Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

PhD értekezés tézisei

Antioxidánsok hatása a terbutalin simaizom relaxáló effektusára

Hódi Ágnes

Témavezető:
Dr. Gáspár Róbert PhD.

Szeged
2016

Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszerhatástan, biofarmácia, klinikai gyógyszerészet PhD program

Programvezető: Dr. Zupkó István PhD.

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
Témavezető: Dr. Gáspár Róbert PhD.

Hódi Ágnes

Szigorlati bizottság:

Elnök:
Prof. Dr. Falkay György, PhD., MTA doktora, SZTE GYTK, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Tagok:
Dr. Földesi Imre PhD., SZTE ÁOK Laboratóriumi Medicinai Intézet

Prof. Dr. Borsodi Anna PhD., MTA doktora, MTA SZBK Biokémiai Intézet

Bíráló bizottság:

Elnök:
Prof. Dr. Dombi György Ph.D., SZTE GYTK Gyógyszeranalitikai Intézet

Opponensek:
Dr. Szökő Éva PhD., MTA doktora, SE GYTK Gyógyszerhatástani Intézet

Dr. Leprán István PhD., MTA doktora, SZTE ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Tagok:
Dr. Benyhe Sándor PhD., DSc, MTA doktora, MTA SZBK Biokémiai Intézet

Dr. Doró Péter PhD., SZTE GYTK Klinikai Gyógyszerészeti Intézet

Szeged
2016

1. Bevezetés

A szabadgyökök (ROS) olyan molekulák összessége, amelyek a külső elektronhéjon egy párosítatlan elektront tartalmaznak. Nagy reaktivitásuk miatt könnyen reakcióba lépnek a test bármely összetevőjével (lipid, fehérje, nukleinsav), így károsítják az egészséges sejteket. Az emlősök oxidatív anyagcseréje során keletkeznek. Normál körülmények között ennek kivédésére a szervezetben antioxidáns enzimekből (szuperoxid-dizmutáz, kataláz, glutation-peroxidáz és glutation-reduktáz) és biológiai antioxidánsokból álló rendszer működik. Oxidatív stressz akkor fordul elő, ha a homeosztázis az oxidáns és antioxidáns rendszerek között megbomlik, és a redox állapot az oxidáció irányába tolódik el. Ha az oxidáns kapacitás nagyobb az antioxidáns kapacitásnál, a ROS egy része kiszabadul az antioxidáns rendszer ellenőrzése alól. Oxidatív stressz során az egyes szövetek és szervek biomolekulái károsodhatnak, illetve transzkripciós faktorok aktiválódhatnak. Ezért egyre nagyobb szerepet kapnak az antioxidáns vegyületek a terápiában és a betegségek megelőzésében. Az enzimatikus védekezést kiegészítik az antioxidáns, scavenger tulajdonságú vitaminok, mint a C-vitamin, E-vitamin, melyek eltérő hatásmechanizmussal képesek közömbösíteni a szabadgyököket, megakadályozva az oxidatív stresszt.

Az utóbbi két évtized kutatásai szerint a szabadgyökök keletkezésének esszenciális szerepe van a fiziológiás és patológiás szignálfolyamatokban. Ennélfogva a reaktív oxigén intermedierek jelenléte nem feltétlenül okai a betegségeknek, de következményei lehetnek, így ezek a reakciók markerként használhatóak. A G-protein kapcsolt receptorok (GPCR) szabályozzák a ROS termelődését, ami befolyásolja a jelátvitel időtartamát és természetét. Különböző GPCR-ok, mint a muszkarinos acetilkolin, angiotenzin II-1, dopamin, szerotonin receptorok stimulálásával megváltozik a ROS koncentráció a sejtekben. Tehát, a G-proteinhez kapcsolt receptorokon ható vegyületekkel szabályozni tudjuk a szervezet redox homeosztázisát. Szívizmon kimutatták, hogy oxidatív stressz során β-receptor aktiváció történik, ami megemeli a ROS képződését, ezzel fokozódik a Ca^{2+} beáramlás, ami nagyobb kontrakciókat eredményez. Ez arra enged következtetni, hogy a szabadgyökök másodlagos hírvivők a sejtekben. Mivel az antioxidánsok használata napjainkban rendkívül elterjedt, lehetséges, hogy az antioxidáns hatás képes módosítani a β-adrenerg gyógyszerhatásokat. E kérdések tisztázására célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk a β-adrenerg agonista terbutalin simaizom relaxáló hatásának befolyásolhatóságát limonén és tokoferol jelenlétében.

