

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet



**A β_2 -adrenerg receptorok, a foszfodiészteráz-4
és az AKAP-PKA által befolyásolt cAMP függő relaxáció
vizsgálata terhes uteruszon**

Ph.D. tézis összefoglaló

Verli Judit

Szeged
2012

Bevezető

Világszerte 13 millió koraszülött születik évente. A mindenkori tokolitikus terápia célja a korai fájástevékenység megszüntetése, ezáltal a koraszülés megakadályozása, a szülés időpontjának lehetőség szerinti késleltetése, a perinatális morbiditás és mortalitás csökkentése. Ehhez azonban ismernünk kell azokat a tényezőket, amelyek a koraszülés létrejöttében szerepet játszanak. Az esetek 25 %-ában az intrauterin infekciók szerepelnek kiváltó okként. Sajnos, a jelenleg alkalmazott farmakológiai kezelések hatékonysága megkérdőjelezhető. A relative magas mértékű anyai és magzati mellékhatások csökkentése céljából egyre nő a tudományos érdeklődés a különböző tokolitikus szerek kombinációja iránt

A miometrium sejteken lévő β_2 -adrenerg receptorok izgalma a receptorhoz kapcsolt Gs -fehérjék aktivációjához vezet, mely a továbbiakban az adenil-cikláz enzim működését stimulálja, és ezzel az ATP-ből való cAMP képződést katalizálja. A miometrium megnövekedett cAMP koncentrációja relaxációt idéz elő. A miometrium sejt cAMP koncentrációjának kialakításában azonban nemcsak az adenil-cikláz vesz részt, hanem a cAMP-t a hatástalan 5'-AMP-vé hidrolizáló foszfodiészteráz enzim is. A foszfodiészteráz enzim gátlásával felerősíthető a cAMP-mediált miometrium relaxáció.

Következtetésképpen, a β_2 -AR agonisták és a miometriumban megtalálható foszfodiészteráz-4 (PDE4) enzim szelektív gátlóinak kombinációja javíthatja a tokolitikus terápia hatékonyságát.

Célkitűzések

1. A nem-szelektív PDE gátló teofillin és a szelektív PDE4 gátló rolipram uterusz relaxáló hatásának vizsgálata izolált szervi kísérletekkel intakt, terminusban lévő 22 napos és LPS-sel indukált koraszülés esetén 20 napos vemhes patkányokon, *in vitro*.
2. A PDE4 gátló rolipram és a β_2 -AR agonista terbutalin kombinációjának uterusz relaxáló hatásának vizsgálata intakt és LPS-kezelt patkányokon, *in vitro* és *in vivo*.
3. Terbutalin és rolipram kombinációjának kontrakciókra kifejtett hatásának tesztelése normál terminusból és koraszülésből származó, humán uterusz mintákban, *in vitro*.

4. Terbutalin és az AKAP-PKA interakciót gátló FMP-API-1 kombinációjának hatásának vizsgálata intakt vemhes patkány uterusban, *in vitro*.
5. A cAMP szint meghatározása enzim immunoassay segítségével rolipram és terbutalin külön illetve együttes jelenlétében terminusban és koraszülés idején a patkány és humán uterusz mintákban, illetve terbutalin és FMP-API-1 jelenlétében patkány uterusban.
6. A humán miometriumban expresszáldó PDE4B és PDE4D fehérjék kimutatása normál terminusból és koraszülésből származó mintákban, Western blot technikával.

Anyagok és módszerek

Állatkísérletek

In vivo kezelés

Kísérleteinket egyrészt intakt, terminusban lévő 22-napos vemhes állatokon végeztük, másrészt a vemhes állatok egy csoportjában bakteriális lipopoliszachariddal (LPS, i.p. 125 µg/nap) a vemhesség 20. napjára koraszülést indukáltunk.

In vitro izolált szervi kísérletek

Kísérleteink során 20 és 22 napos vemhes patkány uterusokat használtunk. Az állatok leölése után az uterusból 5mm hosszúságú gyűrűket metszettünk. A preparátumokat karbogénnel átáramoltatott de Jongh oldatot tartalmazó, 37 °C-os szervfürdőben inkubáltuk. A kontrakciókat 25 mM KCl-dal váltottuk ki. Kísérleteinkben FMP-API-1, teofillin, rolipram és/vagy terbutalin (10^{-12} - 10^{-5} M) jelenlétében kumulatív dózis-hatás görbékét vettünk fel, kontrakció gátló hatásukat a KCl által kiváltott kontrakciókhoz viszonyítottuk és a kontrakciós görbék alatti területet értékeltük a kontroll AUC-hez viszonyítva. A görbék regisztrálását, az adatok rögzítését és feldolgozását ISOSYS DataAcquisition System segítségével végeztük. Az eredmények statisztikai elemzését a Prism 4.0 segítségével ANOVA Newman-Keuls teszttel végeztük.

