

Doktori (Ph.D.) Disszertáció tézisei

2011

**A luteinizáló hormon- és növekedési hormon-releasing hormon
antagonisták hatásainak vizsgálata benignus prosztata
hyperplasia and prosztatarák kísérletes modelljein**



Dr. Rick Ferenc Gyula

Anatómiai Intézet
Pécsi Tudományegyetem Orvostudományi Kara
Pécs, Magyarország

Department of Pathology
University of Miami, Miller School of Medicine
Miami, Florida, USA

Doktori Iskola vezetője : Prof. Lénárd László akadémikus

Programvezető: Prof. Dr. Csernus Valér egyetemi tanár

Témavezetők: Prof. Dr. . Kovács Magdolna egyetemi tanár
Dr. Rékási Zoltán egyetemi docens

Tanácsadók: Prof. Dr. Andrew V. Schally
Prof. Dr. Norman L. Block

1. BEVEZETÉS

1.1 Benignus prosztata hyperplasia

A benignus prosztata hyperplasia (BPH) a prosztata mirigyes és stromalis szöveteinek progresszív hyperplasiája. A BPH az életkor előrehaladtával kialakuló kórkép, mely a 40 éves férfiak 20%-ában, a 60 éves férfiak 70%-ában van jelen. Teljesen hatékony kezelés a BPH-ra jelenleg nem létezik. Gyógyszeres terápiája α -adrenerg-gátlókból (adrenerg tónus csökkentése) és 5α -reduktáz-gátlókból [dihydrotesztoszteron (DHT) szint csökkentése] áll. Egyes betegeknél azonban csak a műtéti kezelés (legtöbbször a prosztata transurethralis resectioja) az egyedüli hatékony kezelés. Újabb terápiákra egyértelműen szükség van.

A BPH-nak a közegészségügyre rótt óriási terhe ellenére a betegség pathogenesis nem teljesen tisztázott. Számos faktor szerepet játszhat a prosztata hyperplasticus növekedésében: az androgén/ösztrogén egyensúly megbomlása, krónikus gyulladás, össejt rendellenesség, stromalis és epithelialis növekedési faktorok túlszaporodása, hypoxia, epithelialis-mesenchymalis átalakulás és egyéb kevésbé jelentős faktorok.

Ennek ellenére, egyre több bizonyíték utal arra, hogy a gyulladás kulcsszerepet játszik a BPH kifejlődésében és progressziójában. Számos klinikai keresztmetszeti tanulmány azt sugallja, hogy a megnagyobbodott prosztata térfogat és a jelenlevő gyulladás között kapcsolat van. Szintén kapcsolat figyelhető meg az alsó húgyuti tünetek (LUTS) és a prosztatában jelenlevő gyulladás között. Műtéti BPH mintákban a gyulladást elősegítő citokinek, (pl. IL-2, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, és IFN γ) fokozott expresszióját figyelték meg. Számos növekedési faktor, úgy mint FGF-2, FGF-7, IGF-I, IGF-II, TGF β , és VEGF szerepet játszik a BPH kialakulásában.

1.2 Prosztatarák

A prosztatarák a leggyakrabban előforduló nem bőrereditű malignus tumor a férfiakban. Androgén-függő prosztatarák az összes prosztata neoplasmák nagyjából 70%-a. A sebészi orchiectomia illetve a luteinizáló hormon-releasing hormon agonisták általi androgén megvonás tekinthető az előrehaladott prosztatarák elsővonalbeli kezelésének. Azonban a hormonterápia az esetek mindössze 70-80%-ában eredményes és átlagban 12-24 hónapig tart csak. A metasztatikus prosztatarák kezelése továbbra is összetett és bonyolult probléma, mivel kuratív kezelés nem létezik. A docetaxelen alapuló kombinált kemoterápiák a túlélési időt jelentősen megnyújthatják. Mindemellett, a kemoterápia kezdetétől számított medián túlélés így sem haladja meg a 20 hónapot. Mindezek miatt az újabb és hatékonyabb terápiák iránti igény óriási.

1.3 A luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH) és növekedési hormon-releasing hormon (GHRH)

A hypothalamikus neurohormonok közé tartozó GHRH és LHRH számos extrahypothalamikus szövetben is termelődik, és sok, de főleg malignus szövetekben képesek modulálni a sejtek szaporodását.

Az LHRH agonistákat tekintjük az előrehaladott prosztatarák elsővonalbeli kezelésének. Azonban az LHRH antagonisták használata kívánatosabb lenne, mivel általuk a hypophysis LHRH receptorok (LHRH-R) blokádján át azonnali androgén hormon szupresszió jön létre, így elkerülhető az LHRH agonisták okozta „flare-up” jelenség. A laboratóriumunk által szintetizált potens LHRH antagonista cetorelix az LH és nemi hormonok szekréciójának szuppresszióján, az apoptózis előidézésén, az LHRH, epidermális növekedési faktor (EGF), EGF-R illetve IGF-II szint csökkentésével gátolja a kísérletes prosztatarák növekedését. A cetorelix által okozott csökkenés a szérum LH szintben és a hypophysis LHRH-R mRNS és protein szintjeiben nagyobb volt, mint az LHRH agonista Decapeptyl által okozott csökkenések. A klinikumban a cetorelixet és más LHRH antagonistákat széles körben használják BPH, leiomyoma, endometriosis kezelésében, illetve az asszisztált termékenységi módszerek közt az *in vitro* fertilizációban és embryo transzferben. A cetorelix onkológia alkalmazása jelenleg klinikai onkológiai vizsgálatok tárgyát képezi, mivel kísérletesen gátolja a humán prosztata-, mell-, és petefészekrákok növekedését. A prosztatarák előrehaladott formájától szenvedő betegekben a szérum PSA csökkenése, metasztatikus léziók regressziója és a társult tünetek (pl. csontfájdalom, paresthesia és paraplegia) gyors javulása a cetorelix klinikai hatékonyságát bizonyítja. A prosztata egy igen hormonérzékeny szerv, mely elsődlegesen a hypophysis-gonád tengely kontrollja alatt áll. Növekedési faktorok, mint például IGF-I és-II, EGF, FGF-2 és VEGF, illetve neurohormonok (pl. LHRH és GHRH) is képesek befolyásolni a prosztata növekedését és funkcióját.

A GHRH, mely egy hypothalamikus neuropeptid, az elülső hypophysislebenyben stimulálja a növekedési hormon (GH) szekrécióját, miután kötődik a receptoraihoz (GHRH-R). A felszabaduló GH stimulálja az inzulin-szerű növekedési faktor 1 (IGF-I) termelését, amely számos daganatnak jelentős anabolikus növekedési faktora és potens mitogéne. A GHRH, annak receptora, illetve csonkolt receptor splice variánsai (SV) jelen vannak különböző normál (pl. prosztata, vese, tüdő, és máj) és számos humán daganatos sejtvonalban és tumorban. Valószínűleg a GHRH-R és SV1 egyaránt közvetítik a GHRH és antagonistáinak hatását a daganatokban. A GHRH maga pedig autokrin/parakrin növekedési faktorként is működik humán rákokban, így a prosztatarákban is.

Laboratóriumunkban számos potens, a kísérletes tumormodelleken erős tumornövekedés-gátló hatással bíró GHRH antagonistát szintetizáltunk az elmúlt években. Ezen analógok gátló hatása egyrészt indirekt módon, a GHRH által kiváltott hypophysealis GH szekréció okozta endokrin mechanizmusok gátlásával érvényesül. A GHRH antagonisták antitumor hatásainak fő mechanizmusát azonban valószínűleg közvetlenül a tumorban lévő autokrin GHRH és IGF-I/II hatásainak gátlása képviseli. A GHRH antagonisták erősen gátolják a nude-egerekbe xenotraszplantált androgén-independens prosztatarák és számos más tumor növekedését az EGF, FGF-2, IGF-I, IGF-II és VEGF tumorális növekedési faktorok szintjének csökkentése útján. A közelmúltban közölt adatok szerint a GHRH antagonisták csökkentik a reaktív oxigén-gyökök képződését, melyek károsítják a prosztatata stromát és hámot is.

LHRH antagonisták, beleértve a cetorelixet és ozarelixet is, a LUTS tünetek jelentős és tartós javulását, a prosztatata térfogat csökkenését, és a vizelet maximális kiáramlási sebességének növekedését okozzák. Az adatok szerint a hólyag detrusor túlműködést a nőstény patkányok ganirelixszel történő kezelése jelentősen ellensúlyozza. Mindezek azt sugallják, hogy az LHRH-R-nak szerepe van a hólyag szabályozásában és alátámasztják az LHRH-R gátlás jótékony hatását a LUTS-tól szenvedő betegekben.

1.4. A p53 és p21 szerepe a prosztatarákban

A p53 egy tumor szupressor, amelynek génmutációja megtalálható az emberi daganatok nagyjából felében. Úgy tűnik, hogy a p53 fontos szerepet játszik a DNS károsodás felismerésében és javításában: leállítja a sejtciklust a DNS javítás céljából, és a súlyosan károsodott sejtekben apoptózist indukál. A multifunkcionális p53 proteint, mely transzkripciós aktivátorként és represszorként is működhet, a DNS károsodás aktiválja és a DNS replikációban és javításban szerepet játszó fehérjékkel egymást befolyásolni tudják. A mutált p53 (mt-p53) gyakran expresszálódik hormon-refrakter és metasztatikus prosztatarákban. A kemoterápiára adott rossz válasz és a p53 gén mutációi között nyilvánvaló összefüggés található.