2. Célkitűzés

Kísérleteink fő célja volt megvizsgálni, hogyan változik a terbutalin simaizomra gyakorolt béta-mimetikus hatása, antioxidánsok jelenlétében.

1. Először is megvizsgáltuk, hogy az antioxidáns vegyületek, (tokoferol és limonén) milyen hatást váltanak ki a különböző simaizom szöveteken. A vizsgálatokat izolált szervi rendszerben végeztük, terhes miometriumon, cervixen és nem vemhes patkány tracheán.

2. Szívizmon kimutatták, hogy oxidatív stressz során β-receptor aktiváció történik, ami megemeli a ROS képződését. Felmerül a kérdés, hogy az antioxidáns hatás képes-e módosítani a béta-adrenerg gyógyszerhatásokat. Ezért vizsgálni kívántuk a β-adrenerg agonista terbutalin simaizom relaxáló hatásának befolyásolhatóságát limonén illetve tokoferol jelenlétében.

3. Ismert, hogy a szexuálszteroidok jelenléte befolyásolja a β_2-receptor expressziót. Míg a progeszteron a cervixben és a miometriumban, addig az öszrogén a tracheában aktiválja a β-receptorokat. Ezért a következő célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a β_2-receptoron mediált simaizom választ antioxidáns jelenlétében, szexuálhormon előkezelést követően.

4. A különböző simaizomszövetek eltérő mértékben termelnek szabadgyököt, illetve az antioxidáns védelem kapacitása is eltérhet. Utolsó célunk ennek tisztázása volt, a szöveti cAMP szint és oxidatív státusz meghatározásával.

3. Kísérleti módszerek

3.1. Az állatok pároztatása

Ivarérett nőstény (180-200 g) és hím (240-260 g) Sprague-Dawley patkányokat pároztattunk. A pároztatás kezdetétől számított 4-5 órán belül a nőstény állatoktól hüvelykenetet vettünk és mikroszkóp alatt hímivarsejteket kerestünk. Amennyiben a keresés pozitív eredménnyel zárult, akkor az állatot elkülönítettük, mint az 1. napos vemhes nőstényt.

3.2. In vivo hormonkezelés

A progeszteront (P4) olívaolajban oldottuk és sc. injekció formájában adagoltuk 0,5mg/0.1ml-es dózisban. A kezelést a vemhesség 15. napjától a 21. napig folytattuk. A 17β-ösztradiol-valerátot (E2) szintén olívaolajban oldottuk és sc. injekció formájában adagoltuk. A kezelés 4 napon keresztül 1μg/200g dózisban történt.

3.3. PCR és Western blot vizsgálatok

PCR

A nem vemhes, ösztuszban lévő patkányból vettünk trachea mintát és a 22 napos vemhes miometriumot és cervixet eltávolítottuk és folyékony nitrogénbe helyeztük, RNS kivonásig -70 °C-on tároltuk.

Western bot analízis

Mintánként 50μg fehérjét 4-12%-os NuPAGE Bis-Tris poliakrilamid gélen elektroforézisnek vetettünk alá. A fehérjét nitrocellulóz membránra helyzetük át, félszáraz blottoló eljárással (iBlot Gel Transfer System, Life Technologies, Magyarország). Mosás után a membránt szobahőmérsékleten β_2-adrenerg receptor és β-aktin poliklonális antitestekkel (Santa Cruz Biotechnology, Kalifornia, 1:200), blokkoló pufferben 1 órán át inkubáltuk. Az immunreaktív sávokat WesternBreeze Chromogenic Western blot immundetektáló kit (Life Technologies, Magyarország) segítségével láthatóvá tettük, majd elektronikusan rögzítettük az EDAS290 Imaging System segítségével. Az optikai denzitás meghatározása Kodak 1D Images szoftverrel történt. Az optikai denzitást háttér kivonás után önkényes egységben határoztuk meg.

