PhD értekezés tézisei

Az α_1-adrenerg receptor altípusok szerepe az uterusz kontraktilitás szabályozásában – molekuláris farmakológiai vizsgálatok

Ducza Eszter

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
Szegedi Tudományegyetem

Szeged
2002

Bevezetés

A perinatális megbetegedések és halálozások leggyakoribb oka a koraszülés. Ezen esetek száma igen magas és nem csökkent jelentősen az elmúlt években. A tokolitikus céllal a klinikai gyakorlatban magnézium-szulfátot, β_2-adrenerg receptor (β_2-AR) agonistákat, ritkán prosztaglandin gátlókat, kalcium-csatorna blokkolókat és oxitocin receptor antagonistákat használnak. Ezen farmakonok mellékhatás profilja és bizonyos esetekben mutatott hatástalanságuk bizonyítja, hogy a tökéletes tokolitikus terápia egyike a szülészeti praxis legnagyobb kihívásainak. Kutatásainkat is a tocolízis megoldatlan problémája motiválta.

A spontán méh kontrakciók kialakulása heterológ szabályozás alatt áll, amelyben szerepet játszanak a prosztaglandinok, az adrenerg rendszer, az oxitocin, a connexinek és a szexuál hormonok.

Az α-adrenerg receptorokon (α-AR) keresztül alakulnak ki a méh kontrakciók, míg a β-AR-okon uterusz relaxációja jön létre. Ezek alapján az α-AR blokkolók elméletileg alkalmasak lehetnek tocolisis kiváltására.

Az α_1-AR altípusok megoszlása és jelentősége a patkány és humán méhműködés szabályozásában a terhesség alatt eddig fel nem tárt terület. Ennek vizsgálatára kiváló lehetőséget nyújt az antiszenz technológia. Hagyományos vizsgálati módszerekkel limitált a receptorok fiziológiás szerepének vizsgálata. Az antiszenz hatás, melynek alapja a szelektív gén expresszió gátlása antiszenz DNS, RNS vagy oligonukleotidok használatával, új lehetőséget nyújt az élettani funkciókba történő szelektív beavatkozásra és a receptorok élettani szerepének tanulmányozására.

Célkitűzések

1. α_1-AR altípusok denzitás és farmakológiai reaktivitás változásának vizsgálata a terhesség végén patkány uteruszon. Az α_1-AR altípusok mRNS expressziójának változását *reverse-transcription polymerase chain* reakcióval (RT-PCR) vizsgáltuk a terhesség 18, 20 és 22. napján. Elektromos erőtéringerléssel (EFS) teszteltük a terhes patkány uteruszok farmakológiai reaktivitását az adott időszakban.

2. α_{1A}-AR szerepének vizsgálata a terhes patkány uterusz kontrakcióinak szabályozásában. Célunk – nem megfelelő állatmodell hiányában - egy *knock-down* transzformáns modell kifejlesztése, amely alkalmas az α_{1A}-AR-ok szerepének vizsgálatára. Erre az AON –ok alkalmazását tartottuk megfelelőnek.

Az α_{1A}-AR ellen tervezett *antiszenz oligodeoxynukleotidok* (AON) receptor szintézist gátló hatását radioligand receptor kötési technikával és Western blot analízissel igazoltuk. EFS technikával vizsgáltuk a post-partum uteruszokban bekövetkezett farmakológiai változásokat.

3. α_1-AR altípusok mRNS szintézisének vizsgálata nem terhes és terhes humán uteruszon RT-PCR technikával.

Módszerek

RT-PCR vizsgálatok

Szövet preparálás – Patkány uterusz

A nem terhes és 18, 20, 22 napos terhes patkány uteruszt eltávolítottuk, folyékony nitrogénbe helyeztük, RNS kivonásáig -70ºC-on tároltuk.

Humán uterusz

Mintáinkat nem terhes humán uteruszból a cervixtől a fundusig tartó metszéssel nyertük, majd a miometrium csíkot egyenlő részekre osztottuk az RT-PCR vizsgálatokhoz. Terhes humán uterusz mintáink császármetszésből származtak. Mintáinkat folyékony nitrogénbe helyeztük, majd felhasználásig -70 ºC-on tároltuk.