In vivo kontraktilitás vizsgálatok

Az *in vivo* kísérleteinket 22 napos intakt és 20 napos LPS-kezelt vemhes patkányokon végeztük. Általános érzéstelenítésben a vizsgált farmakonok intravénás adagolására a nyaki vénába kanült vezettünk. A bal uterusz szarvra egy beültethető erőmérőt varrtunk az uterusz

felszínére. Az állatokat ezután Faraday-kalitkába helyeztük. Az elektromos jelek regisztrálása és értékelése S.P.E.L. Advanced ISOSYS Data Acquisition System program segítségével történt.

Az intravénásan adott terbutalin és rolipram uterusz kontraktilitásra kifejtett hatását detektáltuk. Öt perces intervallumokban az első két alkalommal 0.5 µg/kg terbutalint, majd tíz alkalommal 1 µg/kg terbutalint adtunk. A kombinációs kísérletekben a terbutalin adását egyetlen 500 µg/kg dózis rolipram adása előzte meg. Az AUC-eket 4 perces periódusokban kiértékeljük; a terbutalin vagy terbutalin + rolipram relaxáló hatását a spontán aktivitás százalékában fejeztük ki.

cAMP akkumuláció meghatározás

Az intact 22 napos és LPS-kezelt 20 napos vemhes patkányokból származó uterusz mintákat a fent említett módon de Jongh-oldatban inkubáltuk. A cAMP akkumulációt meghatároztuk önállóan terbutalin (10^{-7} M) vagy rolipram (10^{-6} M) jelenlétében, és kombinációjuk esetén, illetve terbutalin és FMP-API-1 együttes adásával. A minták cAMP tartalmát Enzim Immunoassay Kit (EIA) segítségével meghatároztuk, majd pmol/mg szövet egységben fejeztük ki. Az eredmények statisztikai elemzését egyutas ANOVA Newman-Keuls poszt-teszttel végeztük.

Humán szövetmintákon végzett kísérletek

Izolált szervi miometrium kontraktilitás vizsgálat

A császármetszésből származó humán miometrium minták gyűjtése a terhesség utolsó trimeszterében (32-41. gesztációs héten) történt, melyeket két csoportba osztottunk: normál terminusos (37-41. gesztációs hét) és koraszüléssel (32-36. gesztációs hét). A preparátumokat karbogénnel átáramoltatott Krebs-Henseleit oldatot tartalmazó, 37 °C-os szervfürdőbe helyeztük, inkubáltuk, majd 10^{-6} M oxitocinnal kontrakciókat váltottunk ki. Kísérleteinkben, teofillin rolipram vagy terbutalin jelenlétében nem-kumulatív dózis-hatás görbéket vettünk fel. A terbutalin uterusz relaxáló hatását 10^{-6} M rolipram jelenlétében is megvizsgáltuk. A terbutalin és rolipram hatására az AUC változásából következtettünk a kontroll AUC-hez viszonyítva. Az eredmények statisztikai összehasonlítását párosítatlan t-próbával végeztük.

cAMP szint meghatározás

A normál terminusos és koraszüléssel humán uterusz mintákat a már említett körülmények között izolált szerv rendszerben inkubáltuk. Rolipram jelenlétében (10^{-6} M; 10 min), terbutalinnal (10^{-8} ; 10^{-6} ; 10^{-4} M; 10 min) illetve forskolinnal (10^{-5} M; 10 min) stimuláltuk a cAMP akkumulációt.