3.4. Izolált szervi kísérletek

A kísérleteket izolált szervi rendszeren végeztük *in vitro*, ehhez 22 napos vemhes, illetve ösztruszban lévő nőstény Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatok leölése után kivettük az állatok tracheáját, cervixét, illetve uterus gyűrűket metszettünk ki. A preparátumokat karbogénnel átáramoltatott puffert tartalmazó, 37 °C-os szervfürdőbe helyeztük. A cervix és az uterus gyűrűk esetében de Jongh oldatot használtunk, míg a tracheákat Krebs oldatban tartottuk.

Az adatok rögzítését és értékelését ISOSYS Data Acquisition System (Experimenta Kft., Magyarország) segítségével végeztük.

3.5. Szöveti cAMP akkumuláció mérése

A szöveti mintákat (miometrium, cervix, trachea) szervfürdőben inkubáltuk a fent leírt módon. A cAMP akkumulációt meghatároztuk önállóan terbutalin (10^{-13} M) vagy tokoferol (10^{-7}M) jelenlétében, és kombinációjuk esetén. A minták cAMP tartalmát Enzim Immunoassay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) segítségével meghatároztuk, majd pmol/mg szövet egységben fejeztük ki.

3.6. Az antioxidáns/oxidáns kapacitás mérése

A totál oxidáns státusz (TOS) mérést immunoassay kit (RelAssay Diagnostics, Gaziantep, Törökország) segítségével végeztük. A mintában jelenlevő szabadgyök a vas–*o*-dianizidin komplexet vas ionná oxidálja. A színintenzitás spektrofotometriásan mérhető, ami arányos a mintában lévő oxidáns vegyületek mennyiségével. Az eredményt μmol H_2O_2 equiv./L-ben fejeztük ki. A totál antioxidáns státusz (TAS) mérést szintén immunoassay kittel végeztük (RelAssay Diagnostics, Gaziantep, Törökország). A kimutatási reakció az ABTS oxidációján alapszik. H_2O_2 és metmioglobin jelenlétében a sötétzöld színű ABTS kation gyök keletkezik. Az eredményt mmol Trolox ekvi/L-ben fejeztük ki.

Az oxidatív stressz index (OSI) értékét a TOS és TAS értékek hányadosa adja, melynek képlete: OSI (önkényes egység) = TOS (μmol H_2O_2 ekvi./L)/TAS (mmol Trolox ekvi/L).