A cyclin-dependens kináz (CDK) inhibitor p21 fehérje szerepet játszik a p53-közvetítette növekedés gátlásban és a sejtnövekedés szabályozásának kulcsszereplője. A közelmúltban közölt adatok szerint a p21-nek fontos anti-apoptotikus és túlélést elősegítő szerepe van számos daganatban, így a prosztatrákot is beleértve. A megnövekedett p21 szint az androgén-independens prosztatrák összefüggésben áll egymással. Klinikai tanulmányokban a p21 expresszóját a prosztata daganatos betegek rossz túlélésének indikátoraként azonosították.

2. CÉLKITŰZÉSEINK

2.1 Kísérletes benignus prosztata hyperplasia tanulmányok

2.1.1. A GHRH-R és LHRH-R jelenlétének kimutatása patkány prosztatában

2.1.2. Az alábbi analógok hatásainak vizsgálata androgén-indukált BPH modellben:

- LHRH antagonistá cetorelix
- GHRH antagonistá JMR-132, MIA-313 és MIA-459
- az LHRH antagonistá cetorelix and GHRH antagonistá JMR-132 kombinációja

2.1.3. Az LHRH és GHRH antagonisták, illetve azok kombinációja hatásmechanizmusainak feltárása kísérletes BPH-ban

2.2. Humán prosztatarák xenograft tanulmányok

2.2.1. A potens GHRH antagonistá MZ-J-7-138 minimális hatásos dózisának és dózishatásgörbéjének vizsgálata *in vivo* androgén-independens PC-3 prosztatarák modelljében

2.2.2. A GHRH antagonistá MZ-J-7-138 a tumorális IGF-II-re és VEGF-re gyakorolt hatásainak vizsgálata PC-3 xenograftokban

2.2.3. A GHRH antagonistá MZ-J-7-138 tumornövekedést gátló hatásainak vizsgálata az androgén-independens DU-145 és az androgén-dependens MDA-PCa-2b kísérletes modelleken

2.2.4. A GHRH antagonistá MZ-J-7-138 apoptotikus hatásainak vizsgálata, beleértve a p53 és p21 fehérjékre gyakorolt hatásokat, mt-p53-t expresszáló PC-3 és DU-145, illetve vad típusú p53-t expresszáló MDA-PCa-2b kísérletes modelleken

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Peptidek és reagensek

A GHRH antagonistákat (JMR-132, MIA-313, MIA-459 és MZ-J-7-138) szolid-fázis módszerrel szintetizáltuk. Az LHRH antagonistá cetorelixet, melyet eredetileg laborunk állított elő, szintén szolid-fázis módszerrel szintetizálta az Aeterna-Zentaris. A BPH modellünkben lassan felszívódó tesztosztron-enantátot (TE), kukoricaolajat és 5 α -reduktáz 2 gátló (5AR2) finaszteridet használtunk.

3.2. Kísérleti állatok

A BPH tanulmányainkban Wistar felnőtt hím patkányokat használtunk. A patkányokat standard laboratóriumi tápon és vizen tartottuk *ad libitum*. A tumor xenograft tanulmányokhoz 5-6 hetes hím athymicus (Ncr nu/nu) nude egereket használtunk, melyeket

autoklávozott tápon és vizen tartottunk *ad libitum*. A rágcsálókat klíma-kontrollált 12h nappali/éjszakai fényviszonyokkal rendelkező környezetben tartottuk.

3.3. *In vivo* kísérletes modellek

3.3.1. Tesztoszteron-indukált BPH modell

Mivel az előzetes kísérleteinkben a target receptorainkat, a GHRH- és LHRH-receptorokat kizárólagosan a patkány prosztata hámszövetében találtuk meg, ezért a dominánsan hám hyperplasiát okozó tesztoszteron-indukált BPH modellt használtuk kísérleteinkhez.

Az *in vivo* vizsgálatainkban a patkányokat véletlenszerűen kísérleti és kontroll csoportokra osztottuk (n=10). A kísérleti csoportokban a BPH-t az indukciós fázisban (-28.-tól 0.-ik nap) naponta adott szubkután TE injekciókkal (2mg/nap) idéztük elő, melyet kukoricaolajban oldottunk fel. A negatív kontroll állatok szubkután kukoricaolaj injekciót kaptak ugyanebben az időrendben.

3.3.1.A. Az LHRH antagonistá cetrorelix hatásainak vizsgálata

A kísérleti csoportok a következők voltak: (1) TE, (2) TE/ Cetrorelix 0.625 mg/kg, (3) TE/Cetrorelix 1.25 mg/kg, és (4) TE/Cetrorelix 12.5mg/tskg. Az TE-t kapó pozitív kontroll állatok cetrorelix helyett a vivőanyag mannitolt kaptak.

3.3.1.B. A GHRH antagonisták hatásainak vizsgálata

A kísérleti csoportok a következők voltak: (1) TE, (2) TE/finaszterid (0.1 mg/kg/nap), (3) TE/JMR-132 40 µg/nap, (4) TE/MIA-313 20 µg/nap, and (5) TE/ MIA-459 20 µg/nap. Az TE-t kapó pozitív kontroll állatok a vivőoldatot, 0.1% DMSO 10% vizes propylén glycol oldatot kaptak.

3.3.1.C. A GHRH és LHRH antagonisták kombinációjának hatás-vizsgálata

A kísérleti csoportok a következők voltak: (1) TE, (2) TE/finaszterid (0.1 mg/kg/nap), (3) TE/JMR-132 40 µg/nap, (4) TE/Cetrorelix 0.625 mg/kg and (5) TE/JMR-132 40 µg/nap és Cetrorelix 0.625 mg/kg. Az TE-t kapó pozitív kontroll állatok cetrorelix helyett a vivőanyag mannitolt kaptak, GHRH antagonisták és finaszterid helyett pedig azok vivőoldatát, 0.1% DMSO 10% vizes propylén glycol oldatot kaptak.

A kísérlet előtt és az utolsó napján (42. nap) vénás vérmintákat gyűjtöttünk. A szérumot centrifugálással (10 perc, 1000 rpm) választottuk el és -80°C-on tároltuk. A 42. nap reggelén lemértük a patkányok súlyát, majd az anesztetizált patkányokat feláldoztuk. A prosztatákat rögtön egészben eltávolítottuk, súlyukat lemértük és folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk.

3.3.2. Tumor modellek

3.3.2.A. Sejtkultúrák

Humán androgén-independens (PC-3, DU-145) és humán androgén szenzitív (MDA-PCa-2b) prosztata carcinoma sejtvonalakat használtunk.

3.3.2.B. Tumor xenograft modell

Az *in vivo* tumor xenograft kísérleteinkben 1,5 millió PC-3, DU-145, vagy MDA-PCa-2b sejtet injektáltunk szubkután 3 donor állat lágyékába. Az ebből nőtt tumorokat aseptikusan begyűjtöttük, majd kb. 3 mm³-es darabokra aprítottuk fel, melyeket nude egerbe xenotranszplantáltunk trokár segítségével. Amikor az átlagos tumortérfogat kb. 30-75 mm³-t elérte, az állatokat véletlenszerűen kontroll és különböző kezelt csoportokra osztottuk (n = 8-9).

A tumorok térfogatát (hossz x szélesség x magasság x 0.5236) és a testsúlyt hetente mértük. A kísérlet végén az állatokat pentobarbitállal elaltattuk és az abdominális aorta szekciójával feláldoztuk. A tumorokat óvatosan eltávolítottuk, súlyukat lemértük és további vizsgálatok céljából -80 °C-on gyorsfagyasztottuk. Vérmintákat is gyűjtöttünk, illetve teljes boncolást végeztünk minden állaton. Májat, szívet, tüdőt, veséket, lépét, heréket, prosztátákat és vesiculae seminales óvatosan eltávolítottuk és súlyukat lemértük.

3.4. Szöveti eljárások és morfológiai analízis

Sorozat 5 µm vastag metszeteket készítettünk minden fixált mintából, és standard hematoxylin-eosinnal festettük meg a morfológiai analízishez. Az így készült metszeteket Nikon Eclipse 90i mikroszkóppal analizáltuk. A mitotikus és apoptotikus sejteket a csoportonként 3 különböző állat ventralis prosztatáiból készült metszeteken számoltuk 10 random látómezőben 40x nagyítás alatt.

3.5. Immunhisztokémiai festés

A patkány ventralis prosztatákból sorozat 4 µm-es metszeteket készítettünk és immunoperoxidáz módszerrel festettük meg standard protokollt követve. A GHRH-R elleni antitestet 1:1,000, az LHRH-R elleni 1:5, míg az androgén receptor (AR) elleni 1:20 hígításban használtuk szobahőmérsékleten 30 min inkubációs idővel. A GHRH-R és LHRH-R pozitív reakció esetén narancs-barnás granulatként, míg az AR fekete nuclearis festődésként jelent meg.

3.6. DNS izolálás

A patkány prosztata sejttartalmának meghatározása érdekében teljes DNS-t izoláltunk 20 mg ventralis prosztataszövetből a DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) segítségével. Csoportonként 5 mintát analizáltunk. A DNS minőségét a gyártó ajánlásai szerint ellenőriztük.