Western blot vizsgálatok

A humán mintákból származó proteineket Macherey-Nagel Nucleospin Kit-tel izoláltuk. A protein koncentrációt BioSpec-nano-val állapítottuk meg. Mintaként 60 μ g fehérjét elektroforézisnek vetettünk alá 4-12% NuPAGE Bis-Tris gélen. A fehérjét nitrocellulóz membránra transzferáltuk, blokkolást követően PDE4B és PDE4D poliklonális antitesttel inkubáltuk. Az immunreaktív sávokat WesternBreeze Chromogenic Western blot immundetektáló kit segítségével láthatóvá tettük, majd Kodak 1D Images analízis szoftverrel meghatároztuk a minták optikai denzitását (O.D.). Az eredmények statisztikai elemzését egyutas ANOVA Newman-Keuls poszt-teszttel végeztük.

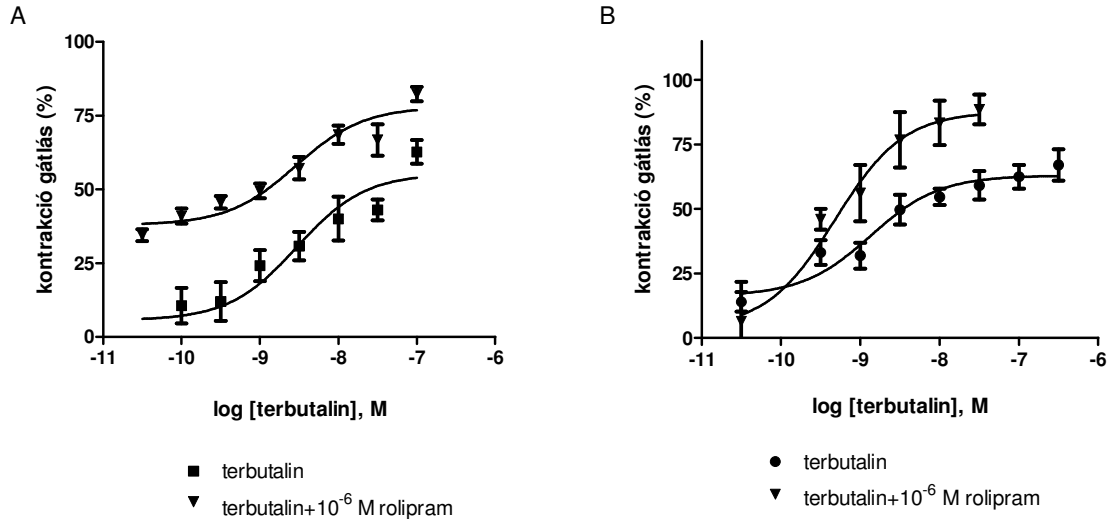
Eredmények

Állatkísérletek

In vitro miometrium kontraktilitási vizsgálatok

Bár a nem szelektív PDE inhibitor teofillin relaxáló hatása igen csekély a 22 napos vemhes patkány uteruszon, jóval hatásosabb az LPS-kezelt uteruszon. A szelektív PDE4 gátló rolipram kontrakció gátló hatása hasonló tendenciát mutat: a kontrakció gátlás mértéke a fiziológiás terhesség előrehaladtával csökken, és LPS-indukálta koraszülés idején a legerőteljesebb.

A β_2 -AR agonista terbutalin uterusz relaxáló hatását önállóan és rolipram jelenlétében egyaránt teszteltük. **(1/A. ábra)**. 10^{-6} M rolipram mellett, a terbutalin 74.02 ± 2.98 S.E.M.%-kal csökkentette a kontrakciókat ($p < 0.05$). A 20 napos LPS-kezelt állatokban **(1/B. ábra)** a terbutalin önmagában 64.25 ± 3.60 S.E.M.%-kal, míg rolipram jelenlétében 90.15 ± 5.21 S.E.M.%-kal csökkentette a kontrakciókat ($p < 0.01$).