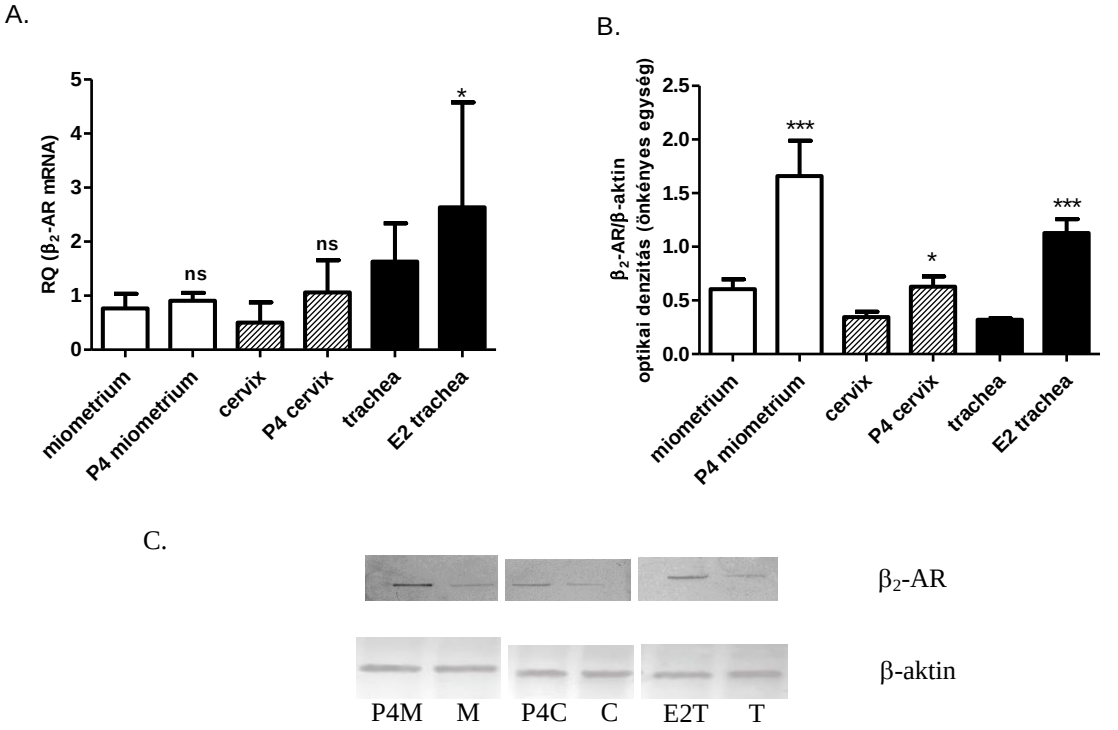
3.7. Statiszikai elemzés

Az adatokat Prism 4.0. számítógépes program segítségével értékeltük ki, az eredmények statisztikai értékelését párosítatlan t-teszttel és ANOVA Dunnett teszttel végeztük.

4. Eredmények

4.1. β_2 adrenerg receptor expresszió patkány simaizom szövetekben

A Western-blot analízis igazolta, hogy a β_2 adrenerg receptor kifejeződése nem egységes a különböző simaizom szövetekben. A vemhes miometriumban a P4-kezelés hatására a β_2-receptor expresszió háromszorosára emelkedett, míg a cervix esetében megduplázódott. A tracheában az E2-kezelés négyszeres értékre emelte a receptorok számát (**1.ábra**).

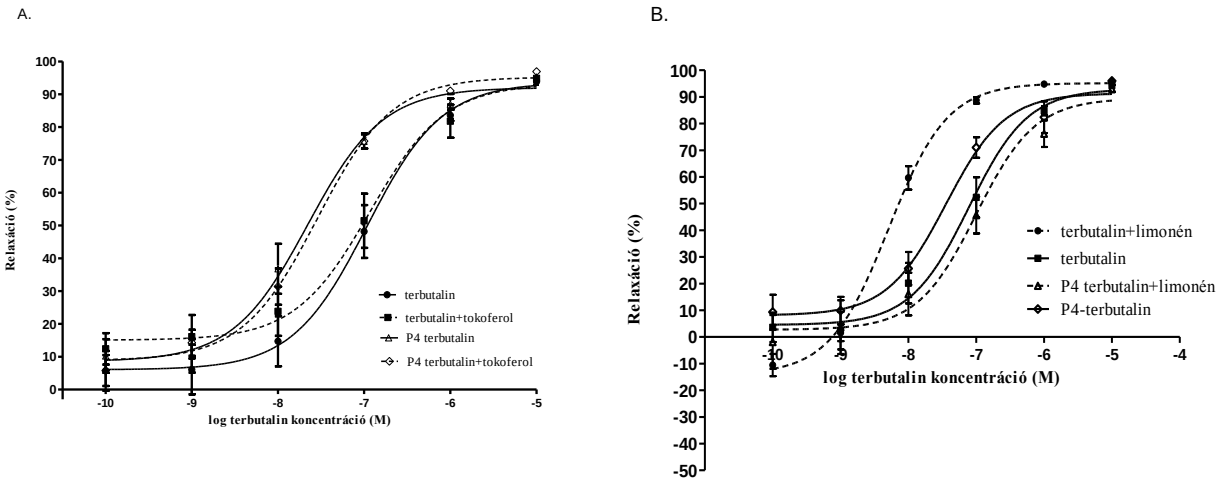


1. ábra: β_2 receptor expresszió patkány miometriumban, cervixben és tracheában.
*: $p<0,05$, ***$p<0.001$
P4M: P4-kezelt miometrium, M: miometrium
P4C: P4-kezelt cervix, C: cervix
E2T: E2-kezelt trachea, T: trachea

