Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

β_2-mimetikumok és gesztagének valamint egy α_2-antagonista hatékonyságának vizsgálata patkány koraszülési modellen

Ph.D. tézis összefoglaló

Gálik Márta

Témavezető
Prof. Falkay György

Szeged
2008

Bevezetés

A WHO definíciója alapján koraszülésről akkor beszélünk, ha a szülés a 20. és a 37. gesztációs hét között következik be. A koraszülés incidenciája Európában 5-7%, az Amerikai Egyesült Államokban 12,5% és amerikai adatok alapján enyhe emelkedést mutat. Jelenleg 3 perc 11 másodpercenként jön világra egy koraszülött.

Annak ellenére, hogy az utóbbi évtizedekben az iparosodott országokban a koraszülöttek túlélése az orvosi technológiában bekövetkezett hatalmas fejlődésnek köszönhetően drámaian javult, mégis a koraszülés felel a neonatális mortalitás 70 %- és a morbiditás 75%-ért. Korai károsodások, melyek összefüggésbe hozhatóak a koraszüléssel: respiratoricus distress szindróma, intraventricularis haemorrhagia, periventricularis leukomalacia, nekrotizáló enterocolitis, bronchopulmonaris dysplasia, szepszis és patent ductus arteriosus. A késői károsodások között az agyvérzés következtében kialakuló bénulás, a mentális retardáció és a retinopathia szerepel.

Sajnos, a jelenleg alkalmazott farmakológiai kezelések hatékonysága gyakran megkérdőjelezhető. A β_2-adrenerg receptor (β_2-AR) agonistákat elsősorban Európában használják, ugyanakkor az Egyesült Államokban kiszorultak a tokolitikus terápiából, mivel számos anyai és magzati mellékhatással rendelkeznek. Hatékonyságuk intenzív vita tárgyát képezi a szakirodalomban. Egy másik nagy probléma a β_2-agonistákkal kapcsolatban, hogy a kezelésre adott miometriális válasz a terhesség vége felé csökken. Egy potenciális magyarázat a terhesség-indukált deszenzitizációra a progeszteron (P) szint csökkenés. Az összefüggést a β_2-AR funkció csökkenés és a P hiánya között korábban leírták: *in vivo* P előkezelés növeli mind a β_2-AR denzitást mind a terbutalin uterus-relaxáló hatását *in vitro*. Továbbá a P kezelés kedvezően befolyásolja a terbutalin hatására bekövetkező aktivált G-protein mennyiség csökkenést 22 napos terhes patkányban. Mindezen eredmények szerint a P és a β_2-agonisták kombinációja egy ígéretes lehetőségnek tűnik a jövőben a tokolitikus terápia számára.

Az α_2-AR-ok miometriális kontraktilitás szabályozásában betöltött szerepe még nem teljesen tisztázott. Három α_2-AR altípust (α_{2A}-, α_{2B}- and α_{2C}-AR) azonosítottak a humán miometriumban. Az α_2-AR aktivációt követő sejt mechanizmusok még nincsenek teljes mértékben feltérképezve. A legújabb vizsgálatok szerint az egyes altípusok különböző szerepet játszanak a terhes patkány uterus kontraktilitásában.

Célkitűzések

Jelenleg nincsenek olyan átfogó kísérletek, amelyek a gesztagén - β_2-mimetikum kombináció uterus-relaxáló hatékonyságát vizsgálnák *in vivo* és *in vitro* patkányban, valamint amelyek az $\alpha_{2B/C}$-antagonista ARC 239 hatását vizsgálnák koraszülési modellből származó hiperkontraktilis uterus szöveten *in vitro*. Mindezek alapján a következő kísérleti célokat határoztuk meg:

1. Adaptált, reprodukálható patkány koraszülési modell segítségével megvizsgálni a β_2-agonista szalmeterol, gesztagének és a szalmeterol – gesztagén kombináció hatékonyságát *in vivo*.

2. A szalmeterol és/vagy gesztagén kezelést követően a hormonálisan indukált koraszülési modell β_2-AR denzitás meghatározása radioligand kötési tecnikával.

3. A β_2-agonista ill. a β_2-agonista – gesztagén kezelés hatékonyságának vizsgálata lipopoliszacharid (LPS-) – indukált patkány koraszülési modellen *in vitro*.

4. Az $\alpha_{2B/C}$-antagonista ARC 239 hatásának felderítése hormonális koraszülési modellből származó szövet nordarenalin-indukált kontrakcióiban *in vitro*.