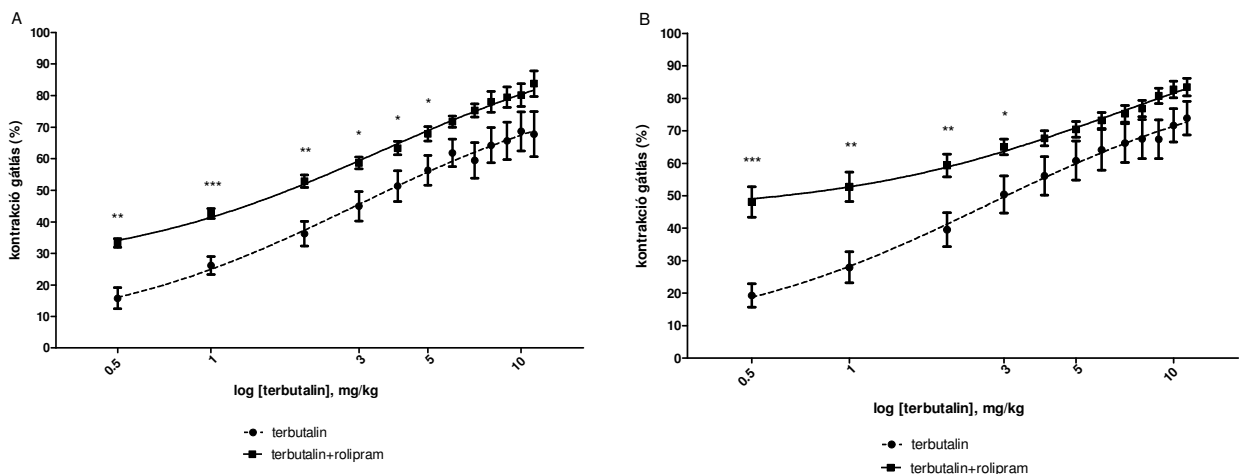


1. ábra. Rolipram hatása a terbutalin uterus relaxáló hatására 22 napos intakt (■) (A), valamint az LPS-kezelt 20 napos (▼) (B) vemhes patkányokban, *in vitro* ..n=8 mindegyik csoportban.

A terbutalin önmagában a KCl-kiváltotta kontrakciók 60.77%-os gátlását hozta létre terminusban. Az AKAP-PKA interakció-gátló FMP-API-1 jelenlétében, a maximális kontrakció gátló hatása 75.09%-ra emelkedett ($p < 0.05$).

In vivo kontraktilitási vizsgálatok

A terbutalin és rolipram kombinációjával elérhető maximális kontrakció gátlás mértékében a 22 napos vemhes (2/A. ábra) és LPS-kezelt (2/B. ábra) patkányok között nem volt eltérés.

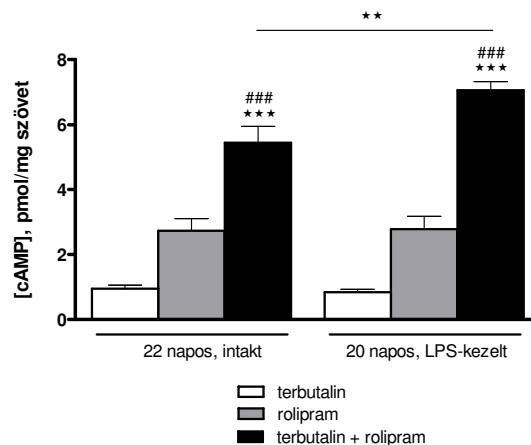


2. ábra. Terbutalin kontrakció gátló hatása rolipram jelenlétében, *in vivo*. Rolipram beadását követően (■), 0.5-11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ terbutalin kontrakció gátló hatása szignifikánsan magasabb volt 22 napos (A) és LPS-kezelt 20 napos vemhes patkányokban (B), mint csak terbutalin adása esetén (●). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Rolipram felerősítette a terbutalin uterusz relaxáló hatását, amely elsősorban a terbutalin alacsony dózisa mellett volt megfigyelhető. Rolipram jelenlétében, már a kezdő terbutalin dózis (0.5 µg/kg) szignifikánsan hatékonyabban ($p < 0.001$) csökkentette az uterusz kontrakciókat az LPS-kezelt uteruszon (**2/B.ábra**), mint a normál terminusban levő uteruszon.

A cAMP szint változása vemhes uteruszban

Meghatároztuk a cAMP akkumulációt vemhes patkány uteruszban terbutalin (10^{-7} M), rolipram (10^{-6} M), illetve kombinációjuk jelenlétében (**3 ábra**). A cAMP szintjét a két farmakon kombinációja esetén szignifikánsan magasabbnak találtuk a normál terminusban lévő és LPS-kezelt patkány uteruszban is, mint önállóan terbutalinnal ($p < 0.001$) vagy önállóan rolipprammal ($p < 0.001$) történő stimulációt követően. A kombináció magasabb cAMP szintet eredményezett az LPS-kezelt, mint az intakt patkányokban ($p < 0.01$).