3.7. RNS izolálás és cDNS szintézis

Teljes RNS-t izoláltunk 30 mg prosztataszövetből a Nucleospin kitet (Macharey-Nagel) használva. Csoportonként 3 mintát analizáltunk. Az RNS minőségét spektrofotometriával határoztuk meg. A cDNS átírásához 2 µg RNS-ből indultunk ki 40µl végső reakciótérfogattal, a QuantiTect Reverse Transcription Kitet használva Veriti 96-well Thermal Cycler gépen.

3.8. Kvantitatív real-time RT-PCR

Számos patkány és human gén expresszióját elemeztük specifikus primerek és molekuláris próbákat használva. A real-time PCR reakciókat iCycler iQ Real-Time PCR Detection System-ben végeztük el. A relative génexpressziót a Pfaffl-féle formulának segítségével határoztuk meg.

3.9. RT² Profiler PCR Array

Patkány Növekedési Faktor, Gyulladásos Cytokinek/Receptorok és Jelátvitel Real-Time PCR Arrayeket használtunk, melyekkel összesen 252 gén mRNS szintjét határoztuk meg. A génexpresszió változását a $\Delta\Delta Ct$ módszerrel végeztük el. Az adatok normalizálása öt háztartási génnel történt.

3.10. Western blot

A patkány prosztátákat, illetve a xenograft tumorszöveteket homogenizáltuk, fehérjét Nucleospin kittel izoláltunk. A fehérje lysátumokat a koncentrációknak egységesítése után standard Western blot módszerrel processzáltuk.

3.11. Radioimmunoassay (RIA) és ELISA

A BPH tanulmányainkban kereskedelemben kapható GH, LH, DHT, IGF-1, illetve PSA immunoassay kiteket használtunk a gyártók utasításait követve.

A PC-3 prosztatarák kísérleteinkben a humán VEGF és IGF-II meghatározását a tumorszövetekből egyedi RIA módszert használva végeztük el.

3.12. Ligand kompetíciós assay

A patkány prosztatában a GHRH és LHRH receptorok, míg a xenograft prosztata tumorszövetekben a GHRH receptorokat ligand kompetíciós assay-el karakterizáltuk.

3.13. Statisztikai analízis

Az adataink statisztikai értékelését SigmaStat 3.0 szoftverrel (Sytat Software) végeztük. Az eredményeinket átlag \pm SEM formában közöltük. One-way ANOVA-t követően Bonferroni *t* tesztet, Student–Newman–Keuls tesztet, vagy two-tailed Student's *t* tesztet végeztünk. Statisztikai különbséget $P < 0.05$ esetén fogadtuk el.

4. LEGJELENTŐSEBB EREDMÉNYEINK

4.1. Az LHRH antagonisták hatásai kísérletes benignus prosztata hyperplasia modellen (1. tanulmány)

4.1.1. Az LHRH antagonisták hatásai a patkány prosztata súlyán

A negatív kontroll állatok prosztatasúlya 264.8 ± 9.6 mg/100 g testsúly volt, míg a TE kontroll állatok prosztatája 40.52%-kal megnagyobbodott: 372.1 ± 25.3 mg/100 g testsúly ($p < 0.001$). A cetorelix 0.625 mg/kg dózisban 17.88%-kal csökkentette az állatok prosztatasúlyát ($p = 0.02$). Ez a csökkenés hasonló volt az 1.25 mg/kg cetorelix-szel elérhető (18.65 % csökkenés [$p = 0.01$]), és további csökkenés történt 12.5 mg/kg cetorelix-szel (35.17% csökkenés [$p < 0.001$]).

4.1.2. A 0.625 mg/kg cetorelix hatása a gyulladást elősegítő citokinek és növekedési faktorok génexpressziójára

A cetorelix kezelés hatására jelentősen lecsökkent a IFN- γ , IL-1 α , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-15, IL-17 β és LTA citokinek szintje. A chemokinek és chemokin receptorok közül a C5, CCL25, SPP1, CCR4, CCR9 and BLR-1/CXCR5 génexpresszióját vitte le a cetorelix. A növekedési faktorok közül FGF-2, FGF-7, FGF-8, FGF-14, TGF- β 1, BMP-7 és VEGF-A szintjei csökkentek. Ezen változásokat real-time PCR-ral megerősítettük.

4.1.3. A 0.625 mg/kg cetorelix hatása az LHRH-R, LHRH, AR and 5 α -reductase 2 expresszióra a patkány prosztatában

Az LHRH-R és LHRH ligand expresszióját a patkány prosztatában mRNS és fehérje szinten is igazoltuk. Az LHRH-R szintben nem történt változás a cetorelix kezelés után. Az LHRH expresszió megemelkedett a cetorelix kezelést követően. Az AR szintet lecsökkentette a cetorelix kezelés. A cetorelix az 5 α -reduktáz 2 szintet is jelentősen csökkentette.

4.1.4. LHRH receptor ligand kompetíciós assay a patkány prosztatában

A ligand kompetíciós assay egységes osztályú nagy-affinitású LHRH receptorok jelenlétét mutatta ki a patkány prosztatában.

4.2. A GHRH antagonisták hatásai kísérletes benignus prosztata hyperplasia modellen (2. tanulmány)

4.2.1. A GHRH receptor expresszió immunohisztokémiai kimutatása

Az immunohisztokémiai analízissel megállapítottuk, hogy a GHRH receptorok a patkány prosztata hámszövetének luminalis membránjában és az apicalis cytoplasmában helyezkednek el.

4.2.2. A GHRH antagonisták csökkentik a prosztataméretet

A negatív kontroll állatok prosztatasúlya 234.9 ± 16.7 mg/100 g testsúly volt, míg a TE kontroll állatok prosztatája 55.5% -kal megnagyobodott: 365.4 ± 20.3 mg/100 g testsúly ($p < 0.001$). A JMR.132, MIA-313, and MIA-459 GHRH antagonisták 17.8%, 17.0% illetve 21.4%-kal csökkentették az állatok prosztatasúlyát ($P < 0.05$). Ezek a csökkenések nagyobbak voltak a 0.1 mg/kg/nap finaszteriddel elért redukciónál (14.43%). A GHRH antagonisták jelentősen csökkentették a prosztata DNS tartalmát is.

4.2.3. A GHRH antagonisták csökkentik a gyulladást elősegítő IL-1 β , NF- κ β and COX-2 expresszióját

A prosztatákban a IL-1 β , NF- κ β /p65 (RelA), és COX-2 fehérjék szintje megemelkedett a TE indukció után, míg a GHRH antagonisták és finaszterid jelentősen csökkentették azokat.

4.2.4. A GHRH antagonisták gátolják a sejtosztódást és apoptózist indukálnak

Az apoptotikus sejtek száma magasabb volt a GHRH antagonistákkal és finaszteriddel kezelt csoportokban, bár az emelkedés a TE kontrollokéhoz képest statisztikailag nem volt szignifikáns. A GHRH antagonisták és a finaszterid emelték a Bax mRNS expresszióját és csökkentették a Bcl-2-ét. A JMR-132 és MIA-459 antagonista jelentősen csökkentette a PCNA fehérje szintet.

4.3. A GHRH és LHRH antagonisták kombinációjának hatása kísérletes benignus prosztata hyperplasia modellen (3. tanulmány)

4.3.1. A GHRH és LHRH receptor expresszió immunohisztokémiai kimutatása

Az immunohisztokémiai analízissel megállapítottuk, hogy a GHRH és LHRH receptorok a patkány prosztata hámjának luminalis membránjában és az apicalis cytoplasmában helyezkednek el.

4.3.2. A GHRH és LHRH antagonisták kombinációja csökkenti a prosztataméretet

A negatív kontroll állatok prosztatasúlya 248.0 ± 10.7 mg/100 g testsúly volt, míg a TE kontroll állatok prosztatája 48.2%-kal nagyobodott: 367.5 ± 15.9 mg/100 g testsúly ($p < 0.001$). A JMR.132 GHRH antagonista, az LHRH antagonista cetorelix és ezek kombinációja 18.6%, 21.3% illetve 30.3%-kal csökkentették az állatok prosztatasúlyát. Ezek a csökkenések nagyobbak voltak a 0.1 mg/kg/nap finaszteriddel elért redukciónál (13.8%). A JMR-132, cetorelix és a kombinációjuk is jelentősen csökkentették a prosztata DNS tartalmát is.

4.3.3. A GHRH és LHRH antagonisták kombinációjának hatása a 5AR2, α 1A-AR, AR, PSA és STEAP fehérjeszintekre

A GHRH antagonista JMR-132 csökkentette a 5AR2 protein szinteket. Cetorelix csökkentette a α 1A-AR protein szinteket. A prosztata AR szintet a TE indukció megemelte, míg a kezelések közül csak a JMR-132 csökkentette azt. A prosztata PSA szintet a TE

indukció 62%-kal emelte, míg a GHRH/LHRH kombináció 83%-kal csökkentette azt. A prosztata STEAP szintet a JMR-132 és a kombináció 74% és 83%-kal csökkentette.

4.3.4. A GHRH és LHRH antagonisták kombinációja csökkenti a gyulladást elősegítő IL-1 β , NF- κ B and COX-2 expresszióját

A prosztata IL-1 β szint 57%-kal csökkent a kombinációs kezelés után. A JMR-132, cetorelix és kombinációs kezelés szintén jelentősen csökkentette a NF- κ B/p65 protein szintet 48%, 37% illetve 54%-kal. A JMR-132 és a kombináció 79% and 97 %-kal csökkentette a COX-2 szinteket.