4.2. Izolált szervi kísérletek eredményei

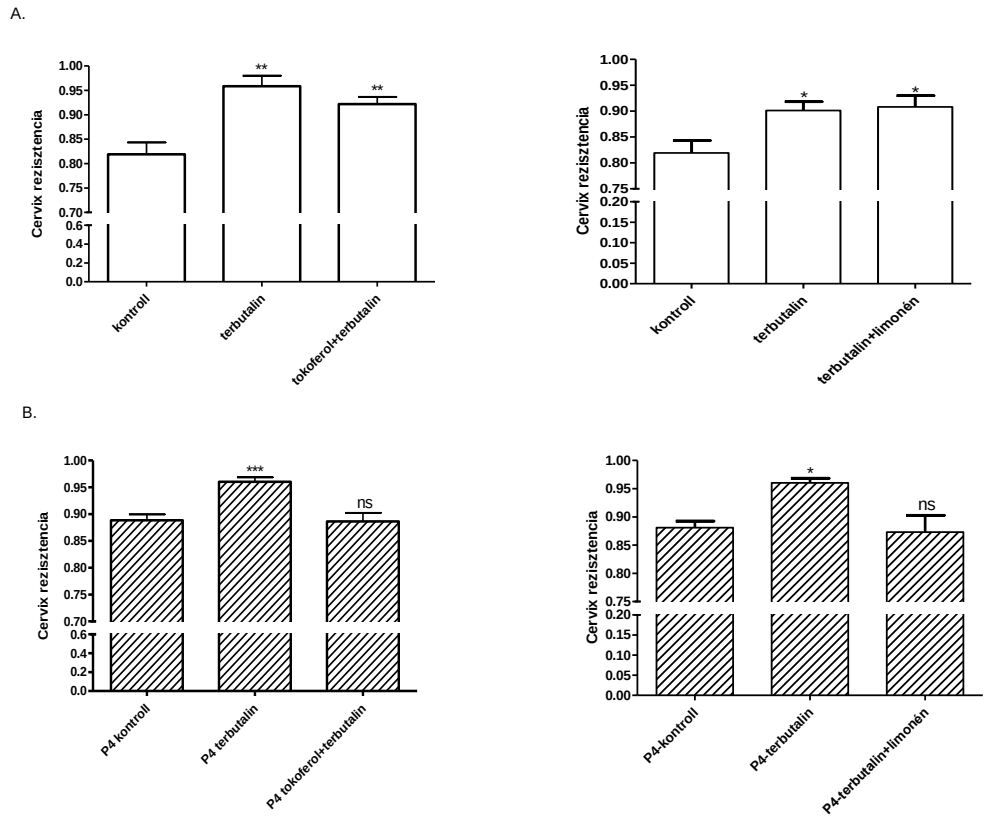
Miometrium. A terbutalin (10^{-10}–10^{-5} M) dózisfüggően gátolta a spontán méh kontrakciókat. A P4-kezelés következtében a terbutalin relaxációt okozó hatása felerősödött. A tokoferol (10^{-7} M) nem módosította szignifikánsan ezt a hatást sem a nem-kezelt, sem pedig a P4-kezelt mintákban (**2A. ábra**).

A terbutalin dózis-hatás görbéje limonén (10^{-13} M) jelenlétében szignifikánsan balra tolódott, ugyanakkor a maximális gátló hatás nem változott. P4-kezelést követően, a limonén nem módosította szignifikánsan a terbutalin dózis-hatás görbéjét (**2B. ábra**).



2. ábra: A β_2 agonista terbutalin (10^{-10}–10^{-5} M) relaxáló hatása spontán kontrakciókra 22 napos vemhes nem kezelt illetve, P4 kezelt, patkány miometriumon 10^{-7} M tokoferol (A), 10^{-13}M limonén jelenlétében (szaggatott vonal) illetve önmagában (B).