3. ábra. Intracelluláris cAMP szint terbutalin vagy rolipram, és kombinációjuk esetén.

***: $p < 0.001$; ###: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$. $n = 6$ mindegyik csoportban.

Terbutalin indukálta cAMP akkumuláció szignifikánsan emelkedett ($p < 0.05$) az FMP-API-1 minden alkalmazott dózisánál.

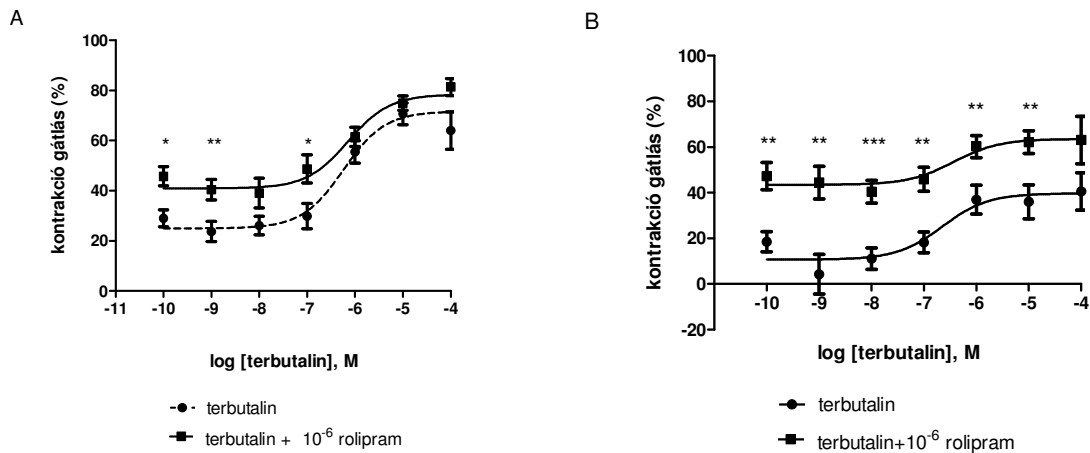
Humán miometrium vizsgálatok

In vitro kontraktilitás vizsgálat

A teofillin és a rolipram egyaránt csökkentették az oxitocin indukálta kontrakciókat a császármetészből származó humán mintákon. A rolipram kontrakció gátló hatása szignifikánsan magasabb volt, mint a teofilliné ($p < 0.001$).

10^{-6} M rolipram jelenlétében, a terbutalin hatékonyabban csökkentette az uterusz kontrakciókat, normál terminusos és koraszüléssel csoportban is. Koraszüléssel mintákban 10^{-10}

M terbutalin relaxáló hatása több mint kétszeresére nőtt 10^{-6} M rolipram jelenlétében ($p < 0.001$) (4. ábra).



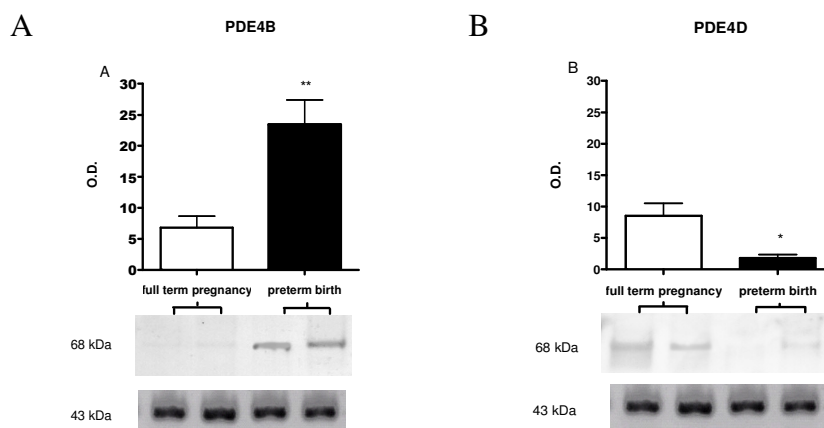
4. ábra. Terbutalin és/vagy rolipram kontrakció gátló hatása császármetszésből származó normál terminusos és koraszüléssel humán uterus mintákban. 10^{-10} – 10^{-4} M terbutalin kontrakció gátló hatása önállóan (●) vagy 10^{-6} M roliprammal kombinálva (■) normál terminusban (A) és koraszülésben (B).