4.3.5. A GHRH és LHRH antagonisták kombinációja gátolja a sejtosztódást és apoptózist indukál

HE metszetek morfológiai elemzésével kimutattuk, hogy a JMR-132, a cetorelix, a kombinációs kezelések és a finaszterid csökkentik az átlagos hámtérületet a ventralis prosztatában. Az mitotikus sejtek száma kevesebb volt az összes kezelés után. Az apoptotikus sejtek száma magasabb volt a JMR-132, cetorelix, kombinációs kezelések és a finaszterid kezelt csoportokban, bár ez a TE kontrollokéhoz képest statisztikailag nem volt szignifikáns. A GHRH és LHRH antagonisták kombinációja jelentősen, 58%-kal csökkentette a PCNA fehérje szintet. A kombinációs kezelés és finaszterid megemelték a Bax mRNS expresszióját, míg JMR-132, cetorelix, és kombinációs kezelések csökkentették a Bcl-2-ét. A p53 mRNS szintet az összes kezelés szupresszálta.

4.4. A PC-3 prosztata carcinoma növekedésének dózis-dependens gátlása MZ-J-7-138 GHRH antagonista kezeléssel tumorális növekedési faktorok szupressziójával

4.4.1. A GHRH antagonista MZ-J-7-138 hatása a PC-3 humán androgen-independens prosztatarák növekedésére nude egerekben

A GHRH antagonista MZ-J-7-138 minimum hatásos dózisa 2.5 μ g/nap volt, mely 52%-os növekedésgátlást okozott, míg az 5 μ g/nap MZ-J-7-138 65%-os, a 10 μ g/nap dózis pedig 78%-os gátlást eredményezett. A tumor duplázódási idő 6.2 napról 12.4 napra nőtt a 10 μ g/nap kezeléssel.

4.4.2. A GHRH antagonista MZ-J-7-138 hatása a VEGF és IGF-II expresszióra

A GHRH antagonista MZ-J-7-138 kezelés 47.3%-os IGF-II és 55%-os VEGF szint csökkenést okozott a PC-3 tumorokban. Az alacsonyabb dózisú antagonista kezelések kisebb csökkenést okoztak.

4.4.3. GHRH receptor ligand kompetíciós assay PC-3 tumoron

A ligand kompetíciós assay egységes osztályú nagy-affinitású GHRH receptorok jelenlétét mutatta ki a vizsgált PC-3 tumorokon.

4.5. A GHRH antagonisták kísérletes prosztatarákok növekedésére gyakorolt gátló hatása összefügg a vad-típusú p53 szint növekedésével, illetve a mutáns-p53 és p21 fehérjeszintek csökkenésével

4.5.1. A GHRH antagonista MZ-J-7-138 hatása a PC-3 humán androgen-independens prosztatarák növekedésére nude egerekben

Az MZ-J-7-138 jelentősen, 77%-kal gátolta a PC-3 tumornövekedést a kontrollhoz képest ($p < 0.01$). Ez az antiproliferatív hatás a végső tumorsúlyokon is megmutatkozott (66%-os gátlás). A tumor duplázódási időt hasonlóan megnyújtotta a MZ-J-7-138.

4.5.2. A GHRH antagonista MZ-J-7-138 hatása DU-145 humán androgen-independens prosztatarák növekedésére nude egerekben

Jelentős, 66%-os tumornövekedés gátlást eredményezett a MZ-J-7-138 kezelés a DU-145 tumorokon, a kontrollhoz képest. Ez a gátló hatás a végső tumorsúlyokon is megmutatkozott (62%-os gátlás). A tumor duplázódási idő 10.6 napról 25.2 napra nőtt a MZ-J-7-138 kezeléssel.

4.5.3. A GHRH antagonista MZ-J-7-138 és LHRH antagonista cetorelix hatása az MDA-PCa-2b humán androgen-dependens prosztatarák növekedésére nude egerekben

A PC-3 és DU-145 tumoroknál tapasztalt gátlásnál nagyobb tumornövekedés gátlást okozott a MZ-J-7-138, cetorelix és kombinációjuk az MDA-PCa-2b tumorokon. A kombinációs terápia vezetett a legnagyobb gátláshoz. A végső tumortömegeket tekintve hasonló tendenciát mutattak a különböző kezelések. A tumor duplázódási időt szintén kitolta a cetorelix önmagában, illetve kombinációban.

4.5.4. GHRH receptor ligand kompetíciós assay

A ligand kompetíciós assay egységes osztályú nagy-affinitású GHRH receptorok jelenlétét mutatta ki mindhárom vizsgált tumorvonalon.

4.5.5. A GHRH antagonista MZ-J-7-138 és LHRH antagonista cetorelix hatása a p53 tumor szupresszor protein expressziójára

A DU-145 tumorokban a mt-p53 szint jelentősen csökkent a GHRH antagonista kezelés hatására. A wt-p53 expresszió a MDA-PCa-2b tumorokban megemelkedett a GHRH antagonista, cetorelix és ezek kombinációinak hatására.

4.5.6. A GHRH antagonista MZ-J-7-138 és LHRH antagonista cetorelix hatása a p21 protein expressziójára

A PC-3 és DU-145 tumorokban a GHRH antagonista MZ-J-7-138 jelentősen gátolta a p21 protein expressziót. A MDA-PCa-2b tumorokban a MZ-J-7-138 illetve a cetorelix

okozta p21 protein expresszió csökkenés nem volt statisztikailag szignifikáns a nagy standard hiba miatt.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az LHRH antagonistá cetrorelix hatásai kísérletes benignus prosztata hyperplasia modellen (1. tanulmány)

Klinikai tanulmányokkal bebizonyították, hogy az LHRH antagonistá cetrorelix terápia a LUTS tünetek hosszan tartó javulását okozta. Ez a javulás, mely magába foglalja a prosztataméret csökkenését és a vizelet maximális kiáramlási sebességének növekedését, nagyobbak tűnik az α -blokkolók vagy a 5α -reduktáz gátlók okozta javuláshoz. A közelmúltban végzett klinikai tanulmányokban a cetrorelix alacsony dózisban a hypophysis-gonád tengely és a tesztosteron szint csak részleges szuppresszióját okozta.

A jelen tanulmányban kimutattuk, hogy a cetrorelix nem kasztráló, 0.625 mg/kg dózisban is jelentősen, 18%-kal csökkenti a prosztatasúlyt. A BPH modellünkben észlelt szövettani megfigyeléseink szerint a tesztosteron kezelt állatok prosztatájában hyperplasticus változások történtek, míg a cetrorelix alacsony, 0.625 mg/kg dózisban ezen hyperplasticus változások involutióját idézte elő, a normal állatok prosztatájának morfológiájához nagyon hasonló szövettani szerkezetet eredményezve.

Az LHRH és LHRH-R jelenlétét real-time PCR-rel és Western blottal mutattuk ki. Továbbá, ligand kompetíciós assay-vel egységes osztályú nagy-affinitású LHRH receptorok jelenlétét mutattuk ki a patkány prosztatájában. A 0.625 mg/kg dózisú cetrorelix csökkentette az AR és 5α -reduktáz 2 szinteket is a prosztatájában, bár a szérumban DHT és LH szintek kevésbé csökkentek és a szérumban PSA szintbeli változások nem voltak jelentősek. Emellett korábbi tanulmányok az LHRH és LHRH-R jelenlétét, illetve az LHRH és analógjainak antiproliferatív hatását mutatták ki számos malignus tumorban. A közelmúltban kimutattuk, hogy a cetrorelix gátolja a BPH-1 humán prosztata epithelialis sejtvonal növekedését *in vitro*. Mindenezek a klinikai és állatkísérletes megfigyelések azt sugallják, hogy az alacsony dózisú cetrorelix a gonadális funkciót nem károsítja. A prosztata zsugorodása a cetrorelix közvetlen, a prosztata LHRH receptorokon kifejtett gátló hatásának az eredménye. Megfigyeléseink egy LHRH-n alapuló autokrin szabályozó rendszer jelenlétét sugallják.

A real-time PCR array kísérleteink megmutatták, hogy számos, a gyulladást elősegítő citokin és növekedési faktor szintje növekedett a tesztosteron kezelt kontroll állatok prosztatájában és csökkent a cetrorelix kezeltekében. Ezen inzulin-szerű, transzformáló és fibroblaszt növekedési faktorok, illetve effektor molekuláik számos más interleukinnel együtt

a stromalis és epithelialis prosztata sejtek abnormális növekedéséhez vezethetnek. Az alacsony dózisú cetorelix a gyulladást elősegítő citokinek mRNS szintét csökkentette. Ezek a citokinek a BPH-ban részét képezik egy gyulladással járó hálózathoz, melynek számos növekedési faktor is része. A T sejtek által termelt IFN- γ a növekedés gátló hatású TGF- β természetes antagonistája, az FGF-2 pedig stimulálja a növekedést. Az IFN- γ stimulálja az IL-15-t is, mely a beáramló T-lymphocyták mennyiségét gyarapítja. Ezek a T-sejtek további lymphokineket, mint például IL-4-et és IL-13-at termelnek, illetve a 3 β -hydroxydehydrogenáz/izomeráz indukálásával aktív androgének és ösztrogének képződését segítik elő. A szintén T-sejtekből eredő IL-17 pedig az IL-6, IL-8, IL-1 α és β stimulálásával az immunválasz finom hangolását végzi.