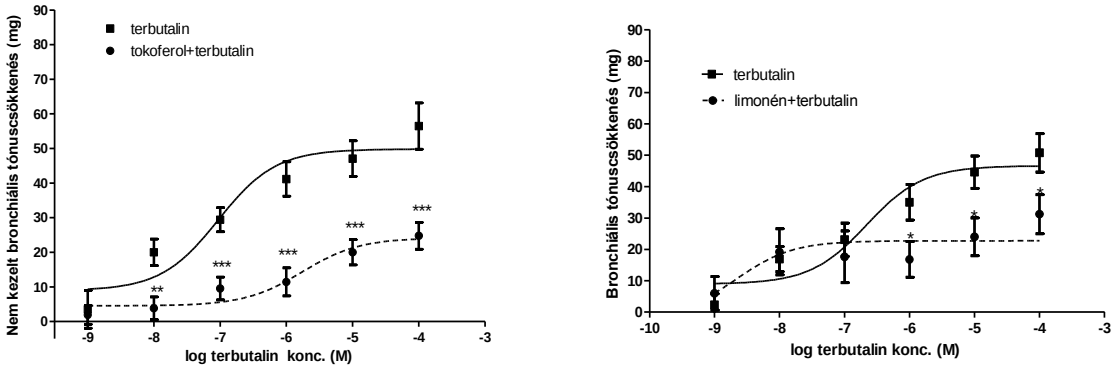
Cervix. Vizsgálataink során a 22. vemhességi napon a terbutalin (10^{-6} M) jelenlétében megnövekedett a cervix rezisztencia, mely hatást sem a limonén (10^{-13} M), sem a tokoferol (10^{-7} M) nem befolyásolta (**3A. ábra**). A P4-kezelés hatására bekövetkezett β_2-receptor stimuláció miatt a terbutalin hatása fokozódott. Ebben az esetben a terbutalin cervix-rezisztencia fokozó hatását mindkét antioxidáns vegyület kivédte (**3B. ábra**).



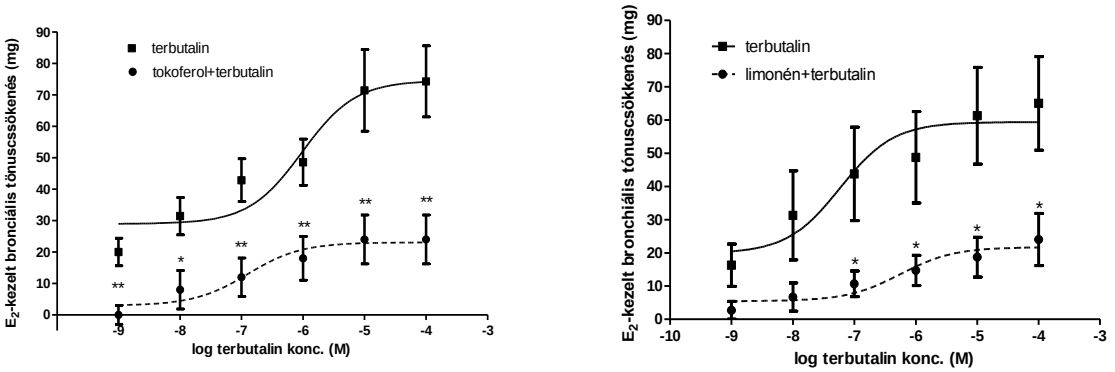
3.ábra: A β_2-agonista terbutalin hatása a cervix rezisztenciára 10^{-7} M tokoferol vagy 10^{-13} M limonén jelenlétében nem kezelt (**A**), illetve P4 kezelt (**B**) cervixeken.
ns: nem szignifikáns, *p<0.05; **p<0,01 ***p<0,001 a kontrollhoz viszonyítva

Trachea. Izolált szerven a terbutalin (10^{-9}–10^{-4} M) dózisfüggően csökkentette a trachea tónusát. Limonénnel illetve tokoferollal történt előinkubációt követően a terbutalin bronchus relaxáló hatása csökkent (**4A. ábra**). E2-kezelést követően a terbutalin tónuscsökkentő hatása markánsabbá vált, amit mind a limonén (10^{-13} M), mind a tokoferol (10^{-7} M) jelenléte kivédett. (**4.B. ábra**).

A.