Humán uterus minták cAMP szintjének mérése

A cAMP szint meghatározása 10^{-8} , 10^{-6} , 10^{-4} M terbutalin és 10^{-6} M rolipram kombinációjával történő stimulációt követően történt normál terminusos és koraszüléssel humán uterus mintákban, melynek eredményeképpen koncentráció-függő cAMP szint emelkedést tapasztaltunk mindkét csoportban. 10^{-6} M terbutalin roliprammal kombinálva szignifikánsan magasabb a cAMP szintet idézett elő a koraszüléssel mintákban, mint a normál terminusosban ($p < 0.05$). 10^{-8} M vagy 10^{-4} M terbutalin adásakor nem volt látható szignifikáns különbség.

Western blot vizsgálat

A PDE4B és PDE4D izoenzimek expresszióját Western blot analízissel határoztuk meg normál terminusos és koraszüléssel humán mintákban. A PDE4B expressziója (6/A. ábra) szignifikánsan magasabb ($p < 0.01$) volt koraszülésben, mint normál terminusban. A PDE4D optikai denzitása ugyanakkor, terminusban volt szignifikánsan magasabb, mint koraszülésben ($p < 0.05$) (5/B. ábra).



5. ábra. PDE4B (A) és PDE4D (B) expresszió normál terminusos és koraszüléssel humán mintákban. n=4 minden csoportban

Megbeszélés

A koraszülés megelőzését célzó gyógyszeres terápiák máig sem bizonyultak kellően hatékonynak. A tokolitikus terápia megkezdésekor, eltekintve a késői terhességben előforduló manifeszt fertőzésektől, a korai méhkontrakciókat kiváltó ok többnyire ismeretlen. Az anya és a magzat védelme érdekében alapvető fontosságú a mainál hatékonyabb és biztonságosabb gyógyszeres terápiák kidolgozása.

A gyulladás a koraszülések mintegy 25%-ában szerepel kiváltó okként, mely esetekben felvetődik a gyulladáscsökkentő hatással rendelkező tokolitikumok alkalmazása. A β_2 -AR agonisták és a PDE4 gátlók gyulladáscsökkentő hatásáról több tanulmány is beszámolt korábban. Immunsejtekben, ahol a PDE4 enzimek nagy számban megtalálhatóak, a cAMP emelkedett szintje pro-inflammatorikus mediátorok, citokinek és oxidatív szabadgyökök szintézisének és felszabadulásának gátlásához vezet. Az uterus aktivitását a β_2 -AR agonisták azonnal és erőteljesen befolyásolják. Kedvezőtlen mellékhatásaik ellenére (tachikardia és pulmonáris hipertenzió kockázata), a β_2 -AR agonisták a mai napig használatban vannak a tokolitikus terápiában. Több publikáció javasolta PDE4 gátlók alkalmazását tokolitikus célokra, bár a klinikai vizsgálatok eredményei ellentmondásosak. A kedvezőtlen mellékhatásként jelentkező hányinger, hányás eddig akadályozták a rolipram vagy a roflumilast monoterápiában való felhasználását. A hányás létrejöttében a PDE4D enzim gátlásának, míg az LPS előidézte gyulladásos folyamatok kialakulásában a PDE4B enzimnek tulajdonítanak szerepet.

Jelen vizsgálataink alátámasztották, hogy intakt patkányokban az alacsony dózisú terbutalin uterusz-relaxáló hatását markánsan potencírozta a PDE4 gátló rolipram, terminusban levő patkányokban és humán uterusz mintákban in vitro és in vivo. Hasonlóan fokozta a terbutalin hatását az AKAP-PKA interakciót gátló FMP-API-1 a terminusban levő patkányokban. A cAMP szint változások összhangban voltak a kontrakciós vizsgálatok eredményeivel. A Western blot vizsgálatok szemléltetik a PDE4B up-regulációját a koraszülésből származó humán mintákban, ezzel ismét bizonyítva, hogy a PDE4 enzimnek fontos szerepe lehet a koraszülést provokáló gyulladásoz folyamatokban. A PDE4D expresszió kisebb mértékű volt normál terminusban lévő és koraszülésoz mintákban is.