Összefoglalva, a széleskörű génextpresszió analízisünkkel kimutattuk, hogy a tesztoszteron kezelt BPH kontroll állatok prosztatájában számos gyulladást elősegítő citokin és növekedési faktor génje aktiválódott, mely gének expresszióját a cetorelix szuppresszálta. Ezen megfigyeléseink azt sugallják, hogy a cetorelix BPH-ra gyakorolt kedvező hatása a gyulladást elősegítő citokin és növekedési faktor mRNS szuppressziójának köszönhető.

Jelen tanulmányunk eredményei szerint a prosztatasúly csökkenés a prosztatában található LHRH-receptorokon kifejtett közvetlen cetorelix hatásnak és a gyulladást elősegítő citokin és növekedési faktor mRNS szuppressziójának köszönhető. Megfigyeléseink fény derítettek az LHRH antagonisták hatásmechanizmusára BPH-ban és az LHRH lokális növekedési faktorként betöltött szerepét sugallják. Lehetséges, hogy az LHRH antagonistákat kombinációban más szerekkel a klinikumban is lehet használni a BPH kezelésére.

5.2. A GHRH antagonisták hatásai kísérletes benignus prosztata hyperplasia modellen (2. tanulmány)

Ennek a tanulmányunknak a legfőbb megfigyelése az, hogy a GHRH antagonisták (JMR-132, MIA-313 és MIA-459) csökkentik a prosztata méretét a BPH egy kísérletes modelljében. A prosztata zsugorodásán felül, számos, a BPH pathogenesisében és progressziójában szerepet játszó növekedési és gyulladással járó faktor szintjét jelentősen csökkentette a GHRH antagonistákkal való kezelés. A GHRH, GHRH-R és annak SV1 splice variánsának expresszióját Western blottal mutattuk ki. Továbbá, ligand kompetíciós assay-vel nagy-affinitású GHRH receptorok jelenlétét igazoltuk a patkány prosztatában, és immunohisztokémiai elemzéseink szerint a GHRH-R az epithelialis sejtek luminalis részén expresszálódik. A szérumban GH, IGF-1, DHT, illetve PSA szintekben nem volt jelentős változás GHRH antagonistákkal való kezelés után. A közelmúltban kimutattuk, hogy a GHRH

antagonisták gátolják a BPH-1 humán prosztata epithelialis sejtvonal növekedését *in vitro*. Mindenezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a prosztata zsugorodása a GHRH antagonisták közvetlen, a GH/IGF-I axistól független, a prosztata GHRH receptorokon át kifejtett gátló hatásának az eredménye. A GHRH és receptorainak együttes jelenléte a patkány prosztatában támogatja egy GHRH-n alapuló autokrin/parakrin szabályozó rendszer létezését. Ennek, a GHRH antagonistákkal gátolható rendszernek a jelenléte megmagyarázza az ilyen antagonisták prosztata sejtekre gyakorolt antiproliferatív hatását, mind sejt kultúrában, mind a prosztatarák xenograft-nude egér modelljében. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a GHRH szerepet játszik a BPH pathogenezisében.

Az adataink, miszerint a gyulladáscsökkentő citokinek szintje megemelkedett az indukált BPH-es állatok prosztatájában konzisztensek korábbi klinikai és kísérletes megfigyelésekkel. A GHRH antagonisták jelentősen csökkentették a gyulladáscsökkentő citokinek szintjét. Ezek a citokinek részét képezik egy gyulladáscsökkentő hálózatnak a BPH-ban, melynek számos növekedési faktor is része, illetve elősegítik a T-sejtek infiltrációját és az ezt követő gyulladás progresszióját a BPH-ban.

Kimutattuk, hogy a tesztoszteron kezelés a IL-1 β , NF- κ B és COX-2 proteinek szintjének emelkedéséhez vezet a patkány prosztatában, míg a JMR-132, MIA-313, és MIA-459 GHRH antagonisták kifejezett csökkenését okozták ezen fehérjéknek. Az IL-1 β , mely egy gyulladáscsökkentő citokin, az NF- κ B aktivációját okozza egérben. Az NF- κ B proteinek, mint például a NF- κ B/p65 (RelA), indukálható transzkripció faktorok, melyek az immunválaszban, angiogenesisben, sejt adhézióban, proliferációban, differenciálódásban és apoptózisban szerepet játszó gének színtjait szabályozzák. Az NF- κ B aktivációja krónikus gyulladás egyik legkorábbi eseménye. A COX-2, mely a cyclooxygenáz enzim indukálható formája, egy korai válasz gén, mely felszaporodik specifikus stimulusok, mint például mitogének, növekedési faktorok és számos citokin, így az IL-1 hatására. A COX-2 expresszióját, illetve a gyulladást elősegítő mediátorok által indukált COX-2 dependens prosztanoid termelését túlnyomóan az NF- κ B dependens géntranszkripció szabályozza, mely arra utal, hogy ok-okozati kapcsolat lehet a GHRH antagonista okozata csökkent NF- κ B/p65 szint, a COX-2 upreguláció gátlása és a csökkent IL-1 β termelés között. A COX-2 túlexpresszióját humán BPH mintákban már leírták, illetve a GHRH antagonisták csökkentették a COX-2 szintet kísérletes tüdő- és prosztatacarcinomákban. Továbbá kimutatták, hogy a COX-2 növeli az anti-apoptotikus Bcl-2 szintet, így csökkenti az apoptózis mértékét a prosztataszövetben.

Bizonyítottuk, hogy mind a három GHRH antagonista gátolja a sejtproliferációt, növeli a p53 tumor szupresszor és csökkenti a PCNA szintet patkány prosztatában. Az anti-

apoptotikus Bcl-2 szint emelkedését figyeltük meg a tesztoszteron-indukált BPH prosztatákban. Ez a Bcl-2 túlexpresszió megegyezik Alonso-Magdalena és mtsai human BPH mintákban történt megfigyelésével, mely arra utal, hogy a BPH nem egy proliferatív betegség, hanem inkább az apoptózisnak ellenálló sejtek felszaporodása. Munkánkban kimutattuk, hogy a GHRH antagonista kezelés megemelkedett pro-apoptotikus Bax és csökkent anti-apoptotikus Bcl-2 mRNS szinteket okoz. A prosztatahámiban található apoptotikus sejtek száma szintén emelkedett a GHRH antagonista kezelés után, bár ez nem volt szignifikáns. A GHRH antagonisták ezen pro-apoptotikus hatásait valószínűleg a csökkent prosztatabéli COX-2 szint vagy az intrinsic és extrinsic apoptotikus utak gátlása okozza.

A jelátviteli utak kvantitatív PCR array-el történő elemzésével kimutattuk a mitogén hedgehog, PI3-AKT, és foszfolipáz-C jelátviteli utak és effektor molekuláik szerepét. Ezen jelátviteli utak közvetítik valószínűleg a GHRH antagonisták BPH-ra gyakorolt kedvező hatását. A GHRH antagonisták a MAPK útvonal gátlásán át akadályozzák a malignus sejtek növekedését.

A GHRH antagonisták terapeutikus hatása számos tekintetben, így a prosztata zsugorodásban, a növekedési faktorok és gyulladást elősegítő COX-2 szint csökkentésben, illetve antiproliferációs és pro-apoptotikus hatásokban is felülmúlta a finaszteridet. A finaszterid mellékhatásait is figyelembe véve a GHRH antagonisták akár a BPH alternatív gyógyszeres kezelését is képezhetik.

Összefoglalva, a jelen tanulmányban kimutattuk, hogy a JMR-132, MIA-313, és MIA-459 GHRH antagonisták jelentős súlycsökkenést és DNS tartalom csökkenést okoznak a patkány prosztatában. Adataink szerint ez a prosztatasúly csökkenés a prosztatában található GHRH-receptorokon kifejtett közvetlen GHRH antagonista hatásnak és a számos gyulladást elősegítő cytokin és növekedési faktor mRNS szintjének szuppressziójának köszönhető. Kimutattuk azt is, hogy a GHRH antagonisták erősen gátolják a IL-1 β , NF- κ β , és COX-2 expresszióját a prosztatában. Szemléltettük a GHRH antagonisták apoptózist elősegítő hatását. Megfigyeléseink fény derítettek az GHRH antagonisták hatásmechanizmusára BPH-ban, és az GHRH lokális növekedési faktorként betöltött szerepére utalnak. Lehetséges, hogy az GHRH antagonisták önmagukban, vagy más szerekekkel kombinálva a klinikumban is hasznossá válhatnak a BPH kezelésében.

5.3. A GHRH és LHRH antagonisták kombinációjának hatása kísérletes benignus prosztata hyperplasia modellen (3. tanulmány)

Ebben a tanulmányunkban kimutattuk, hogy a GHRH antagonistá JMR-132 az LHRH antagonistá cetorelix-szel kombinálva növeli a prosztatá zsugorodását és sejttartalmának csökkenését okozza. Ezen antagonisták kombinációjával történt kezelés csökkentette számos, a BPH pathogenesisében és progressziójában szerepet játszó molekula szintjét.