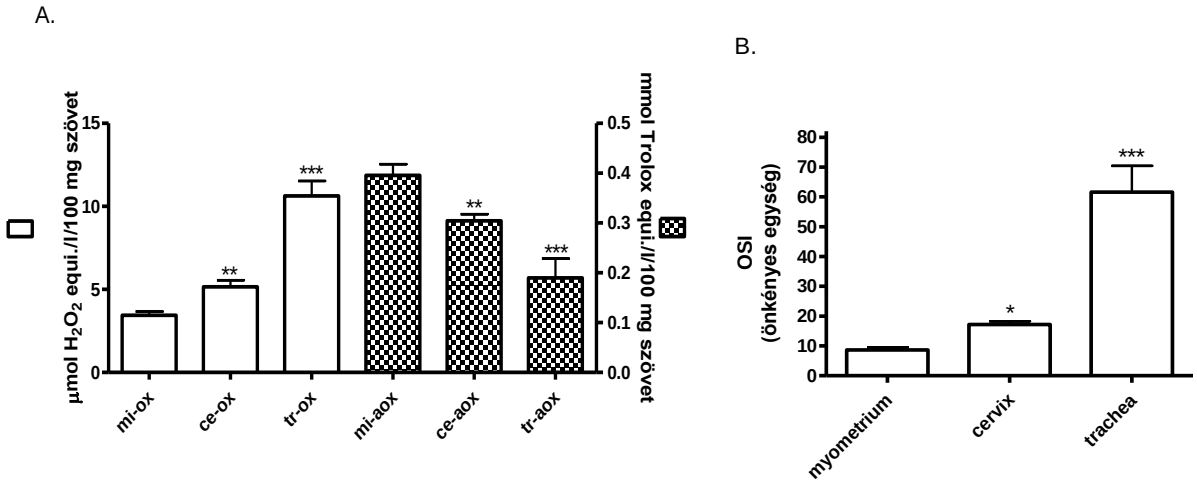
B.



4. ábra: A terbutalin bronchus tónuscsökkentő hatása önmagában, tokoferol (10^{-7} M) és limonén (10^{-13} M) jelenlétében nem kezelt (**A**), illetve E2-kezelt állaton (**B**). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0,001 a terbutalin önálló hatásához viszonyítva.

4.3. Az oxidáns és antioxidáns státusz a patkány simaizom szövetekben

A legalacsonyabb TOS érték a vemhes miometriumban, a legmagasabb pedig a tracheában volt mérhető. A vemhes cervixben magasabb oxidatív státuszt állapítottunk meg, mint a vemhes miometriumban. Az antioxidáns státusz ennek pontosan az ellenkezőjét mutatta. A legmagasabb értéket a vemhes miometriumban mértük, míg a legalacsonyabbat a tracheában (**5A. ábra**). A két érték hányadosa (TOS/TAS), az oxidatív stressz index (OSI) ennek megfelelően a vemhes miometriumban a legalacsonyabb, a tracheában pedig a legmagasabb (**5B. ábra**).



5. ábra: Az antioxidáns (üres oszlop) és az oxidáns státusz (csíkozott oszlop) a vemhes miometriumban, cervixben illetve nem vemhes trachea szövetben (A). Az oxidatív stressz index (OSI), mint a TOS és TAS értékek hányadosa (B). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 a vemhes miometriumhoz viszonyítva.
mi: miometrium, ce: cervix, tr: trachea

5. Diszkusszió

Az elmúlt két évtized kutatásai rávilágítottak arra, hogy a ROS fontos szignálrendszer az intra- és intercelluláris kommunikációs folyamatokban és a redox-homeosztázis fenntartásában. Feltételezzük, hogy a béta-mimetikus jelátvitel közvetítésében fontos szerepet játszanak a szabadgyökök.

Mivel a β_2-receptor agonista vegyületeket alkalmazása a koraszülés megelőzésében illetve az asztma kezelésében széles körben elterjedt, ezért megvizsgáltuk, hogy az antioxidáns (limonén, tokoferol) hogyan hat a különböző simaizomszövetekre. A β_2-AR agonista, terbutalin hatására a miometrium relaxál, a cervix rezisztencia fokozódik, a trachea tónusa pedig csökken.

Antioxidáns jelenlétében a terbutalin ezen hatásai különböző módon változtak. Feltehetőleg a limonén a Ca^{2+}-csatorna gátlás következtében fokozza a terbutalin által kiváltott relaxációt a vemhes miometriumban, míg a tokoferol nem módosította a jelátvitelt. A cervix-rezisztenciára kifejtett terbutalin hatás változatlan maradt mind a limonén mind a tokoferol jelenlétében. Eredményeink alapján, ezen szövettípusban nem befolyásolja a simaizom működését. A trachea esetében a tónuscsökkenésből következtettünk a hatásra, mivel ez a szövettípus nem kontrahál jelentős mértékben. A terbutalin koncentrációfüggően gátolta a trachea tónusát, amit az antioxidánsok jelenléte mérsékelt. Az eltérő simaizom szöveti reakciók alapján felmerült a lehetősége annak, hogy a különbözőségek hátterében az egyes szövetek más-más ROS tartalma állhat.

