

**A LUTEINIZÁLÓ HORMON-RELEASING HORMON
(LH-RH) ANALÓGJAI HYPOPHYSIS-GONÁD TENGYLYRE
ILLETVE TUMORNÖVEKEDÉSRE KIFEJTETT HATÁSAINAK
VIZSGÁLATA**

PHD ÉRTEKEZÉS TÉZISEI



Dr. Koppán Miklós

PÉCSI ORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Humán Anatómia Intézet
1998

BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

Az adenohipophysis hormonelválasztását serkentő ún. “releasing” hormonok egyike a luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH). Az LHRH felfedezése, szerkezetének megállapítása, valamint a natív hormon és analógjainak szintetikus úton történő előállítás (agonista, antagonistá, citotoxikus) nemcsak a gyakorlati medicina fejlődését mozdította elő bizonyos endokrin, reprodukív és daganatos betegségek hatékonyabb kezelésének lehetőségével, hanem olyan alapkutatásokat is serkentett, melyek hozzájárulnak a reprodukció fízíológájának mélyrehatóbb megértéséhez.

Ezen alapulva munkámat is kettős cél vezérelte: **egyrészt (I.)** vizsgáltam a munkacsoportunk közreműködésével korábban kifejlesztett antagonistá LHRH analógok hatását a hypophysis-gonád rendszerre, **másrészt (II.)** tanulmányoztam egy új citotoxikus LHRH analóg (AN-207) hypophysisre gyakorolt és általános *toxikus*, valamint egy LHRH receptort hordozó daganat növekedésére gyakorolt *gátló hatását*, ezzel hozzájárulva a citotoxikus LHRH analógok preklinikai vizsgálataihoz.

I. Mivel az elmúlt évtizedekben számos fízíológiai adat született intakt illetve gonadektomizált állatokban a luteinizáló hormon (LH) és a follikulá stimuláló hormon (FSH) szekréció eltérő jellegére vonatkozóan (FSH-releasing factor?, FSH-RF), kísérleteimben különös figyelmet fordítottam az analógok FSH szekrécióra gyakorolt hatásának tanulmányozására. Ezen alapkutatás jellegű vizsgálatokkal új adatokat kívántam szolgáltatni az FSH szekréció hypothalamikus szabályozására vonatkozóan. Az LHRH antagonisták használatával lehetővé vált az endogén LHRH receptor-mediált hatásának felfüggesztése és a gonadotropin szekréció LHRH-tól független komponensének tanulmányozása. Kísérleteinkben vizsgáltuk:

I./1. LHRH antagonistá analógok hatásait a hypophysis gonadotropin szekréciójára *in vitro* a **hypophysis sejt szuperfúziós rendszerben**

I./2. LHRH antagonistá analóg (MI-1544) **egyszeri** és **tartós** alkalmazásának hatásait a hypophysis gonadotropin szekréciójára **ovariektomizált (OVX) patkányban**

I./3. LHRH antagonist analógok (MI-1544 és SB-030) **krónikus** alkalmazásának hatását a hypophysis-gonád tengely működésére **intakt patkányban**

I./4. a feltételezett FSH-RF jelenlétét **OVX patkányok** eminentia medianájában *in vivo*, **LHRH antagonist** kezelés (MI-1544) és az eminentia mediana **elektrokémiai stimulációjának (ECS)** kombinálásával

I./5. a feltételezett FSH-RF jelenlétét **OVX patkányok** eminentia medianájában *in vitro*, a **hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszerben**

II. Az LHRH analógok új családja, a citotoxikus LHRH analógok, az LHRH receptorokat hordozó daganatok hatékonyabb kezelése céljából állnak fejlesztés alatt. Az általunk használt új citotoxikus LHRH analógnak a "szállító" (carrier) funkcióért felelős [D-Lys⁶]LHRH-hoz, egy doxorubicin származék (AN-201) van kovalensen kapcsolva. Figyelembe véve ezen citotoxikus konjugátum feltételezett LHRH receptor-specifikus toxicitását, a tumorelles hatása mellett nem közömbös annak ismerete sem, hogy milyen mértékű károsodást okoz ez az analóg az LHRH receptorokat legnagyobb koncentrációban tartalmazó hypophysis működésében. Ezért kísérleteink során tanulmányoztuk a konjugátumnak mind a toxikus, mind pedig a tumornövekedést gátló hatását. Vizsgáltuk az:

II./1. AN-207 citotoxikus LHRH analóggal történt kezelés **toxikus hatását** a hypophysis működésére **normál patkányban**

II./2. AN-207-el történt i.v. kezelés **tumornövekedést gátló és általános toxikus hatását** LHRH receptort expresszáló humán prosztata karcinóma xenograftokat hordozó **meztelen egerekben**

EREDMÉNYEK

I./1. LHRH antagonist analógok hatása a hypophysis gonadotropin szekréciójára *in vitro* a hypophysis sejt szuperfúziós rendszerben

Az általunk használt LHRH antagonist analógok (MI-1544 és SB-030) az *in vitro* hypophysis sejt szuperfúziós rendszerben kivédtek az exogén LHRH-nak mind az LH, mind az FSH release-t kiváltó hatását. Ez a gátlás az LHRH-indukálta FSH release-re nézve több mint háromszor tartósabb volt, mint az LHRH-indukálta LH release-re vonatkozóan. Amikor az LHRH antagonistákat az exogén LHRH-t megelőzően juttattuk a rendszerbe (előinkubáció), 10-20-szor kisebb antagonist koncentráció képes volt ugyanolyan hatás elérésére, mint az LHRH-val egyidőben történő alkalmazás esetén.

I./2. LHRH antagonist analógok egyszeri és tartós alkalmazásának hatása a hypophysis gonadotropin szekréciójára *OVX patkányokban*

a. MI-1544 egyszeri szubkután (s.c.) injekciója (10 illetve 100 µg) az *OVX* patkányokban észlelhető magas szérums LH koncentráció azonnali és tartós csökkenését eredményezte mindkét dózisban, míg a szérums FSH szint nem csökkent az injekciót követő első 6 órában, és szignifikáns csökkenést csak a nagyobb dózis eredményezett a kezelést követő 12. órától.

b. *OVX* patkányokban az MI-1544 LHRH antagonist 21 napig tartó krónikus alkalmazása (napi 1×10 µg, s.c.) a szérums LH koncentráció jelentős csökkenését eredményezte, mialatt a szérums FSH koncentráció nem csökkent. Ezzel egyidőben a hypophysis LH koncentrációja emelkedett, az FSH koncentrációja viszont nem változott szignifikánsan.

I./3. LHRH antagonisták tartós alkalmazásának hatása a hypophysis-gonád tengelyre *intakt patkányban*

a. Intakt patkányokban a 21 napig tartó krónikus kezelés (1×10 μ g MI-1544 illetve SB-030, s.c.) a szérumban LH koncentrációjának a detektálhatósági szint alá történő csökkenését eredményezte, mialatt a szérumban FSH koncentráció nem változott szignifikánsan. Ugyanakkor a hypophysis LH koncentrációja emelkedett, az FSH koncentrációja viszont szignifikánsan csökkent a kísérlet végére.

b. Mindkét antagonistát 21 napig tartó alkalmazása a szérumban progeszteron koncentrációját jelentősen csökkentette, az ösztrogén koncentrációját viszont nem befolyásolta. A patkányok szabályos ovarialis ciklusa megszakadt és az ovárium súlyok jelentősen csökkentek mindkét kezelt csoportban. Az uterus súlyok kisfokban emelkedtek (MI-1544) illetve változatlanok maradtak (SB-030) a kezelés során. A hypophysis súlyok szintén nem változtak a kísérlet alatt.

I./4. LHRH antagonisták kezelése és az eminentia mediana elektrokémiai stimulációjának kombinálásának hatása a hypophysis gonadotropin szekréciójára *in vivo*

OVX patkányok eminentia medianájában végzett ECS a szérumban LH és FSH koncentrációját szignifikánsan emelkedést idézte elő a stimulációt követő 10. és 60. percben. Az ECS-t 60 perccel megelőzően adott LHRH antagonisták (MI-1544, 100 μ g) kivédte az ECS által kiváltott LH release-t, de nem tudta kivédeni és csak kisfokban csökkentette az ECS által indukált FSH release-t.

