegyzéke

1. Táblázat: A humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) mRNS expressziójának mérésére használt PCR protokollok összefoglalója.

2. Táblázat: A vizsgált BPH szövetminták (n=35) klinikai adatai, a humán bACT, a három humán LHRH-R-I génre specifikus (LHRH-R-I F1/R1, LHRH-R-I F2/R3, LHRH-R-I F1'/R2') primerpárokkal mért LHRH-R-I és a humán LHRH-I ligand mRNS expressziója.

3. Táblázat: A humán hipofízisben három különböző primerpárral mért humán LHRH-R-I (LHRH-R-I F1/R1, LHRH-R-I F2/R3, LHRH-R-I F1'/R2'), LHRH-I és bACT mRNS expressziója.

4. Táblázat: A humán BPH-ban három különböző primerpárral mért humán LHRH-R-I (LHRH-R-I F1/R1, LHRH-R-I F2/R3, LHRH-R-I F1'/R2'), LHRH-I és bACT mRNS expressziója.

5. Táblázat: A vizsgált BPH szövetminták (n=20) klinikai adatainak, a humán bACT, az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral mért LHRH-R-I és az LHRH-I ligand mRNS expressziójának valamint a ligand kötési assay eredményeinek összefoglalása.

6. Táblázat: A vizsgált BPH minták (n=35+20; n=55) klinikai adatainak, az mRNS expresszió (humán bACT, LHRH-R-I F1/R1 primerpárral mért LHRH-R-I és LHRH-I) és a ligand kötési assay eredményeinek összefoglalása.

Összefoglalás

Az idősebb férfiak leggyakoribb urológiai betegsége a benignus prosztata hiperplázia (BPH). A BPH rizikó faktorai a prosztata volumen, az életkor és a PSA-szint. A BPH kialakulását elsősorban az életkor és a hormonális változások határozzák meg. Napjainkban a BPH hátterében álló molekuláris mechanizmusok tanulmányozása során előtérbe kerültek a különböző peptid hormonok és azok receptorainak expressziós vizsgálatai. Ezen peptid hormonok illetve receptoraik különböző mértékben expresszálódhatnak egyes benignus és malignus betegségek során, lehetőséget teremtve mindezzel a célzott daganatterápia megvalósítására (1-13). Az 1990-es években Eri LM és munkatársai (14) széleskörű tanulmányokat folytattak a BPH Luteinizáló hormon – releasing hormon (LHRH) agonista analógokkal történő kezelésében. Ezen tanulmányok azt mutatták, hogy a BPH LHRH agonistával történő kezelésének hatásaként, a tesztoszteron szint jelentősen (kasztrációs szintre) lecsökken az alsó húgyúti tünetek (LUTS) javulása azonban csekély mértékű. Az újabb kísérleti eredmények és szemlélet szerint az LHRH antagonistá analógok lehetnek a lehetséges új gyógyszer-molekulák a BPH illetve a prosztata karcinóma kezelésében.

Az eddigi kutatások alapján az LHRH receptorok (LHRH-R) humán daganatokban különböző splice variánsok formájában expresszálódhatnak. Humán szövetekben ezidáig teljes funkcionális receptorként csak az LHRH-R-I-et igazolták (hipofizeális LHRH-R-I), melynek 2 transzkript variánsáról számol be az irodalom. A LHRH-R-I jelenlétét több kutatócsoport is bizonyította már számos humán extrahipofizeális normál és daganatos szövetben, azonban az LHRH-R-I mRNS expressziójának mérésére használt primereket általában nem a teljes LHRH-R-I génre tervezték és receptorális fehérje vizsgálataikat a rendelkezésre álló, nem minden tekintetben specifikus antitestekkel végezték.

A Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Urológiai Klinikáján 2006-2008 között műtött 35 BPH és 3 pozitív kontrollként használt humán hipofízis szövetben mértük az LHRH-R-I, LHRH-R-I transzkript variánsok és a LHRH-I ligand mRNS expresszióját irodalomban már közölt és saját tervezésű primerpárokkal. Kollaborációs kísérleteink keretein belül további 20 BPH szövetmintában történt az LHRH-R-I és az LHRH-I ligand mRNS expressziójának vizsgálata. Továbbá LHRH-R-I fehérje expressziós vizsgálatokat végeztünk 10 formalinnal fixált paraffinba ágyazott benignus prosztata hiperpláziás szövetmintán és 2 pozitív kontrollként használt humán hipofízis mintán immunhisztokémiával a humán hipofizeális LHRH-R-I-re specifikus monoklonális antitest segítségével. Kollaborációs kísérletek során vizsgáltuk a 20 BPH szövetminta

membránfrakciójában az LHRH-receptorok funkcióképességét, valamint direkt leszorítási vizsgálatok során az LHRH antagonista analóg Cetorelix és az LHRH agonista analóg Buserelin alkalmazásával a BPH szövetminták membránfrakcióiban expresszáldó LHRH receptorok kötési affinitását és kapacitását.

A funkcióképes, teljes LHRH-R-I mRNS expressziója csak a pozitív kontrollként használt humán hipofízis mintákban volt kimutatható, a BPH szövetekben nem. Kutatócsoportunk feltételezése szerint a vizsgált 55 BPH mintából 5 mintában az irodalomban ezidáig nem közölt LHRH-R-I transzkript variáns expresszióját mértük. A BPH mintákban az LHRH-I ligand magas mRNS expressziója volt kimutatható, mely autokrin hatásmechanizmusra utalhat.

A pozitív kontrollként használt humán adenohipofízis acidofil sejtjeiben mért humán LHRH-R-I pozitív immunreakcióhoz képest a BPH sztrómasejtek alacsony, míg a BPH mirigyhámsejtek egyáltalán nem mutattak pozitivitást a humán hipofízeális LHRH-R-I fehérje expressziójára. Ezen immunhisztokémiai eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a BPH szövetmintákban nem a hipofízeális LHRH-R-I expresszáldik, hanem a receptor valamely izoformja.

A vizsgált 20 BPH szövetminta közül 18 minta membránfrakciójában sikerült kimutatni ligand kötési assay során az LHRH-receptorok jelenlétét és a direkt leszorítási vizsgálatok során az LHRH antagonista analóg Cetorelix és az LHRH agonista analóg Buserelin specifikusan és nagy affinitással szorította le a radioaktívan jelölt LHRH ligandot, mely arra utal, hogy a 18 ligand kötésre pozitív BPH minta membránfrakciójában erős ligandkötéssel rendelkező specifikus LHRH receptor vagy LHRH receptor izoform van jelen.

Eddigi eredményeink alapján feltételezzük, hogy az irodalomban közölt két LHRH-R-I splice variánson kívül más transzkript variánsok is expresszáldhatnak humán BPH szövetekben. Ennek igazolására további, a humán LHRH-R-I génre specifikus primerpárok tervezése szükséges, valamint elengedhetetlen ezen transzkript variánsok pontos nukleotid szekvenciájának meghatározása nukleotid szekvencia analízissel. A nukleotid szekvencia ismeretében az LHRH-R-I transzkript variánsokról történő transzláció is vizsgálható. A transzlálódó fehérje izoformok aminosavszekvenciájának ismeretében specifikus antitestek segítségével igazolható, hogy milyen mértékű a hipofízeális LHRH-R-I illetve, az LHRH receptor izoformáinak az expressziója humán BPH szövetben. További célkitűzéseink többek között a mért LHRH-R-I transzkript variánsokról történő transzláció mértékének meghatározása, valamint az LHRH-R-I izoformok funkcióképességének mérése ligand kötési assay-vel humán BPH szövetben.

Abstract

Benign prostatic hyperplasia (also known as BPH, nodular hyperplasia, and benign prostatic hypertrophy) is a very common condition affecting adult men. Primary risk factors for BPH include prostate volume and PSA values. The development of BPH is determined by aging and changing hormone levels. Nonetheless, the etiology of BPH is far from being completely understood, despite the great efforts made by molecular and clinical researchers. Most of the present research studies focused on the measurement of the expression of peptide hormones and peptide hormone receptors in BPH. These peptide hormones and peptide hormone receptors might be expressed on different levels in malignant and benign diseases to provide the opportunity for targeted therapy (1-13). Earlier, only the LHRH-R-I was isolated as a functional receptor in human tissues. In human malignant and benign tissues the LHRH receptors might be expressed in different transcript forms (12-13). Two splice variants of the LHRH-R-I (LHRH-R-I Sb1), termed Sb2 and Sb3 have been identified recently. The shorter transcript Sb3 contains a 220 bp deletion in exon 2, the other splice variant, Sb2 carries a shorter deletion of 128 bp. Expression of LHRH-R-I has been demonstrated in normal and malignant tissues by several groups. However, specific primers were not designed for the full length LHRH-R-I gene and the antibodies used were not specific enough.

Human BPH specimens from 35 patients were collected at the Department of Urology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary and 20 human BPH specimens were obtained from patients at Veterans Affairs Medical Center, New Orleans, LA and Department of Urology, Miami, FL, USA. Histopathological examinations of each specimen were undertaken to confirm the presence of BPH before the molecular biology studies. Three normal pituitary samples were collected at autopsy from the Department of Pathology, University of Debrecen and were used as positive controls.

The aim of our work was to investigate the mRNA expression for LHRH-R-I and its splice variants and mRNA for LHRH-I ligand in human BPH specimens. The investigation was carried out with previously published and self-designed primers. We also studied the protein expression of human LHRH-R-I in BPH tissues by immunohistochemistry. Human BPH specimens from 10 patients were collected at the Department of Urology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary. The characteristics of binding sites for LHRH on 20 samples were determined by ligand competition assays. We used Cetrorelix as an LHRH antagonist and Buserelin as an LHRH agonist in direct competition assays to investigate LHRH receptors in the membrane fractions of the BPH tissues and to determine the binding affinity

of the LHRH analogs as potential candidates for clinical therapy.

We detected LHRH-I and the transcripts of LHRH-R-I in human BPH specimens, but we were unable to amplify the full-length LHRH-R-I sequences in these BPH samples. Our negative results raise the possibility that LHRH-R-I gene may have more than two splice variants (uncharacterised transcript forms of the LHRH-R-I). PCR products for LHRH-I ligand were also detected in 18 of 35 BPH specimens.

In human pituitary tissue samples, used as a positive control, we were able to detect the LHRH-R-I with immunohistochemistry. The acidophil cells of adenohypophysis demonstrated strong LHRH-R-I specific immunolabelling. In BPH specimens we measured weak positive immunohistochemical reaction for LHRH-R-I. The stromal cells of benign prostatic hyperplasia tissue demonstrated weak LHRH-R-I specific immunolabelling, whereas immunopositivity was never seen in the endothelial cells of prostate gland. Eighteen of 20 samples showed a single class of high affinity binding sites for [D-Trp6] LHRH. LHRH antagonist Cetrorelix showed high affinity binding to LHRH receptors in BPH. Our findings support the merit of further investigation of the expression of LHRH-I and LHRH-R-I and their transcript forms in human benign prostatic hyperplasia. The results of our study demonstrate, for the first time, that human BPH specimens obtained from surgery express LHRH and its receptors.

Our findings support the merit of further investigation of the expression of LHRH-I and LHRH-R-I and their transcript forms in human benign prostatic hyperplasia. The results of our study demonstrate, for the first time, that human BPH specimens obtained from surgery express LHRH and its receptors. Our findings that a high percentage of human BPH specimens express receptors for LHRH support the view that LHRH antagonists could be used for an effective treatment of BPH. Since the LHRH receptors and mRNAs for receptor subtypes and transcript forms are variably expressed in BPH, a precise determination of LHRH receptors in samples of human BPH is necessary before therapy with LHRH analogs. Some BPH specimens may not have LHRH receptors and therefore would not respond to therapy with an antagonistic analog such as Cetrorelix. The response of individual patients with BPHs to LHRH analogs might be predicted by evaluating the LHRH receptors in their specimens. Thus, biopsy samples of BPH should be subjected to ligand competition assays for protein or RT-PCR analyses for mRNA expression of receptors for LHRH. A rational therapy with LHRH antagonistic analog could be then implemented.

I. Bevezetés

Az idősödő férfiak körében a benignus prosztata hiperplázia (BPH) a leggyakoribb urológiai megbetegedés. A 60 év körüli férfiak 60 %-ának vannak tünetei. Rizikó faktorok a prosztata volumen, az életkor és a PSA-szint.

Az elmúlt 15 évben a daganatos betegségek hátterében álló molekuláris mechanizmusok vizsgálatai során reflektorfénybe kerültek a különböző peptid hormonok és azok receptorainak expressziós vizsgálatai. Ezen peptid hormonok illetve receptoraik különböző mértékben expresszálódhatnak egyes daganatos betegségben, lehetőséget teremtve mindezzel egy esetleges célzott daganatterápia megvalósítására (1-13). 2006-ban Ph.D-hallgatóként csatlakoztam a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Gyógyszerésztudományi Kar Biofarmácia Tanszék munkacsoportjához, mely részben a Miami Egyetem (Florida, U.S.A.) és a Veterans Medical Center (Miami, Florida, U.S.A.) több intézetével, részben a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum számos klinikájával és Patológiai Intézetével együttműködve végez molekuláris biológiai, receptor farmakológiai és célzott terápiás kutatásokat, többek között urológiai daganatos betegségek hátterében álló molekuláris mechanizmusok pontosabb feltárása és megértése céljából.

Napjainkban számos kutatás folyik a benignus illetve malignus daganatos megbetegedések hátterében álló molekuláris mechanizmusok pontosabb megértése céljából, és az elmúlt 20 év molekuláris biológiai kutatásai igazolták, hogy a hipofízis gonadrotrop sejtjeinek hormon elválasztását szabályozó Luteinizáló hormon – releasing hormon–I (LHRH–I) vagy másnéven Gonadotropin hormon – releasing hormon–I (GnRH–I) befolyásolhatja a különböző daganatok működését. A LHRH agonista illetve antagonisták közvetlenül receptor-mediált módon is hathatnak a daganatos sejtekre, valamint „carrier”/szállító molekulaként felhasználva őket, szintén kifejthetik hatásukat és fontos szerepet játszhatnak a modern célzott terápiákban. A benignus és malignus betegségek hátterében lévő molekuláris mechanizmusok kutatásainak egyik központi kérdésévé vált ezen betegségek során megjelenő, normálistól eltérő fehérje expressziós tulajdonságok elemzése.

Dolgozatomban szeretném összefoglalni az 1 – típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon (LHRH–I), valamint receptora, az 1 – típusú Luteinizáló hormon –releasing hormon receptor–I (LHRH–R–I) BPH-ban és humán hipofízisben mért expressziós eredményeit. A disszertációm alapjául szolgáló molekuláris biológiai módszerek közül reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval (RT–PCR) igazoltam a vizsgált LHRH–I ligand és az

LHRH-R-I mRNS expresszióját és immunohisztokémia (IHC), valamint ligand kötési assay-vel (LBA) vizsgáltam az LHRH-R-I fehérje expresszióját és funkcióképességét.

Elsőként az LHRH-I és az LHRH-R-I mRNS szintű expressziós vizsgálatait végeztem el. Kutatócsoportunk azért döntött ennek a fehérjének a vizsgálata mellett, mert számos korábbi irodalmi adat igazolta már a LHRH-I expresszióját humán benignus és malignus szövetekben (1-11). Az LHRH-R-I extrahipofízeális expresszióját igazoló irodalmi adatok azonban limitáltak (12-13). Bár számos kutatócsoport vizsgálta napjainkig a humán LHRH-R-I mRNS expresszióját, az mRNS expressziós mérésekhez használt primereket általában nem a teljes LHRH-R-I génre tervezték, és receptoriális fehérje vizsgálataikat a rendelkezésre álló nem minden tekintetben specifikus antitestekkel végezték. A mRNS expressziós mérések során irodalomban közölt és saját tervezésű primerpárokkal is dolgoztunk. A humán LHRH-R-I fehérje expresszióját a hipofízeális LHRH-R-I-re specifikus monoklonális antitesttel mértünk. A humán LHRH-R-I funkcióképességét ligand kötési assay segítségével elemeztük.

A BPH szövetmintákban mért humán mRNS LHRH-R-I expressziós eredményeink alapján feltételezzük, hogy az irodalomban ezidáig közölt két LHRH-R-I transzkript variánson kívül más (LHRH-R-I) transzkript variáns(ok) is expresszáldhatnak humán BPH szövetekben. Az „új” LHRH-R-I transzkript variánsok igazolására a humán LHRH-R-I génre specifikus további primerpárok tervezése szükséges. Továbbá nélkülözhetetlen ezen transzkript variáns(ok) pontos nukleotid szekvenciájának meghatározása. Az LHRH-R-I transzkript variáns(ok) pontos nukleotid szekvenciájának ismeretében az LHRH-R-I transzkript variánsokról történő transláció mértéke is vizsgálhatóvá válna. A translálódó fehérje izoform(ok) aminosavszekvenciájának ismeretében specifikus antitestek segítségével igazolható, hogy milyen mértékű a hipofízeális LHRH-R-I, illetve a receptor izoformjának/izoformjainak expressziója humán BPH szövetben.

További célkitűzéseink többek között az LHRH-R-I transzkript variánsokról történő transláció mértékének meghatározása, valamint az LHRH-R-I izoform(ok) funkcióképességének mérése ligand kötési tanulmányok során humán BPH szövetben.

II. Irodalmi áttekintés

1.1.A benignus prosztata hiperplázia (BPH)

1.1.1. A BPH definíciója, terminológiája

Benignus prosztata hiperpláziának (BPH) vagy más néven jóindulatú prosztata-megnagyobbodásnak a prosztatát alkotó kötőszöveti, simaizom és mirigysejtek felszaporodását nevezzük. Hiperpláziának azt a folyamatot tekintjük, melynek során a sejtek száma gyarapszik. A kor előrehaladtával a sejtek felszaporodása arányosan nő.

A BPH kizárólag hisztológia diagnózist jelent, bár a gyakorlatban szélesebb értelemben használják. A betegek többsége az alsó húgyuti traktus tünetei (LUTS: Lower urinary tract symptoms) miatt fordul orvoshoz. A BPH-s betegek LUTS-sal és a következményes panaszokkal keresik fel orvosukat, melyeknek hatásai az életminőség romlásához vezethetnek. A 2009-es European Association of Urology (EAU) alapján készült tanulmány szerint az eddig BPH jelzett kórképet helyesebb lenne benignus prosztata szindrómának (BPS) nevezni annak érdekében, hogy ezzel a tünettannal (LUTS), a prosztata megnagyobbodással (BPE: Benign prostatic enlargement) és az obstrukcióval (BOO- Bladder outlet obstruction; BPO: Benign prostatic obstruction) közötti rendkívül változó patofiziológiai viszony kifejezhetővé váljon.

1.1.2. A BPH tünetei

A BPS tünetegyüttese irritatív és obstruktív komponenseket tartalmaz, amelyek különböző mértékben jelentkezhetnek. Az obstruktív tünetek kialakulásáért a megnagyobbodott prosztata a felelős. A megnagyobbodott prosztata mechanikusan szűkíti a prosztaticus húgycsőszakaszt, ezáltal subvesicalis obstrukciót, ún. statikus obstrukciót okoz. Az irritatív tünetekért, a hólyagnyak és a prosztata simaizom elemeinek tónusfokozódásából adódó dinamikus obstrukció a felelős. A kórélettani alapja az itt nagy számban elhelyezkedő α -1-receptorok adrenerg stimulációjára létrejövő, fokozott ingerlékenység. Több vizsgálat is igazolta, hogy a prosztata mérete (BPE), a hólyagnyaki obstrukció (BOO) és a tünetek (LUTS) között csak laza összefüggés áll fenn. Vannak olyan betegek, akiknek jelentős mértékű prosztata megnagyobbodása ellenére nincsenek, vagy

alig vannak tünetei, míg léteznek olyanok is, akiknek kifejezett dysuriás panaszai háttérben nem mutatható ki a prosztatata megnagyobbodása.

1.1.3. A BPH epidemiológiája, prognosztikai faktorok

Az érintettek számát tekintve a BPH-t népbetegségnek kell tekinteni. Etiológiája multifaktoriális, a betegség kialakulását elsősorban az életkor és hormonális változások határozzák meg. Rasszok tekintetében a BPS – BPH elsősorban az európai és a fehér amerikai férfiakat érinti, ázsiaiaknál és fekete bőrűeknél az előfordulás ritkább. BPH epidemiológiai tanulmányok alapján elmondható, hogy a tünetekben érintettek száma az életkor előrehaladtával évtizedenként megduplázódik (15). A jelenlegi irodalmi adatok, klinikai tapasztalatok, valamint a betegség okozta komplikációk alapján a BPH-t progresszív betegségként értelmezik. A kockázatelemző és longitudinális tanulmányok (Olmsted Country, PLESS) alapján a legfontosabb rizikófaktorok az életkor, a PSA-szint és a prosztatata volumene. Ezen tényezők alapján meghatározható a fokozottabb kockázatot viselő betegek köre.

1.1.4. A BPH diagnosztikája

A prosztatata tapintása fizikális vizsgálat során transzrektális digitális vizsgálattal (TRDV) történik. A TRDV vizsgálat során a prosztatata nagyságát, felszínét, a két lebeny szimmetriáját, konzisztenciáját és érzékenységet vizsgálják. A prosztatata térfogatának meghatározása lényegesen pontosabb hasi ultrahang (UH) vizsgálat során. A legmegbízhatóbb eredményt transzrektális UH vizsgálattal kaphatunk. Bár a prosztatata mérete nincs egyenes arányban a tünetekkel, de a konzervatív kezelés nyomon követésére, és amennyiben szükséges, a műtéti típus megválasztásához elengedhetetlen a pontos ismerete. A vizelet retentio mérése, amely a hólyagban vizelet után maradó vizelet mennyiségének meghatározását jelenti suprapubicus UH vizsgálattal történik. A tünetek súlyosságát, életminőséget rontó hatását egy kérdőív segítségével határozzák meg. A Nemzetközi Prosztata Tünet Pontrendszer (IPSS: International Prostate Symptom Score) magyar fordításának kitöltése jó megközelítéssel ad választ erre a kérdésre. (Mind Európában, mind az Egyesült Államokban a legelterjedtebben elfogadott és használt táblázat). A diagnózis felállításának következő lépése egy egyszerű urodinamikai vizsgálat a vizelet áramlásának mérése, az

uroflowmetria, melynek során a maximális áramlási sebességet (Q_{max}) és az átlagos áramlást határozzák meg (uroflow görbe).