Immunohisztokémiai elemzéseink szerint a GHRH- és LHRH-receptorok az epithelialis sejtek luminalis részén expresszálódnak. A GHRH, LHRH, illetve ezek receptorainak jelenlétét a patkány prosztatában Western blottal igazoltuk. Korábban már beszámoltunk arról, hogy ligand kompetíciós assay-vel nagy-affinitású GHRH- és LHRH receptorok vannak jelen a patkány prosztatában. A szérúm GH, IGF-1, DHT, illetve PSA szintekben nem volt jelentős változás GHRH-és LHRH antagonistá kombinációs kezelés után. A prosztatá és szérúm PSA, egy jól ismert tumor marker, szintjei jelentősen leestek a kombinációs kezelés után. A STEAP egy sejtfelszíni antigén, mely túlnyomóan prosztatacarcinómában expresszálódik, és számos szolid tumorban potenciális terápiás célpont. A kombinációs kezelés radikálisan csökkentette a STEAP szintet.

A közelmúltban kimutattuk, hogy a GHRH és LHRH antagonisták gátolják a BPH-1 humán prosztatá epithelialis sejtvonal növekedését *in vitro*. Mindenezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a prosztatá zsugorodása a GHRH és LHRH antagonisták közvetlen, a prosztatá GHRH illetve LHRH receptorokon át kifejtett gátló hatásának az eredménye. A GHRH, LHRH és ezek receptorainak együttes jelenléte a patkány prosztatában támogatja egy GHRH-n és LHRH-n alapuló autokrin/parakrin szabályozó rendszer létezését. Ennek, az antagonistákkal gátolható rendszernek a jelenléte megmagyarázza a GHRH és LHRH antagonisták prosztatá sejtekre gyakorolt antiproliferatív hatását mind sejt kultúrában, mind és a prostatárák xenograft-nude egér modelljében. Megfigyeléseink arra autalnak, hogy a GHRH és LHRH szerepet játszik a BPH pathogenesisében.

Kimutattuk, hogy a JMR-132 és a cetorelix kombinációjá az IL-1 β , NF- κ β és COX-2 proteinek szintjének és az NF- κ β /p50 foszforilációjának jelentős csökkenéséhez vezet. Az IL-1 β , NF- κ β és COX-2 proteinek szerepét fent tárgyaltuk.

Tanulmányunkban bebizonyítottuk, hogy a kombinációs kezelés jelentősen csökkentette a ventralis prosztatá átlagos hámtérületet, DNS tartalmát és a PCNA proliferációs marker fehérje szintjeit. Ezek mellett az anti-apoptotikus Bcl-2 gén downregulációját és a pro-apoptotikus Bax gén upregulációját is megfigyeltük.

A JMR-132 és a cetorelix kombinációjának terápiás hatása számos tekintetben, így a prosztatá zsugorodásban, a PSA, STEAP, IL-1 β és COX-2 szintek csökkentésben, illetve antiproliferációs és pro-apoptotikus hatásokban is felülmúlta a finaszteridet. A finaszterid

mellékhatásait is figyelembe véve a GHRH és LHRH antagonisták kombinációja akár a BPH alternatív gyógyszeres kezelésének is bizonyulhat.

Összefoglalva, a jelen tanulmányban kimutattuk, hogy a GHRH antagonista JMR-132 az LHRH antagonista cetorelix-szel kombinálva növeli a prosztatata zsugorodását és sejttartalmának csökkenését kísérletes BPH modellünkben. Adataink szerint ez a prosztatasúly csökkenés a prosztatában található GHRH- és LHRH receptorokon kifejtetett közvetlen GHRH és LHRH antagonista hatásoknak és a PSA, STEAP, IL-1 β és COX-2 szintek szupressziójának köszönhető. Szemléltettük a kombinációs terápia antiproliferatív és apoptózist elősegítő hatását. Megfigyeléseink fény derítettek az GHRH és LHRH antagonisták kombinációjának a hatásmechanizmusára BPH-ban, és az GHRH/LHRH lokális növekedési faktorként betöltött szerepét sugallják. Lehetséges, hogy az GHRH antagonisták önmagukban, vagy LHRH antagonistával kombinálva a klinikumban is hasznos terápiává válhatnak a BPH kezelésében.

5.4. A PC-3 prosztata carcinoma növekedésének dózis-dependens gátlása MZ-J-7-138 GHRH antagonista kezeléssel tumorális növekedési faktorok szupressziójával

A visszaeső androgén-független prosztatarák kezelése továbbra is jelentős kihívás. Az LHRH és GHRH antagonisták, valamint célzott cytotoxicus peptidanalógok fejlesztésével újabb kezelési lehetőségeket kínálnak. A polypeptid növekedési faktorok, úgy mint GHRH, gastrin-releasing peptide, IGF-I és -II, VEGF, bFGF, EGF illetve ezek receptorai széles körben jelen vannak a prosztatarákban. Ezen növekedési faktorok némelyike aberránsan stimulálja az androgén receptor útvonalat és így hozzájárul az prosztata rákos sejteinek androgén-független növekedéséhez. A GHRH-nak a különböző humán neoplasmák növekedésében játszott szerepe GHRH antagonisták kifejlesztésére ösztönözte laboratóriumunkat ezen malignanciák endokrin terápiájának céljából. A GHRH antagonisták képesek számos humán kísérletes prosztatarák növekedését gátolni egyrészt indirekten, a hypophysisealis GH és hepaticus IGF-I szekréció gátlásával, másrészt direktén, a tumorális GHRH receptorok blokkolásával és tumorális IGF-I és -II csökkentésével.

Jelen tanulmányunkban kimutattuk, hogy az MZ-J-7-138 GHRH antagonista dózis-dependens módon gátolja a PC-3 prosztatarák növekedését és a tumorális VEGF és IGF-II növekedési faktorokat. Az elmúlt években számos GHRH antagonista növekedés gátló hatását teszteltünk különböző dózisokban prosztatarák xenograftokon *in vivo*.

Egyértelműen megmutattuk a laboratóriumunk által kifejlesztett egyik leghatásosabb GHRH antagonista, a MZ-J-7-138, dózis-dependens hatásait a tumor gátláson és növekedési

faktorok szupresszió. A VEGF fehérje szintek jelentős csökkenését tapasztaltuk 5 µg és 10 µg/nap dózisoknál. Az IGF-II szint csökkenését 10 µg/nap dózisonál figyeltük meg. A tumorális VEGF és IGF-II gátlása megegyezik a laborunkban korábban megfigyelt adatokkal, ahol is a növekedési faktorok szintjének csökkenése történt nagy dózisú GHRH antagonisták kezelése után. Azonban a jelen tanulmány szerint az alacsonyabb dózisú GHRH antagonistával elért tumornövekedés gátlás nem társult a tumorális növekedési faktorok szintjének jelentős csökkenésével, hanem az valószínűleg ezen antagonistáknak tumorális GHRH receptorokon kifejtett direkt gátló hatásának az eredménye.

Ebben a tanulmányunkban RT-PCR-rel és radioligand assay-vel is kimutattuk a GHRH receptorok jelenlétét. A 10 µg/nap dózisú MZ-J-7-138 GHRH-R és SV1 mRNS expressziójára gyakorolt hatását is vizsgáltuk. Az SV1 a PC-3 tumorokban magas szinten jelen van és mely valószínűleg a fő tumorális GHRH receptor típus. Az SV1 mRNS csekély mértékben downregulálódott a kezelés után. Ezzel ellentétben, a GHRH-R jelentősen upregulálódott. Végül, a GHRH ligand mRNS szintje jelentősen, egynegyedére lecsökkent a GHRH antagonisták kezelése hatására.

Eredményeink jól szemléltetik egy újabb GHRH antagonisták dózisfüggő hatásosságát az androgén-független prosztatarák tumornövekedés gátlásában. A növekedési faktorok, úgy mint VEGF és IGF-II, szintjének csökkenése a GHRH antagonisták magasabb dózisánál volt megfigyelhető. További vizsgálatokra van szükség, hogy megállapítsuk a GHRH antagonisták potenciális használatát a prosztatarák terápiájában. Valószínűleg további, még hatásosabb antagonisták szintézise szükséges e vegyületek terápiás eszközzé való konvertálásához.

5.5. A GHRH antagonisták kísérletes prosztatarákok növekedésének gátló hatása összefügg a vad-típusú p53 szint növekedésével illetve a mutáns-p53 és p21 fehérjeszintek csökkenésével

A p53 tumor szupresszor gén mutációi a malignus tumorokban leggyakrabban talált genetikai változások egyike. Mivel a p53 fehérje számos sejtfunkciót, mint pl. génátírás, DNS szintézis és javítás, sejtciklus gátlása és apoptózis, modulál, a fehérje mutációi ezen funkciókat megszüntetheti és a daganat genetikai instabilitásához, illetve progressziójához vezethet. A p53 változásai egyértelműen társulnak az androgén-független prosztatarákkal, a mutáns-p53 jelentős túlexpressziója figyelhető meg a hormon-refrakter és metasztatikus prosztatarák szövetben.