I./5. Stimulált mediobazális hypothalamus fragmentumokból kibocsátott faktorok hatása az LH és FSH szekrécióra *in vitro*, a hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszerben

Az *in vitro* hypothalamus-hypophysis coperifúziós rendszerben, exogén LHRH-val, valamint a stimulált mediobazális hypothalamus (MBH) fragmentumokat perfundáló médiummal egyaránt ki tudtuk váltani LH és FSH release-t, diszpergált hypophysis sejtekből. Az MI-1544 LHRH

antagonista alkalmazása után, exogén LHRH-val FSH release-t nem, LH release-t pedig csak csökkent mértékben tudtuk kiváltani. Ugyanakkor a stimulált MBH fragmentumokon átáramló médium FSH release-t indukált, de nem okozott LH release-t.

II./1. Citotoxikus LHRH analóg hatása a hypophysis működésére

Patkányban, az AN-207 citotoxikus LHRH analóg egyszeri alkalmazása (150 nmol/kg, i.v.) által okozott testsúlycsökkenés nem tért el szignifikánsan az AN-201 citotoxikus gyök (75 nmol/kg, i.v.) által előidézett testsúlycsökkenéstől.

a. Egy héttel a kezelés után, az AN-207-el kezelt csoportból származó hypophysisek LH szekréciójának szelektív károsodását tapasztaltuk *in vitro*, amelyet a GH- illetve TSH szekréció kisebb mértékű csökkenése kísért. A citotoxikus gyökkel kezelt csoportban ugyanakkor mindhárom sejtpopuláció jelentős funkciózavarát észleltük. Három héttel a kezelés után mindkét kezelt csoportban visszatértek a normális szekréciós válaszok.

b. *In vivo*, az AN-207-el illetve AN-201-el történt kezelés után 2, 4 és 6 héttel, a bazális szérumban LH, GH és TSH koncentrációkban nem volt szignifikáns különbség a kísérleti csoportok között. Az LHRH, GHRH és TRH stimulusokra adott specifikus LH, GH és TSH válaszok egyik kísérleti időpontban sem tértek el a kontrolltól az AN-207-el kezelt csoportban. Az AN-201-el kezelt csoportban az injekció után 2 héttel az LHRH stimulusra adott LH válasz kisfokban csökkent. A GHRH-ra illetve TRH-ra adott specifikus GH és TSH válaszok ebben a csoportban sem tértek a kontrolltól 2, 4 és 6 héttel a kezelés után.

II./2. Citotoxikus LHRH analóg általános toxikus és tumornövekedést gátló hatása

a. Meztelen egerekben, az AN-207 citotoxikus LHRH analóg (200 nmol/kg) egyszeri i.v. injekciója nem okozott szignifikáns testsúlycsökkenést a kontrollhoz képest, míg az AN-201 citotoxikus gyök (200 nmol/kg, i.v.) szignifikáns testsúlyvesztést idézett elő. Az AN-207-jelű konjugátum a teljes fehérvérsejtszám és thrombocytaszám szignifikánsan

kisebb mértékű csökkenését okozta, mint a citotoxikus gyök.

b. Az AN-207 konjugátum a PC-82 humán prosztata karcinóma xenograftok növekedésének tartós és jelentős gátlását eredményezte a 8 hetes kísérlet teljes időtartamában, míg a citotoxikus gyökkel történt kezelésnek csak a kísérlet első felében volt mérsékelt tumornövekedést gátló hatása. Kontroll állatokban a carrier [D-Lys⁶]LHRH önmagában illetve a citotoxikus gyökkel alkotott konjugátatlan keverék formájában egyaránt hatástalan volt a PC-82 tumor növekedésére.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS ÚJ EREDMÉNYEK