Anyagok és módszerek

A pároztatás ivarérett nőstény (180-200 g) és hím (240-260 g) Sprague-Dawley patkányokkal történt egy erre a célra kialakított speciális ketrecben. Kenetet vettünk a nőstény állatoktól és mikroszkóp alatt spermiumok után kutattunk 1200 x nagyításon. Amennyiben a minta pozitívnak bizonyult, a nőstényeket elkülönítettük és a kopuláció napja a terhesség első napját jelentette.

A szalmeterol és gesztagén hatásának meghatározása hormonálisan indukált koraszülési modellen

Koraszülés indukció

Az állatokat mifepriszton (3 mg/0,1 ml) és PGE_2 (0,5 mg/állat) kombinációval kezeltük a terhesség 19. napján. A mifeprisztont olíva olajban szuszpendáltuk és szubkután (sc.) injekció formájában adagoltuk reggel 9 órakor. A PGE_2 intravaginálisan alkalmaztuk délután 4 órakor. A koraszülés időpontja az első magzat megszületését jelentette és a mifepriszton injekciótól számítva órákban kifejezve adtuk meg.

Az állatok kezelése

A szalmeterol xinafoátot metanol-víz 1:1 arányú elegyében oldottuk. A szalmeterol-xinafoát oldatot vagy az oldószer elegyet tartalmazó Alzet ozmotikus minipumpát sc. az állatok hát bőre alá ültettük be a terhesség adott (15-18) napján, izoflurán anesztézia mellett. A szalmeterol dózisa 130 μg/nap/állat volt.

A P és 17α-OH-progeszteron-kapronátot (17P) olíva olajban szuszpendáltuk és sc. (0,5 mg/0,1 ml) adagoltuk a pumpa beültetés napjától a terhesség 20. napjáig.

Kísérleti elrendezés

Az *A* csoport volt a kontroll csoport. A *B* csoportot P-nal, a *C* csoportot szalmeterollal, a *D* csoportot szalmeterol – P, míg az *E* csoportot szalmeterol – 17P kombinációval kezeltük. Csoportonként 8 állatot vizsgáltunk. Minden állaton elvégeztük a szalmeterolt vagy annak oldószerét tartalmazó minipumpa beültetést, és emellett gesztagén vagy olíva olaj sc. injekciót is kaptak.

A szalmeterol/gesztagén/oldószer kezelést a terhesség adott napján (15, 16, 17 vagy 18) indítottuk, kivéve az *E* csoport esetén, ahol a 15. napon.

A statisztikai analízis során az ANOVA Newman-Keuls tesztet használtuk.

Radioligand kötési technika

Az állatokat 17P és/vagy szalmeterollal kezeltük a terhesség 15. napjától a 20. napig. A koraszülés-indukció a terhesség 19. napján történt a korábban leírtaknak megfelelően. Az eltávolított uterus szöveteket pufferben homogenizáltuk, majd centrifugáltuk (20 000xg, 40 perc, 4 ^{o}C). A pelletet újra szuszpendáltuk és centrifugáltuk az előző paraméterek alapján, majd a további vizsgálatokig -70 ^{o}C-on tároltuk.

A total kötés mérésekor a reakció elegy 100µl membrán preparátumot (~0,5 mg/ml fehérje), 100 µl [^{3}H]ICI 118,551 β_2-AR szelektív ligandot (specifikus aktivitás 18,8 Ci/mmol), és a nem-specifikus kötés mérése során 100 µl jelöletlen ligandot (dihidro-alprenolol) vagy inkubációs puffert tartalmazott. Az inkubációt követően a mintát Brandell cell harvester készüléken Whatman GF/B filteren szűrtük. A minták radioaktivitását a HighSafe szcintillációs koktél hozzáadása után Wallac 1409 liquid szcintillációs számláló segítségével határoztuk meg.

A specifikus kötést a totálkötés és a nem-specifikus kötés különbségeként határoztuk meg. Minden minta esetében legalább három független mérést végeztünk, amelyek két párhuzamos mintából álltak. A β_2-AR fehérje mennyiségét a telítési görbe Scatchard transzformációjával határoztuk meg. A statisztikai analízis során az ANOVA Newman-Keuls tesztet használtuk.