Eredményeink tükrében megállapíthatjuk, hogy a β_2 -AR agonisták és szelektív PDE4 gátlók / AKAP-PKA interakciót gátlók kombinációja a tokolitikus terápia hatékonyságát kedvezően befolyásolhatja. A β_2 -AR agonisták más farmakonokkal kombinációban történő alkalmazása előnyös lehet, mert ezáltal a β_2 -AR agonisták dózisa csökkenthető, ami ily módon késlelteti a receptorok deszenzitizációját és csökkenti a kedvezőtlen kardiovaszkuláris mellékhatásokat. Úgy véljük, hogy új szelektív PDE4B gátlók fejlesztése fokozhatja a tokolízis hatékonyságát.

Az értekezés alapját képező közlemények

1. Klukovits A, **Verli J**, Falkay G, Gáspár R. Improving the relaxing effect of terbutaline with phosphodiesterase inhibitors: studies on pregnant rat uteri *in vitro*. *Life Sci.* 87(23-26):733-7. 2010. **IF: 2,451**
2. Christian F, Szaszak M, Friedl S, Drewianka S, Lorenz D, Goncalves A, Furkert J, Vargas C, Schmieder P, Goetz F, Zuehlke K, Moutty M, Goettert H, Joshi M, Reif B, Haase H, Morano I, Grossmann S, Klukovits A, **Verli J**, Gaspar R, Noack C, Bergmann M, Kass R, Hampel K, Kashin D, Genieser HG, Herberg FW, Willoughby D, Cooper DM, Baillie GS, Houslay MD, von Kries JP, Zimmermann B, Rosenthal W, Klusmann E. Small molecule AKAP/PKA interaction disruptors that activate PKA interfere with compartmentalized cAMP signaling in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 286(11):9079-96. 2011. **IF: 5,328**
3. **Verli J**, Klukovits A, Kormányos Z, Hajagos-Tóth J, Ducza E, Seres AB, Falkay G, Gáspár R. Uterus relaxing effect of β_2 -agonists in combination with phosphodiesterase inhibitors: studies on pregnant rat *in vivo* and on pregnant human myometrium *in vitro*. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012. **IF: 0,869**

Egyéb közlemények

1. Ahmed AA, Marki A, Gaspar R, Vasas A, Mudawi MM, **Verli J**, Jójárt B, Hohmann J, Falkay G. $\beta(2)$ -Adrenergic activity of 6-methoxykaempferol-3-O-glucoside on rat uterus: *in vitro* and *in silico* studies. *Eur J Pharmacol.* 2011;667(1-3):348-54.
2. Klukovits A, Tekes K, Gündüz Cinar O, Benyhe S, Borsodi A, Deák BH, Hajagos-Tóth J, **Verli J**, Falkay G, Gáspár R. Nociceptin inhibits uterine contractions in term-pregnant rats by signaling through multiple pathways. *Biol Reprod.* 2010;83(1):36-41.

Az értekezéshez kapcsolódó kongresszusi absztraktok

1. Klukovits Anna, **Verli Judit**, Falkay György. Uterus relaxáció kiváltása a foszfodiészteráz-4 enzim gátlásával terhes patkányban. Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság, A Magyar Experimentális Farmakológia III. Szimpóziuma. Budapest, 2007. június 1-2.
2. Klukovits A., **Verli J.**, Falkay G. Uterus relaxation by selective inhibition of phosphodiesterase-4 in pregnant rats. 8th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Amsterdam, August 29-September 1, 2007
3. **Verli J**, Gáspár R. A kombinált β_2 -mimetikus és foszfodiészteráz 4-gátló kezelés uterus relaxáló hatásának vizsgálata terhes patkányokban. Korányi Frigyes Szakkollégium XIV. Tudományos Fórum, Budapest. 2009. március 26.
4. **Verli Judit**, Klukovits Anna, Falkay György, Kormányos Zsolt, Gáspár Róbert. A kombinált β_2 -mimetikus és foszfodiészteráz 4-gátló kezelés uterus relaxáló hatásának vizsgálata in vitro. A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXIV. Vándorgyűlése Szeged, 2010. június 16–18.
5. **Judit Verli** , Anna Klukovits, Zsolt Kormányos, Judit Hajagos-Tóth, Eszter Ducza, Attila Pál, George Falkay, Róbert Gáspár Uterus-relaxing effect of β_2 -agonists in combination with phosphodiesterase inhibitors: studies on pregnant rat in vivo and on human myometrium in vitro. Pharmaceutical Sciences for the Future of Medicines. Prague, Czech Republic. June 13-17, 2011,