

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ GnRH ΑΝΑΛΟΓΩΝ ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΩΝ ΜΕ ΜΙΤΟΞΑΝΔΡΟΝΗ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΗ ΔΡΑΣΗ



X. Μαρκάτος¹, Β. Καραγεώργος¹, Μ. Σωμαράκη¹, Γ. Μπινιαρη², Μ. Βενογάκη³, Θ. Τσέλιος², Γ. Λιαπάκης¹

¹Τμήμα Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο

²Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα

³Τμήμα Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης, Ηράκλειο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH, Gonadotropin-Releasing Hormone), είναι ένα πεπτίδιο που διεγείρει την έκκριση γοναδοτροπινών ορμονών, δηλαδή της ωχρινότροπου (LH) και της ωοθυλακιοτρόπου (FSH)¹. Η GnRH παράγεται στον υποθάλαμο και ασκεί τη δράση του αφού αλληλοεπιδράσει με τους GnRH υποδοχείς (GnRH-R), που βρίσκονται στην επιφάνεια των γοναδοτροπινών κυττάρων της πρόσθιας υπόφυσης². Οι GnRH-R εκφράζονται επίσης σε μεγάλο βαθμό σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των καρκίνων του ωοθηκών και θεωρούνται στόχοι για τη θεραπεία ορμονοεξαρτώμενων καρκίνων³.

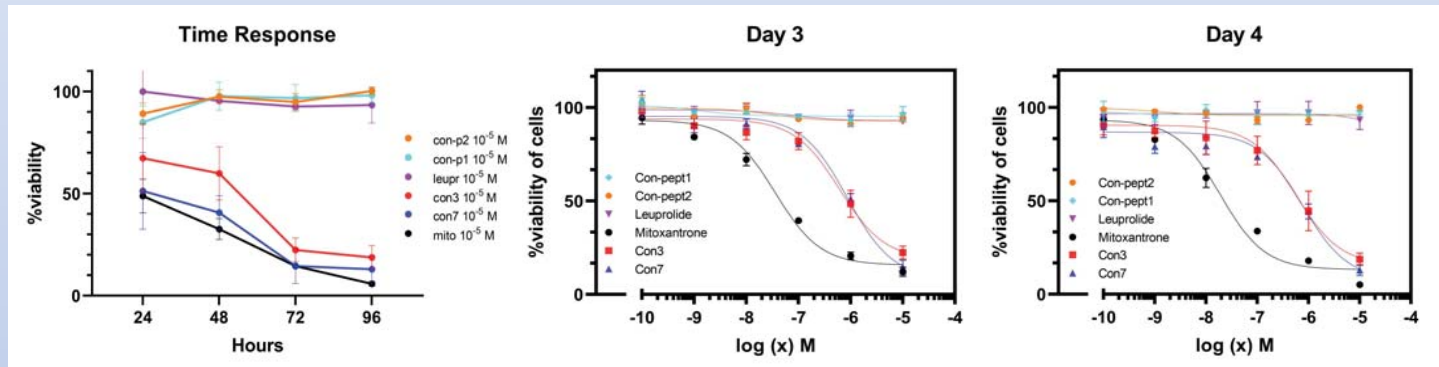
ΣΚΟΠΟΣ

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ανάλογα GnRH ασκούν κυτταροτοξική δράση σε καρκινικά κύτταρα^{4,5}. Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήσαμε τη κυτταρική σειρά καρκίνου ωοθηκών SKOV3 για να εξετάσουμε τις κυτταροτοξικές ιδιότητες δύο πεπτιδικών αναλόγων του GnRH που είναι συζευγμένα με την αντικαρκινική ουσία, μιτοξανδρόνη. Τα συζευγμένα αυτά ανάλογα του GnRH ονομάζονται con3 και con7, ενώ τα αντίστοιχα μη συζευγμένα ανάλογα έχουν τις ονομασίες con-p2 και con-p1. Υποθέσαμε ότι η δέσμευση των συζευγμένων αναλόγων στον GnRH-R έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυττάρωση του συμπλέγματος GnRH-R-προσδέτη. Η ενδοκυττάρωση αυτή επιφέρει την απελευθέρωση της μιτοξανδρόνης στο κυτταρόπλασμα, η οποία με τη σειρά της ασκεί την κυτταροτοξική της δράση⁵.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Για να συνθέσουμε τα con3 και con7, τροποποιήσαμε χημικά την λευπρολίδη (ανάλογο της GnRH) και την συζεύξαμε με την μιτοξανδρόνη. Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης των GnRH αναλόγων, χρησιμοποιήσαμε τη χρωματομετρική μέθοδο MTT. Η ανάλυση MTT βασίζεται στην ικανότητα των ζωντανών κυττάρων να ανάγουν το κίτρινο τετραζόλιο MTT, σε μωβ κρυστάλλους φορμαζίνης. Επώασαμε την καρκινική κυτταρική σειρά ωοθηκών, SKOV3, με τα con3 και con7 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για 1-4 μέρες, ώστε να καθορίσουμε τις κυτταροτοξικές τους δράσεις. Επώασαμε επίσης τα SKOV3 κύτταρα με τα con-p1, con-p2, την λευπρολίδη και την μιτοξανδρόνη, για να συγκρίνουμε τα αποτελέσματά τους με τα con3 και con7.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Σχήμα 1: Χρονοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση των con3, con7, λευπρολίδης, con-p1, con-p2 και μιτοξανδρόνης ($10^{-5}M$) στην καρκινική κυτταρική σειρά ωοθηκών SKOV3 (n=3-5).