Totál RNS tisztítása Chomczynski és Sacchi szerint történt. Az RNS-t denaturáltuk, majd az elegyet M-MLV reverse transcriptase hozzáadásával 37 ºC-on 60 percig, majd 72 ºC-on 10 percig inkubáltuk. A PCR-t cDNS, ReadyMix REDTaq PCR elegy és primerek segítségével végeztük. A PCR termék kvantifikálásához α-^{32}P-dCTP-t (1 μCi) adtunk a reakció elegyhez. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen elektroforézisnek vetettük alá; vákuumszárítás után PhosphoImager kazettába helyeztük. A gélek kvantifikálása ImageQuant programmal történt.

AON-ek szintézise

A három AON és a kontroll oligonukleotidok szintézise Bottka Sándor irányításával a Biológiai Kutató Központ Növénybiológiai Intézetében történt.

Állatok kezelése AON-okkal

A patkányok kezelése 2-3 órával szülés után urethan narkózisban, haránt laparotómia után történt. Az AON-okat és kontroll oligonukleotidokat speciális vivőanyag keverékben (pluronic gél, DOTAP) injektáltuk az uterusz szarvakba. További vizsgálatainkat az expozíciót követő 24. órában eltávolított uteruszon végeztük.

Radioligand-receptor kötési vizsgálatok

Radioligand kötési kísérleteket patkány uterusz membránon végeztük. Az α_1-AR-ok telítési analízisét [^{3}H]prazozinnal és jelöletlen fentolaminnal hajtottuk végre. Displacement vizsgálatokhoz [^{3}H]prazozint és jelöletlen ligandot (prazozin, WB4101) használtunk. A reakciót minden esetben a membrán hozzáadásával indítottuk. A receptor-ligand complex radioaktivitását folyadék szcintillációs számlálóban mértük. A nem specifikus kötést jelöletlen fentolamin jelenlétében vizsgáltuk.

Western blot analízis

Fehérje mintát SDS-poliakrilamid gélen elektroforézisnek vetettük alá, majd a szétválasztott fehérjéket áttranszformáltuk nitrocellulóz membránra. A membránt blokkoltuk, majd anti-α_{1A}-, α_{1B}-, α_{1D}-AR poliklonális antitesttel inkubáltuk. Mosás után tormaperoxidázzal konjugált IgG-t adtunk a rendszerhez. Az antitest kötést kemilumineszcencia reagenssel detektáltuk, az expozíciót Kodak X-Omat filmen végezztük. Kontrollként anti-β-actin monoklonális antitestet használtunk.

Elektromos erőtér ingerlés

Az AON kezelt és kontroll uteruszokat 24 órával a szülés után távolítottuk el. Az uterusz szarvakból 0,5 cm hosszú izom gyűrűt metszettünk ki, melyeket két platina elektród közé függesztettünk fel szervfürdőbe, melyben 37 °C-os, karbogénnel (95% O_2 / 5% CO_2) átáramoltatott puffer volt. Maximális ritmikus kontrakciókat váltottunk ki digitális, programozható ingerlővel, korábban meghatározott jelszélességgel (60 s), periódus idővel (200 ms) és 40 V feszültséggel. A szövetgyűrűk kontrakcióit transzducerrel mértük, a görbe regisztrálását és az adatok értékelését IsosysData Acquisition System segítségével végeztük. Nem-

kumulatív dózis-hatás görbét vettünk fel a szelektív α_{1A}-blokkoló 5-metil-urapidilre (5-MU) és a WB4101-re, α_{1B}-antagonista BMY7378-ra, α_{1D}-blokkoló ciklazozinra és β_2-agonista terbutalinra. A dózis-hatás görbe és a görbék alatti terület (AUC) értékelése és statisztikai elemzése Prism 2.01 programmal történt. A statisztikai számításokat ANOVA Neuman-Keuls teszttel végeztük.

Eredményeink

α_1-AR altípus mRNS expressziója és farmakológiai reaktivitása patkány uteruszban a terhesség végén

Patkányban a terhesség 18. napjától a 22. napjáig az α_{1A}-AR mRNS mennyisége fokozatosan növekedett, míg az α_{1B}-AR mRNS expressziója nem volt kimutatható RT-PCR analízissel. Az α_{1D}-AR mRNS szintézise a 20. napon mutatott maximumot, majd a 22. napon csökkent. Elektromos erőtér ingerléssel a terhesség 18, 20 és 22 napján dózisfüggően gátolható volt a méh kontrakció α_{1A}-antagonista 5-MU-el. A vizsgált koncentráció tartományban a szelektív α_{1B}-AR antagonista ciklazozinnal nem találtunk szignifikáns változást a stimulált kontrakciók gátlásában csak nagy dózisban. α_{1D}-AR antagonista BMY7378 dózisfüggően gátolta az uterusz kontrakciókat. A dózis-hatás görbék alapján kiszámított EC50 értékei az alábbiak voltak: α_{1A}-AR antagonista 5-MU $6{,}3 \times 10^{-6}$ M (18. nap), $2{,}9 \times 10^{-6}$ M (20. nap), $1{,}9 \times 10^{-6}$ M (22. nap); α_{1D}-AR antagonista BMY 7378 $1{,}09 \times 10^{-5}$ M (18. nap), 4×10^{-6} M (20. nap), 3.6×10^{-5} M (22. nap).