A fenti vizsgálatok kezelést ellenőrző viziteken történő elvégzése jó képet adhat a betegség tüneteinek javulásáról, vagy az esetleges súlyosbodásáról. Miután a fenti panaszokkal jelentkező betegek életkora általában ötven év felett van, az évenkénti PSA vérvizsgálat, a prosztatatarák szűrése szempontjából szintén ajánlott. A 80-as évek végén Stamey és munkatársai igazolták (16), hogy a prosztata volumene és a szérum PSA-értékek korrelálnak egymással, ezért a vérvételt a TRDV előtt kell elvégezni az álpozitív értékek elkerülése céljából.

1.2. A BPH kezelése

1.2.1. A BPH nem sebészeti kezelése

1.2.1.1. Gondos követés (Watchfull waiting: WW)

A BPH során alkalmazott terápiát a beteg panaszai határozzák meg. A BPH kezelésének célja az alsó húgyúti tünetek csökkentése, az életminőség javítása, valamint a BPE vagy BPO okozta szövődmények kialakulásának megelőzése. Helyes indikáció esetén a gondos követés (Watchfull waiting-WW) hatékony módszer. Vizsgálati adatok bizonyítják, hogy a betegek 85 %-a a WW első évében progresszió mentes, valamint a betegek 65 %-a 5 év távlatban is megőrizte stabilitását (17-18).

1.1.2.2. Fitoterapeutikumok

Kezdeti, mérsékelt fokú klinikai panaszok mellett a BPH növényi kivonatokkal történő kezelése is ismert. A fűrészpálma (*Sabal serrulata*, *Serona repens*) gyümölcsének kivonata antiflogesztikus és antikongesszív szöveti hatásával és 5α reduktáz aktivitás csökkentésével fejti ki terápiás hatását. A csalángyökér (*Urtica radix*) kivonat a fehérjéhez kötött tesztoszteron csökkentésével, a tökmagkivonat (*Cucurbita semen*) a dihidro-tesztoszteron receptor kötődés gátlásával csökkenti a beteg panaszait. A rozspollen (*Secale cereale*) antiflogisztikus és antikongesztív, a lilium növény (*Hypoxidace*) a prosztaglandin szintézis gátlás útján kialakuló antiflogisztikus aktivitásán keresztül fejti ki hatását.

A növényi kivonatok hatékonyságának bizonyítása nem minden szer esetében egyértelmű, a pontos hatásmechanizmusuk nem tisztázott - emiatt további randomizált, placebokontrollált vizsgálatok elvégzésére lenne szükség (19).

1.1.2.3. Gyógyszeres kezelés

Az α -blokkoló gyógyszerkészítmények (*prazosin, doxazosin, alfuzosin, terazosin, tamzulosin*) a prosztataállomány simaizomzatában és a hólyagnyakon elhelyezkedő α -1 adrenoreceptorok közvetlen blokkolása útján fejtik ki hatásukat. A terápiás gyógyszerhatás eredményeként a tünetek gyorsan csökkennek, az uroflowmetriás paraméterek javulnak. Az α -1 receptor blokkolókat a közepesen súlyos és a súlyos alsó húgyúti tünetektől szenvedő betegek elsőként választandó gyógyszeres kezelésének ajánlják.

Az 5α reduktáz inhibitorok (*finaszterid, dutaszterid*) az 5α reduktáz enzim működésének gátlásával megakadályozzák a tesztoszteron – dehidrotesztoszteron átalakulást, így csökken a szérumban a dihidrotesztoszteron (se DHT) szintje. A prosztata növekedésében közvetlenül aktív szerepet játszó DHT tartós depléciója által a BPH visszafejlődik, a prosztata térfogata csökken, a vizeletáramlás szabaddá válik. A gyógyszer tartós alkalmazásával bizonyos esetekben a teljes vizeletelzáródás megszüntethető.

A dutaszterid a finaszteriddel ellentétben az 5α reduktáz enzim mindkét izoenzimjének szuppressziójára képes, ezáltal a se DHT szint 90 %-os csökkenését okozza (20).

A dutaszteriddel kapcsolatban lefolytatott tanulmányok alapján elmondható, hogy a dutaszterid jól tolerálható készítmény, az észlelt hatékonyság, mellékhatások és tolerálhatóság tekintetében a finaszteriddel megegyező képet mutat, azonban e tekintetben további randomizált összehasonlító tanulmányok elvégzése szükséges (21-22).

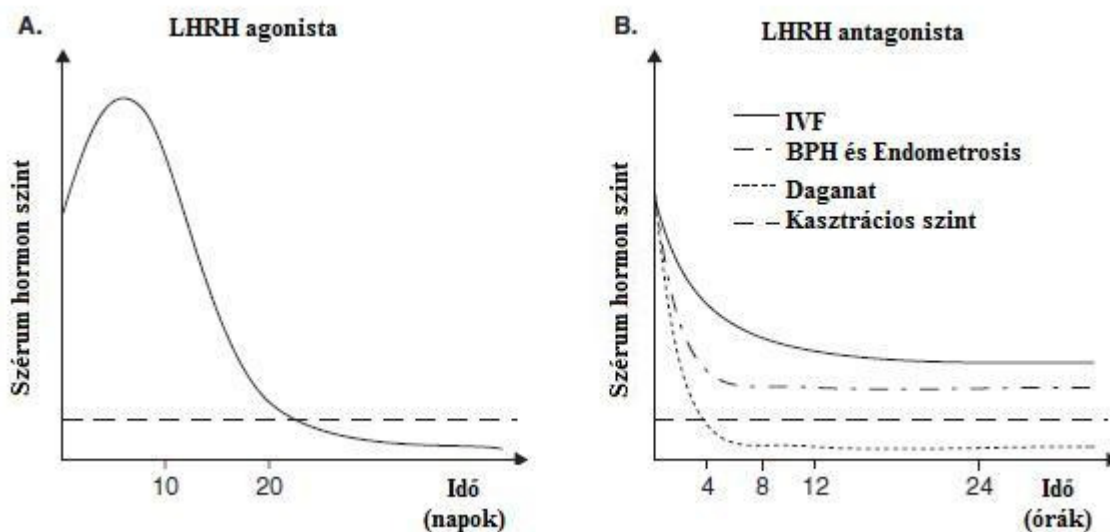
1.2.2. A BPH sebészeti kezelése

A BPH műtéti kezelése az obstrukció fő okának tartott szövetszaporulat eltávolítására irányul. A műtéti beavatkozások döntő többsége a gyógyszeres kezelésre refrakter LUTS-sal rendelkező betegek köréből kerül ki. A konvencionális beavatkozások körébe a prosztata transzuretrális rezekcióját (TURP) és a nyílt adenomektómiát sorolják. Ide tartoznak továbbá a transzuretrális lézer vaporizációs eljárások és a TURP-technika elektrosebészeti modifikációi is (rotorezekció, bipoláris technika).

1.3. Luteinizáló –hormon releasing hormon agonista és antagonisták szerepe a BPH kezelésében

Az 1990-es években Eri LM. és munkatársai széleskörű tanulmányokat folytattak a BPH LHRH agonista analógokkal történő kezelése terén (14). Ezek a tanulmányok igazolták, hogy a BPH LHRH agonista kezelése során a tesztoszteron szint jelentősen (kasztációs szintre) csökken, az alsó húgyúti tünetek (LUTS) javulása azonban csekély mértékű. Az LHRH antagonisták lehetnek a lehetséges új gyógyszermolekulák a BPH illetve a prosztata karcinóma kezelésében. Az LHRH antagonisták direkt módon gátolhatják az LHRH-receptorokat, így elmarad az LHRH agonista analógok alkalmazása során kialakuló „flare-up jelenség” – melynek következménye az emelkedett LH és FSH felszabadulás/release, illetve a megemelkedett tesztoszterontermelés (1. Ábra).

Az LHRH antagonistákkal történő kezelés során így nem szükséges a kezelést megelőző antiandrogén kezelés sem. A BPH kezelésében alkalmazható LHRH antagonisták közül a Cetrorelixnek vannak a legszélesebbkörű vizsgálatai (23-24), de BPH-ban történő klinikai alkalmazásához további randomizált összehasonlító tanulmányok elvégzése szükséges.



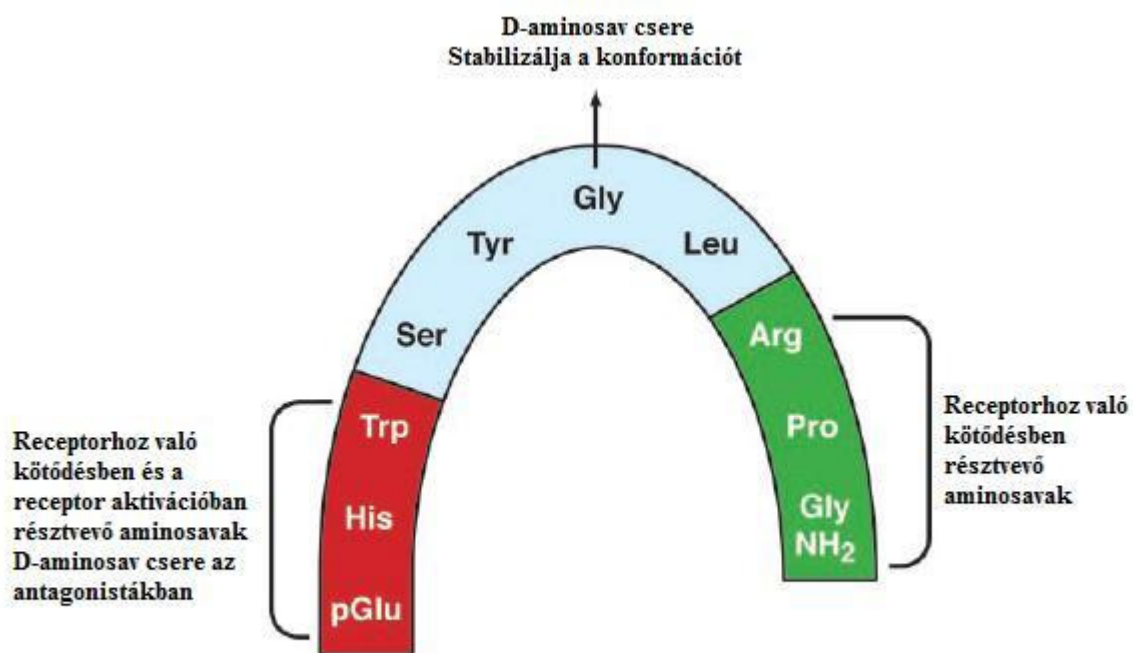
1.Ábra: Az LHRH agonista és az LHRH antagonisták hatása a szérum hormon szintre (LH, FSH, tesztoszteron, ösztrogén szintre). BPH: benignus prosztata hiperplázia, IVF: in vitro fertilizáció. (forrás: Gabor Mezo és mtsai. 2009 Luteinizing hormone-releasing hormone antagonists. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 19 (12)1771-85. Módosítva, átvéve (25)).

2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon (LHRH– I) kémiai szerkezete, szintézise és az LHRH–I térbeli modellje. Az 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand és az 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor között kialakult komplex (az LHRH–I ligand és az LHRH–R–I között kialakult komplex) térbeli elrendeződése (forrás: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

A Luteinizáló hormon – releasing hormon–I (LHRH–I) a reprodukzív hormonális rendszer egyik központi szabályozója. Először 1971-ben három egymástól független kutatócsoport izolálta a Luteinizáló hormon – releasing hormon–I-et (LHRH–I) emlős hipotalamuszból (26). Andrew V. Schally és Roger Guillemin egymástól függetlenül írta le az LHRH–I mint decapeptid pontos aminosav szekvenciáját (pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂), melyért 1977-ben mindketten Nobel-díjban részesültek. Az LHRH–I-et a hipotalamusz neuroszekretoros idegsejtjei termelik. A hipotalamusz neuroszekretoros idegsejtjei által termelt hormonok a hipofízis portális keringésébe szekretálódnak. A hipofízis gonadotróp sejtjei pulzatilis módon juttatják a szisztémás vérkeringésbe a gonadotróp hormonjaikat: a luteinizáló hormont (LH) és a follikulus stimuláló hormont (FSH). Az LH és FSH fő feladata az ivarmirigyek ivarsejtjeinek és szteroid hormon termelésének serkentése.

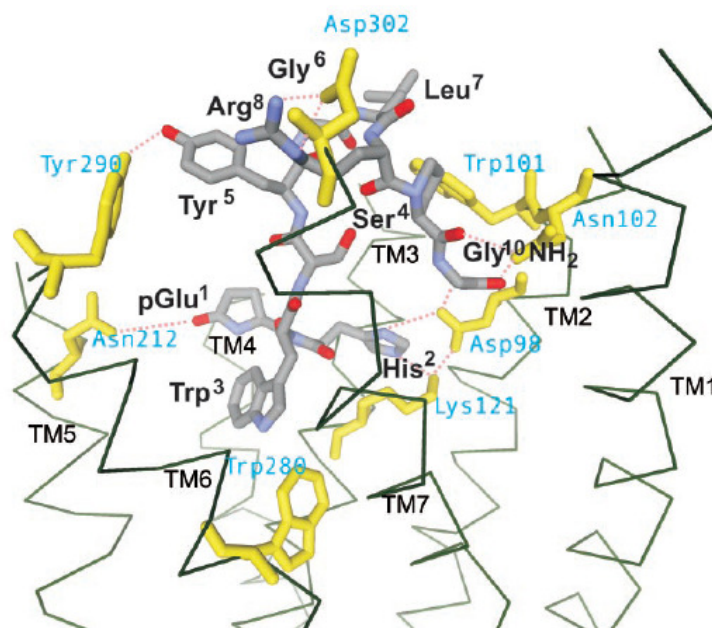
Az LHRH–I ligand az LHRH–R–I-hez kötődése során „hajlott” konformációt vesz fel. Azonosították azokat az aminosavakat is, melyeknek szerepe van a ligand–receptor komplex kialakításában illetve a receptor aktiválásában (**2. Ábra**).

Az LHRH–I decapeptid pontos aminosav (aa) szekvenciájának és konformációjának ismeretében lehetővé vált az LHRH–I ligand és az LHRH–R–I komplex térbeli modelljének ábrázolása (**3. Ábra**). Mindezek ismeretében megindultak a kutatások abba az irányba, hogy egyes aminosavak kicserélésével az eredeti LHRH–I molekulánál hatásosabb polipeptidet fejlesszenek ki. A fejlesztések hatására először az agonista LHRH–I analógok kerültek kifejlesztésre, majd viszonylag gyorsan gyógyszer formájában is hozzáférhetővé váltak. LHRH–I antagonisták kidolgozása hosszabb időt vett és vesz igénybe napjainkban is (**3.Ábra**).

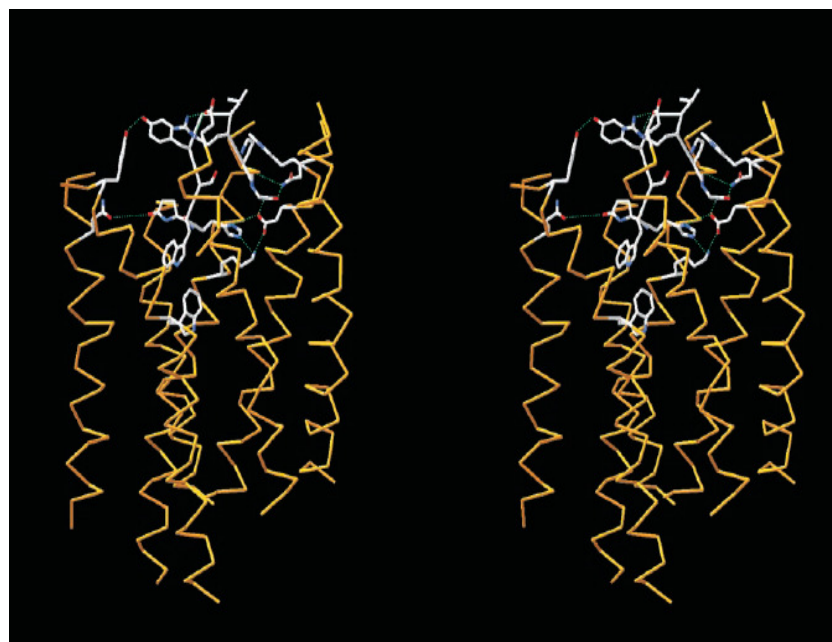


2.Ábra: Az emlős LHRH-I ligand „hajlott” konformációjának sematikus ábrázolása. A hipofizeális LHRH receptor-I ebben a konformációban köti az LHRH-I ligandot. A 6. aminosav (Gly–glycin) stabilizálja a „hajlott” konformációt és növeli a ligand kötődési affinitását az LHRH receptor-I-hez. Az N–terminális (–NH₂) rész pirossal, a C–terminális (–COOH) rész pedig zölddel jelölve. Az LHRH-I ligand –NH₂ és –COOH része is részt vesz az LHRH receptor-I-hez történő kötésben. Az –NH₂ résznek szerepe van az LHRH receptor-I aktivációban és LHRH antagonistáknak az itt lévő aminosavak cseréjével szintetizálják (forrás: Millar RP. 2002 *Reproductive medicine: molecular cellular and genetic fundamentals* edited by B.C.J.M. Fauser, Parthenon Publishing, Lancaster, UK. pp 199-224. módosítva, átvéve (27)).

A.

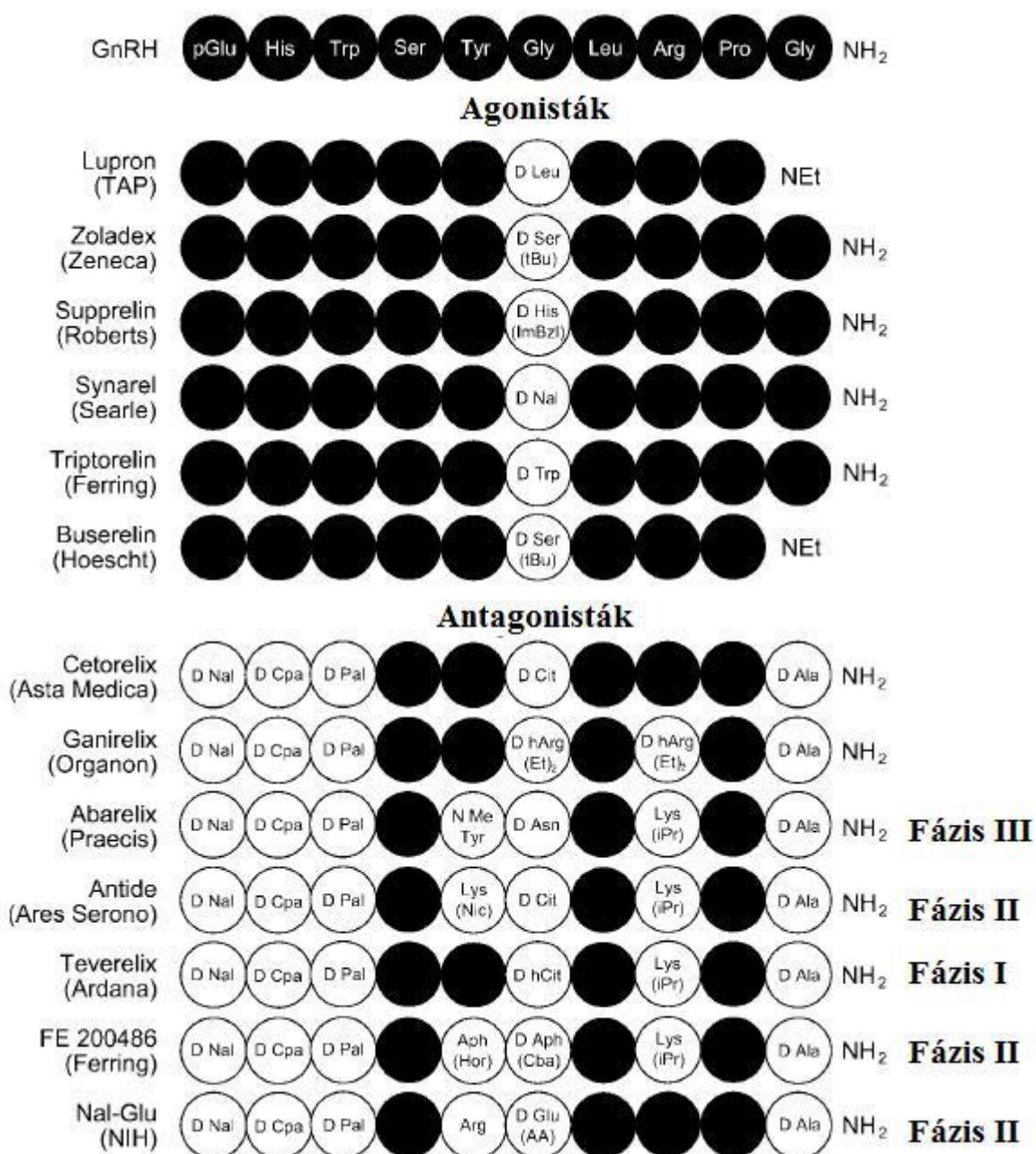


B.



3. Ábra: A humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand és a humán 1 – es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–I és LHRH–R–I) komplex térbeli modellje. **A.** LHRH–I ligand szürkével jelölve, az LHRH–I ligand – LHRH receptor–I komplex kialakításában résztvevő LHRH–I ligand aminosavai sárgával, az LHRH receptor–I 7 transzmembrán doménjei kékkel jelölve; **B.** LHRH–I ligand – LHRH receptor–I komplex kialakításában résztvevő aminosavak fehérrel, az LHRH

receptor–I 7 transzmembrán doménjei narancssárgával jelölve (*forrás: Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K and Maudsley SR. 2004 Gonadotropin-releasing hormone receptors. Endocrine Reviews 25 235-275. Módosítva, átvéve (28).*).