A terbutalin és a 17P hatásának vizsgálata LPS-kezelt patkány uteruson

LPS-indukált koraszülési modell

A terhes állatokat 3 csoportra osztottuk: nem-kezelt, LPS-kezelt és LPS-17P-kezelt csoport.

Az LPS-t fiziológiás sóoldatban oldottuk és intraperitoneálisan (ip.) adagoltuk a terhesség 18 napjától egészen a 20. napig. A 17P-t olíva olajban szuszpendáltuk és sc. 0,5 mg/0,1 ml/nap dózisban alkalmaztuk.

A nem-kezelt csoport ip. fiziológiás sóoldatot és sc. olíva olajat kapott.

A terbutalin izolált szervi vizsgálata

A szöveteket a terhesség 20. napján távolítottuk el az intakt ill. kezelt patkányokból. Az uterus szarvakból 5 mm hosszúságú gyűrűket metszettünk, és 10 ml de Jongh oldatba (pH=7,4) helyeztük. A szerfürdő hőmérsékletét 37 °C-on tartottuk karbogén gázkeverék (95% O_2 + 5% CO_2) folyamatos átáramoltatása mellett. Az előkészítést követően a preparátumokat 1 órán keresztül inkubáltuk. Az előfeszítés 1,5 g volt. A szövetek feszülésének mértékét egy

jelátalakító mérőberendezéssel mértük, az AUC értékeket a S.P.E.L. Advanced ISOSYS Data Acquisition System segítségével rögzítettük és értékeltük.

25 mM KCl oldattal kontrakciókat váltottuk ki és vizsgáltuk a terbutalin (10^{-12} – 10^{-7} M) hatékonyságát. A kontrakciók mértékét SG-02 izometriás mérőfejjel detektáltuk. A görbék regisztrálását, az adatok rögzítését és feldolgozását ISOSYS Data Acquisition System segítségével végeztük. A dózis-hatás görbék statisztikai elemzését a Prism 4.01. segítségével ANOVA Newman-Keuls teszttel végeztük.

Az $\alpha_{2B/C}$ antagonista ARC 239 hatásának vizsgálata hormonális koraszülési modellen

A hormonális koraszülés-indukált állatokból a terhesség 20. napján a szülés előtt az uterust eltávolítottuk.

Az $\alpha_{2B/C}$ antagonista ARC 239 izolált szervi vizsgálata

A szöveteket preparáltuk és inkubáltuk a korábban leírtaknak megfelelően.

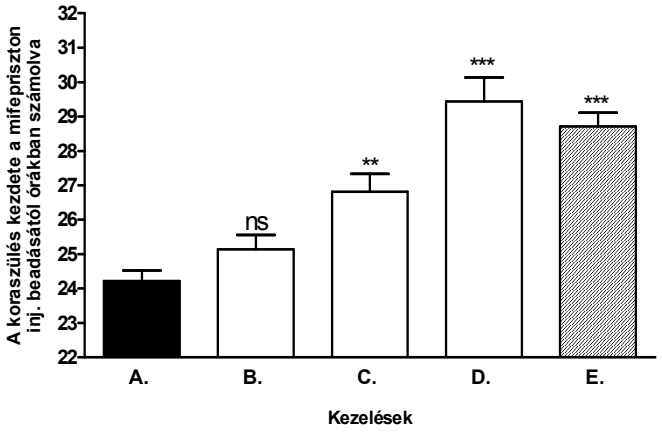
Az inkubációt követően noradrenalinnal ($1x10^{-8}$–$3x10^{-5}$ M) kontrakciókat váltottunk ki és propranolol (10^{-5} M) valamint doxazozin (10^{-7} M) jelenlétében kumulatív dózis-hatás görbét vettünk föl. A noradrenalin hozzáadását megelőzően az ARC 239 jelenlétében 20 percig inkubáltuk a szövetet. A kiértékelést és a statisztikai analízist a korábban leírtak alapján végeztük. Az analízis során párosítatlan *t*-próbát alkalmaztunk.

Eredmények

A szalmeterol és a gesztagének hatékonysága hormonálisan indukált koraszülési modellen

A kontroll (*A*) csoportban az állatok a mifepriszton kezeléstől számítva 24 óra múlva koraszültek, a 20. terhességi napon reggel 9 óra körül.