A szexuálhormonok szerepet játszanak a G protein kapcsolt β-adrenerg jelátvitelben. Az adrenerg rendszer a terhes uteruszban a szteroid hormonok szabályozása alatt áll. Gesztagén szubsztitúció szignifikánsan megnöveli a β-agonista érzékenységet, azaz fokozza a G-protein kapcsoltságot. Tehát P4 kezeléssel a miometriumban és a cervixben β-receptor expresszió fokozódás érhető el, míg mindez trachea esetében E2 kezeléssel váltható ki. Ha a jelátviteli mechanizmust fokozzuk, akkor valószínűsíthető, hogy ezzel párhuzamosan a ROS termelés is megemelkedik. A szignálmechanizmus hormonális fokozása következtében a terbutalin hatása a miometrium kontrakciókra kifejezettebb lett, azonban ezt nem befolyásolta szignifikánsan az antioxidáns jelenlét. A cervix esetében azonban a rezisztenciafokozó hatást az antioxidáns visszaszorította a kontroll értékre. A terbutalin tracheatónus csökkentő hatása antioxidáns jelenlétében visszaesett. Ezek alapján feltételezhető, hogy a különböző simaizomszövetek eltérő mértékben termelnek szabadgyököt, illetve az antioxidáns védelem kapacitása is eltérhet.

A szövetekben képződött ROS és termékei szintjét az oxidatív státusszal jellemezzük, amit az oxidáns és antioxidáns kapacitás hányadosából számítunk ki. Az antioxidáns kapacitás a vizsgált rendszerre vonatkozó összes antioxidáns vegyület együttes gyökfogó hatását jelenti, míg az oxidáns kapacitás a szövetekben jelenlevő összes gyök oxidatív hatását. Méréseink alapján a legmagasabb OSI értékkel a trachea rendelkezik, míg a legalacsonyabbal a vemhes miometrium. A limonén és a tokoferol hatása a β-jelátvitelre ott a legmarkánsabb, ahol az OSI értéke a legmagasabb. Ahol viszont az OSI érték alacsony, ott ez a hatás nem érvényesül.

Mindezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a ROS szerepe a β_2-adrenerg jelátvitel közvetítésében különböző mértékű a simaizomszövet funkciójától illetve lokalizációjától függően. A limonén és tokoferol esetében feltételezhető, hogy gyengíti az asztma kezelése során alkalmazott β_2-agonista szerekre adott terápiás választ.

Az értekezés alapját képező közlemények

1. **Hódi A**, Földesi I, Ducza E, Hajagos-Tóth J, Seres AB, Klukovits A, Gáspár R. Tocopherol inhibits the relaxing effect of terbutaline in the respiratory and reproductive tracts of the rat: The role of the oxidative stress index. Life Sci. 105 (1-2):48-55 (2014).
   (2.702 impakt faktor)

2. Judit Hajagos-Tóth, **Ágnes Hódi**, Adrienn B. Seres, Róbert Gáspár: Effects of d- and l-limonene on the pregnant rat myometrium in vitro. Croat Med J. 2015 Oct;56(5):431-8.

   (1,373 impakt faktor)

3. **Hódi A**., Földesi I., Hajagos-Tóth J., Ducza E., Gáspár R.: The effect of R (+) limonene on β-adrenerg signaling: the significance of oxidative stressz index. Acta Pharm Hung. 2014 84(3):111-9.

Poszterprezentációk:

1. Hódi Ágnes, Hajagos-Tóth Judit, Seres Adrien, Klukovits Anna, Gáspár Róbert: Tocopherol interacts with beta-mimetic effect in reproductive and respiratory tracts in the rat
   Society for Endocrinology BES, Harrogate, United Kingdom, 2013

2. Hódi Ágnes, Földesi Imre, Hajagos-Tóth Judit, Seres Adrien, Klukovits Anna, Gáspár Róbert: Terbutalin simaizom relaxáló hatása tocopherol jelenlétében: az oxidatív státusz szerepe
   Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, Magyarország, 2014, 04, 10-12.