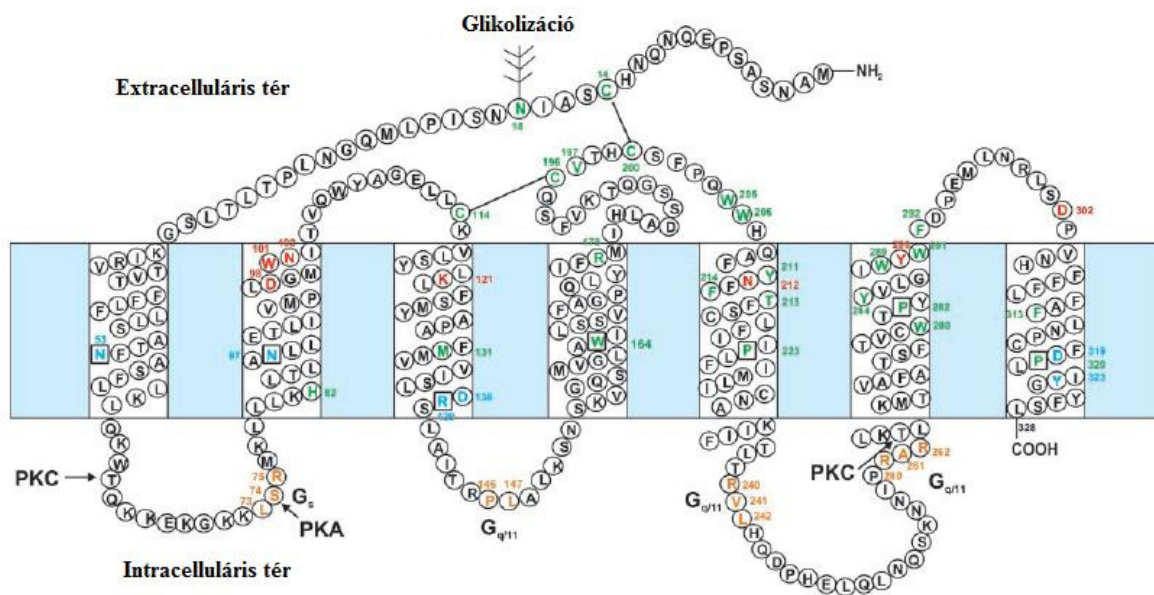
4. Ábra: A klinikai gyakorlatban/terápiásan alkalmazott vagy fejlesztés alatt álló LHRH agonista és antagonistá analógok (forrás: Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K and Maudsley SR. 2004 Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Reviews* 25 235-275. Módosítva, átvéve (28)).

Az LHRH-nak több izoformja is ismert. Az 1990-es évek végén Chen és mtsai. illetve Gestrin és mtsai. izolálták a Luteinizáló hormon – releasing hormon–II-t (LHRH–II) (29,30). Az LHRH-II gén a 20p13 (31) kromoszómán lokalizálódik, távol az LHRH-I géntől, mely a 8p21-p11.2 kromoszómán lokalizálódik. Az LHRH-II szignifikánsan magasabb mértékben expresszálódik extraneuronális szövetekben. Elsősorban vesében, csontvelőben és prosztatában igazolták expresszióját (31). In vitro tanulmányok igazolják az LHRH-II tumor növekedés gátló hatását. Az LHRH-II nagyobb affinitással kötődik a 2-típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptorhoz (LHRH-R-II), mint az LHRH-R-I-hez. Azonban in vitro humán karcinóma sejtvonalakon elvégzett tanulmányok arról is beszámolnak, hogy az LHRH-II, az LHRH-R-I mediált szignálutvonalakat is aktiválhatja (32,33). Humán endometrium és ovárium karcinóma sejtvonalakban igazolták a teljes LHRH-R-II mRNS expresszióját (34).

1999-ben Yaholom és mtsai. izolálták az LHRH harmadik izoformját a Luteinizáló – hormon releasing hormon–III-at (LHRH-III) (35).

3. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) (Ábra: ligandkötés, aktiváció)

A Luteinizing hormon releasing hormon receptor–I (LHRH–R–I) az irodalomban számos szinoním névvel szerepel: Gonadotropin hormon – releasing hormon receptor (GnRHR), Luliberin receptor (LRHR), 1-típusú Luteinizing hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I). Dolgozatomban az LHRH–R–I nomenklatúrát követem. Az LHRH–R–I génje a 4. kromoszóma hosszú karján (4q21.1) lokalizálódik és 3 exonból és 2 intronból épül fel. Az LHRH-R–I 7 transzmembrán doménnel (TM) rendelkező, 60 kDa nagyságú G–protein kapcsolt receptor (GPCR: G–protein coupled receptor), mely az adenohipofízis gonadrotrop sejteinek felszínén expresszálódik. A 7 TM-hez 3 extracelluláris és 3 intracelluláris loop csatlakozik. A humán LHRH–R–I az egyetlen ismert GPCR, mely nem rendelkezik C–terminális farki résszel (**5. Ábra**).



5. Ábra: A humán LHRH receptor–I kétdimenziós ábrázolása – jelölve a 7 transzmembrán doméneket, az extracelluláris és az intracelluláris loopokat. Az LHRH ligand kötésében fontos aminosavak az ábrán piros színnel vannak feltüntetve. Zöld betűvel szerepelnek az LHRH receptor–I konformáció stabilitásában és az LHRH–I ligand kötésében fontos aminosavak. A receptor aktivációban fontos aminosavak kék színnel vannak jelölve, míg a G–protein aktiválásában résztvevő aminosavak narancssárgával. (forrás: Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K and Maudsley SR. 2004 *Gonadotropin-releasing hormone receptors*. *Endocrine Reviews* **25** 235-275. Módosítva, átvéve (28)).

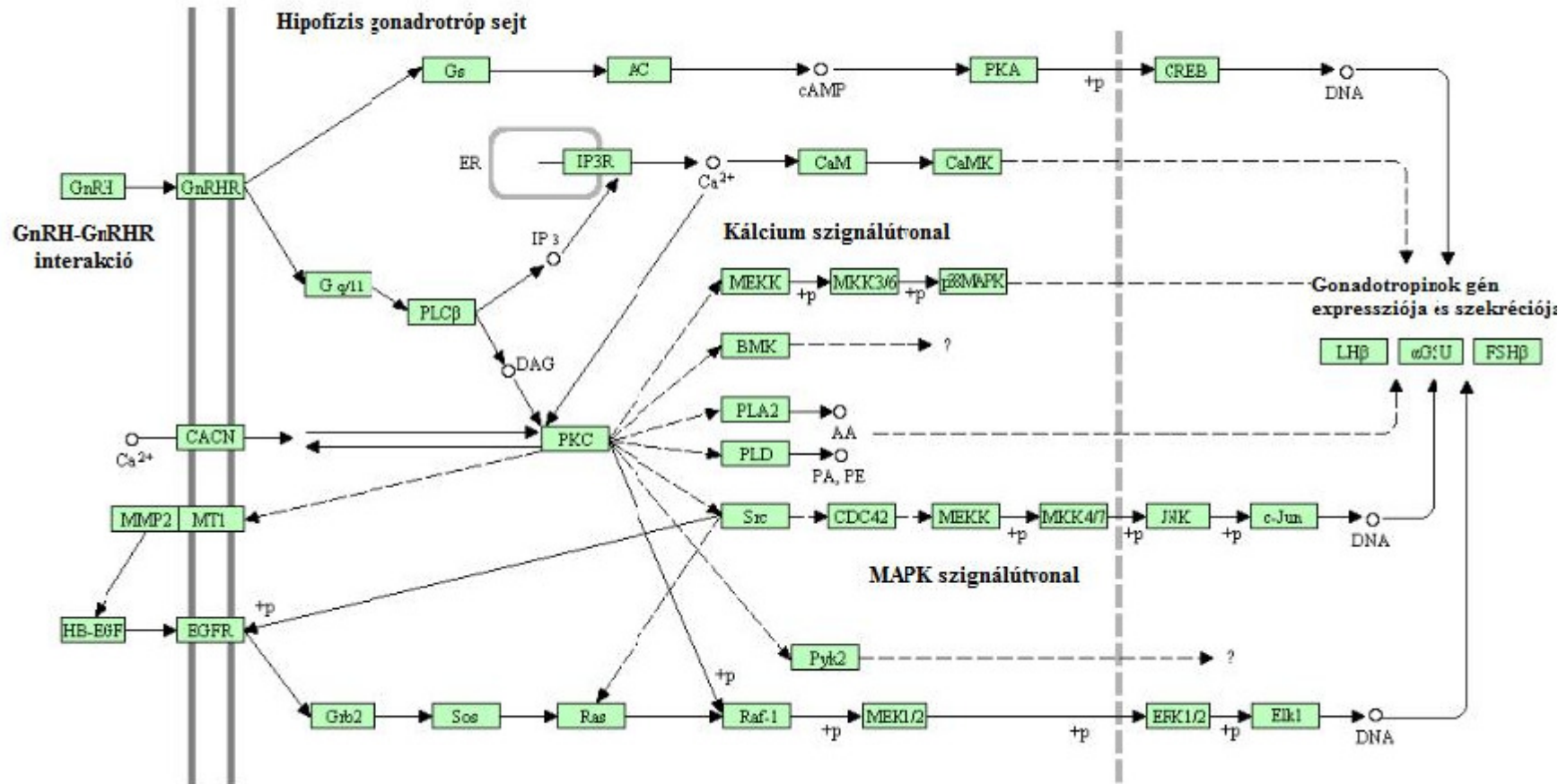
3.1. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor–I (LHRH–R–I) jelátviteli mechanizmusai

Az LHRH–R–I ligand kötődése után számos jelátviteli utat aktivál. Ezen jelátviteli utak közül leginkább tanulmányozottak a G–protein kapcsolt szignál transzdukciós útvonalak, melyeket alapvetően a fehérje α -alegysége határoz meg. Ez utóbbiak az LHRH–I ligand kötése esetén, jelen ismereteink szerint a G_s (stimulatórikus/stimuláló G-protein) és $G_{q/11}$ lehetnek. A G_s fehérje aktivációját követően az adenilát cikláz foszforilálja a ciklikus adenosin–monofoszfátot (cAMP), majd a keletkező aktív cAMP cAMP–függő protein kinázokat, azok pedig további fehérjéket indukálnak. A $G_{q/11}$ szignál transzdukciós útvonala különbözik a G_s szignál transzdukciós útvonalától. A $G_{q/11}$ elsőként a foszfolipáz C– β (PLC– β) fehérjét aktiválja, majd a foszfatidil–4,5–biszfoszfátot (PIP₂) diacil-glicerolra (DAG) és inozitol-trifoszfátra (IP₃) hidrolizálja. A DAG protein kináz C (PKC) aktivációt vált ki, míg az

IP₃ intracelluláris Ca²⁺ felszabaduláshoz vezet.

Az elmúlt 15 évben megjelent számos tanulmány igazolta, hogy az LHRH-R-I expresszálódhat extrahipofizeális normál és tumor szövetekben is (1-11). A gonadrotrop sejtekben és az extrahipofizeális szövetekben végbement szignál transzdukciós útvonalak, azonban különböznek egymástól. Az adenohipofízis gonadotrop sejtjeinek LHRH-receptorai ligand kötést követően elsősorban G_s- és G_{q/11}- protein aktivációt hoznak létre, míg az extrahipofizeális szövetekben leginkább tanulmányozott szignál transzdukciós útvonal a G_i (inhibitorikus/gátló G-protein) aktiválódásához vezet **(6. Ábra)** (25, 36-39).

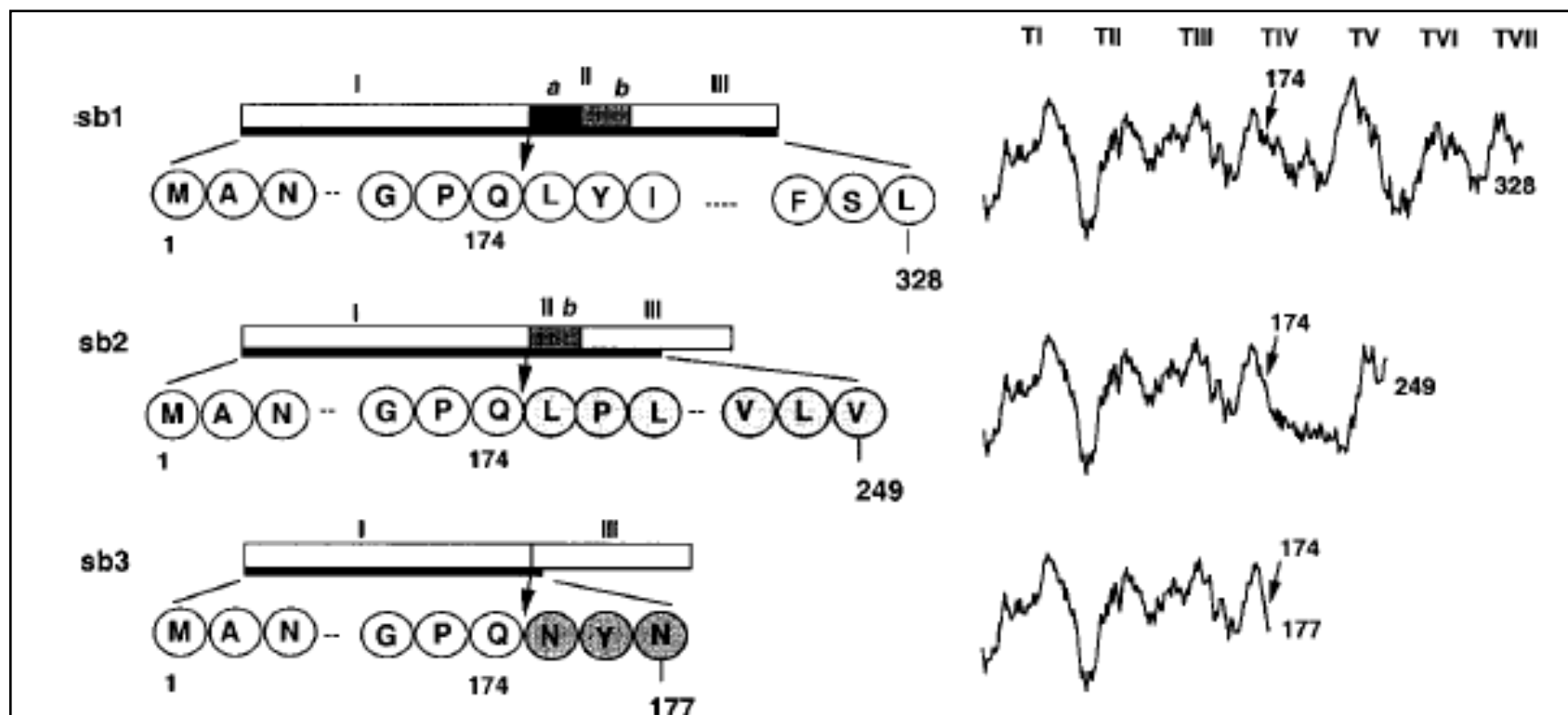
GnRH/LHRH szignálútvon



6.ábra: Az 1-es típusú humán Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) ligand kötés során aktivált G-protein vezérelt szignál traszdukciós útvonai (forrás: http://www.genome.jp/dbgetbin/show_pathway?map04912, Módosítva, átvéve)

3.2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor–I (LHRH–R–I) transzkript variánsai és izoformái

A humán 1-es típusú LHRH–receptornak korábbi irodalmi adatok szerint két transzkript variánsa igazolt (12-13). A két transzkript variáns az LHRH–R–I gén 2. exonját érintő deléciónak következtében alakul ki (**7. Ábra**). Az irodalmi nomenklaturát követve az LHRH–R–I sb2 transzkript variáns az LHRH–R–I gén 2. exonjának 128 bázispáros (bp) deléciója, míg az LHRH–R–I sb3 transzkript variáns az LHRH–R–I gén teljes 2. exon (220 bp) deléciója miatt jön létre. A delécióval kialakult LHRH–R–I transzkript variánsokról transzlálódó fehérje izoformok is eltérnek a teljes LHRH–R–I génről transzlálódó 7 TM-mel rendelkező 328 aa-ból felépülő hipofizeális fehérjétől. Az LHRH–R–I sb2 transzkript variánsról egy 249 aa-ból felépülő 5 TM-mel rendelkező fehérje izoform transzlálódik. Az LHRH–R–I sb3 transzkript variánsról eddigi irodalmi adatok nem igazolták a transzlációt, az mRNS expresszióját egérben mutatták ki (40).



7. Ábra: Az 1-es típusú humán Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) transzkript variánsainak és izoformáinak **sematikus ábrázolása**. Az LHRH–R–I gén 3 exonját az ábrán római számokkal jelölték (I, II, III). Az LHRH–R–I transzkript variánsokról transzlálódó proteinek részleges aminosavszekvenciája és a transzlálódó LHRH–R–I izoformok aminosavszáma (aa) (LHRH–R–I sb1:328 aa, LHRH–R–I sb2: 249 aa és LHRH–R–I sb3: 177 aa) az LHRH–R–I izoformok közti különbséget szemlélteti (forrás: Kottler ML, Bergametti F, Carre MC, Morice S, Decoret E, Lagarde JP, Starzec A and Counis R. 1999 *Tissue-specific pattern of variant transcripts of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. European Journal of Endocrinology* **140** 561–569. Módosítva, átvéve (13)).

III. Célkitűzések

Eddigi irodalmi adatok alapján nem tisztázott a humán Luteinizáló hormon–releasing hormon–I (LHRH–I) és a humán Luteinizáló hormon–releasing hormon receptor–I (LHRH–R–I) expressziójának mértéke humán benignus prosztata hiperpláziában (BPH). A humán Luteinizáló hormon–releasing hormon receptor–I-nek (LHRH–R–I) irodalomban 2 transzkript variánsa igazolt. Ezeknek az LHRH–R–I transzkript variánsoknak mRNS szinten valamint a transzlálódó LHRH receptor–I izoformok fehérjeszinten történő expressziójának meghatározása nagyban segítheti újabb, a terápiában jól alkalmazható LHRH receptor–I agonista illetve antagonistá analógok kifejlesztését.

Ph.D. munkám során a humán 1-es típusú LHRH ligand (LHRH–I), a humán 1-es típusú LHRH receptor (LHRH–R–I), illetve az LHRH receptor–I transzkript variánsainak messenger RNS (mRNS) expresszióját mértem reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval (RT–PCR) új, saját tervezésű és irodalomban már korábban közölt primerpárok segítségével. A humán LHRH receptor–I expresszióját immunhisztokémiával (IHC) vizsgáltam humán BPH szövetmintákban és pozitív kontrollként alkalmazott humán hipofízis szövetben. Az IHC mérések alapvető célkitűzése, hogy vizsgáljuk az LHRH–R–I illetve és/vagy LHRH–R–I izoform(ok) expresszióját BPH szövetmintában a kontrollként használt hipofízishez képest. Az LHRH–R–I funkcióképességét ligand kötési assay segítségével mértük kollaborációs kísérleteink során a BPH szövetminták membránfrakcióiban. A direkt leszorítási vizsgálatok során LHRH antagonistá és agonista analógok alkalmazásával mértük a BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH receptorok specificitását és kötési affinitását valamint kapacitását.

Kísérleteinkben a következő kérdésekre kerestük a választ:

A. mRNS expressziós mérések reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióval (RT–PCR-rel)

- Fagyasztott natív BPH szövetminta esetén melyek az optimális körülmények a szövet homogenizálásához és megfelelő minőségű RNS izolálásához?
- A reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT–PCR) során alkalmazott protokollok beállítása és optimalizálása a humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing

hormon (LHRH-I) és a humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) expressziójának méréseihez.

- Az RT-PCR reakciókhoz alkalmazott saját tervezésű új és az irodalomban már korábban közölt primerpárokkal a reakciók optimalizálása a pozitív kontrollként használt humán hipofízis szövetre és humán BPH szövetmintákra.

- Expresszálódik-e a humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon (LHRH-I) mRNS szinten BPH-ban?

- Expresszálódik-e a humán hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) mRNS szinten BPH-ban?

- Expresszálódnak-e a humán hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) irodalmi adatok alapján igazolt transzkript variánsai mRNS szinten BPH-ban?

- Létezik-e/léteznek-e a humán hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló Hormon – releasing hormon receptornak (LHRH-R-I) irodalmi adatok alapján ezidáig nem igazolt transzkript variánsa(i) humán hipofízisben illetve jelen munkánkban legfőképpen BPH-ban?

B. Fehérje expressziós mérések Immunohisztokémiával (IHC)

- Formalinnal fixált paraffinba ágyazott BPH szövetminta és humán hipofízis minta esetén melyek az optimális körülmények, milyen antigénfeltárás szükséges?

- A humán hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) fehérje expressziójának és lokalizációjának vizsgálata a pozitív kontrollként alkalmazott humán hipofízis szövetben és a humán BPH szövetben?

- A humán hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) expressziót mutató sejtek azonosítása humán hipofízis szövetben és a humán BPH szövetben.

- Van-e különbség a kontrollként alkalmazott humán hipofízisben és a humán BPH szövetmintákban mért 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) fehérje expressziójában?

C. Az LHRH-R-I funkcióképességének vizsgálata humán BPH-ban Ligand kötési Assay-vel (Ligand Binding assay:LBA)

- Membránpreparálási protokoll beállítása humán BPH szövetminta esetén.
- Kompetíciós ligand kötési vizsgálatokkal igazoltuk a BPH szövetminták membránfrakcióiban a funkcióképes LHRH receptor jelenlétét.
- Vizsgáltuk, hogy melyek az optimális körülmények a direkt leszorítási ligand kötési assay elvégzéséhez.
- Tanulmányoztuk a BPH szövetminták membránfrakcióiban jelenlévő LHRH receptorok specificitását, kötési affinitását és kapacitását valamint a terápiában alkalmazható két LHRH analóg, egy LHRH antagonist (Cetrorelix) és egy LHRH agonista (Buserelin) receptor kötési tulajdonságait.
- A klinikai kép, a humán hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) transzkript variánsok, a-humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand (LHRH–I) mRNS expressziója és a humán Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor funkcióképessége közötti összefüggés vizsgálata.
- Elemeztük, hogy van-e korreláció a vizsgált BPH minták klinikai adatait és az mRNS expresszió és/vagy a ligand kötési tanulmányok között?

IV. Módszerek

1. Mintagyűjtés

2006–2008 között műtéti úton eltávolított 35 BPH szövetminta (átlag életkor: 67.9 év $\pm$ 0.5; életkor tartomány: 55-82 év) állt a rendelkezésünkre molekuláris biológiai vizsgálatokhoz a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Urológiai Klinikájáról. Pozitív kontrollként 3 humán hipofízis mintát használtunk, melyet a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Patológiai Intézetéből kaptunk. A Miami Egyetem Patológiai Intézetével folytatott kollaborációs munka során további 20 BPH szövetmintában történtek molekuláris biológiai és funkcionális vizsgálatok. A mintákat feldolgozásig mélyfagyasztottuk, melyre a mRNS expressziós vizsgálatok miatt volt szükség. Kísérleteink tervezése és kivitelezése során a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Etikai Bizottsága által jóváhagyott protokollok szerint jártunk el.