A terhesség 15. napján indított P kezelés (*B* csoport) önmagában nem bizonyult hatékonynak a koraszülés késleltetésében. A szalmeterollal (*C* csoport) szignifikáns mértékben késleltetni tudtuk a hormonálisan indukált koraszülés kezdetét (2,41 ± 0,52 h). A szalmeterol - P kombináció esetén (*D* csoport) azonban a koraszülés időpontját 5,24 ± 0,69 órával tudtuk eltolni (1. ábra).



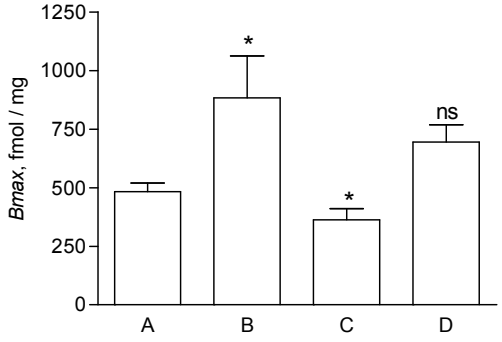
1. ábra: A terhesség 15. napján kezdett tokolitikus kezelések összehasonlítása.
A szalmeterol és a kombináció között a szignifikancia p<0,01 volt. A szalmeterol és a 17αOH-progeszteron-kapronát kombinációs kezelés között nem volt szignifikáns a különbség (p>0,05).
A szignifikancia jelölése: ns p>0,05, * p<0,05, *** p<0,001.

Hasonló eredményeket kaptunk, ha a kezeléseket a terhesség 16-18. napján indítottuk. Minden vizsgált esetben a *D* és *E* csoporton végzett kezelések (szalmeterol – gesztagén kombinációk) jóval hatékonyabbnak bizonyultak, mint a *B* és *C* csoportban alkalmazott monoterápiák. A hatékonyságokat tekintve a legmarkánsabb különbséget a kombináció és a szalmeterol között a terhesség 15. napján indított kezelések esetén tapasztaltuk.

Az *E* csoport (szalmeterol – 17P) és a *D* csoport (szalmeterol – P) a koraszülés késleltetés szempontjából nagyon hasonlónak bizonyult. A különbség a két csoport között nem volt szignifikáns.

Radioligand kötési technika

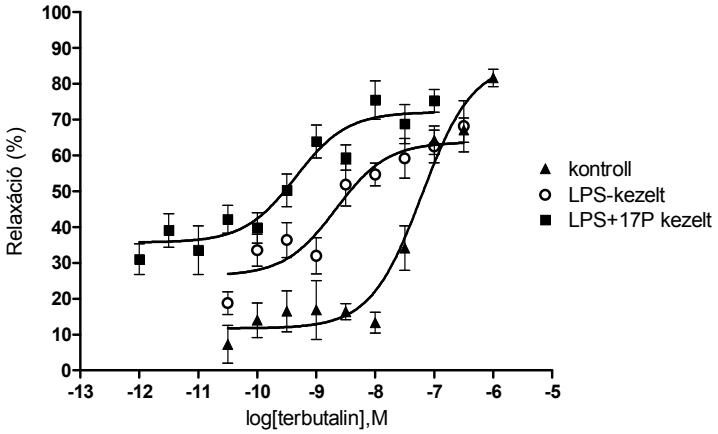
A 17P kezelés fokozta a β_2-AR denzitást a kontroll csoporthoz képest (p<0,05), szemben a szalmeterol kezeléssel, mely β_2-AR szám csökkenést okozott (p<0,05). Ugyanakkor a szalmeterol – gesztagén kombináció nem befolyásolta szignifikáns mértékben a receptor denzitást.



2. ábra: A β_2-adrenerg receptor denzitásának változása a terhesség 15. napján kezdett szalmeterol és/vagy gesztagén kezelések hatására a hormonálisan indukált patkány koraszülési modellen.
Az egyes oszlopok jelentése: átlag ± SE, 6 kísérletből számítva. A statisztikai összehasonlítást a kontroll, nem-kezelt koraszült állatok csoporthoz viszonyítva tűntettük föl.
A: kontroll csoport; **B**: P-kezelt; **C**: szalmeterol-kezelt; **D**: szalmeterol – P kombináció. A szignifikancia jelölése: ns $p>0,05$; * $p<0,05$.

A terbutalin és a gesztagének hatékonysága LPS-indukált koraszülési modellen, *in vitro*

A KCl indukálta kontrakciókat a terbutalin dózisfüggően gátolta. A terbutalin hatékonyságát az LPS kezelés kismértékben növelte a kontroll állatokhoz képest, amit a dózis-hatás görbe balra tolódása jelzett. Ugyanakkor az LPS-17P csoportban a 17P-tal történő kezelés hatására a β_2-mimetikum hatása tovább fokozódott.