Σχήμα 2: Δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση των con3, con7, λευπρολίδης, con-p1, con-p2 και μιτοξανδρόνης στην 3^η μέρα σε κύτταρα SKOV3 (n=3-5).

Σχήμα 3: Δοσοεξαρτώμενη κυτταροτοξική δράση των con3, con7, λευπρολίδης, con-p1, con-p2 και μιτοξανδρόνης στην 4^η μέρα σε κύτταρα SKOV3 (n=3-5).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ✓ Ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων ωοθηκών SKOV3 μειώνεται μετά από την έκθεσή τους στις ουσίες con3 ή con7, αλλά όχι από τα αντίστοιχα ελεύθερα πεπτίδια τους con-p1 και con-p2.
- ✓ Η δράση των con3 και con7 είναι χρονοεξαρτώμενη, με την μεγαλύτερη αναστολή να παρατηρείται την 4^η μέρα και την μικρότερη την 2^η μέρα.
- ✓ Η δράση των con3 και con7 είναι δοσοεξαρτώμενη. Συγκεκριμένα, η ισχύς αναστολής του con3 είναι 0,4 μM , 0,62 μM και 0,57 μM , τη δεύτερη, τρίτη και τέταρτη μέρα αντίστοιχα, ενώ οι τιμές για το con7 είναι 0,75 μM , 0,86 μM και 0,78 μM .
- ✓ Εν εξελίξει in vivo μελέτες θα προσδιορίσουν τις αντικαρκινικές επιδράσεις των con3 και con7 σε πειραματικά μοντέλα ζώων.

Βιβλιογραφία

1. Limonta P, Montagnani M., et al., GnRH in the Human Female Reproductive Axis. Vitamins and Hormones, Volume 107, 2018. ISSN 0083-6729. doi:10.1016/bs.vh.2018.01.003.
2. Millar, R.P., et al., Gonadotropin-releasing hormone receptors. Endocr Rev, 2004. 25(2): p. 235-75.
3. Tzoupis H, Nteli A, et al., Gonadotropin-Releasing Hormone and GnRH Receptor: Structure, Function and Drug Development. Curr Med Chem. 2020;27(36):6136-6158. doi: 10.2174/0929867326666190712165444. PMID: 31309882.
4. Li, S, Zhao, H, et al. Synthesis, in vitro stability, and antiproliferative effect of d-cysteine modified GnRH-doxorubicin conjugates. J Pep Sci. 2019; 25:e3135. https://doi.org/10.1002/psc.3135
5. Evison BJ, Sleebs BE, et al., Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison. Med Res Rev. 2016 Mar;36(2):248-99. doi: 10.1002/med.21364. Epub 2015 Aug 19. PMID: 26286294.
6. J.B. Engel, J.C. Hahne, et al., Peptidomimetic GnRH Antagonist AEZS-115 Inhibits the Growth of Ovarian and Endometrial Cancer Cells. Anticancer Research May 2012, 32 (5) 2063-2068;

Ευχαριστίες

Η έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση και από Ελληνικούς εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία, στο πλαίσιο της πρόσκλησης ΕΡΕΥΝΩ - ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ (κωδικός έργου: Τ2ΕΔΚ 02056). Authors declare no further conflicts of interest.



Πληροφορίες επικοινωνίας

George Liapakis, Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Greece, liapakig@uoc.gr