2. Alkalmazott módszerek

(A következőkben ismertetett módszerekkel legkevesebb három, független kísérletet végeztünk)

2.1. Homogenizálás és teljes RNS izolálás

Minden BPH mintából és humán hipofízis mintából 20-30 mg szövetet homogenizáltunk mechanikusan kapszulás homogenizátorral (*Mikro-Dismembrator U Sartorius, Németország*), folyamatos nitrogén-hűtés mellett (RNáz gátlás). A homogenizálást 3 percig 1800-as fordulatszámon végeztük. Ezt követően a szövet homogenizátumokból teljes RNS-t izoláltunk (*NucleoSpin Total RNA Isolation Kit Macherey-Nagel, Németország*) gyári kit segítségével a gyári protokollt optimalizálva. Röviden: A szövet homogenizátumokat β – merkaptotetanolt (β –ME) tartalmazó guanidin–izotiocianát–tartalmú pufferben lizáltuk, majd a viszkozitás csökkentése érdekében filteren szűrtük. Ezt követően szilícium–dioxid membránhoz (*NucleoSpin® RNS/DNS-kötő oszlop*) kötöttük a sejtlizátumok nukleinsav tartalmát. Az oszlophoz kötött DNS-t kétszeri DNáz emésztéssel (2x15 min) elimináltuk, majd a további lépések során az alkalmazott DNázt megfelelő pufferrel semlegesítettük.

Végül a szilícium-dioxid membrán háromszori átmosását követően az RNS-t 40 µl RNáz-mentes H₂O-ben eluáltuk. Az izolált teljes RNS-t felhasználásig -70°C-on tároltuk.

Az RNS koncentrációját és tisztaságát Nanodrop spektrofotométerrel (*Nanodrop® ND-1000 UV Spectrophotometer, Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA*) határoztuk meg. Az RNS-t a reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakcióhoz (RT-PCR-hez) megfelelő koncentrációjúnak (100-1000 ng/µl) és tisztaságúnak tekintettük, ha a minták abszorpciója 260/280 és 260/230 nm-en 1,8-2,0 közötti érték volt.

2.2. Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR)

Az ismert RNS koncentrációk függvényében normalizáltuk az egyes mintákat, majd reverz transzkripció segítségével az RNS-t komplementer DNS-é konvertáltuk. A reakció során mintánként 100-250 ng RNS-ből indultunk ki. A reverz transzkripció MMLV reverz transzkriptáz enzim (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Reverse Promega Co, Madison, WI, USA*) segítségével történt két lépésben a gyári protokoll utasításai szerint. A reverz transzkripció sikerességét belső standard gén (humán beta – aktin: bACT) mRNA expressziójával igazoltuk. Minden esetben humán hipofízis szövetet használtunk pozitív kontrollként. Negatív kontrollként ún. no – templát kontrollt használtunk (azaz a mintát nem, de a reakcióhoz szükséges minden más reagenst tartalmazó elegyet) annak céljából, hogy kizárjuk a kontamináció ill. álpozitivitás lehetőségét. A PCR-termékek detektálása minden esetben az alábbiak szerint történt: az amplifikált PCR-termékeket 1,5 %-os etidium bromidot tartalmazó agaróz gélen választottuk el, UV-fényben tettük láthatóvá és géldokumentációs rendszerrel (*DigiDoc RT2 Alpha Innotech, USA*) detektáltuk. 50 bp-os DNS-markert használtunk (*Promega, USA*) a PCR-termékek méretének ellenőrzéséhez.

2.2.1. Reverz transzkripció ellenőrzése a humán beta–aktin (bACT) mRNA expressziójának mérésével

A reverz transzkripció eredményességét a humán bACT housekeeping gén mRNA expressziójának pozitivitásával igazoltuk a humán LHRH-R-I és a humán LHRH-I ligand mRNA expressziójának mérése előtt. A bACT mRNA expressziójának mérésére irodalomban közölt primerpárt használtunk (43). Mivel a bACT génre specifikus forward (F) és reverse (R) primerpár külön exonra tervezett (3. exon és 4. exon), így az amplifikált termék nagyságából az esetleges genomi DNS (gDNS) kontaminációt is vizsgálhattuk. Az alábbi PCR protokoll alapján mértük a humán bACT mRNA expresszióját: 2 µl cDNS-t amplifikáltunk 1,5 mM

MgCl₂-ot, 1xPCR puffert (*Invitrogen*), az egyes deoxynukleotidokból (dNTP: dGTP,dCTP,dATP,dTTP) (*Promega, WI,USA*) 200 µM-t tartalmazó elegyben 1U Taq DNS polimeráz (*Invitrogen*) segítségével, 0.25 µM (F3: 5'-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3' (3. exon)) és 0.25 µM (R4: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3' (4. exon)) primer koncentráció mellett 25 µl végtérfogatban. A kezdeti denaturációs lépést, melyet 94 °C-on 3 percig végeztünk, a humán bACT PCR 30 ciklusa követte, mely az alábbi lépésekből állt: denaturálás 94 °C-on 45 s-ig, anellálás 60 °C-on 30 s-ig, extenzió 72 °C-on, 90 s-ig. A 30 ciklus után egy végső extenziós lépést végeztünk 72 °C-on 10 percig.

2.2.2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) mRNS expressziójának mérése PCR-rel

A humán LHRH–R–I mRNS expresszióját három primerpárral mértük, melyből egy saját tervezésű primerpár (LHRH–R–I F1'/R2') volt. A humán LHRH–R–I mRNS expressziós méréséhez használt primerpárok jelölése során a **8. Ábra** szerinti nomenklatúrát követtem (13,14,48,49). A humán LHRH–R–I mRNS expressziójának mérésére optimalizált RT–PCR protokollokat foglalja össze az **1. Táblázat**.

LHRH-R-I F1/R1-(319 bp LHRH-R-I Sb1, LHRH-R-I Sb2, LHRH-R-I Sb3, gDNS)

(Halmos G. és mtsai.: 2000 The Journal of Urology 163, 623-629)

F1: 5'-GACCTTGTCTGGAAAGATCC-3' (EXON 1 1844-1863)**R1:5'-CAGGCTGATCACCACCATCA-3' (EXON 1 2143-2162)****LHRH-R-I F2/R3- (309 bp LHRH-R-I Sb1)**

(Wilson AC. És mtsai.: 2006 J. of Endocrinology 191, 651-663)

F2: 5'-AGCAGACAGCTCTGGACAGACAAAA-3' (EXON 2 2300-2334)**R3: 5'-ACATAGTAGGGAGTCCAGCAGACA-3' (EXON 3 2582-2605)****LHRH-R-I F1'/R2'-(219 bp LHRH-R-I Sb1, 91 bp LHRH-R-I Sb2)**(Primer3 <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi>)**F1': 5'-TAGTGTCTTTGCAGGACCACA-3' (EXON 1 2252-2272)****R2': 5 -CGTGTTCAGGGTGAAGATGATT-3' (EXON 2 450-2470)****Gén:LHRH-R-I Sb1****CDS: 987 bp [NP_000397](#)**

```

1741 cctgggaaaa tatggcaaac agtgcctctc ctgaacagaa tcaaaatcac tgttcagcca
1801 tcaacaacag catcccactg atgcagggca acctccccac tctgaccttg tctggaaaga
1861 tccgagtgac gggtactttc ttcctttttc tgctctctgc gacctttaat gcttctttct
1921 tgttgaaact tcagaagtgg acacagaaga aagagaaagg gaaaaagctc tcaagaatga
1981 agctgctctt aaaacatctg accttagcca acctgttgga gactctgatt gtcatgccac
2041 tggatgggat gtggaacatt acagccaat ggtagctgg agagttactc tgcaaagttc
2101 tcagttatct aaagcttttc tccatgtatg cccagcctt catgatgggtg gtgatcagcc
2161 tggaccgctc cctggctatc acgaggcccc tagctttgaa aagcaacagc aaagtcggac
2221 agtccatggt tggcctggcc tggatcctca gtagtgtctt tgcaggacca cagttataca
2281 tcttcaggat gattcatcta gcagacagct ctggacagac aaaagttttc tctcaatgtg
2341 taacacactg cagtttttca caatgggtggc atcaagcatt ttataacttt ttcaccttca
2401 gctgcctctt catcatccct cttttcatca tgctgatctg caatgcaaaa atcatcttca
2471 ccctgacacg ggtccttcat caggaccccc acgaactaca actgaatcag tccaagaaca
2521 atataccaag agcagcggctg aagactctaa aaatgacggt tgcatttgcc acttcattta
2581 ctgtctgctg gactccctac tatgtcctag gaatttggtt ttggtttgat cctgaaatgt
2641 taaacagggt gtcagacca gtaaatcact tcttctttct ctttgccttt ttaaaccat
2701 gctttgatcc acttatctat ggatattttt ctctgtga

```

8. Ábra: A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) mRNS expressziójának méréséhez használt specifikus primerpárok szekvenciája.

Rózsaszínnel jelölve az 1. exonra, szürkével a 2. – 3. exonra és sárgával az 1. – 2. exonra általunk tervezett LHRH-R-I primerpár. Pirossal jelölve a start kodon (atg) és stop kodon (tga). A forward primerek jelölése F, a reverse primerek jelölése R – mellettük számmal jelölve, hogy a humán LHRH-R-I gén melyik exonjára specifikusak.

(forrás: www.genatlas.org)

2.2.2.1. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) gén 1. exonjára tervezett specifikus primerpárral mért LHRH–R–I mRNS expresszió mérése PCR-rel

A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) mRNS expressziójának mérését a humán LHRH–R–I gén 1. exonjára tervezett primerpárral kezdtük. A primerpár jelölésére az LHRH–R–I F1/R1 nomenklaturát alkalmaztam. Erre az LHRH–R–I F1/R1 primerpárra található a legtöbb irodalmi hivatkozás (50). Korábbi irodalmi adatok szerint ezzel a primerpárral extrahipofizeális normál és tumor szövetekben is mértek mRNS LHRH–R–I expressziót (2, 50,51). Azonban a humán LHRH–R–I gén 1. exonjára tervezett primerpárral végzett RT–PCR során a hipofizeális LHRH–R–I, a két LHRH–R–I transzkript variáns valamint a gDNS kontamináció következtében amplifikálódó PCR termékek nagysága azonos lesz.

Az LHRH–R–I F1/R1 primerpárral az alábbi PCR protokoll alapján mértük a humán LHRH–R–I mRNS expresszióját: 2 µl cDNS-t amplifikáltunk 1,5 mM MgCl₂-ot, 1xPCR puffert (*Invitrogen*), az egyes dNTP-ékből (dGTP,dCTP,dATP,dTTP) (*Promega, WI, USA*) 200 µM-t tartalmazó elegyben 1U Taq DNS polimeráz (*Invitrogen*) segítségével, 0.25 µM (F1:5'-GACCTTGTCTGGAAAGATCC-3' (1.exon)) és 0.25 µM (R1: 5'-TGATGGTGGTGATCAGCCTG-3' (1.exon)) primer koncentráció mellett 25 µl végtérfogatban. A kezdeti denaturációs lépést, melyet 94 °C-on 3 percig végeztünk a humán LHRH–R–I F1/R1 PCR 45 ciklusa követte, mely az alábbi lépésekből állt: denaturálás 94 °C-on 45 s-ig, anellálás 60 °C-on 30 s-ig, extenzió 72 °C-on, 90 s-ig. A 45 ciklus után egy végső extenziós lépést végeztünk 72 °C-on 10 percig.

2.2.2.2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) gén 2. és 3. exonjára tervezett specifikus primerpárral mért LHRH–R–I mRNS expresszió mérése PCR-rel

A humán 1-es típusú Luteinizáló Hormon – Releasing Hormon Receptor (LHRH–R–I) mRNS expressziójának mérését a humán LHRH–R–I gén 2. és 3. exonjára tervezett primerpárral folytattuk. A forward (F) primer a humán LHRH–R–I gén 2. exonjának olyan szekvenciájára van tervezve, mely az irodalomban igazolt két LHRH–R–I transzkript variánsban nincs jelen (a 2. exont érintő 128 bp-os/LHRH–R–I sb2 illetve 220 bp-os/LHRH–R–I sb3 deléció miatt). Így ezzel a primerpárral csak a hipofizeális teljes LHRH–R–I mRNS expressziója mérhető a két LHRH–R–I transzkript variáns mRNS expressziója nem. Korábbi irodalmi adatok szerint ezzel a primerpárral csak neuronokban mértek LHRH–R–I mRNS expressziót (51). A primerpár jelölésére az LHRH–R–I F2/R3 nomenklatúrát alkalmaztam.

Az LHRH–R–I F2/R3 primerpárral az alábbi PCR protokoll alapján mértük a humán LHRH–R–I mRNS expresszióját: 2 µl cDNS-t amplifikáltunk 3 mM MgCl₂-ot, 1xPCR puffert (*Invitrogen*), az egyes dNTP-kből (dGTP,dCTP,dATP,dTTP) (*Promega, WI, USA*) 200 µM-t tartalmazó elegyben 1U Taq DNS polimeráz (*Invitrogen*) segítségével, 0.25 µM (F2:5'-AGCAGACAGCTCTGGACAGACAAAA-3' (2.exon)) és 0.25 µM (R3: 5'-TGTCTGCTGGACTCCCTACTATGT-3' (3.exon)) primer koncentráció mellett 25 µl végtérfogatban. A kezdeti denaturációs lépést, melyet 94 °C-on 3 percig végeztünk a humán LHRH–R–I F2/R3 PCR 45 ciklusa követte, mely az alábbi lépésekből állt: denaturálás 94 °C-on 45 s-ig, anellálás 66 °C-on 30 s-ig, extenzió 72 °C-on, 90 s-ig. A 45 ciklus után egy végső extenziós lépést végeztünk 72 °C-on 10 percig.

2.2.2.3. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) gén 1. és 2. exonjára kutatócsoportunk által tervezett primerpárral mért LHRH–R–I mRNS expresszió mérése PCR-rel

A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon–releasing hormon receptor (LHRH–R–I) mRNS expressziójának mérését a saját tervezésű primerpárral folytattuk, melyet az LHRH–R–I gén 1. és 2. exonjára tervezetünk. Az LHRH–R–I primerpárt az alábbi primertervező szoftver segítségével terveztük: primer3 www.cgi v 0.2 program. A saját tervezésű primerpárral a hipofizeális LHRH–R–I és az LHRH–R–I sb2 különböző nagyságú termékkel amplifikálódik. Azonban az LHRH–R–I sb3 mRNS expressziója a 2. exon teljes deléciója miatt ezzel a primerpárral nem mérhető. A saját tervezésű primerpár jelölésére az LHRH–R–I F1'/R2' nomenklatúrát alkalmaztam.

Az LHRH–R–I F1'/R2' primerpárral az alábbi PCR protokoll alapján mértük a humán LHRH–R–I mRNS expresszióját: 2 µl cDNS-t amplifikáltunk 1,5 mM MgCl₂-ot, 1xPCR puffert (*Invitrogen*), az egyes dNTP-ékből (dGTP,dCTP,dATP,dTTP) (*Promega, WI, USA*) 200 µM-t tartalmazó elegyben 1U Taq DNS polimeráz (*Invitrogen*) segítségével, 0.25 µM (F1': 5'-TAGTGTCTTTGCAGGACCACA-3' (1. exon)) és 0.25 µM (R2': 5' - AATCATCTTCACCCTGACACG-3' (2. exon)) primer koncentráció mellett 25 µl végtérfogatban. A kezdeti denaturációs lépést, melyet 94 °C-on 3 percig végeztünk a humán LHRH–R–I F1'/R2' PCR 45 ciklusa követte, mely az alábbi lépésekből állt: denaturálás 94 °C-on 45 s-ig, anellálás 60 °C-on 30 s-ig, extenzió 72 °C-on, 90 s-ig. A 45 ciklus után egy végső extenziós lépést végeztünk 72 °C-on 10 percig.

A humán LHRH–R–I mRNS expressziójának mérésére optimalizált RT–PCR protokollokat foglalja össze az **1. Táblázat**.

1.Táblázat: A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) mRNS expressziójának mérésére használt PCR protokollok összefoglalója

LHRH–R–I primerpár	LHRH–R–I F1/R1	LHRH–R–I F2/R3	LHRH–R–I F1'/R2'
PCR reakció mix:			
PCR puffer	1x	1x	1x
DNS Taq polimeráz	1U	1U	1U
MgCl ₂	1.5 mM	3 mM	1.5 mM
Primer (F+R)	0.25 µM+0.25 µM	0.25 µM+0.25 µM	0.25 µM+0.25 µM
dNTP	200 µM	200 µM	200 µM
Templát (cDNS)	2 µl	2 µl	2 µl
Végtérfogat	25 µl	25 µl	25 µl
PCR protokoll			
Kezdeti denaturáció	94 °C 3 min	94 °C 3 min	94 °C 3 min
Amplifikáció:			
Denaturáció	94 °C 45 s	94 °C 45 s	94 °C 45 s
Anelláció	60°C 30 s	66°C 30 s	60°C 30 s
Extenzió	72°C 90s	72°C 90s	72°C 90s
Ciklusszám	45	45	45
Végső extenzió	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min

 : a legfontosabb optimalizálási lépések

2.2.3. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon (LHRH–I) mRNS expressziójának mérése PCR-rel

A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand (LHRH–I) mRNS expressziójának mérését irodalomban közölt primerpárral mértük. A forward primert a humán LHRH–I gén 1. exonjára, a reverse primert pedig a 3. exonra tervezték (52).

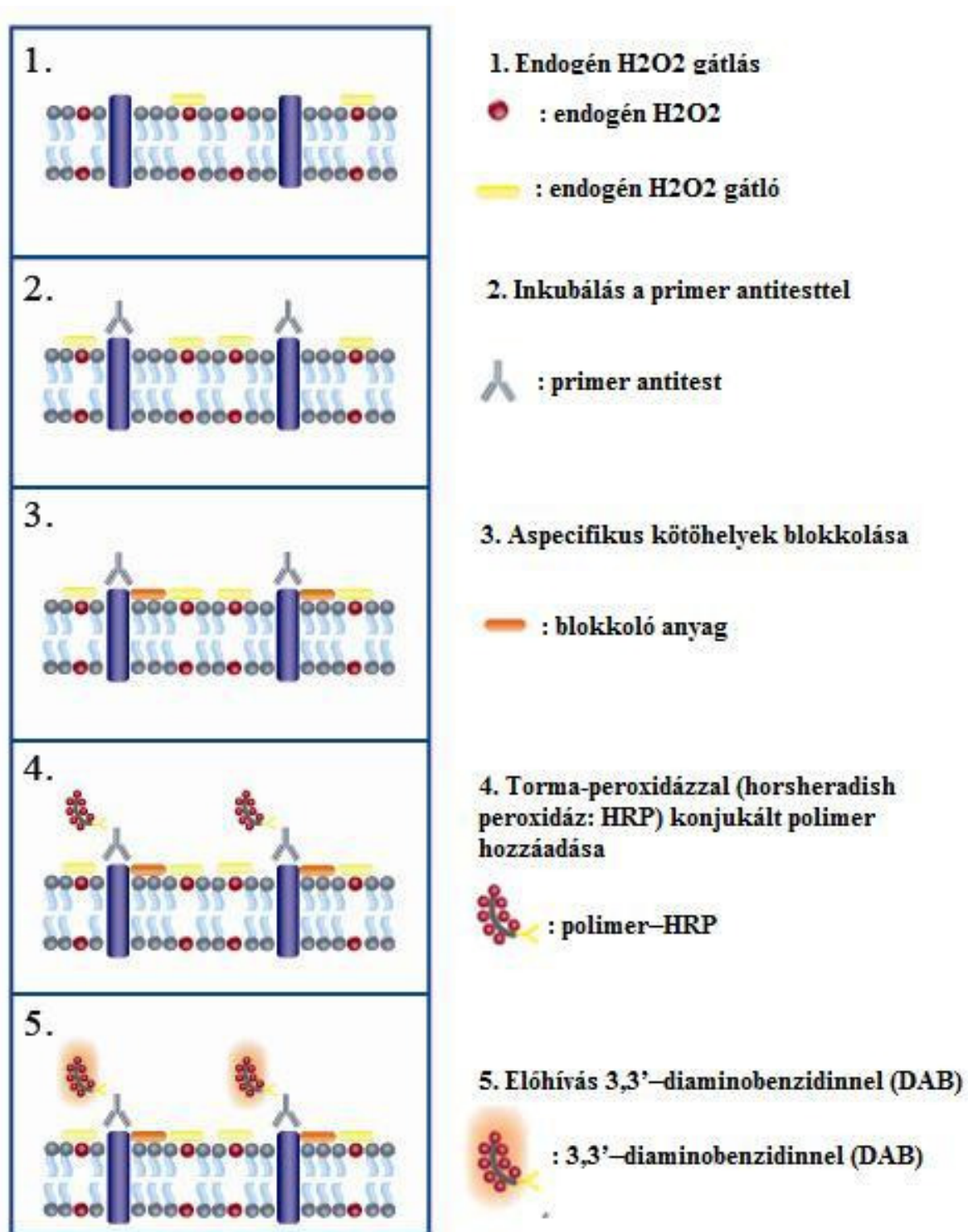
Az LHRH–I ligand mRNS expresszióját az alábbi PCR protokoll alapján mértük: 2 µl cDNS-t amplifikáltunk 3 mM MgCl₂-ot, 1xPCR puffert (*Invitrogen*), az egyes dNTP-ékből (dGTP,dCTP,dATP,dTTP) (*Promega, WI, USA*) 200 µM-t tartalmazó elegyében 1U Taq DNS polimeráz (*Invitrogen*) segítségével, 0.25 µM (F1: 5'-CTACTGACTTGGTGCCTGGA-3' (1.exon)) és 0.25 µM (R3: 5'-CTGCCAGTTTCCTCTTCAA-3' (3.exon)) primer koncentráció mellett 25 µl végtérfogatban. A kezdeti denaturációs lépést, melyet 94 °C-on 3 percre végeztünk a humán LHRH–I PCR 45 ciklusa követte, mely az alábbi lépésekből állt: denaturálás 94 °C-on 45 s-ig, anellálás 66 °C-on 30 s-ig, extenzió 72 °C-on, 90 s-ig. A 45 ciklus után egy végső extenziós lépést végeztünk 72 °C-on 10 percre.

2.3. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) expressziójának mérése Immunohisztokémiával (IHC)

A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) immunohisztokémiai mérések célja az volt, hogy kutatócsoportunk igazolja, hogy extrahipofizeálisan a humán BPH szövetmintákban elsősorban nem a hipofizeális LHRH–R–I, hanem az LHRH–R–I valamely izoformja expresszálódik.