3. ábra: A terbutalin relaxáló hatásának vizsgálata KCl-indukált kontrakciókban nem-kezelt, LPS valamint LPS és 17P-kezelt 20. napos terhes uteruson.
Statisztikai átlag ± SE, 6 kísérletből számítva.

Az ARC 239 hatékonysága hormonálisan indukált koraszülési modellen *in vitro*

Az ARC 239 csökkentette a noradrenalin által kiváltott kontrakciók mértékét a hormonálisan indukált koraszülési modellen.

Megbeszélés

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a P kezelés fokozza a β_2-mimetikumok hatását *in vitro*. Egy klinikai kísérletben a mikronizált P és β_2-mimetikum kombinációs kezelés esetén az uterus-aktivitást csökkentő hatás gyorsabban kialakult, mint a monoterápiában alkalmazott β_2-agonista esetén, ugyanakkor a kombináció sem volt képes megnyújtani a terhességet. Mindezen előzmények után kezdtük el vizsgálni a szalmeterol – gesztagén (P vagy 17P) kezelés hatékonyságát hormonálisan indukált koraszülési modellen patkányban, *in vivo*. Az általunk alkalmazott modell nagyon hatásosnak és jól reprodukálhatónak bizonyult, mivel minden állat egy órán belül koraszült a mifepriszton kezelést követő napon.

Kísérleteink szerint a monoterápiában alkalmazott gesztagén nem védte ki a P antagonista mifepriszton és PGE_2 kombinációjával indukált koraszülést. A szalmeterol hatékonynak bizonyult a koraszülés késleltetésében és ez a hatás fokozható volt gesztagén adagolással, függetlenül a kezelés kezdetének napjától.

Feltételeztük, hogy a hatásfokozódás egyik lehetséges oka a gesztagén kezelést követő β_2-AR denzitás vagy az aktivált G-protein mennyiség növekedés. A radioligand mérési technika eredményei szerint a β_2-AR denzitást nem befolyásolt szignifinkáns mértékben a szalmeterol mellett adagolt 17P, vagyis a megnövekedett hatékonyság a β_2-AR kapcsolt aktivált G-protein mennyiségének növekedésével magyarázható.

Vizsgáltuk a β_2-mimetikum – gesztagén hatását LPS-indukált koraszülési modellen *in vitro*. Kísérleteinkben terbutalint alkalmaztunk a szalmeterol helyett. A terbutalin hatékonysága fokozódott a gyulladt patkány uteruson összehasonlítva a kontroll 20. napos terhes uterus szövettel. A hatásnövekedés feltételezhetően a β_2-AR szignál transzdukció fokozódásával magyarázható. Ugyanakkor, ha a terhes állatok párhuzamosan az LPS-sel 17P kezelésben is részesültek, a terbutalin hatékonysága szignifikáns mértékben megnőtt a kontroll és LPS csoporthoz képest.

A kutatás egyik irányvonala új lehetséges célpontokat találni a tokolitikus terápia számára. Az altípus szelektív α_2-AR antagonistákkal folytatott kísérletek alapján noradrenalin

hatására az α_{2B}-AR-on kontrakció, míg a α_{2A}- és α_{2C}-AR esetén kontrakciót csökkentő hatás mediálódik.

Mindezen előzmények után megvizsgáltuk az $\alpha_{2B/C}$-AR antagonista ARC 239 hatékonyságát hormonálisan indukált koraszülési modellen, *in vitro*. A koraszülés-indukált szövet fokozott szenzitivitást mutat a noradrenalinra: az EC_{50} érték tízszer alacsonyabb volt, mint normál terhességben. A maximális kontrakció nagysága azonban csaknem a fele volt a kontroll csoporthoz képest. Kísérleteink szerint a noradrenalin-indukált maximális kontrakciók mértéke 50%-kal csökkent az ARC 239 jelenlétében a koraszülés indukált modellen, vagyis az antagonista a korábbi tapasztalatokkal összevetve ugyanolyan hatékonynak bizonyult, mint késői terhességben.