Az androgén-független prosztatarák modellek, úgy mint PC-3 és DU-145, és az androgén-függőek, mint pl. MDA-PCa-2b és LNCaP, különböző növekedési karakterisztikája és terápiás

válasza ezen modellek p53 státuszának tulajdonítható: az előbbiek mt-p53-t, míg az utóbbiak wt-p53-t expresszálnak. A jelen tanulmányban kimutattuk, hogy a humán kísérletes prosztatarákok növekedésének gátlása az GHRH antagonistá MZ-J-7-138 és LHRH antagonistá cetorelix kezeléssel a wt-p53 és mt-p53 szinteken való különböző hatásokon át valósul meg. Az MZ-J-7-138 a PC-3 és DU-145 tumorok gátlását a mt-p53 szintek csökkenése mellett hozta létre, míg a MDA-PCa-2b tumorokban a wt-p53 upregulációja mellett történt a gátlás. A cetorelix szintén növelte a wt-p53 expressziót a MDA-PCa-2b tumorokban. A wt-p53 expresszió indukciója valószínűleg szerepet játszik a GHRH és LHRH antagonisták MDA-PCa-2b tumornövekedés gátlásának. Eredményeink összhangban vannak a közelmúltban történt megfigyelésekkel, miszerint egy BPH kísérletes modellben a wt-p53 upregulálódott és a DMS-153 kissejtes tüdőcarcinomában az mt-p53 downregulálódott a GHRH antagonistá kezelés hatására. A MDA-PCa-2b tumorokban a GHRH és LHRH antagonistá kombinációja nagyobb tumornövekedés gátlást eredményezett, mint ezen antagonisták külön-külön. Az MZ-J-7-138 az első GHRH antagonistá, mely jelentősen gátolta a MDA-PCa-2b androgén-függő prosztatarák növekedését a velejáró androgén-depriváció nélkül. A korábbi tanulmányainkban, ahol kevésbé potens GHRH antagonistákat alkalmaztunk, az androgén-depriváció szükséges volt a jelentős tumornövekedés gátlás eléréséhez. A GHRH és LHRH receptorok jelenlétét a PC-3, DU-145 és MDA-PCa-2b human sejtvonalakban korábban kimutattuk.

A GHRH antagonisták számos humán kísérletes prosztatarák növekedését direkten gátolják a tumorális GHRH receptorok blokkolásával és a tumorális IGF-I és II termelésének csökkentésével. A GHRH antagonistá kezelés utáni tumornövekedés gátláshoz vezető intracelluláris jelátviteli utak közé tartozik a PKC isoformák expressziójának változása, a p42/44 MAPK (pERK1/2) – c-jun útvonal gátlása, és a Ca^{2+} sejtekbe való belépése, mely apoptózist indukál.

A PC-3 és DU-145 tumorokkal ellentétben, az androgén-függő MDA-PCa-2b prosztatarák modellben a wt-p53 expresszálódik. A MDA-PCa-2b tumorok kezelése MZ-J-7-138-cal a wt-p53 nem szignifikáns upregulációjához vezet.

A p53-nak a DNS károsodás utáni apoptózis ellenőrzésében betöltött szerepe miatt a p53 gént a tumorok cytotoxikus terápiákra adott válasza-döntő faktorának gondolják. A vad típusú p53 fehérje transzkripciós faktorként képes a tumorigenesis szupressziójára és az apoptózis indukálására, míg a mutáns p53 fehérje számos pathophysiológiai folyamathoz kötődik, és a wt-p53-val ellentétes hatásokat vált ki. A PC-3 és DU-145 tumorokban megfigyelt, GHRH antagonisták általi anti-apoptotikus mt-p53 gátlás stratégiát nyújthat az előrehaladott,

kemoterápiára rosszul reagáló prosztatákok chemosensitivitásának növeléséhez és további progressziójának megakadályozásához.

Jelen munka, számos korábbi tanulmányainkkal együtt azt sugallja, hogy a GHRH antagonisták hatékonyak mind a wt-p53 és mt-p53 státuszú tumorok kezelésében is. A GHRH antagonisták határozott előnye így a mt-p53 státuszú tumorok kezelésében lenne, mivel azokban a hagyományos antitumor szerek, mint pl. DNS keresztköti ágensek, antimetabolitok és topoizomeráz I és II gátlók, kevésbé hatékonyak. A közelmúltban kimutatták, hogy a p53 funkció gátlása csökkenti az androgén-receptor mediálta jelátvitelt.

A GHRH antagonista kezelt tumorok p53 jelátviteli változásainak pontosabb feltérképezésének érdekében, megvizsgáltuk a p53 effektoraként ismert p21 (p21^{WAF1/Cip1}) expresszióját. A GHRH és LHRH antagonista kezelés konzekvensen, a tumor p53 státuszára való tekintet nélkül szuppresszálta a p21 protein szinteket. Ez azt jelzi, hogy az antagonisták valószínűleg a p53-tól független mechnizmusokon át befolyásolják a tumorális p21-t. Ennélfogva a wt-p53-t tartalmazó MDA-PCa-2b modellben a wt-p53 upregulációját a p21 szuppressziója kísérte az antagonistákkal történt kezelés után annak ellenére, hogy a wt-p53 a p21 expresszió jól ismert szabályozója. Mindemellett a mt-p53-t expresszáló PC-3 és DU-145 tumorokon végzett kísérleteinkben a mt-p53 gátlását szintén a p21 szuppressziója kísérte. A GHRH antagonistáink p53-tól független p21 szuppressziója a tumorális MAPK (pERK1/2) és pAkt gátlása útján valósulhat meg, mivel a pERK1/2 és pAkt a p21 pozitív regulátorai és a GHRH antagonisták csökkentik a pERK1/2 és pAkt szintet prosztata és tüdőcarcinómákban.

Az anti-apoptotikus p21 GHRH és LHRH antagonisták általi gátlása egy nagyon kedvező molekuláris hatásmechanizmus, mely azt sugallja, hogy ezen antagonisták valószínűleg képesek kivédeni a hagyományos kemoterápiák és sugárterápiák p21 upreguláló hatását és így kemo- vagy radioterápia szenzitizáló ágensként működhetnek. Hasonlóan nem zárható ki az, hogy a GHRH és LHRH antagonisták a kemo- vagy radioterápia káros hatásait kivédő ágensei is lehetnek. A p21 expresszió csökkenése a korábban leírt parakrin/autokrin növekedési factor blokáddal együtt egy multimodális megközelítést ajánlhat egy új rákterápiához.

A GHRH antagonisták által okozott *in vivo* PC-3 and DU-145 tumorgátlás részben a defektív p53 gátlásával, illetve a p21 fehérje expressziójának csökkentésével magyarázható. További kísérletek ezen analógokkal a relapszál, konvencionális kezelésre nem reagáló prosztatákos betegek számára új terápiás modalitás kifejlesztéséhez vezethetnek.

6. ÚJ EREDMÉNYEINK ÖSSZEFOGLALÁSA

6.1. Kísérletes benignus prosztata hyperplasia tanulmányok

- Kimutattuk az egységes osztályú nagy-affinitású GHRH és LHRH receptorok jelenlétét a patkány prosztatában
- Megállapítottuk, hogy a GHRH és LHRH receptorok a patkány prosztata hámjának luminalis membránjában és az apicalis cytoplasmában helyezkednek el
- Az LHRH antagonistá cetorelix-szel történő kezelés jelentős prosztata súlycsökkenést okoz dózis-dependens módon a kísérletes BPH modellünkben
- Adataink szerint ez a prosztatasúly csökkenés a prosztatában található LHRH-receptorokon kifejtett közvetlen cetorelix hatásnak és a gyulladást elősegítő cytokin és növekedési faktor mRNS expresszió szuppressziójának köszönhető
- Bebizonyítottuk, hogy a JMR-132, MIA-313, és MIA-459 GHRH antagonisták jelentős súlycsökkenést és DNS tartalom csökkenést okoznak a patkány prosztatában
- Adataink szerint ez a prosztatasúly csökkenés a prosztatában található GHRH-receptorokon kifejtett közvetlen GHRH antagonistá hatásnak és a számos gyulladást elősegítő cytokin és növekedési faktor mRNS expresszió szuppressziójának köszönhető
- Kimutattuk azt is, hogy a GHRH antagonisták erősen gátolják a IL-1 β , NF- $\kappa\beta$, és COX-2 expresszióját a prosztatában
- Szemléltettük a GHRH antagonisták apoptózist elősegítő hatását
- Megfigyeltük, hogy a mitogén, hedgehog, PI3-AKT, és foszfolipáz-C jelátviteli utak és effektor molekulái szerepet játszanak a GHRH antagonisták hatásmechanizmusában
- Bebizonyítottuk, hogy a GHRH és LHRH antagonisták kombinációja potenciózza a prosztatasúly csökkenését a kísérletes BPH modellünkben
- Eredményeink azt sugallják, hogy ez a prosztatasúly csökkenés a prosztatában található GHRH- és LHRH receptorokon kifejtett közvetlen antagonistá hatásoknak köszönhető
- Kimutattuk, hogy a GHRH és LHRH antagonisták kombinációja jelentősen szuppresszálja a PSA, STEAP, IL-1 β , NF- $\kappa\beta$, és COX-2 expressziót a prosztatában
- Demonstráltuk a kombinációs terápia apoptózist elősegítő és antiproliferatív hatásait is.
-

6.2. Humán prosztata carcinoma xenograft tanulmányok

- Eredményeink szerint a GHRH antagonistá MZ-J-7-138 hatékony a wt-p53 (MDA-PCa-2b) és mt-p53 (PC-3 and DU-145) fenotípusú kísérletes prosztatarákok kezelésében
- Kimutattuk, hogy a GHRH és LHRH antagonistá kezelés szupresszálja a p21 protein szintet a tumor p53 fenotípusától függetlenül. Ez azt mutatja, hogy ezek az antagonisták valószínűleg a p53-tól független mechnizmuson át befolyásolják a tumoralis p21 szintet.
- A VEGF és IGF-2 növekedési faktorok szintek csökkenése a GHRH antagonistá a nagyobb dózisainál és hosszabb kezelésénél volt evidens.

7. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

A Ph.D. értekezéshez felhasznált eredeti közlemények impakt faktora:	23.456
Az összes eredeti közlemény kumulatív impakt faktora (absztraktok nélkül):	79.027
A Ph.D. értekezéshez felhasznált absztraktok impakt faktora:	2.365
Absztraktok összesített impakt faktor (közlemények nélkül):	117.95

I. Az értekezés alapjául szolgáló eredeti közlemények

1. Minősített folyóiratban megjelent cikkek:

1. **Rick FG**, Schally AV, Block NL, Nadji M, Szepeshazi K, Zarandi M, Vidaurre I, Perez R, Halmos G, Szalontay L. Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) reduce prostate size in experimental benign prostatic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Mar 1;108(9):3755-60. **[IF: 9.771]** (2010)
2. **Rick FG**, Schally AV, Block NL, Halmos G, Perez R, Fernandez JB, Vidaurre I, Szalontay L. LHRH antagonist Cetrorelix reduces prostate size and gene expression of proinflammatory cytokines in a rat model of benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2011 May 15;71(7):736-47. **[IF: 3.377]** (2010)
3. **Rick FG**, Szalontay L, Schally AV, Block NL, Nadji M, Szepeshazi K, Vidaurre I, Zarandi M, Kovacs M, Rekasi Z. Combining of antagonist of GHRH with antagonist of LHRH greatly improves BPH shrinkage. *J Urol*. 2012. Közlésre elfogadva. **[IF: 3.862]** (2010)
4. Stangelberger A, Schally AV, **Rick FG**, Varga JL, Baker B, Zarandi M, Halmos G. Inhibitory effects of antagonists of growth hormone releasing hormone on experimental prostate cancers are associated with upregulation of wild-type p53 and decrease in p21 and mutant p53 proteins. *Prostate*. 2011 July 27. doi: 10.1002/pros.21458. [Epub ahead of print] **[IF: 3.377]** (2010)
5. Heinrich E, Schally AV, Buchholz S, **Rick FG**, Halmos G Mile M, Groot K, Hohla F, Zarandi M, Varga JL. Dose-dependent growth inhibition in vivo of PC-3 prostate cancer with a reduction in tumoral growth factors after therapy with GHRH antagonist MZ-J-7-138. *Prostate*. 2008 Dec 1;68(16):1763-72. **[IF: 3.069]**

2. Referált folyóiratban megjelent összefoglalók:

1. **Rick FG**, Schally AV, Block NL, Szalontay L, Siejka A, Rincon R, Fensterle J, Engel J. Reduction in prostate size after treatment with Cetrorelix in a rat model of benign prostatic hyperplasia (BPH). *Urology*. 2009;74(4) S45. **[IF: 2.365]**

II. Egyéb saját közlemények

1. Minősített folyóiratban megjelent cikkek:

1. Kanashiro-Takeuchi RM, Takeuchi LM, **Rick FG**, Dulce R, Treuer AV, Florea V, Rodrigues CO, Paulino EC, Hatzistergos KE, Selem SM, Gonzalez DR, Block NL,

- Schally AV, Hare JM. Activation of Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) Receptor Stimulates Cardiac Reverse Remodeling After Myocardial Infarction (MI). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011. Közlésre elfogadva. [IF: 9.771] (2010)
2. Pozsgai E, Schally AV, Hocsak E, Zarandi M, **Rick F**, Bellyei S. The effect of a novel antagonist of growth hormone releasing hormone on cell proliferation and on the key cell signaling pathways in nine different breast cancer cell lines. *Int J Oncol*. 2011 Oct;39(4):1025-32. [IF: 2.571] (2010)
 3. Papadia A, Schally AV, Halmos G, Varga JL, Seitz S, Buchholz S, Rick FG, Zarandi M, Bellyei S, Treszl A, Lucci JA. Growth hormone releasing-hormone antagonist JMR-132 inhibits growth of ES-2 clear cell human ovarian cancer. *Horm Metab Res*. 2011 Oct;43(11):816-20. [IF: 2.414] (2010)
 4. Kovacs M, Schally AV, Hohla F, **Rick FG**, Pozsgai E, Szalontay L, Varga JL, Zarandi M. A correlation of endocrine and anticancer effects of some antagonists of GHRH. *Peptides*. 2010 Oct;31(10):1839-46. [IF: 2.654]
 5. Pozsgai E, Schally AV, Varga JL, Halmos G, **Rick F**, Bellyei S. The inhibitory effect of a novel cytotoxic somatostatin analogue AN-162 on experimental glioblastoma. *Horm Metab Res*. 2010 Oct;42(11):781-6. [IF: 2.414]
 6. Hohla F, Buchholz S, Schally AV, Krishan A, **Rick FG**, Szalontay L, Papadia A, Halmos G, Koster F, Aigner E, Datz C, Seitz S. Targeted cytotoxic somatostatin analog AN-162 inhibits growth of human colon carcinomas and increases sensitivity of doxorubicin resistant murine leukemia cells. *Cancer Lett*.
 7. Kanashiro-Takeuchi RM, Tziomalos K, Takeuchi LM, Treuer AV, Lamirault G, Dulce R, Hurtado M, Song Y, Block NL, **Rick F**, Klukovits A, Hu Q, Varga JL, Schally AV, Hare JM. Cardioprotective effects of growth hormone-releasing hormone agonist after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Feb 9;107(6):2604-9. [IF: 9.771]
 8. Hohla F, Buchholz S, Schally AV, Seitz S, **Rick FG**, Szalontay L, Varga JL, Zarandi M, Halmos G, Vidaurre I, Krishan A, Kurtoglu M, Chandna S, Aigner E, Datz C. GHRH antagonist causes DNA damage leading to p21 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cell Cycle*. 2009 Oct 1;8(19):3149-56. [IF: 4.087]
 9. Buchholz S, Seitz S, Schally AV, Engel JB, **Rick FG**, Szalontay L, Hohla F, Krishan A, Papadia A, Gaiser T, Ortmann O, Brockhoff G, Koster F. Triple negative breast cancers express receptors for LHRH and their growth can be inhibited by the LHRH antagonist Cetrorelix. *Int J Oncol*. 2009 Oct;35(4):789-96. [IF: 2.447]
 10. Treszl A, Schally AV, Seitz S, Szalontay L, **Rick FG**, Halmos G. Inhibition of Human Non-Small Cell Lung Cancers with a Targeted Cytotoxic Somatostatin Analog, AN-162. *Peptides*. 2009 Sep;30(9):1643-50. [IF: 2.705]
 11. Seitz S, Schally AV, Treszl A, Papadia A, **Rick F**, Szalontay L, Szepeshazi K, Ortmann O, Halmos G, Buchholz S. Preclinical evaluation of properties of new targeted-cytotoxic

somatostatin analogue AN-162 [AEZS-124] and its effects on tumor growth inhibition. *Anticancer Drugs*. 2009 Aug;20(7):553-8. **[IF: 2.23]**

12. Hohla F, Schally AV, Szepeshazi K, Varga JL, Buchholz S, Koster F, Heinrich E, Halmos G, **Rick FG**, Kannadka C, Datz C, Kanashiro CA. Synergistic inhibition of growth of lung carcinomas by antagonists of growthhormone-releasing hormone in combination with docetaxel. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Sep 26;103(39):14513-8. **[IF: 9.643]**

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom **Dr. Kovács Magdolna Professzor Asszonynak**, aki orvostanhallgató koromban felkeltette érdeklődésemet az alapkutatás iránt, és mindvégig nagyszerű mentorom volt. Az ő állandó bátorítása, támogatása és hasznos tanácsai nélkül nem lettem volna képes mindezen sikereket elérni.

Legmélyebb nagyrabecsülésemet szeretném kifejezni **Dr. Andrew V. Schally**-nek, a főnökömnek és mentoromnak, aki folyamatosan támogatja munkámat és a buzdítja a kutatásomat. Ez a disszertáció az ő tanácsadása és nagylelkű támogatásának az érdeme.

Itt szeretném megragadni az alkalmat, hogy megköszönjem **Dr. Norman L. Block**-nak támogatását és tanácsait az urológia kutatásban.

Külön köszönöm **Dr. Rékási Zoltánnak**, mentoromnak a lelkesítő támogatását és tanítását.

Hálámat fejezem ki az minden kollégámnak (Department of Pathology, University of Miami, Miller School of Medicine and Endocrine, Polypeptide and Cancer Institute, Veterans Affairs Medical Center and South Florida Veterans Affairs Foundation for Research and Education, Miami), de különösen **Dr. Szalontay Lucának, Dr. Szepeshazi Károlynak, Dr. Zarándi Mártának, Dr. Roberto Perez**-nek, **Dr. Mehrdad Nadji**-nak, **Dr. Ren-Zhi Cai**-nak, **Dr. Varga L. Józsefnek, Irving Vidaurre**-nak, **Ricardo Rincon**-nak és **Benny Fernandez**-nek.

Végül, de nem utolsósorban szívből jövő köszönettel és örök hálával tartozom a családomnak a szeretetükért, áldozatukért és folytonos bátorító támogatásukért.