4%-os formalinban fixált paraffinba ágyazott 10 BPH szövetmintából és 2 humán hipofízis mintából 2-3 µm vastag metszetet készítettünk mikrotómmal (*MICROM HM 335E*), 3-amino-propil-treitoxi-szilánnal (APES) előkezelt tárgylemezre (*SuperFrost Ultra Plus Thermo*). A metszeteket 56°C-on egy éjszakán át szárítottuk, majd deparafinálás (xilol 2x5 min; leszálló alkoholsor: abszolút alkohol, 96 %-os etanol, 70 %-os etanol; desztillált H₂O) követően kuktában a maximális nyomás kialakulása után 3 percre főztük az antigén feltárás céljából magas pH-jú citrát pufferben (*Target Retrieval Solution, pH 9 10X Dako*).

A hipofizeális LHRH–R–I kimutatására egérben termeltetett monoklonális anti-LHRH–R–I antitestet használtunk (*NCL-GnRHR A9E4 NovoCastr*) 1:20 hígításban. Az alkalmazott antitest a humán hipofizeális LHRH–R–I 1-29 aminosavszekvenciájára specifikus. Az immunreakciót BondTM automatával (*NovoCastr Visionbiosystems BondTM*) végeztük el a rendszerrel kompatibilis kit (*BondTM Polymer Refine Detection Kit, NovoCastr Visionbiosystems BondTM*) segítségével. Az immunreakcióhoz alkalmazott kit tartalmazta az endogén H₂O₂ gátlásához, az aspecifikus reakciók gátlásához és az előhíváshoz szükséges reageneket. Az immunreakció előhívása torna – peroxidázzal (horseradish peroxidáz: HRP) konjugált polimer segítségével történt, melyhez a festék 3,3’-diaminobenzidin (DAB) volt. A háttér magfestést metilzölddel jelenítettük meg. Kontroll kísérletet végeztünk az aspecifikus reakciók és a háttérfestődés kizárása céljából, melynek során a primer antitestet kihagytuk az inkubáció során. Az immunreakció összefoglalását mutatja a **9. Ábra**.



9. Ábra: Az LHRH-R-I immunreakcióhoz használt kit működésének alapelve (*Bond™ Polymer Refine Detection Kit, NovoCastr Visionbiosystems Bond™*) (forrás: http://bsd.leica-microsystems.com/pdfs/misc/Bond_Refine_Brochure.pdf, Módosítva, átvéve).

2.4. Ligand kötési assay (LBA)

A fenti molekuláris biológiai vizsgálatokat funkcionális kísérletekkel is kiegészítettük, amelynek során a BPH szövetminták membránfrakciójában elhelyezkedő LHRH–receptorok ligand kötési vizsgálataira került sor. Ezen vizsgálatokat kollaborációs kísérletek során végeztük a Miami Egyetem Pathológiai Intézetével.

2.4.1. Kísérleti preparátumok – Membránpreparálás

A BPH szövetmintákat kis darabokra vágtuk és folyamatos hűtés mellett szöveti homogenizátorban (*Ultra-Turrax tissue homogenizer IKA Works, Wilmington, NC*) 50 mM Tris-HCl pufferben (pH 7.4) homogenizáltuk. A puffer proteáz inhibitorokat tartalmazott a fehérjebontó enzimek aktivitásának csökkentése céljából (0.25 mM fenil–metil–szulfonil–fluorid (PMSF), 0.4 v/v% aprotinin és 2 µg/ml pepstatin A). A nukleáris sejtösszetevőket és a lipid frakciót centrifugálással választottuk el, melynek során a szövet homogenizátumot 10 percig 500xg fordulatszámon 4 °C-on centrifugáltuk. Az üledéket friss pufferben kétszer szuszpendáltuk és ultracentrifugában (*Beckman L8-80 M*) 70,000xg fordulatszámon 50 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A pelletet homogenizáló pufferben reszuszpendáltuk és a ligand kötési tanulmányok elvégzéséig - 80 °C-on tároltuk. A fehérje koncentrációját Bradford módszerrel határoztuk meg Bio–Rad protein assay kit (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*) segítségével a gyártó leírásainak megfelelően.

2.4.2. Ligand kompetíciós vizsgálatok

2.4.3. A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorok ligand kötési tulajdonságainak vizsgálatai radioaktívan jódozott LHRH analóg ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) alkalmazásával direkt leszorítási vizsgálatok során

A radioaktívan jódozott LHRH analógot ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) chloramine-T módszerrel állítottuk elő és reverz fázisú HPLC-vel (High performance/pressure liquid chromatography nagy teljesítményű folyadékkromatográfia) tisztítottuk. Direkt leszorítási un. ligand kompetíciós vizsgálatok során radioaktívan jelölt LHRH liganddal ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) mértük a BPH membránfrakció ligand kötési tulajdonságait. 150 µl végtérfogatú elegyben

(50-60 μg fehérjekoncentráció) található receptorkötő helyeket 60-80000 percenkénti beütésszámú (counts per minute:cpm) [^{125}I][D-Trp⁶] LHRH liganddal inkubáltuk. A radioaktívan jelölt LHRH ligandot a kötési helyekről a jelöletlen LHRH ligand növekvő koncentrációival (10^{-12} – 10^{-6} M) szorítottuk le. Az inkubációt követően a szuszpenzió 125 μl -ét 1 mL jéghideg 1.5 %-os BSA-t (marha szérum albumin–bovine serum albumin) tartalmazó kötő pufferhez réteg felszínére pipettáztuk és szilikon polypropilénnel bevont centrifugacsőben (*Sigma-Aldrich*) 12000xg fordulatszámon 3 percig 4°C-on centrifugáltuk (*Beckman J2-21M*). A szilikon polypropilénnel bevont centrifugacső alján lévő pelletet leválasztottuk és a radioaktivitás detektálásához a percenkénti beütésszámot (cpm) gamma-counter készülékkel mértük (*Micromedic System, Huntsville, AL*). Előzetes kísérleteink során meghatároztuk azt a minimális fehérjekoncentrációt, mely szükséges a specifikus ligand kötési tanulmányok elvégzéséhez és elemzéséhez. Kísérleteink alapján a 150 μl végtérfogatú inkubációs elegyben 40-180 μg protein koncentráció volt a legmegfelelőbb a ligand kötési assay elvégzéséhez.

A direkt leszorítási vizsgálatok során az az LHRH antagonistá Cetorelix és az LHRH agonista Buserelin specifikus LHRH–receptor kötőhelyhez történő kompetícióját vizsgáltuk a BPH szövetminták membránfrakciójában. Ezekből a típusú vizsgálatokból következtettünk a BPH szövetminták membránfrakciójában található LHRH–receptorok specifitására is. Az LHRH agonista Buserelin és az LHRH antagonistá Cetorelix direkt leszorítási vizsgálatait összevetettük más peptidek, így az epidermális növekedési faktor (EGF: Epidermal Growth Factor), a szomatosztatin, [Tyr⁴]bombesin, a humán növekedési hormon – releasing hormon (GH–RH: human Growth Hormone–Releasing Hormone) és az inzulinszerű növekedési faktor–I (IGF–I: Insulin like Growth Factor–I) radioaktívan jelölt LHRH liganddal ([^{125}I][D-Trp⁶] LHRH) szembeni kompetícióival.

2.4.4. Matematikai analízis

A specifikus ligand kötési kapacitást és affinitást a Munsun és Rodbrand szerinti Ligand–PC “curve-fitting program” segítségével elemeztük (53). Meghatároztuk a receptor ligandkötését, az 50 %-os telítettséghez tartozó ligandkoncentrációt (IC_{50}), a disszociációs konstanst (K_d) és a receptor maximális kötési kapacitását (B_{max}). A mért adatokat Scatchard módszerrel analizáltuk (54), melynek segítségével a mért adatok feldolgozásakor a kapott telítési görbe matematikai átalakításokkal egyenessé alakítható, amiről a K_d és (B_{max}) érték

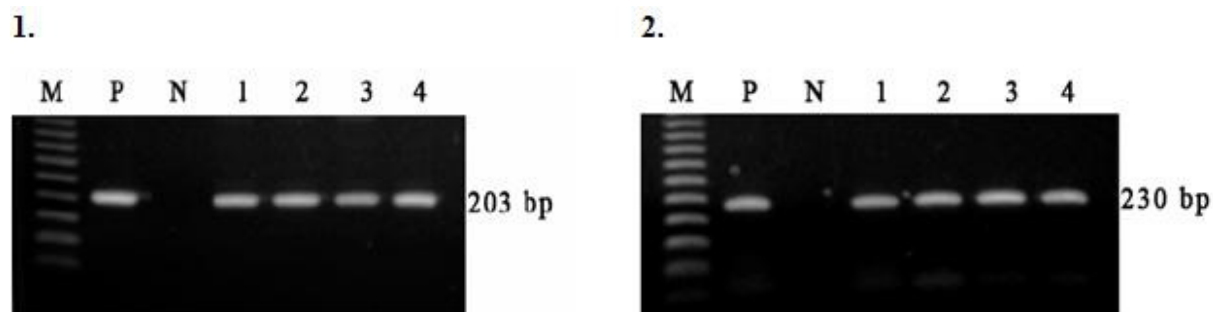
egyszerűen meghatározható. Az átalakítás lényege, hogy a kötött ligand mennyiségének függvényében ábrázoljuk a kötött/szabad radioaktívan jelölt ligand mennyiségét. Az így kapott egyenes meredeksége az $1/K_d$ értékét adja meg, a tengely metszete pedig a kötési kapacitást (B_{max}) mutatja.

V. Eredmények

1. Reverz transzkripciót követő polimeráz láncreakció (RT-PCR) mRNS expressziós eredmények

1.1. A humán beta-aktin (bACT) és a humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon ligand (LHRH-I) mRNS expressziója humán hipofízisben és BPH-ban

A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon–releasing hormon (LHRH-I) mRNS expressziójának mérése előtt a humán bACT housekeeping gén mRNS expressziójának mérésével igazoltuk a reverz transzkripció eredményességét. Minden minta pozitivitást mutatott a humán bACT mRNS expressziójára. Összesen 35 humán BPH szövetmintában és 3 pozitív kontrollként használt humán hipofízis mintában mértük RT-PCR segítségével a LHRH-I ligand mRNS expresszióját. Az mRNS expresszionális vizsgálataink célja az volt, hogy megállapítsuk, hogy a humán BPH szövetminták milyen mértékben expresszálják a humán LHRH-I ligandot a pozitív kontrollként vizsgált humán hipofízishez képest. A pozitív kontrollként használt humán hipofízis minták mindegyike pozitív volt LHRH-I mRNS expresszióra és a vizsgált 35 BPH mintából 18 mintában mértünk LHRH-I mRNS expressziót. Az LHRH-I mRNS expressziója 50 % feletti volt a vizsgált BPH mintákban, mely felveti az autokrin szabályozás lehetőségét. A vizsgált BPH minták klinikai adatainak és az LHRH-I mRNS expressziójának összefüggését a **2. Táblázat** foglalja össze. A humán LHRH-I ligand és a belső standard génként vizsgált humán bACT reprezentatív RT-PCR analízisét mutatja a be a **10. Ábra**. A humán bACT 203 bp-ral, a humán LHRH-I ligand 230 bp-ral amplifikálódik.



10.Ábra: A humán aktin- β (bACT) (1. panel) és a humán 1-es típusú Luteinizáló hormon–releasing hormon ligand (LHRH-I) (2. panel) specifikus primerpárokkal mért reprezentatív RT-PCR analízise humán hipofízisben és BPH-ban.

M: DNS marker (50 bp), P: pozitív kontroll (humán hipofízis szövet), N: no templát kontroll, 1-4: BPH minta (*forrás: Rózsa B. és mtsai. Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in benign prostatic hyperplasia (BPH) as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist cetorelix. The Prostate, 2010 (accepted, Article first published online: 21 SEP 2010 (56)).*

1.2. Az 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) mRNS expressziója humán hipofízisben és BPH-ban

mRNS expressziós vizsgálataink során RT–PCR segítségével mértük a humán LHRH–R–I expresszióját irodalomban közölt és saját tervezésű a humán LHRH–R–I génre specifikus primerpárok segítségével. mRNS expressziós vizsgálataink célja az volt, hogy összehasonlítsuk az LHRH–R–I mRNS expresszióját a humán BPH szövetmintákban és a pozitív kontrollként vizsgált humán hipofízis mintákban.

1.2.1. LHRH–R–I F1/R1 primerpárral mért mRNS expresszió humán hipofízisben és BPH-ban

RT–PCR-rel összesen 55 humán BPH szövetmintában (ebből 35 BPH szövetmintát a Debreceni Egyetem Orvos – és Egészségtudományi Centrum Urológiai Klinikájáról és 20 BPH szövetmintát kollaborációs kísérleteink során a Miami Egyetem Pathológiai Intézetétől gyűjtöttünk) és 3 humán hipofízis szövetmintában mértük a humán LHRH–R–I mRNS expresszióját az LHRH–R–I gén 1. exonjára tervezett LHRH–R–I F1/R1 primerpárral. Az LHRH–R–I F1/R1 primerpárral amplifikált termék nagysága 319 bp.

Az LHRH–R–I F1/R1 primerpárral a humán hipofízis minták mindegyike pozitív volt, míg a vizsgált 55 BPH szövetmintából 39 mintában (71 %) mértünk LHRH–R–I mRNS expressziót.

Mivel az LHRH–R–I F1/R1 primerpárral (1. exonra tervezett primerpár) a hipofizeális LHRH–R–I és az irodalomban igazolt két LHRH–R–I transzkript variáns azonos nagyságú termékkel (319 bp) amplifikálódik, ezért az amplifikált termék a hipofizeális LHRH–R–I illetve az irodalomban igazolt két LHRH–R–I transzkript variáns(ok) mRNS expressziójára is utalhat. Az LHRH–R–I F1/R1 primerpárral mért eredmények alapján nem igazolható egyértelműen a humán BPH szövetmintákban és hipofízis mintákban a hipofizeális teljes

LHRH–R–I és/vagy az irodalomban igazolt LHRH–R–I transzkript variáns(ok) mRNS expressziója.

1.2.2. LHRH–R–I F2/R3 primerpárral mért mRNS expresszió humán hipofízisben és BPH-ban

A humán LHRH–R–I gén 2. és 3. exonjára tervezett primerpárral (LHRH–R–I F2/R3) végzett RT–PCR mRNS receptoriális vizsgálataink célja az volt, hogy specifikusan mérjük milyen mértékű a hipofizeális LHRH–R–I mRNS expressziója a vizsgált 35 BPH szövetmintában a pozitív kontrollként használt humán hipofízis mintákhoz képest. Az LHRH–R–I F2/R3 primerpárral amplifikált termék nagysága 309 bp.

Az LHRH–R–I F2/R3 primerpárral mért humán LHRH–R–I mRNS expressziója a BPH mintákban jóval alacsonyabb incidenciájú volt az LHRH–R–I F1/R1 primerpárral mért mRNS expresszióhoz képest. A vizsgált 35 BPH mintából mindössze 5 minta (14 %) mutatott mRNS LHRH–R–I pozitivitást, míg a humán hipofízis minták mindegyike pozitív volt. Az LHRH–R–I F2/R3 primerpárral pozitív 5 BPH minta mRNS koexpressziót mutatott az 1. exonra tervezett LHRH–R–I F1/R1 primerpárral.

1.2.3. LHRH–R–I F1'/R2' sajáttervezésű primerpárral mért mRNS expresszió humán hipofízisben és BPH-ban

A saját tervezésű LHRH–R–I F1'/R2' primerpárral végzett RT–PCR mRNS receptoriális vizsgálataink céljai az alábbiak voltak:

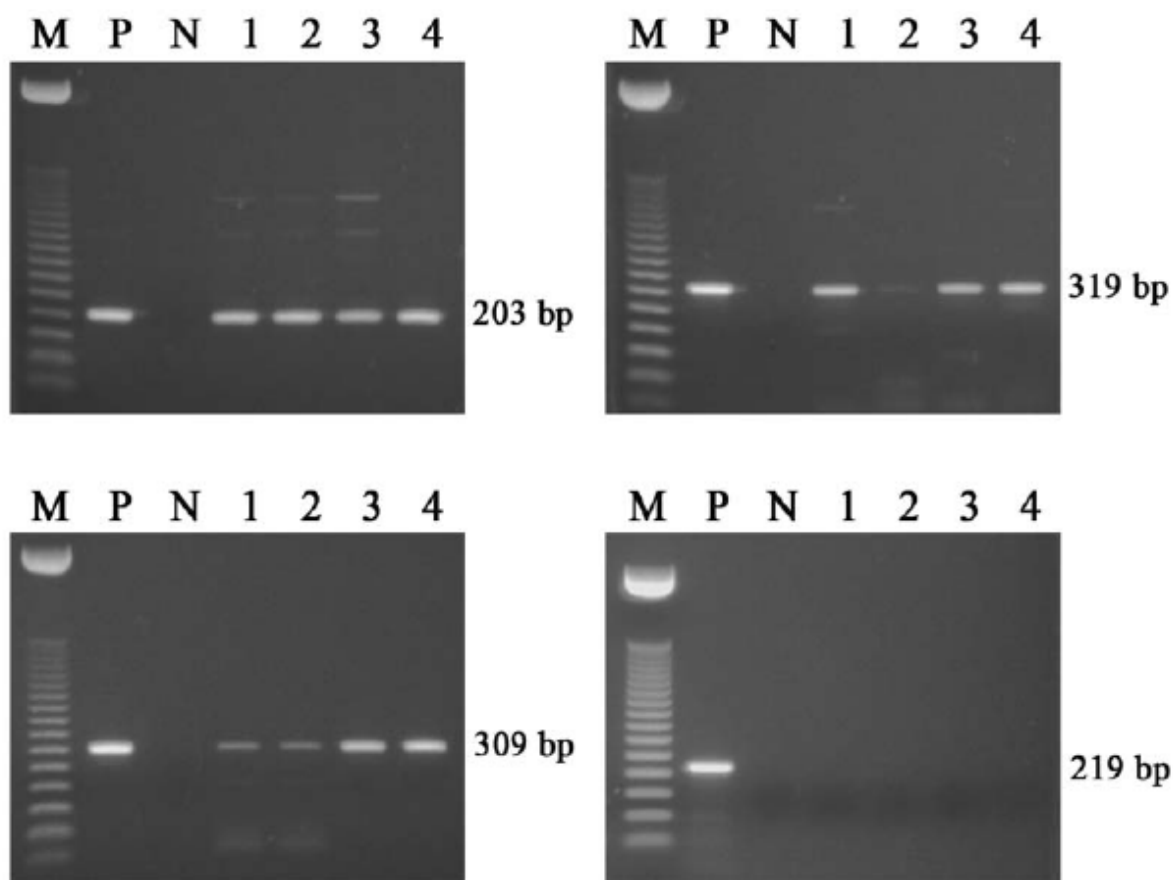
- A hipofizeális LHRH–R–I mRNS-szintű expressziójának igazolása abban az 5 BPH szövetmintában, amelyek mRNS koexpressziót mutattak LHRH–R–I F1/R1 és LHRH–R–I F2/R3 primerpárral. A hipofizeális teljes LHRH–R–I mRNS expressziója esetén az amplifikált termék 219 bp nagyságú.
- Az irodalomban igazolt LHRH–R–I sb2 transzkript variáns mRNS expressziójának igazolása abban a 16 BPH szövetmintában, amelyek mRNS LHRH–R–I pozitivitást mutattak az LHRH–R–I F1/R1 primerpárral, azonban az LHRH–R–I F2/R3 primerpárral nem voltak pozitívak. Az LHRH–R–I sb2 transzkript variáns mRNS expressziója esetén az amplifikált termék 91 bp nagyságú.

A hipofizeális, 219 bp-ral amplifikálódó LHRH-R-I mRNS expresszióját csak a humán hipofízis mintákban mértük. Abban az 5 BPH szövetmintában, amelyek mRNS koexpressziót mutattak LHRH-R-I F1/R1 és LHRH-R-I F2/R3 primerpárral, ezzel a primerpárral nem mértünk mRNS expressziót. Az LHRH-R-I sb2 transzkript variáns mRNS expresszióját nem mértük sem a humán hipofízis mintákban, sem a BPH szövetmintákban.

A humán hipofízisben és BPH-ban mért humán LHRH-R-I (három különböző primerpárral) és a belső standard génként vizsgált humán bACT reprezentatív RT-PCR analízisét mutatja a **11. Ábra**.

A vizsgált 35 BPH szövetminta klinikai adatait és a vizsgált humán bACT, a három különböző primerpárral mért humán LHRH-R-I (LHRH-R-I F1/R1, LHRH-R-I F2/R3, LHRH-R-I F1'/R2') és az LHRH-I ligand mRNS expresszióját foglalja össze a **2. Táblázat**.

A **3. Táblázat** a humán hipofízisben, míg a **4. Táblázat** a humán BPH szövetmintákban három különböző primerpárral mért humán LHRH-R-I (LHRH-R-I F1/R1, LHRH-R-I F2/R3, LHRH-R-I F1'/R2'), LHRH-I és bACT mRNS expresszióját foglalja össze.



11. Ábra: A humán bACT (1. panel) és az LHRH-R-I F1/R1 (2. panel), LHRH-R-I F2/R3 (3. panel) és LHRH-R-I F1'/R2' (4. panel) specifikus primerpárokkal mért reprezentatív RT-PCR analízis humán hipofízisben és BPH-ban. M: DNS marker (50 bp), P: pozitív kontroll (humán hipofízis szövet), N: no templát kontroll, 1-4: humán BPH minta (forrás: Rózsa B. és mtsai. *Expression of mRNA for human type-I LHRH receptor transcript forms in human benign prostatic hyperplasia* *Int. J. Oncology* 2009 (35): 1053-1059 (57)).

2. Táblázat: A vizsgált BPH szövetminták (n=35) klinikai adatai, a humán bACT, a három humán LHRH-R-I génre specifikus (LHRH-R-I F1/R1, LHRH-R-I F2/R3, LHRH-R-I F1'/R2') primerpárokkal mért LHRH-R-I és a humán LHRH- I ligand mRNS expressziója.