Szoros korrelációt találunk α_{1A}-AR mRNS expresszió és az 5-MU EC50 értéke (r^2=0,9712) továbbá az α_{1D}-AR mRNS expresszió és a BMY 7378 EC50 értéke között (r^2=0,9936).

α_{1A}-AR-ok szerepének vizsgálata patkány uteruszban AON-okkal

A szintetizált három AON közül a 480-AON csökkentette az α_{1A}-AR denzitását időfüggően a kezeletlen és random-oligonukleotiddal kezelt csoporthoz képest.

A szülést követő 12. és 24. órában eltávolított, 480-AON-el kezeletlen uteruszban lehetett mérni a legjelentősebb α_{1A}-AR denzitás csökkenést. A 480-AON-el történt 12 órás inkubáció 58,7%-os (B_{max}=12,04 ± 0,86), a 24 órás 53,0%-os (B_{max} =3,69 ± 0,42 fmol/mg) csökkenést okozott a B_{max} értékében. Szignifikáns változás a többi AON esetében nem volt kimutatható.

A α_{1A}-szelektív WB 4101 két kötőhelyet ismert fel a (K_d=0,011 és 15,05 nM) a nem kezelt uteruszon, míg a 480-AON-el kezelt állatoknál csak egy kötőhely (K_i = 36,12 nM) volt kimutatható.

Western-blot analízis során 480-AON hatására létrejövő α_{1A}-AR denzitás csökkenést detektáltuk.

EFS vizsgálatokban az uterusz kontrakciók AUC értékeiben szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kontroll, operált kontroll, DOTAP-kezelt kontroll, 480-*missmatched* AON és 480-*scrambled* AON kezelt kontrollokhoz viszonyítva.

Továbbá EFS vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a kontroll uterusz gyűrűn kiváltott ritmikus kontrakciókat az α_{1A}-szelektív antagonista 5-MU 75%-ban, és a WB 4101 70%-ban gátolja. 480-AON-el kezelt uteruszon a kontrakciók gátolhatósága 25 és 20% volt. Az IC50 értékek az 5-MU esetében 3,8 x 10^{-5}M a WB 4101-nél 9,5 x 10^{-6} M volt a kontroll uterusznál. A ritmikus kontrakciók gátolhatósága a 480-AON kezelt

uteruszon α_{1D}-antagonista BMY 7378-al és β-mimetikus terbutalinnal nem mutatott eltérést a kontrollokhoz viszonyítva.

α_1-AR altípusok mRNS szintjének változása humán uteruszban

Az α_1-AR altípusok (α_{1A}-, α_{1B}-, α_{1D}-AR) mRNS jelenlétét detektáltuk nem terhes uteruszban, α_{1B}-AR mRNS dominancia mellett. α_{1B}-AR mRNS szintje az uterusz corpus részében mutatott maximumot és szintje a fundus felé csökkent. Az α_{1A}-és α_{1D}-AR mRNS expressziója a cervixben a legalacsonyabb, szintje a fundus felé nő.

Császármetszésből származó szövetmintákban α_{1A}-, α_{1B}-, α_{1D}-AR mRNS expresszióját mutattuk ki. Ezekben a mintákban α_{1D}-AR mRNS-t detektáltunk a legnagyobb mértékben.

Összefoglalás

1. Vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy a terhes patkány uterusz kontraktilitásában az α_{1A}- és α_{1D}-AR-ok involválódnak, melyek közül kiemelt szerepe az α_{1A}-AR altípusnak van a terhesség végén.

2. Az α_{1B}-AR mRNS expressziója és ezen receptor altípus farmakológiai reaktivitása nem volt mérhető patkány uteruszban a terhesség végén. Ebből arra következtethetünk, hogy az α_{1B}-AR-ok valószínűleg nem játszanak kiemelkedő szerepet a terhes patkány uterusz kontraktilitásának szabályozásában.