Mindezen eredmények fényében kijelenthetjük, hogy a β_2-mimetikumok tokolitikus hatékonysága fokozható gesztagénnel kombinálva mind a hormonálisan indukált koraszülésben *in vivo* mind a LPS-indukált koraszülési modellen *in vitro*. Elképzelhetőnek tartjuk, hogy a humán tokolitikus terápiában alkalmazott β_2-agonisták hatása is fokozható gesztagén együttes adásával. A kombináció humán kipróbálását elősegítheti az a tény, hogy mind a gesztagének, mind a β_2-mimetikumok farmakodinámiás, farmakokinetikai és toxikológiai paraméterei ismertek, tehát kombinációjuk terápiás kockázata igen alacsony.

Az $\alpha_{2B/C}$-antagonista ARC 239 csökkenti a noradrenalin által kiváltott kontrakciók mértékét hormonális koraszülési modellen patkányban. Az $\alpha_{2B/C}$-AR antagonisták új potenciális lehetőséget jelenthetnek a koraszülési kontrakciók kezelésében.

Függelék

Értekezés alapját képező közlemények:

I. Gáspár R, Gál A, **Gálik M**, Ducza E, Minorics R, Kolarovszki-Sipiczki Z, Klukovits A, Falkay G. Different roles of α_2-adrenoceptor subtypes in non-pregnant and late-pregnant uterine contractility *in vitro* in the rat. Neurochem Int; 2007 Oct;51(5):311-8.

II. **Márta Gálik**; Róbert Gáspár, Ph.D; Zoltán Kolarovszki-Sipiczki; George Falkay D.Sc. Gestagen treatment enhances the tocolytic effect of salmeterol in hormone-induced preterm labor in the rat *in vivo*. Am J Obstet Gynecol; 2008 Mar;198(3): 319-5.

III. **Gálik M**., Dr. Gáspár R., Dr. Klukovits A., Dr. Márki Á., Prof. Falkay Gy. A salmeterol tocolyticus hatásának fokozása gestagennel. Magyar Nőorvosok Lapja 2008; 71: 37-43.

Egyéb kivonatok:

1. **Gálik M**., Gáspár R., Kolarovszki-Sipiczki Z., Benyhe S., Páldy E., Borsodi A., Falkay Gy. A β_2-adrenerg agonisták hatásának fokozása izolált terhes patkány uteruson és *in vivo* koraszülés modellben. A Magyar Experimentális Farmakológia Tavaszi Szimpóziuma; Budapest, 2005. június 6-7.

2. Gáspár R., Kolarovszki-Sipiczki Z., Gál A., Minorics R., **Gálik M**., Ducza E., Falkay G.: α_2-adrenergic receptor subtypes as new targets for tocolytic therapy. 1st Hot Topics & Controversies in Perinatal Medicine; Rhodes Island, Greece, June 16-19, 2005.

3. **Gálik M.,** Gáspár R., Kolarovszki-Sipiczki Z., Benyhe S., Páldy E., Borsodi A., Falkay Gy: A gesztagén kezelés fokozza a β_2-mimetikumok relaxáló hatását izolált terhes uteruson és indukált koraszülésben patkányban. Gyógyszerkutatási Szimpózium 2005; Pécs, 2005. november 4-5.

4. **Gálik M**., Gáspár R., Gál A., Ducza E., Minorics R., Klukovits A., Kolarovszki-Sipiczki Z., Falkay Gy: α-adrenerg receptorok szerepe a terhes patkány uterus kontraktilitásában; XIII. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus; Budapest, 2006. május 25-27.

5. Gáspár R., **Gálik M.**, Gál A., Ducza E., Minorics R., Kolarovszki-Sipiczki Z., Falkay G.: Different roles of α_2-adrenergic receptor subtypes in the pregnant uterine contractility in the rat. IUPHAR 2006; Beijing, China, July 2-7, 2006.

6. **Gálik Márta**, Kolarovszki-Sipiczki Zoltán: Szalmeterol tokolitikus hatásának fokozása gesztagénnal patkány koraszülési modellen. VIII. Clauder Ottó Emlékverseny; Budapest, 2007. április 12-13.

7. R. Gáspár, **M. Gálik**, Z. Kolarovszki-Sipiczki, E. Ducza, Á. Márki, S. Benyhe, E. Páldy, A. Borsodi, G. Falkay. Gestagens enhances the relaxing effect β_2-adrenergic receptor agonists on pregnant rat myometrium: old drugs with new perspective in therapy. 8th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics; Amsterdam, August 29-September 1, 2007.