Minta azonosító száma	Életkor (év)	PSA-érték (ng/ml)	bACT	LHRH-R-I F1/R1	LHRH-R-I F2/R3	LHRH-R-I F1'/R2'	LHRH-I
1.	81	-	+	+	+	-	+
2.	55	0.45	+	+	-	-	-
3.	82	normál	+	+	-	-	+
4.	70	3.52	+	+	+	-	+
5.	71	6.62	+	+	-	-	+
6.	65	emelkedett	+	+	+	-	-
7.	73	9.45	+	+	-	-	+
8.	66	NA	+	+	-	-	+
9.	62	NA	+	+	-	-	-
10.	70	1.12	+	+	-	-	+
11.	65	NA	+	+	-	-	+
12.	70	0.5	+	+	-	-	-
13.	56	10-12	+	+	-	-	-
14.	64	2.4	+	+	-	-	-
15.	73	1.56	+	+	-	-	+
16.	76	normál	+	+	-	-	-
17.	77	0.92	+	+	-	-	-
18.	55	NA	+	-	-	-	-
19.	67	3.21	+	-	-	-	-
20.	59	NA	+	-	-	-	-
21.	74	NA	+	-	-	-	+
22.	61	NA	+	-	-	-	+
23.	75	1.57	+	+	-	-	+
24.	74	3.76	+	+	-	-	-
25.	75	10.84	+	-	-	-	-
26.	73	NA	+	+	-	-	+
27.	68	3.84	+	-	-	-	+
28.	67	NA	+	-	-	-	-
29.	69	NA	+	+	+	-	-
30.	75	NA	+	+	+	-	+
31.	62	NA	+	-	-	-	-
32.	67	0.3	+	-	-	-	-
33.	58	NA	+	-	-	-	+
34.	76	2.26	+	-	-	-	+
35.	55	NA	+	-	-	-	+

NA: Nem áll rendelkezésre adat

 : az LHRH-R-I F1/R1 és LHRH-R-I F2/R3 primerpárokkal LHRH-R-I mRNS koexpressziót mutató minták

 az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral LHRH-R-I mRNS expressziót mutató minták

3. Táblázat: A humán hipofízisben három különböző primerpárral mért humán LHRH-R-I (LHRH-R-I F1/R1, LHRH-R-I F2/R3, LHRH-R-I F1'/R2'), LHRH-I és bACT mRNS expressziója.

Gén	Pozitív mintaszám/ Teljes mintaszám	Pozitivitás (%)
bACT	3/3	100
LHRH-R-I F1/R1	3/3	100
LHRH-R-I F2/R3	3/3	100
LHRH-R-I F1'/R2'	3/3	100
LHRH-I	3/3	100

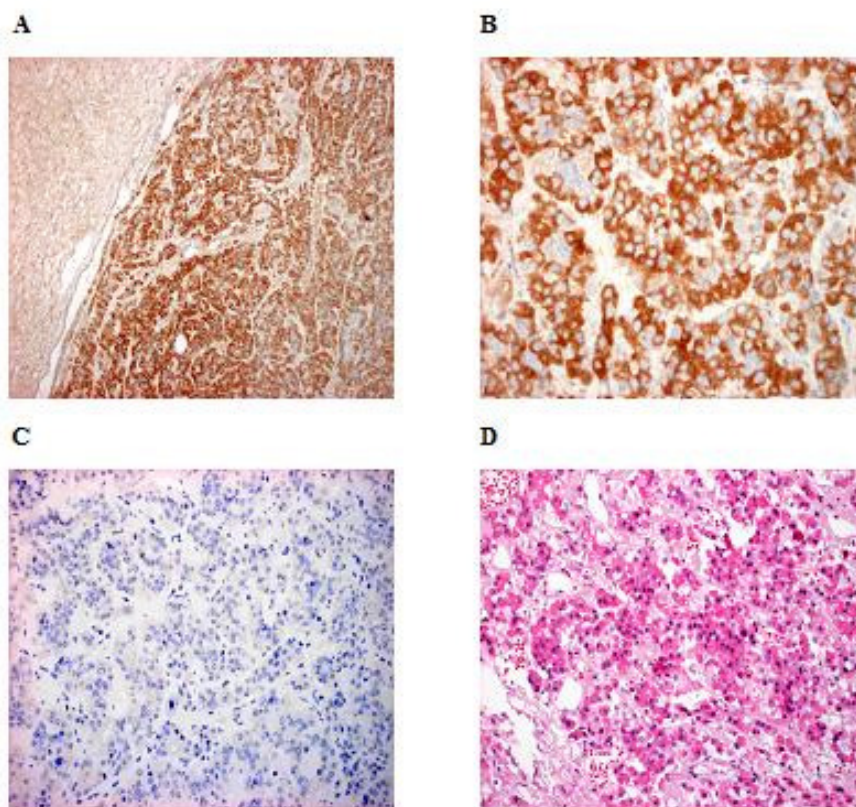
4. Táblázat: A humán BPH-ban három különböző primerpárral mért humán LHRH-R-I (LHRH-R-I F1/R1, LHRH-R-I F2/R3, LHRH-R-I F1'/R2') LHRH-I és bACT mRNS expressziója.

Gén	Pozitív mintaszám/ Teljes mintaszám	Pozitivitás (%)
bACT	35/35	100
LHRH-R-I F1/R1	21/35	60
LHRH-R-I F2/R3	5/35	14
LHRH-R-I F1'/R2'	0/35	0
LHRH-I	18/35	51

2. Immunhisztokémiai eredmények

2.1. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) immunreakció kvalitatív értékelése humán hipofízisben

A metszeteket Olympus BX51 mikroszkóppal elemeztük és Olympus DP50 digitális kamerával fényképeztük (*Olympus Europe, Hamburg, Germany*). A pozitív kontrollként használt humán adenohipofízisben a humán LHRH–R–I expressziója jelentősen magasabb volt, mint a neurohipofízisben. Humán LHRH–R–I fehérje pozitivitást elsősorban humán adenohipofízis acidofil sejtjei mutattak.

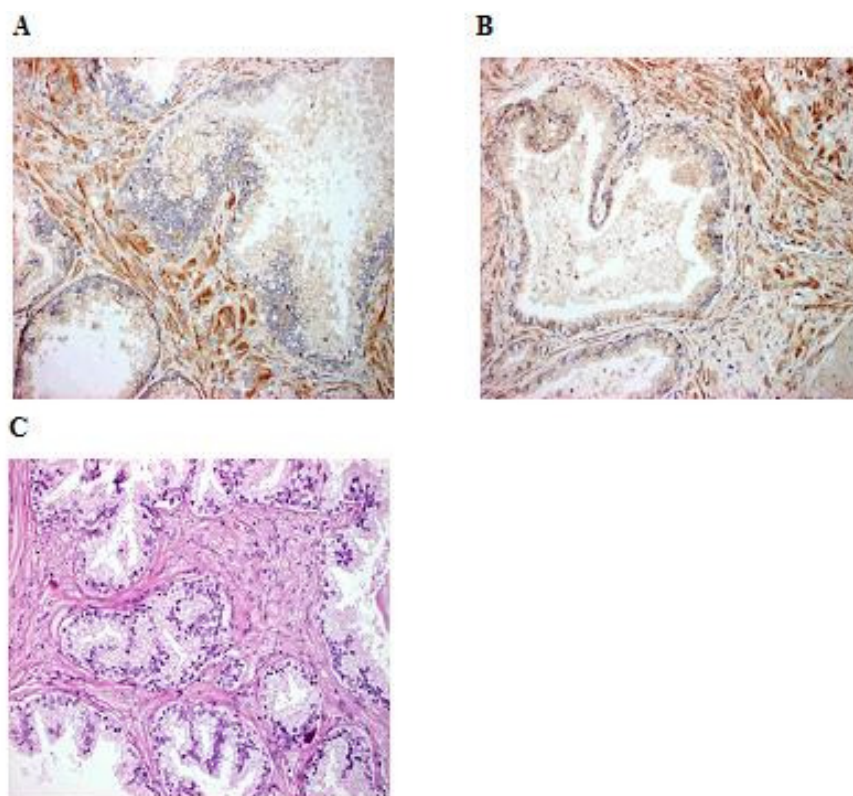


12. Ábra: A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) expressziója humán hipofízisben. . A sejtmagok festése metilzölddel történt, a nukleusz kékkel festődik. Az immunreakcióhoz használt kitben a festék DAB volt, a pozitív LHRH–R–I immunreakció barna színnel festődik. **A.** Humán adenohipofízis és neurohipofízis LHRH–R–I immunreakciója 20x nagyításban. **B.** A humán adenohipofízis LHRH–R–I immunreakciója 40x nagyításban. **C.** A humán adenohipofízis kontroll reakciója 20x nagyításban. A kontroll kísérletekben a primer antitestet kihagytuk inkubálás során.

A kontroll kísérletek során **(C.)** nem tapasztaltunk pozitív immunreakciót. **D.** A humán adenohipofízis hematoxin-eosin festése 20x nagyításban. A nukleusz kék a citoplazma rózsaszín színnel festődik.

2.2. A humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) immunreakció kvalitatív értékelése humán BPH szövetmintában

A BPH mintákban a hipofizeális humán LHRH–R–I expressziója a pozitív kontrollként vizsgált humán hipofízisben mért LHRH–R–I expressziójához képest alacsony volt. A BPH mirigyhámsejtek nem mutattak pozitivitást a hipofizeális LHRH–R–I fehérjére, azonban a BPH sztrómasejtekben ugyan alacsony mértékű, de LHRH–R–I pozitivitás megfigyelhető.



13. Ábra: Két reprezentáns humán BPH szövetmintában mért humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH–R–I) expressziójának kvalitatív immunreakciója 20x nagyításban. A sejtmagok festése metilzölddel történt, a nukleusz késsel festődik. Az immunreakcióhoz használt kitben a festék DAB volt, a pozitív LHRH–R–I immunreakció barna színnel festődik. **A. és B.** Humán BPH szövetminta LHRH–R–I immunreakciója 20x nagyításban. **C.** Humán BPH szövetminta hematoxin-eosin festése 20x nagyításban. A nukleusz kék a citoplazma rózsaszín színnel festődik (forrás: Rózsa B. és mtsai. *Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in benign prostatic hyperplasia (BPH) as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist cetrorelix. The Prostate, 2010 (accepted, Article first published online: 21 SEP 2010 (56)).*

Az immunohisztokémia során alacsony LHRH–R–I pozitivitást mutató két reprezentatív BPH szövetminta (**2. Táblázat**: 14. és 16.) pozitivitást mutatott LHRH–R–I F1/R1 primerpárral mért LHRH–R–I mRNS expresszióra, azonban az LHRH–R–I F2/R3 és a sajáttervezésű LHRH–R–I F1'/R2' primerpárral nem mértünk ebben a két BPH szövetmintában pozitivitást. Az LHRH–I ligand mRNS expressziót szintén nem mértünk ebben a két BPH mintában.

3. A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorok ligand kötési tulajdonságai radioaktívan jódozott LHRH analóg ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) alkalmazásával kompetíciós ligand assay során

A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorok funkcióképességének vizsgálatát kompetíciós ligand kötési assay során a Miami Egyetem Patológiai Intézetével folytatott kollaborációs munka során végeztük el.

A kompetitív ligand kötési assay során a radioaktívan jelölt LHRH ligand ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) és a jelöletlen LHRH ligand kompetíciós tulajdonságait vizsgáltuk a BPH szövetminták membránfrakcióiban. A vizsgált 20 BPH szövetmintából 18-ban mértünk LHRH–receptor kötést (90 %) (**5. és 6. Táblázat**). A standard leszorítási görbe céljából a jelöletlen LHRH ligand növekvő koncentrációit (10^{-12} – 10^{-6} M) alkalmaztuk. A 18 LHRH–receptor kötést mutató BPH szövetmintában Munsun és Rodbrand szerinti Ligand-PC “curve-fitting program” és Scatchard analízis segítségével határoztuk meg a disszociációs konstans (K_d) és a receptor maximális kötési kapacitását ($B_{\max}$). A K_d értéke: 4.04 nM (1.09 - 7.26 nM) volt, a $B_{\max}$ értéke: 527.6 fmol/mg membránprotein (344.7 - 900.2 fmol/mg protein) volt. A radioaktívan jelölt LHRH ligand ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) kötődése reverzibilis, idő-, és hőmérsékletfüggő volt. A ligand kötési kapacitás egyenes arányosságban volt a BPH minták fehérjekoncentrációival (ezek az utóbbi adatok nem szerepelnek a dolgozatban).

A BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorokon megvizsgáltuk az utóbbi évek során egyik leginkább tanulmányozott LHRH antagonistá analóg, a Cetrorelix receptor kötési tulajdonságát. Az LHRH antagonistá analóg Cetrorelix leszorította a radioaktívan jelölt LHRH-t ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH). Meghatároztuk az 50 %-os receptor gátláshoz tartozó koncentrációt (IC_{50}). Az IC_{50} értéke: 0.94 ± 0.07 nM volt. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a BPH szövetminták membránjában elhelyezkedő LHRH–receptorok nagy ligand kötési affinitással kötik a terápiában potenciálisan alkalmazható LHRH antagonistá Cetrorelixet (**14. Ábra**).

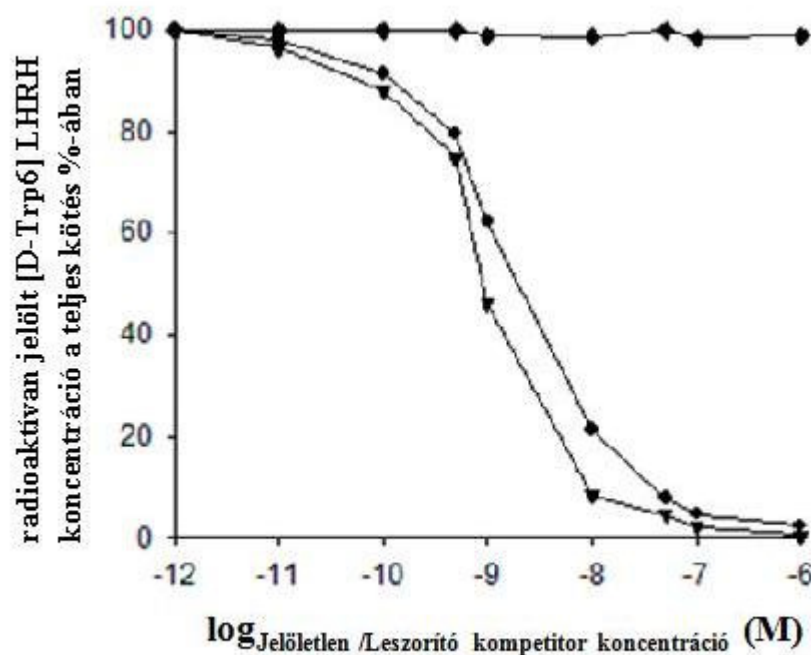
A Miami Egyetem Patológiai Intézetével folytatott kollaborációs munka során

további 20 BPH szövetmintában mértük az LHRH–R–I mRNS expresszióját a humán LHRH–R–I gén 1. exonjára tervezett LHRH–R–I F1/R1 primerpárral. A vizsgált 20 BPH szövetmintából 18 mintában (90 %) mértünk az LHRH–R–I mRNS expresszióját. Az LHRH–R–I mRNS expresszióra és a ligand kötési assay-re pozitív BPH szövetminták korrelációt mutattak. Az a két BPH szövetminta, amely negatív volt LHRH–R–I mRNS expresszióra, a ligand kötési assay során is negativitást mutatott (5. Táblázat, 6. Táblázat).

A vizsgált BPH minták klinikai adatait az mRNS expresszió és/vagy a ligand kötési assay között nem volt korreláció.

A ligand kötési assay során az LHRH antagonistá analóg Cetrorelix és az LHRH agonista analóg Buserelin LHRH receptorra kifejtett hatását vizsgáltuk.

Háromszor ismételt – egybevágó kísérletsorozat reprezentatív eredményeit ábrázolja a 14. Ábra. A kísérleteket BPH szövetminták membránpreparátumán végeztük el.



14. Ábra: A radioaktívan jelölt LHRH–I ligand ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) direkt leszorítási vizsgálata a BPH szövetminták membránfrakcióiban elhelyezkedő LHRH–receptorok kötési helyeiről.

▼: Cetrorelix – LHRH antagonistá analóg

●: Buserelin – LHRH agonista analóg

◆: natív/jelöletlen peptidek:

- EGF: epidermális növekedési faktor (Epidermal Growth Factor)
- szomatosztatin
- [Tyr⁴]bombesin
- GH–RH: humán növekedési hormon – releasing hormon (human Growth Hormone – Releasing Hormone)
- IGF-I: inzulinszerű növekedési faktor-I (Insulin like Growth Factor-I)

(forrás: Rózsa B. és mtsai. *Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in benign prostatic hyperplasia (BPH) as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist cetrorelix. The Prostate, 2010 (accepted, Article first published online: 21 SEP 2010 (56)).*

A BPH szövetminták membránfrakcióiban az LHRH antagonista analóg Cetrorelix és az LHRH agonista analóg Buserelin növekvő koncentrációi leszorították a radioaktívan jelölt LHRH-t ([¹²⁵I][D-Trp⁶] LHRH). Azonban más natív/jelöletlen peptidek, mint az EGF, a [Tyr⁴]bombesin, a GH–RH és az IGF-I nem voltak képesek leszorítani a radioaktívan jelölt LHRH ligandot ([¹²⁵I][D-Trp⁶] LHRH) a kötési helyéről.

5. Táblázat: A vizsgált BPH szövetminták (n=20) klinikai adatainak, a humán bACT, az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral mért LHRH-R-I és az LHRH-I ligand mRNS expressziójának valamint a ligand kötési assay eredményeinek összefoglalása

Minta azonosító száma	Életkor (év)	PSA- érték (ng/ml)	bACT mRNA	LHRH-R-I F1/R1 mRNA	B _{max} (fmol/mg protein)	K _d (nM)
1.	53	3.53	+	+	425.3	1.28
2.	62	2.57	+	+	344.7	2.71
3.	79	0.98	+	+	495.1	6.03
4.	65	3.41	+	+	352.9	3.95
5.	81	6.42	+	+	721.8	5.02
6.	64	1.67	+	+	581.6	4.09
7.	72	8.15	+	-	-	-
8.	55	2.53	+	+	900.2	3.61
9.	69	1.86	+	+	733.4	7.26
10.	71	2.32	+	+	482.9	1.63
11.	58	0.35	+	+	640.7	6.26
12.	75	0.83	+	+	474.8	2.17
13.	57	4.77	+	+	600.5	4.00
14.	74	2.26	+	+	398.3	1.37
15.	69	4.06	+	+	415.2	4.77
16.	52	0.75	+	+	364.6	1.09
17.	73	3.86	+	+	483.7	6.20
18.	66	0.49	+	-	-	-
19.	80	6.17	+	+	623.9	6.26
20.	76	3.78	+	+	458.0	5.05

7. : az LHRH-R-I mRNS expresszióra és a ligand kötési assayre negatív minták

(forrás: Rózsa B. és mtsai. *Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in benign prostatic hyperplasia (BPH) as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist cetrorelix. The Prostate, 2010 (accepted, Article first published online: 21 SEP 2010 (56)).*

6.Táblázat: A vizsgált BPH minták (n=35+20; n=55) klinikai adatainak, az mRNS expresszió (humán bACT, LHRH-R-I F1/R1 primerpárral mért LHRH-R-I és LHRH-I) és a ligand kötési assay eredményeinek összefoglalása.

Gén	Pozitív mintaszám/ Teljes mintaszám	Pozitivitás (%)	Életkor (év)
bACT	55/55	100	51-83
LHRH-R-I F1/R1	39/55	71	51-82
LHRH-I	18/35	51	54-79
LHRH-R-I receptor kötés	18/20	90	52-81

(forrás: Rózsa B. és mtsai. *Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in benign prostatic hyperplasia (BPH) as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist cetrorelix. The Prostate, 2010 (accepted, Article first published online: 21 SEP 2010 (56)).*

VI. Diszkusszió

A benignus prosztata hiperplázia (BPH) az idősebb férfiak leggyakoribb betegsége. Az érintettek számát tekintve a BPH-t népbetegségnek kell tekinteni. A BPH etiológiája multifaktoriális, a kialakulását elsősorban az életkor és a hormonális változások határozzák meg. Az epidemiológiai tanulmányok alapján a tünetekkel érintettek száma az életkor előrehaladtával évtizedenként megduplázódik (15). A jelenlegi irodalmi adatok, klinikai tapasztalatok, valamint a betegség okozta komplikációk alapján a betegséget progresszívnek tekintik. A kockázat-elemző és longitudinális tanulmányok (Olmsted Country, PLESS) alapján a legfontosabb rizikófaktorok az életkor, a PSA-szint és a prosztata volumene. Ezen tényezők segítségével meghatározható a magasabb kockázati csoportba sorolható betegek köre.

A daganatos betegségekben szenvedők száma továbbra is évről évre emelkedik, ezért a háttérben álló molekuláris mechanizmusok vizsgálata és tisztázása egyre inkább sürgetővé válik. A daganatos betegségek során végbemenő molekuláris mechanizmusok ismeretében pontosabb diagnosztikai és hatékonyabb terápiás lehetőségek kifejlesztésére nyílt lehetőség. A 70-es évek elején két egymástól független kutatócsoport azonosította az adenohipofízis hormon elválasztásra ható gonadotropin termelését szabályozó Luteinizáló hormon – releasing hormont (LH–RH, LHRH–I, GnRH, GnRH–I). A kutatások fontosságát jelzi, hogy 1977-ben mindkét kutatócsoport vezetőjét, Andrew V. Schallyt és Roger C.L. Guillemint is orvosi Nobel–díjjal jutalmazták.

Ezzel egyidőben megindultak a kutatások abba az irányban, hogy egyes aminosavak kicserélésével az eredeti LHRH molekulánál hatásosabb LHRH analógokat fejlesszenek ki. A fejlesztések hatására először agonista LHRH analógokat szintetizáltak, melyek közül több viszonylag gyorsan gyógyszer formájában is hozzáférhetővé vált. A klinikumban használható antagonist LHRH analógok kifejlesztése hosszabb időt vett igénybe, azonban már néhány éve ezek is hozzáférhetőek gyógyszer formájában. Eri LM. és munkatársai a BPH-ban szenvedő betegek LHRH agonista analógokkal történő kezelése során igazolták, hogy az LHRH agonista terápia hatásaként a tesztoszteron szint jelentősen (kasztrációs szintre) lecsökken, az alsó húgyúti tünetek (LUTS) javulása azonban csak csekélyebb mértékű (14). Az adenohipofízis gonadotrop sejt felszíni 1-es típusú LHRH–receptorok telítődnek az LHRH agonista analógok hatására, melynek következménye a receptorok deszenzitizációja és „downregulációja”/alulszabályozása. A kezdeti megnövekedett LH és FSH elválasztást/release-t (úgynevezett „flare up” jelenség), majd az LH és FSH termelés (le)csökkenése követi, így következményesen csökken a gonádok hormon termelése is.