3. Szoros korrelációt igazoltunk az α_{1A}-AR és α_{1D}-AR mRNS mennyisége és a receptorok farmakológiai reaktivitása között a terhesség végén patkányban. Ez a korreláció nagy jelentőségű lehet, mivel a

leggyakrabban használt tokolitikumoknak (β_2–mimetikumok) a receptor deszenzitizáció miatt csökken hatékonyságuk.

4. AON-ok lokális alkalmazása, mellyel megvizsgálhatjuk egyes receptorok szerepét az uterusz működésében, új eljárás az experimentális farmakológiában. Ezen új modell használatával kifejlesztettünk egy α_{1A}-AR *knock-down* transzformáns állatmodellt, melyre az eddigi farmakológiai modellek nem adtak lehetőséget.

5. AON-dal végzett vizsgálatainkban bizonyítottuk az α_{1A}-AR-ok jelentős szerepét az uterusz kontraktilitásának szabályozásában.

6. Nem terhes humán uteruszban α_{1B}-AR mRNS, császármetszésből származó mintákban α_{1D}-AR mRNS dominanciát igazoltunk.

Eredményeink tükrében feltételezzük, hogy az α_{1A}-AR és α_{1D}-AR jelentős szerepet játszanak a terhességben a miometriális kontraktilitás szabályozásában. Továbbá megállapíthatjuk, hogy az α_{1B}-AR altípus nem involválódik jelentősen a terhes uterusz kontraktilitásának szabályozásába. További vizsgálatok szükségesek az α_1-AR altípusok terhes humán uteruszban betöltött szerepének meghatározására és egy új uterusz szelektív α_1-AR blokkoló tokolítikumként való kifejlesztéséhez.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek Dr. Falkay György professzor úrnak, iránymutatásaiért, bátorításáért és a munkám elvégzéséhez nyújtott biztos szakmai és anyagi háttér megteremtéséért.

Köszönettel tartozom szerzőtársaimnak és kollégáimnak

együttműködésükért és inspiráló gondolataikért.

Ph.D. tézishez kapcsolódó közlemények és idézhető előadás kivonatok

1. E. Ducza, R. Gáspár, A. Márki, P. Gyula, S. Bottka, G. Falkay: Use of antisense oligonucleotids to verify the role of the α_{1A}-adrenergic receptor in the contractility of the rat uterus post partum *Mo .Pharmacol 59(5) 1235-1242, 2001*

IF.: 5,678

2. Ducza E., Gáspár R., Márki Á., Bottka S., Falkay G: Farmakológiai modell az adrenerg rendszer szerepének vizsgálatára post partum patkány uteruszon. *Acta Pharm Hung.* 71. 300-305, 2001

3. E. Ducza, R. Gáspár, G. Falkay: Alteration of α_1-adrenergic receptor subtypes and pharmacological reactivity of the late-pregnant myometrium in the rat. *Mol Reprod and Deveolpment, 62 (3): 343-347, 2002*

IF.: 2,535

4. E. Ducza, R. Gáspár, G. Falkay, S. Bottka, P. Gyula: Effects of α_{1A}-adrenergic receptor antisense oligonucleotides on post-partum rat uterus contractility and pharmacological reactivity *Fundam. Clin. Pharm. 13(1), 247s. 1999.*

IF.: 1,265

5. E. Ducza, R. Gáspár, Á. Márki, S. Bottka, G. Falkay: Antisense oligonucleotides: a new possibility to investigate the role of α_1-adrenergic

receptor in rat uterus contractility and pharmacological reactivity *Hum. Reprod. 15, Abstract book 1, 205. 2000.*

IF: 2,997

6. R. Gáspár, A. Márki, E. Ducza, G. Falkay: Comparison of the effects of terbutaline and subtype selective alpha1-adrenoceptor antagonists on pregnant rat uterine contractions in vitro. *Eur J Pharm Sci 11. Suppl. 1 S109. 2000.*

IF.: 1,212

7. E. Ducza, R. Gáspár, Á. Márki, G. Falkay : Alteration of α-adrenergic subtypes and pharmacological reactivity of the late-pregnant myometrium in the rat.*Fundamental&Clinical Pharmacology Suppl. 8P116, 2001*

IF.: 1,265

8. Ducza E., Gáspár R., Falkay Gy., Bottka S.: Az antisense oligonukleotidok: új terápiás lehetőség. In vitro és in vivo farmakológiai vizsgálatok post partum patkány modellben *Gyógyszerészet, Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XI előadásösszefoglalók, 24, 1999*