1. Fiziológias körülmények között az FSH szekréció szabályozásában nem az LHRH játsza a döntő szerepet.
2. Az FSH release szabályozásában szerepet játszó, LHRH-tól eltérő faktor (vagy faktorok, FSH-RF?) megtalálható a hypothalamus eminentia medianájában, ahonnan release-e kiváltható.
3. Az AN-207 citotoxikus LHRH konjugát nagyfokú szelektivitást mutat az LHRH receptorokat hordozó sejtek iránt és kevésbé toxikus más sejtekre nézve, míg citotoxikus komponense, az AN-201-jelű doxorubicin származék, nem-szelektíven károsítja a recipiens szervezet sejtjeit.
4. A citotoxikus LHRH analóg illetve a benne foglalt citotoxikus gyök által a hypophysis funkcióban okozott károsodás reverzibilis.
5. Az AN-207 citotoxikus LHRH analóg kisfokú általános toxicitás mellett erőteljesen képes gátolni LHRH receptorokat hordozó daganat növekedését, ezáltal alkalmas lehet egyes, LHRH receptor-pozitív tumorok célzott kemoterápiájára.

AZ EREDMÉNYEK JELENTŐSÉGE

Az LHRH antagonistá analógokkal végzett kísérleteink új adatokkal gazdagították a gonadotropinok szekréciójának szabályozására vonatkozó ismereteinket.

Az általunk tervezett dinamikus coperifúziós rendszerben, *in vitro* is modellálni lehetett az elektrokémiailag stimulált eminentia mediana gonadotropin szekrécióra gyakorolt hatását.

A citotoxikus LHRH analógok vizsgálatával nyert eredményeink hozzájárulnak egy esetleges új gyógyszeres család, az LHRH analógokat mint szállító molekulákat felhasználó célzott citotoxikus szerek családjának kifejlesztéséhez.

AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉBEN MEGJELENT VAGY KÖZLÉSRE ELFOGADOTT DOLGOZATOK

Folyóirat cikkek:

1. **Koppán M.**, Kovács M., Mező I., Flerkó B.: Electrochemical stimulation of the median eminence evokes FSH but not LH release after LHRH antagonist treatment *in vivo* and *in vitro*. *J Neuroendocrinol* 1998; 10:231-236.
2. **Koppán M.**, Nagy A., Schally A.V., Plonowski A., Halmos G., Arencibia J., Groot K.: Targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207 inhibits the growth of PC-82 human prostate cancer in nude mice. *The Prostate* 1998; (accepted)
3. Kovács M., Schally AV, Nagy A., **Koppán M.**, Groot K.: Recovery of pituitary function after treatment with a targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH). *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1420-1425.
4. Mező I., Seprődi J., Vincze B., Pályi I., Kéri Gy., Vadász Zs., Tóth G., Kovács M., **Koppán M.**, Horváth J.E., Kálnay A., Teplán I.:

Synthesis of GnRH analogs having direct antitumor and low LH-releasing activity. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1996; 2:33-40.

5. Kovács M., **Koppán M.**, Mező I., Teplán I.: Diverse effects of a potent LH-RH antagonist on the LH and FSH release. *Acta Biol Hung* 1994; 45:285-296.

6. Kovács M., **Koppán M.**, Mező I., Teplán I., Flerkó B.: Antioviulatory doses of antagonists of LH-RH inhibit LH and progesterone but not FSH and estradiol release. *J Neuroendocrinol* 1993; 5:603-608.

Előadás abstractok:

7. **Koppán M.**, Schally A.V., Nagy A., Halmos G., Arencibia J.: Citotoxikus LHRH analóg gátolja az LHRH receptor-pozitív PC-82 prosztatata karcinóma növekedését *in vivo*. *A Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XVII. Kongresszusa*, Pécs, 1998.

8. **Koppán M.**, Kovács M., Mező I., Teplán I., Flerkó B.: Effects of a potent LHRH antagonistic analog on the FSH release in rats. *4th World Congress of Gynecological Endocrinology*, Madonna di Campiglio, Italy, 1995. *J Gynecological Endocrinol* 1995; 9(Suppl1): P6.

9. **Koppán M.**, Kovács M.: LH-RH antagonista analóg hatása az eminentia mediana elektrokémiai stimulációját követő LH és FSH release-re. E-8, p 17. *A Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság XV. Kongresszusa*, Budapest, 1994.

10. Kovács M., **Koppán M.**, Mező I., Teplán I., Flerkó B.: Effects of new highly potent GnRH antagonists on the pituitary-gonad system. *Satellite Symposium on Gonadotropins, GnRH, GnRH Analogs and Gonadal Peptides*, Paris, 1992.