Az LHRH agonista analógok tehát közvetve csökkentik a tesztoszteron termelődését. A prosztata karcinóma kezelésében az LHRH agonista analógokkal történő kezelés előnyös vagy előnyösebb lehet más terápiával szemben, azonban a BPH hosszútávú kezelésében nem bizonyultak hatékony, biztonságos vegyületeknek. Bár az LHRH agonista analógokkal kezelt BPHs betegek szérum dihidrotesztoszteron szintje és prosztata mérete csökken, a vizelet ürítési valamint az erektilis funkciók rövidtávon javulnak, hat hónappal az LHRH agonista analógokkal történő kezelést követően a prosztata mérete közel azonos lesz az LHRH agonista analógokkal történő kezelése előtti mérettel (32, 57).

Az LHRH antagonistá analógok válhatnak új, hatékony gyógyszermolekulákká a BPH illetve a prosztata karcinóma kezelésében. Az LHRH antagonistá analógok „flare up jelenség” nélkül, direkt módon, reverzibilisen gátolják az adenohipofízis gonadotróp sejtjeinek sejt felszíni LHRH receptorait. LHRH antagonistá analógokkal történő kezelés hatására azonnal csökken az LH és FSH termelés és következményesen a gonádok hormon termelése is (32, 33, 57). Az LHRH antagonistá analógokkal történő kezelés során így nem szükséges a kezelést megelőző antiandrogén kezelés sem. A BPH kezelésében alkalmazható LHRH antagonistá analógok közül a Cetrorelixet vizsgálták a legbehatóbban (23, 24, 57), azonban a Cetrorelix BPH-ban történő klinikai alkalmazásához további randomizált összehasonlító tanulmányok elvégzése szükséges.

Számos kísérleti és klinikai vizsgálat eredménye igazolja, hogy kimutatható az LHRH-I ligand jelenléte humán BPH-ban (23, 32, 58-61). A funkcionális hipofizeális LHRH-R-I extrahipofizeális expresszióját igazoló irodalmi adatok azonban limitáltak (12-13). Számos kutatócsoport vizsgálta a humán LHRH-R-I mRNS expresszióját, de az mRNS expressziós mérésekhez használt primereket általában nem a teljes LHRH-R-I génre tervezték és receptorális fehérje vizsgálataikat a rendelkezésre álló nem minden tekintetben specifikus antitestekkel végezték. A molekuláris biológiai vizsgálatok mellett számos funkcionális vizsgálat igazolja, hogy a humán BPH szövetminták membránjában jelen vannak a funkcionális, ligand kötéssel rendelkező LHRH-receptorok. Az azonban, hogy ez a receptor a hipofizeális LHRH-R-I receptor vagy annak valamely izoformja, még nem tisztázott. Ezért tűzte ki célul kutatócsoportunk, hogy mind irodalomban közölt, mind saját tervezésű primerpárral méri az LHRH-R-I mRNS expresszióját az irodalmi adatok összevetése és a specifikusabb mRNS expresszió meghatározása céljából.

Az irodalomban eddig két humán LHRH-R-I transzkript variáns expresszióját igazolták. A humán LHRH-R-I gén 2. exonjának teljes deléciója (220 bp) következtében jön létre a gén kisebb LHRH-R-I sb3 transzkript variánsa, míg az LHRH-R-I sb2 transzkript

variáns a 2. exon 128 bp-os deléciója következtében alakul ki (12-13). A transzkript variánsokról transzlálódó fehérje izoformok is eltérnek a teljes LHRH-R-I génről átíródó 7 TM-mel rendelkező hipofizeális proteintól.

Eddigi irodalmi adatok csak az LHRH-R-I sb2 transzkript variánsról igazoltak transzlációt. Az sb2 transzkript variánsról egy 5 TM-mel rendelkező fehérje izoform jön létre. LHRH-R-I sb3 transzkript variánsról eddig nem igazoltak transzlációt. Az sb3 mRNS expresszióját egérben mutatták ki (40).

A humán BPH szövetmintákban a humán hipofízis mintákhoz képest vizsgáltuk a humán LHRH-R-I mRNS expresszióját három, a humán LHRH-R-I gén különböző szekvenciáira tervezett specifikus primerpárral.

A humán LHRH-R-I mRNS expressziós vizsgálataink céljai az alábbiak voltak:

- A vizsgált BPH szövetmintákban a kontrollként használt hipofízis szövetekhez képest van-e különbség:

- a humán hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) mRNS expressziójában
- a humán hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor (LHRH-R-I) irodalmi adatok alapján igazolt transzkript variánsai (sb2, sb3) mRNS expressziójában
- Létezik-e/léteznek-e a humán hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló Hormon – releasing hormon receptornak (LHRH-R-I) irodalmi adatok alapján igazolt sb2 és sb3 transzkript variánsokon kívül több transzkript variánsa humán hipofízisben illetve BPH-ban.

A humán LHRH-R-I mRNS expressziójának mérését a humán LHRH-R-I gén 1. exonjára tervezett primerpárral kezdtük, mivel erre állt rendelkezésre a legtöbb irodalmi hivatkozás. Összesen 55 humán BPH szövetmintában és 3 humán hipofízis szövetmintában mértük a humán LHRH-R-I mRNS expresszióját az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral. A pozitív kontrollként használt minták mindegyike pozitív volt LHRH-R-I F1/R1 primerpárral, míg a vizsgált 55 BPH mintából 39 mintában (71 %) mértünk LHRH-R-I mRNS expressziót.

A humán LHRH-R-I gén 1. exonjára tervezett primerpárral végzett RT-PCR során a hipofizeális LHRH-R-I, a két LHRH-R-I transzkript variáns, valamint a gDNS kontamináció következtében amplifikálódó PCR termékek nagysága azonos lesz (319 bp). A specifikusabb mRNS expressziós eredmények mérésének céljából a humán LHRH-R-I gén 2. és 3. exonjára tervezett primerpárral folytattuk méréseinket. A forward (F) primert a humán LHRH-R-I gén 2. exonjának olyan szekvenciájára tervezték, mely az irodalomban igazolt két

LHRH-R-I transzkript variánsban (sb2, sb3) nincs jelen, ezért ezzel a primerpárral csak a hipofizeális teljes hosszúságú LHRH-R-I mRNA expressziója mérhető (309 bp), az irodalmi adatok alapján igazolt sb2 és sb3 transzkript variáns mRNA expressziója nem. Az LHRH-R-I F2/R3 primerpárral végzett RT-PCR mRNA receptoriális vizsgálataink célja az volt, hogy specifikusan meghatározzuk a hipofizeális teljes hosszúságú LHRH-R-I mRNA expresszióját a vizsgált BPH szövetmintában a kontroll hipofízis mintákhoz képest. A hipofízis minták pozitivitást mutattak ezzel a primerpárral, azonban a vizsgált 35 BPH szövetmintákban nagyon alacsony mRNA LHRH-R-I pozitivitást mértünk. Mindössze 5 BPH mintában tudtuk az mRNA LHRH-R-I expressziót detektálni. Ezekben a mintákban az 1. exonra tervezett LHRH-R-I F1/R1 primerpárral is pozitív eredményt mértünk.

Kutatócsoportunk a humán LHRH-R-I gén 1. és 2. exonjára egy új, irodalomban ezidáig nem közölt LHRH-R-I primerpárt tervezett. Az LHRH-R-I F1'/R2' primerpárral végzett RT-PCR méréseink céljai az alábbiak voltak:

- Igazolni az LHRH-R-I F1/R1 és LHRH-R-I F2/R3 primerpárokkal együttes LHRH-R-I mRNA pozitivitást mutató 5 BPH szövetmintákban a humán hipofizeális teljes LHRH-R-I mRNA expresszióját (219 bp)
- Igazolni, a csak az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral pozitivitást mutató 16 BPH szövetmintákban a humán LHRH-R-I sb2 mRNA expresszióját (91 bp).

Mindhárom pozitív kontroll hipofízis mintában kimutattuk a 219 bp-os termékkel amplifikálódó hipofizeális teljes hosszúságú LHRH-R-I mRNA expresszióját. A 91 bp-ral amplifikálódó LHRH-R-I sb2 transzkript variáns mRNA expresszióját azonban nem detektáltuk. A vizsgált 35 BPH mintában nem mértünk pozitivitást ezzel a primerpárral, abban az 5 BPH mintában sem, melyek koexpressziót mutattak az LHRH-R-I F1/R1 és LHRH-R-I F2/R3 primerpárokkal.

A három humán LHRH-R-I génre specifikus primerpárral mért mRNA LHRH-R-I expressziós eredmény alapján kutatócsoportunk azt feltételezi, hogy a humán LHRH-R-I gén 1. exonja végén is történik delécio és a humán LHRH-R-I génnek az irodalmi adatok alapján igazolt két transzkript variánson kívül több transzkript variánsa is létezik, human BPH szövetben. Ezen hipotézisünket nukleotid szekvencia analízissel tervezzük a későbbiek során igazolni. Amennyiben BPH-ban sikerülne bizonyítani egy hipofízisben nem expresszáldó humán LHRH-R-I transzkript variánst, az további kérdéseket vet(het)ne fel.

Amennyiben a hipotetikus, BPH-ban expresszáldó „új” humán LHRH-R— transzkript variánsról történik transláció és a translálódó humán LHRH-R-I izoform funkcióképes, azaz ligandkötési tulajdonsággal rendelkezik, lehetőség nyílik a célzott terápia megvalósítására.

Összesen 35 humán BPH szövetmintában és 3 humán hipofízis szövetmintában mértük a humán LHRH-I mRNS expresszióját RT-PCR segítségével irodalomban közölt primerpárral. mRNS expresszionális vizsgálataink célja az volt, hogy meghatározzuk a humán LHRH-I ligand mRNS expresszióját a humán BPH szövetmintákban a humán hipofízis mintákban mért expresszióhoz képest. A humán hipofízis minták mindegyike pozitív volt LHRH-I mRNS expresszióra és a vizsgált 35 BPH mintából 18-ban (51 %) mértünk LHRH-I ligand mRNS expressziót. A magas LHRH-I mRNS expresszió felveti az autokrin szabályozás lehetőségét.

A BPH szövetmintákban immunhisztokémiával ellenőriztük, hogy a hipofizeális teljes hosszúságú 7 TM-mel rendelkező LHRH receptor-I és/vagy a receptor valamely izoformja van-e jelen. Az IHC mérésekhez a hipofizeális LHRH-R-I-re specifikus monoklonális antitestet használtunk. A pozitív kontrollként használt humán hipofízis elülső lebenyében található acidofil sejtek expresszálták legnagyobb mértékben az LHRH-R-I-t, ehhez képest a hipofízis hátulsó lebenyében mért LHRH-R-I expresszió jóval alacsonyabb volt. A BPH mintákban a hipofizeális LHRH-R-I expressziója a pozitív kontrollhoz viszonyítva alacsony volt. A BPH mirigyhámsejtek nem expresszálták az LHRH-R-I fehérjét. Azonban a BPH sztrómasejtek pozitivitást mutattak a vizsgált LHRH-R-I expressziójára. A monoklonális, hipofizeális LHRH-R-I-re specifikus antitesttel mért immunhisztokémiai eredményeink megerősítették azt a hipotézisünket, mely szerint extrahipofizeálisan a BPH szövetmintákban nem a hipofizeális 7 TM-mel rendelkező LHRH-R-I, hanem ennek a receptornak valamely izoformja expresszáldik. Az immunhisztokémia során LHRH-R-I pozitivitást mutató két reprezentatív BPH szövetminta (**2. Táblázat:** 14. és 16.) pozitivitást mutatott LHRH-R-I F1/R1 primerpárral mért LHRH-R-I mRNS expresszióra. Azonban az LHRH-R-I F2/R3 és a sajáttervezésű LHRH-R-I F1'/R2' primerpárral nem mértünk ebben két BPH szövetmintában pozitivitást. Az LHRH-I ligand mRNS expressziót szintén nem mértünk ebben a két BPH mintában.

A molekuláris biológiai vizsgálatokat funkcionális kísérletekkel is kiegészítettük, amelynek során a BPH szövetminták membránfrakciójában elhelyezkedő LHRH-receptorok ligand kötését tanulmányoztuk. Ezeket a vizsgálatokat kollaborációs munka keretében végeztük a Miami Egyetem Pathológiai Intézetével. Az LHRH-receptorok ligand kötési tulajdonságait 20 BPH szövetminta membránfrakciójában mértük radioaktív jóddal jelölt LHRH analóg ($[^{125}\text{I}][\text{D-Trp}^6]$ LHRH) alkalmazásával ligand kompetíciós assay segítségével. A vizsgált 20 BPH szövetmintából 18 membránfrakciójában (90 %) sikerült specifikus LHRH-receptor jelenlétét igazolni. A standard leszorítási görbe céljából a ligand növekvő koncentrációit alkalmaztuk. A vizsgált BPH mintákban meghatároztuk a receptorok affinitására utaló disszociációs konstans értéket (K_d) és a receptor maximális kötési kapacitását ($B_{\max}$).

Az utóbbi évek során az egyik leginkább tanulmányozott LHRH antagonistá Cetrorelix és emellett egy ismert LHRH agonista (Buserelin) humán BPH szövetekben expresszáldó LHRH receptorokhoz történő kötésének affinitását is meghatároztuk. Vizsgálatainkban az LHRH antagonistá Cetrorelix nagy affinitással leszorította a radioaktívan jelölt $[\text{D-Trp}^6]$ LHRH-t így meghatároztuk az 50 %-os receptor leszorításhoz/gátláshoz tartozó koncentrációt (IC_{50}) is. Az LHRH-receptorok funkcionális eredményei arra utalnak, hogy a BPH szövetmintákban expresszáldó LHRH receptorok erős ligandkötési affinitással rendelkeznek és a humán terápiában potenciálisan alkalmazható és kipróbálás alatt álló Cetrorelix specifikusan és nagy affinitással köt a BPH szövetek LHRH receptoraihoz.

A fenti 20 BPH szövetmintában vizsgáltuk az LHRH-R-I mRNS expresszióját a humán LHRH-R-I gén 1. exonjára tervezett LHRH-R-I F1/R1 primerpárral. A 20 BPH mintából 18 minta mutatott pozitívítást (90 %). Az LHRH-R-I F1/R1 primerpárral pozitív 18 BPH minta együttes pozitívítást mutatott a ligand kötési assay során is. Az a két BPH szövetminta, amely negatív volt LHRH-R-I F1/R1 mRNS expresszióra, a ligand kötési tanulmányokban is negativitást mutatott.

A vizsgált BPH minták klinikai adatai, az mRNS expresszió és/vagy a ligand kötési tanulmányok között nem találtunk korrelációt.

VII. Következtetések

Molekuláris biológiai vizsgálataink eredményei alapján feltételezzük, hogy a humán LHRH-R-I-nek az irodalmi adatok által igazolt két transzkript variánsán kívül további transzkript variánsai is lehetnek. Ezen hipotézisünk igazolására a jövőben további a humán LHRH-R-I génre specifikus primerpárok tervezése szükséges. Munkacsoportunk célkitűzése, hogy nukleotid szekvencia analízissel meghatározza az 1. exonra tervezett LHRH-R-I F1/R1 primerpárral pozitív 16 BPH minta, valamint az LHRH-R-I F1/R1 és LHRH-R-I F2/R3 primerpárral együttes pozitivitást mutató 5 BPH minta pontos nukleotid szekvenciáját. A vizsgált BPH mintákban mért LHRH-R-I transzkript variánsok pontos nukleotid szekvenciájának ismeretében tervezzük vizsgálni a transzkript variánsokról történő transzláció mértékét. Amennyiben sikerül ezen új LHRH-R-I transzkript variánsokról transzlációt igazolni, ligand kötési tanulmányokat tervezünk a transzlálódó LHRH-R-I izoformok funkcióképességének vizsgálatára.

Tervezzük a Miami Egyetem Patológiai Intézetével kialakult kollaboráció folytatását, melynek során mérni kívánjuk BPH szövetmintákban a humán LHRH-R-I mRNS szintű expresszióját a saját tervezésű LHRH-R-I F1'/R2' és a 2. és 3. exonra tervezett LHRH-R-I F2/R3 primerpárokkal is, valamint immunhisztokémiai módszerrel a humán LHRH-R-I-re specifikus monoklonális antitesttel vizsgálni szeretnénk, hogy a funkcionálisan vizsgált 20 BPH mintában a hipofizeális 7 TM-mel rendelkező LHRH-R-I expressziója igazolható-e, vagy a ligandkötési assay során pozitív 18 BPH mintában a funkció képességért azaz a ligandkötésért valamely LHRH-R-I izoform a felelős.

Nem tisztázott, hogy a humán 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor transzkript variánsoknak milyen fiziológias illetve patológias szerepe lehet. Azonban amennyiben malignus illetve benignus betegségek során a hipofizeális 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor valamely transzkript variánsának az expressziója megnő, illetve erről a transzkript variánsról transzláció történik, ez lehetőséget teremthet új farmakonok tervezésére, mely célzottan fejtheti ki hatását a benignus illetve malignus szövetekben expresszálódó 1-es típusú Luteinizáló hormon – releasing hormon receptor izoformokra.

Irodalomjegyzék

1. Leung PC, Squire J, Peng C, Fan N, Hayden MR and Olofsson JI. 1995 Mapping of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene to human chromosome 4q21.2 by fluorescence in situ hybridization. *Mammalian Genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **6** 309–310.
2. Chatzaki E, Bax CM, Eidne KA, Anderson L, Grudzinskas JG and Gallagher CJ. 1996 The expression of gonadotropin-releasing hormone hormone and its receptor in endometrial cancer, and its relevance as an autocrine growth factor. *Cancer Research* **56** 2059–2065.
3. Chegini N, Rong H, Dou Q, Kipersztok S and Williams RS. 1996 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81** 3215–3221.
4. Schally AV, Halmos G, Rekasi Z and Arencibia JM. 2001 The action of LH-RH agonists, antagonists, and cytotoxic analogs on the LH-RH receptors on the pituitary and tumors *In: Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America. Devroey P. (ed.)* **12** pp 17-44.
5. Dong KW, Marcelin K, Hsu MI, Chiang CM, Hoffman G and Roberts JL. 1998 Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene in human uterine endometrial tissue. *Molecular Human Reproduction* **4** 893–898.
6. Raga F, Casan EM, Krussel JS, Wen Y, Huang HY, Nezhat C and Polan ML. 1998 Quantitative gonadotropin-releasing hormone gene expression and immunohistochemical localization in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biology of Reproduction* **59** 661–669.
7. Harris N, Dutlow C, Eidne K, Dong KW, Roberts J and Millar R. 1991 Gonadotropin-releasing hormone gene expression in MDA-MB- 231 and ZR-75–1 breast carcinoma cell lines *Cancer Research* **51** 2577–2581.

8. Chen A, Kaganovsky E, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Okon E and Koch Y. 2002 Two forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) are expressed in human breast tissue and overexpressed in breast cancer: a putative mechanism for the antiproliferative effect of GnRH by down-regulation of acidic ribosomal phosphoproteins P1 and P2. *Cancer Research* **62** 1036-1044.
9. Azad N, LaPaglia N, Kirsteins L, Uddin S, Steiner J, Williams DW, Lawrence AM and Emanuele NV. 1997 Jurkat cell proliferative activity is increased by luteinizing hormone releasing hormone *The Journal of Endocrinology* **153** 241–249.
10. Choi KC, Auersperg N and Leung PC. 2001 Expression and antiproliferative effect of a second form of gonadotropin-releasing hormone in normal and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **86** 5075–5078.
11. Kang SK, Tai CJ, Nathwani PS and Leung PC. 2001 Differential regulation of two forms of gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in human granulosa-luteal cells. *Endocrinology* **142** 182–192.
12. Grosse R, Schoneberg T, Schultz G and Gudermann T. 1997 Inhibition of gonadotropin-releasing hormone receptor signaling by expression of a splice variant of the human receptor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **11** 1305–1318.
13. Kottler ML, Bergametti F, Carre MC, Morice S, Decoret E, Lagarde JP, Starzec A and Counis R. 1999 Tissue-specific pattern of variant transcripts of the human gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *European Journal of Endocrinology* **140** 561–569.
14. Eri LM, Tveter KJ. 1993 A prospective placebo-controlled study of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist leuprolide as treatment for patient with benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology* **150** 359-364.
15. Sagnier PP, MacFarlane G, Teillac P, Botto H, Richard F, Boyle P. 1995 Impact of symptoms of prostatism on level of bother and quality of life of men in the French community. *The Journal of Urology* **153** (3 Pt 1) 669-73.

16. Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. 1987 Prostate specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of prostate. *The New England Journal of Medicine* **317** 909-916.
17. Wasson JH, Reda DJ, Bruskewitz RC, Elinson J, Keller AM, Henderson WG. 1995 A comparison of Transurethral surgery with watchfull waiting for moderate symptoms of benign prostatic hyperplasia The Veterans affairs cooperative Study group on Transurethral resection of the prostate. *The New England Journal of Medicine* **332 (2)** 75-9.
18. Netto NR Jr, de Lima ML, Netto MR, D'Ancona CA. 1999 Evaluation of patients with bladder outlet obstruction and mild international prostate symptom score followed up by watchful waiting. *Urology* **53 (2)** 314-6.
19. Dreikorn K. 2002 The role of phytotherapy in treating lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *World Journal of Urology* **19 (6)** 426-35.
20. Bartsch G, Rittmaster RS, Klocker H. 2002 Dihydrotestosterone and the concept of 5-alpha-reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *World Journal of Urology* **19 (6)** 413-25.
21. Roehrborn CG, Boyle P, Nickel JC, Hoefner K, Andriole G; ARIA3001 ARIA3002 and ARIA3003 Study Investigators. 2002 Efficacy and safety of a dual inhibitort or 5-alpha reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology* **60 (3)** 434-41.
22. Andriole G, Kirby R. 2003 Safety and tolerability of the dual 5 alpha-reductase inhibitor dutasteride int he treatment of benign prostatic hyperplasia. *European Urology* **44 (1)** 82-8.
23. Comaru-Schally AM, Brannan W, Schally AV, Colcolough M, Monga M. 1998 Efficacy and safety of luteinizing hormone releasing hormone antagonist cetrorelix in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 3826-3861.

24. Herbert Lepor 2006 The role of gonadotropin-releasing hormone antagonists for the treatment of benign prostatic hyperplasia *Reviews in Urology* **8** (4) 183-189.
25. Gabor Mezo and Marilena Manea. 2009 Luteinizing hormone-releasing hormone antagonists. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **19** (12) 1771-85.
- 26.
- Schally AV. et al. 1971 *Biochemical and Biophysical Research Communications* **43** 459-463.
- Matsuo H. et al 1971 *Biochemical and Biophysical Research Communications* **43** 393-399.
- Baba Y. et al 1971 *Biochemical and Biophysical Research Communications* **43** 1334-1339.
27. Millar RP. 2002 *Reproductive Medicine: molecular cellular and genetic fundamentals* edited by B.C.J.M. Fauser; Parthenon Publishing, Lancaster; UK. pp 199-224.
28. Millar RP, Lu ZL, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K and Maudsley SR. 2004 Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Reviews* **25** 235-275.
29. Chen, A., Yahalom, D., Ben-Aroya, N. et al. 1998 A second form of gonadotrophin-releasing hormone is present in the brain of human and rodents. *FEBS Letters* **18** 199–203.
30. Gestrin, E.E., White, R.B. and Fernald, R.D. 1999 Second form of gonadotrophin-releasing hormone in mouse: immunocytochemistry reveals hippocampal and periventricular distribution. *FEBS Letters* **9** 289–291.
31. White, R.B., Eisen, J.A., Kasten, T.L. and Fernald, R.D. 1998 Second gene for gonadotrophin-releasing hormone in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (PNAS) **95** 305–309.
32. Schally A.V. and Engel J. 2007 Drug Insight: Clinical use of agonists and antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone. *Nature Clinical Practice. Endocrinology & Metabolism* **3** 157-167.
33. Gabor Mezo and Marilena Manea. 2009 Receptor-mediated tumor targeting based on peptide hormones. *Expert Opinion on Drug Delivery* **7**(1) 79-96.

34. Grundker C, Gunthert AR, Millar RP, Emons G. 2002 Expression of gonadotropin-releasing hormone II (GnRH-II) receptor in human endometrial and ovarian cancer cells and effects of GnRH-II on tumor cell proliferation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87** 1427-30.
35. Yahalom, D., Chen, A., Ben-Aroya, N. et al. 1999 The gonadotrophin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS Letters* **463** 289–294.
36. Limonta P, Moretti RM, Marelli MM, Dondi D, Parenti M and Motta M. 1999 The luteinizing hormone-releasing hormone receptor in human prostate cancer cells: messenger ribonucleic acid expression, molecular size, and signal transduction pathway. *Endocrinology* **140** 5250-5256.
37. C A McArdle, J Franklin, L Green and J N Hislop. 2002 Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *Journal of Endocrinology* **173** 1–11.
38. Emons G, Schröder B, Ortmann O, Westphalen S, Schulz KD and Schally AV. 1993 High affinity binding and direct antiproliferative effects of luteinizing hormone-releasing hormone analogs in human endometrial cancer cell lines. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **77**: 1458-1464.
39. Emons G, Ortmann O, Becker M, Irmer G, Springer B, Laun R, Hölzel F, Schulz KD and Schally AV. 1993 High affinity binding and direct antiproliferative effects of LHRH analogues in human ovarian cancer cell lines. *Cancer Research* **53** 5439-5446.
40. Zhou W, Sealfon SC. 1994 Structure of the Mouse Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Gene: Variant Transcripts Generated by Alternative Processing *DNA and Cell Biology* **13** (6) 605-614.
41. Ovstebo R, Haug KB, 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) 425-32.

42. Miller GM, Alexander JM, Klibanski A. 1996 Gonadotropin-releasing hormone messenger RNA expression in gonadotroph tumors and normal human pituitary. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **81** 80-83.
43. Sanno N, Jin L, Qian X, Osamura RY, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV. 1997 Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acids expression in nontumorous and neoplastic pituitaries. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 1974-1982.
44. Chen HF, Jeung EB, Stephenson M, Leung PC. 1999 Human peripheral blood mononuclear cells express gonadotropin-releasing hormone (GnRH), GnRH receptor, and interleukin-2 receptor gamma-chain messenger ribonucleic acids that are regulated by GnRH in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84** 743-750.
45. Karande AA, Rajeshwari K, Schol DJ, Hilgers JH. 1995 Establishment of immunological probes to study human gonadotropin-releasing hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* **114** (1-2) 51-6.
46. La Rosa S, Celato N, Uccella S, Capella C. 2000 Detection of gonadotropin-releasing hormone receptor in normal human pituitary cells and pituitary adenomas using immunohistochemistry. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* **437** 264-269.
47. Bono AV, Salvatore M, Celato N. 2002 Gonadotropin-releasing hormone receptors in prostate tissue. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* **24** (4) 221-7.
48. Stojilkovic SS, Reinhart J and Catt KJ. 1994 Gonadotropin releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocrine Reviews* **15** 462-499.
49. Chi L, Zhou W, Prikhozhan A, Flanagan C, Davidson JS, Golembo M, Illing N, Millar RP and Sealfon SC. 1993 Cloning and characterization of the human GnRH receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology* **91** R1-6.
50. Halmos G, Arencibia JM, Schally AV, Davis R, Bostwick DG. 2000 High incidence of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) and LHRH receptor gene expression in human prostate cancers. *The Journal of Urology* **163** (2) 623-9.

51. Wilson AC, Salamat MS, Haasl RJ, Roche KM, Karande A, Meethal SV, Terasawa E, Bowen RL, Atwood CS. 2006 Human neurons express type I GnRH receptor and respond to GnRH I by increasing luteinizing hormone expression. *The Journal of Endocrinology* **191** (3) 651-63.
52. Tang X, Yano T, Osuga Y, Matsumi H, Yano N, Xu J, Wada O, Koga K, Kugu K, Tsutsumi O, Schally AV, Taketani Y. 2002 Cellular mechanisms of growth inhibition of human epithelial ovarian cancer cell line by LH-releasing hormone antagonist Cetrorelix. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87** (8) 3721-7.
53. Munson PJ, Rodbard DA 1980 A versatile computerized approach for characterization of ligand binding systems. *Analytical Biochemistry* **107** 220-239.
54. Scatchard B 1949 The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **51** 660-672.
55. **B.Rózsa**, M.Nadji, A.V. Schally, B.Dezső, T.Flaskó, Gy.Tóth, M.Mile, N.L.Block, G. Halmos 2010 Receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in benign prostatic hyperplasia (BPH) as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist cetrorelix. *The Prostate (accepted, Article first published online: 21 SEP 2010)*.
56. **B.Rózsa**, A.Juhász, A.Treszl, Gy.Tóth, T.Flaskó, B.Dezső, N.L. Block, A.V. Schally, G.Halmos. 2009 Expression of mRNA for human type-I LHRH receptor transcript forms in human benign prostatic hyperplasia. *International Journal of Oncology* **35** 1053-1059.
57. A.Tiwari, N.S. Krishna, K. Nanda és Anita Chugh. 2005 Benign prostatic hyperplasia: an insight into current investigational medical therapies. *Expert Opinion on Investigational Drugs* **14** (11) 1359-1372.
58. Radovick S, Wondisford FE, Nakayama Y, Yamada M, Cutler GB and Weintraub BD: 1990 Isolation and characterization of the human gonadotropin-releasing hormone gene in the hypothalamus and placenta. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **4** 476–480.

59. Yang-Feng TL, Seeburg PH and Francke U. 1986 Human luteinizing hormone-releasing hormone gene (LHRH) is located on short arm of chromosome 8 (region8p11.2–p21). *Somatic Cell and Molecular Genetics* **12** 95–100.
60. Fan NC, Peng C, Krisinger J and Leung PC. 1995 The human gonadotropin- releasing hormone receptor gene: complete structure including multiple promoters, transcription initiation sites, and polyadenylation signals. *Molecular and Cellular Endocrinology* **107** R1–R8.
61. Kakar SS. 1997 Molecular structure of the human gonadotropin releasing hormone receptor gene. *European Journal of Endocrinology* **137** 183–192.

Az értekezést megalapozó saját impakt faktorral rendelkező közlemények

Angol nyelvű publikációk:

Bernadett Rózsa, Mehrdad Nadji, Andrew V. Schally, Balázs Dezső, Tibor Flaskó, György Tóth, Melinda Mile, Norman L. Block, Gábor Halmos

Receptors for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) in BPH as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist Cetrorelix

2010 The Prostate (*accepted, Article first published online: 21 SEP 2010*). **IF: 3,08**

Bernadett Rózsa, Aliz Juhász, Andrea Treszl, György Tóth, Tibor Flaskó, Balázs Dezső, Norman L. Block, Andrew V. Schally, Gábor Halmos

Expression of mRNA for human type-I LHRH receptor transcript forms and LHRH-I ligand in human benign prostatic hyperplasia

2009 International Journal of Oncology **35** 1053-1059. **IF:2,295**

Bernadett Rózsa, Aliz Juhasz, György Tóth, Tibor Flaskó, Csaba Tóth, Balázs Dezső and Halmos Gábor

Expression of mRNA for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) and LHRH receptor splice variants in human prostate and testicular cancers and in benign prostatic hyperplasia

2009 Acta Physiologica Hungarica **96 (1)**:120-121 **IF: 0,48**

Kertész István, Pótári Norbert, Józai István, Semjéni Mariann, **Rózsa Bernadett**, Galuska László, Halmos Gábor

The development of an 18F-labeled luteinizing hormone-releasing hormone receptor targeting peptide ligand series

2009 Acta Physiologica Hungarica **96 (1)**:90-91 **IF: 0,48**

Juergen Engel, **Bernadett Rózsa**, Andrew V Schally, Balázs Dezső, György Tóth, Tibor Flaskó, Mehrdad Nadji and Gábor Halmos. Luteinizing hormone–releasing hormone (LHRH) receptors in BPH as potential molecular targets for therapy with Cetrorelix.

2008 The Journal of Urology **179**:449-450. **IF: 4,016**

Egyéb saját impakt faktorral rendelkező közlemények

Bernadett Rózsa, András Gyetvai, Melinda Mile, Kálmán Tóth and Gábor Halmos

Expression of mRNA for three bombesin/gastrin-releasing peptide receptor subtypes in human connective tissue sarcomas

2009 Acta Physiologica Hungarica **96 (1)**:119-120

IF: 0,48

Anna Molnár, **Bernadett Rózsa**, Melinda Mile, István Szegedi, Csongor Kiss and Gábor Halmos

Expression of somatostatin receptors in childhood tumors and other malignancies

2009 Acta Physiologica Hungarica **96 (1)**:106-107

IF: 0,48

Katayoun Djazayeri, Zoltán Szilvássy, Klára Benkő, B, **Bernadett Rózsa**, A.József Szentmiklósi, Ilona Benkő

Effect of rosiglitazone, an insulin sensitizer, on myelotoxicity caused by repeated doses of 5-fluorouracil.

2006 Pharmacological Research **53**:156-161.

IF: 2,42

Ilona Benkő , Katayoun Djazayeri, **Bernadett Rózsa**, Zsuzsanna Kovács, Zoltán Dinya, A.József Szentmiklósi

Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin-induced myelotoxicity.

2004 Fundamental and Clinical Pharmacology **18**. S1, 89.

IF: 1,052

A disszertáció témájához kapcsolódó, fel nem használt magyar nyelvű publikációk:

Rózsa Bernadett, Tóth György, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezso Balázs, Halmos Gábor

Luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok expressziója humán prosztata karcinóma és benignus prosztata hiperplázia mintákban.

2007 Hungarian Oncology **51éfv./4. szám** 389

Rózsa Bernadett, Tóth György, Flaskó Tibor, Tóth Csaba, Juhász Aliz, Dezső Balázs, és Halmos Gábor¹

Luteinizáló hormon-releasing hormon receptor-I (LHRH-R-I) splice variánsok és a

Luteinizáló hormon–releasing hormon-I (LHRH–I) expressziója humán benignus prosztata hiperpláziában

2009. október Magyar Urológia

Tóth György, Semjéni Mariann, **Rózsa Bernadett**, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezső Balázs és Halmos Gábor

Luteinizáló hormon–releasing hormon receptor–I (LHRH–R–I) splice variánsok és a Luteinizáló hormon–releasing hormon–I (LHRH–I) expressziója humán hólyag tumorokban

2009. október Magyar Urológia

A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb magyar nyelvű publikációk:

Vámos Zoltán , Cséplő Péter, Tóth Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos

Differences in Angiotensin I- and II-induced responses of isolated carotid arteries. Role of ACE and AT1 receptors

2009 Érbetegségek **16.évf./2.szám** 55.

Tóth Péter, Vámos Zoltán, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Komoly Sámuel , Koller Ákos

Flow/Shear stress-induced constrictions of rat middle cerebral artery

2009 Érbetegségek **16.évf./2.szám** 55.

Rózsa Bernadett, Bagi Zsolt, Vámos Zoltán, Tóth Péter, Koller Ákos

Az angiotenzin II receptor 1 (AT1R) funkcionális dinamikája hipertóniában és diabetes mellitusban (DM). Saját adatok és irodalmi összefoglaló.

2009. november Hypertonia és Nephrológia

Vámos Zoltán, Tóth Péter, Cséplő Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos

Az öregedés hatása a carotis artériák angiotenzinogén, angiotenzin–I és angiotenzin–II-re adott vazomotor válaszaira. Az AT1 receptorok feltételezett szerepe

2009. november Hypertonia és Nephrológia

A disszertáció témájához kapcsolódó konferenciák és poszterek:

Rózsa Bernadett, Juhász Aliz, Dezső Balázs Tóth György, Flaskó Tibor, Klekner Álmos, Mezey Géza, Bognár László, Molnár Anna, Kiss Csongor, Gyetvai András és Halmos Gábor
Gonadotropin hormon–releasing hormon–I (GnRH–I), Gonadotropin hormon–releasing hormon receptor–I (GnRHR–I) és splice variánsainak expressziója humán benignus és malignus szövetekben

Magyar Onkológusok Társasága XXVIII. Kongresszusa
2009. november 12-14. Budapest

Molnár Anna, **Rózsa Bernadett**, Szegedi István, Kiss Csongor, Halmos Gábor
Vazoaktív intestinális peptid receptorok kifejeződése gyermekkori vérképzőszervi malignus betegségekben és szolid tumorokban

Magyar Onkológusok Társasága XXVIII. Kongresszusa
2009. november 12-14. Budapest

Rózsa Bernadett, Tóth György, Flaskó Tibor, Tóth Csaba, Juhász Aliz, Dezső Balázs, és Halmos Gábor

Luteinizáló hormon–releasing hormon receptor–I (LHRH–R–I) splice variánsok és a Luteinizáló hormon–releasing hormon–I (LHRH–I) expressziója humán benignus prosztata hiperpláziában

Magyar Urológusok Társaságának 2009. évi Kongresszusa
2009. október 01-03. Keszthely

Tóth György, Semjéni Mariann, **Rózsa Bernadett**, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezső Balázs és Halmos Gábor

Luteinizáló hormon–releasing hormon receptor–I (LHRH–RvI) splice variánsok és a Luteinizáló hormon–releasing hormon–I (LHRH–I) expressziója humán hólyag tumorokban

Magyar Urológusok Társaságának 2009. évi Kongresszusa
2009. október 01-03. Keszthely

Norbert Pótári, István Kertész, Melinda Mile, **Bernadett Rózsa**, László Galuska and Gábor Halmos

F-fluoro-deoxyglucose, a putative prosthetic group for peptide labeling

Seventh International Conference on Nuclear and Radiochemistry
24-29 August 2009 Budapest

István Kertész, János Gardi, Mariann Semjéni, **Bernadett Rózsa**, László Galuska and Gábor Halmos

The synthesis of ^{18}F - labeled Luteinising hormone–releasing hormone receptor targeting peptide ligand

Seventh International Conference on Nuclear and Radiochemistry
24-29 August 2009 Budapest

Kertész István, Pótári Norbert, Jószai István, Semjéni Mariann, **Rózsa Bernadett**, Galuska László és Halmos Gábor

Tumorokban expresszáldó Luteinizáló hormon–releasing hormon receptorokhoz kötődő PET radiofarmakon sorozat fejlesztése

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése
2008. június 4-6. Debrecen

Rózsa Bernadett, Gyetvai András, Mile Melinda, Tóth Kálmán és Halmos Gábor

Gastrin–releasing peptid receptorok expressziója humán végtagokon kialakult kötőszöveti sarcomákban

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése
2008. június 4-6. Debrecen

Rózsa Bernadett, Juhász Aliz, Tóth György, Flaskó Tibor, Tóth Csaba, Dezső Balázs és Halmos Gábor

Luteinizáló hormon–releasing hormon receptor–I (LHRH–R–I) splice variánsok és a Luteinizáló hormon–releasing hormon–I (LHRH–I) expressziója humán urogenitális daganatokban.

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII. Vándorgyűlése
2008. június 4-6. Debrecen

Molnár Anna, **Rózsa Bernadett**, Mile Melinda, Szegedi István, Kiss Csongor és Halmos Gábor

Szomatosztatin receptorok vizsgálata gyermekkori rosszindulatú daganatokban

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság és a Magyar Élettani Társaság LXXII.

Vándorgyűlése Debrecen, 2008. június 4-6

2008. június 4-6. Debrecen

Juergen Engel, **Bernadett Rózsa**, Andrew V Schally, Balázs Dezső, György Tóth, Tibor Flaskó, Mehrdad Nadji and Gábor Halmos

Luteinizing hormone–releasing hormone (LHRH) receptors in BPH as potential molecular targets for therapy with Cetrorelix.

American Urological Association (AUA) Annual Meeting 17-22 May 2008 Orlando, Florida USA

Gabor Halmos, **Bernadett Rozsa**, Mehrdad Nadji, Balazs Dezso, Tibor Flasko, Gyorgy Toth, Mariann Semjeni, Norman L. Block and Andrew V. Schally

Receptors for Luteinizing hormone–releasing hormone (LHRH) in benign prostatic hyperplasia (BPH) as potential molecular targets for therapy with LHRH antagonist Cetrorelix. Miami VA Research Awareness Day Poster Session, T.C. Dougherty Auditorium May 13, 2008

Rózsa Bernadett, Tóth György, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezso Balázs és Halmos Gábor

Luteinizáló hormon–releasing hormon receptorok expressziója humán prosztata karcinóma és benignus prosztata hiperplázia mintákban

Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság IX. Kongresszusa

2007. november 29-december 01. Debrecen

Rózsa Bernadett, Tóth György, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezso Balázs és Halmos Gábor

Luteinizáló hormon-releasing hormon receptorok expressziója humán prosztata karcinóma és benignus prosztata hiperplázia mintákban

Magyar Onkológusok Társasága XXVII. Jubileumi Kongresszusa

2007 Hungarian Oncology 51éfv./4.szám 389

Rózsa Bernadett, Tóth György, Tóth Csaba, Flaskó Tibor, Dezso Balázs és Halmos Gábor
Luteinizáló hormon–releasing hormon receptorok expressziója humán prosztata karcinóma és benignus prosztata hiperplázia mintákban
Magyar Onkológusok Társasága XXVII. Jubileumi Kongresszusa
2007. november 8-10. Budapest

Huga Sándor, Treszl Andrea, **Rózsa Bernadett** és Halmos Gábor
Bombesin/Gastrin–releasing peptid receptorok, mint molekuláris célpontok az endometrium karcinóma kezelésében
Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság „Gyógyszerkutató Szimpózium”
2006. december 1-2. Debrecen

Mile Melinda, Treszl Andrea, Juhász Aliz, Huga Sándor, **Rózsa Bernadett**, Buglyó Ármin és Halmos Gábor
Endometrium karcinómák célzott terápiájának lehetősége szomatosztatin receptorokon keresztül
Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság VIII. Kongresszusa
2006. december 14-16. Debrecen

A disszertáció témájához nem kapcsolódó egyéb konferenciák és posztterek:

Rózsa Bernadett, Bagi Zsolt, Vámos Zoltán, Tóth Péter, Koller Ákos
Az angiotenzin II receptor 1 (AT1R) funkcionális dinamikája hipertóniában és diabetes mellitusban (DM). Saját adatok és irodalmi összefoglaló.
Fiatal hypertonológusok IV. Fóruma
2009.szeptember 25-27. Hajdúszoboszló

Vámos Zoltán, Tóth Péter, Cséplő Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos
Az öregedés hatása a carotis artériák angiotenzinogén, angiotenzin-I és angiotenzin-II-re adott vazomotor válaszaira. Az AT1 receptorok feltételezett szerepe
Fiatal hypertonológusok IV. Fóruma
2009.szeptember 25-27. Hajdúszoboszló

Vámos Zoltán, Tóth Péter, Cséplő Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos
Az öregedés hatása a carotis artériák angiotenzinogén, angiotenzin–I és angiotenzin–II-re
adott vazomotor válaszaira. Az AT1 receptorok feltételezett szerepe
Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése
2009. augusztus 27-29. Budapest

Vámos Zoltán , Cséplő Péter, Tóth Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos
Differences in Angiotensin I– and II–induced responses of isolated carotid arteries. Role of
ACE and AT1 receptors
6. Magyar Mikrokeringés Kongresszus
2009. Május 22-23. Balatonfüred

Tóth Péter, Vámos Zoltán, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Komoly Sámuel, Koller Ákos
Flow/Shear stress-induced constrictions of rat middle cerebral artery
6. Magyar Mikrokeringés Kongresszus
2009. Május 22-23. Balatonfüred

Vámos Zoltán, Cséplő Péter, Tóth Péter, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Koller Ákos
Differences in Angiotensin I– and II–induced responses of isolated carotid arteries. Role of
ACE and AT1 receptors
Works and Views in Endothelium-Dependent Vasodilation Conference Iasi
13-14 May 2009 Romania

Tóth Péter, Vámos Zoltán, **Rózsa Bernadett**, Hamar János, Komoly Sámuel, Koller Ákos
Flow/Shear stress-induced constrictions of rat middle cerebral artery
Works and Views in Endothelium-Dependent Vasodilation Conference Iasi
13-14 May 2009 Romania

Ilona Benkő, Katayoun Djazayeri, **Bernadett Rózsa**, Zsuzsanna Kovács, Zoltán Dinya and
A.József Szentmiklósi
Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin-induced
myelotoxicity. EPHAR
July 14-17., 2004 Portugália, Porto

Bernadett Rózsa, Boglárka Szabó, Katayoun Djazayeri, Tünde Erdélyi, Zsolt Szoby, Zoltán Dinya, József Szentmiklósi and Ilona Benkő

Protective effects of fruit extract with high polyphenol content against doxorubicin induced myelotoxicity in vivo.

Magyar Molekuláris és Prediktív Epidemiológiai Társaság (MMPET) II. Nemzetközi Kongresszusa.

2005.április 1-3. Pécs

Tudományos paraméterek:

Referált folyóiratban megjelent közlemények száma: 3

Referált folyóiratban megjelenés alatt álló közlemények száma: 1

Összesített impakt faktor: 15,438

Független idézettség: 4