

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Nifedipin miometrium kontrakciót gátló hatásának vizsgálata

Ph.D. tézis összefoglaló

Hajagos-Tóth Judit

Szeged

2011

Bevezetés

A szüléset legnagyobb kihívásai közé tartozik a koraszülés gátlása. A statisztikák szerint a fejlett országokban a koraszülések száma továbbra is számottevő.

Számos vegyület rendelkezik korai fájástevékenységet gátló, ún. tokolitikus hatással. Azonban az alkalmazott gyógyszeres terápia ellenére az epidemiológiai paraméterek nem javulnak, ezért az eddiginél hatásosabb gyógyszerek fejlesztése szükséges, ami a reprodukciós farmakológiai kutatások egyik fontos területét képezi.

A méhkontrakciók során a simaizom-sejtek az extracelluláris Ca^{2+} -ionokat használják. A Ca^{2+} -antagonisták az L-típusú Ca^{2+} -csatornán keresztül szelektíven gátolják a Ca^{2+} -ionok sejtekbe való beáramlását. Mindazok a gyógyszerek, amelyek a szabad Ca^{2+} -ion szintet csökkentik, gátolják a miometrium kontrakcióját. Ezzel a mechanizmussal a Ca^{2+} -csatorna gátlók alkalmazhatóak a koraszülés terápiájában. A Ca^{2+} -antagonisták közül a legtöbb klinikai tapasztalat a nifedipinnel áll rendelkezésre, azonban ennek hatékonysága sem teljesen kielégítő. Ugyanakkor, ha a nifedipint sikeresen tudnánk kombinálni más szerekkel, melyek erősítik a kívánt hatást és csökkentik mellékhatását, akkor annak komoly terápiai jelentősége lehet.

Célkitűzések

A szakirodalomban nem ismertek olyan kísérleti eredmények, amelyek a nifedipinnek más szerekkel való kombinációja kapcsán beszámolnának az uterus-relaxáló hatékonyságáról. Ebből kiindulva a következő kísérleti célokat határoztuk meg:

1. A miometrium kontrakciók befolyásolhatóságának vizsgálatát nifedipin jelenlétében a vemhesség különböző napjain (15, 18, 20, 22) patkány miometriumon *in vitro*
2. BK_{Ca} -csatorna (szelektív (paxillin) és nem szelektív (tetraetil-ammónium) blokkolók, progeszteron és terbutalin nifedipinre gyakorolt hatásának vizsgálatát patkány miometriumon *in vitro*.
3. Miometrium kontrakciók befolyásolhatóságának vizsgálatát nifedipin – β_2 -agonista kombináció esetén *in vitro* császármetszésből származó humán uteruson.
4. A nifedipin, nifedipin – progeszteron, ill. nifedipin – szalmeterol kombináció hatásának vizsgálatát hormonális koraszülési modellen vemhes patkányban *in vivo*.

Anyagok és módszerek

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.

In vitro kísérletek

Uterus preparálása, nifedipin hatásának vizsgálata patkány miometrium kontrakciókra

Kísérleteink során 15, 18, 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 valamint 100 mM KCl-dal váltottuk ki, majd mindegyik kísérletben nifedipin (10^{-11} - 10^{-6} M) jelenlétében nem-kumulatív dózis-hatás görbét vettünk fel. A nifedipin gátló hatását 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.

BK_{Ca}-csatorna blokkolók vizsgálata patkány miometrium kontrakciókra

Kísérleteink során 22 napos vemhes állatokat használtunk. Az uterus gyűrűket a fent leírt módon izolált szervfürdőbe helyeztük, és 10^{-6} M oxitocinnal ritmikus kontrakciókat váltottunk ki. Mindegyik kísérletben paxillin (5 μ M) vagy TEA (10^{-3} M) jelenlétében kumulatív módon nifedipin (10^{-11} – 10^{-6} M) dózis-hatás görbét vettünk fel. A nifedipin gátló hatását az oxitocin által kiváltott ritmikus kontrakciókhoz viszonyítottuk. Az eredmények statisztikai elemzését ANOVA Newman-Keuls teszttel végeztük.

Nifedipin és terbutalin hatásának vizsgálata patkány miometrium kontrakciókra

Kísérleteink során 22 napos vemhes állatokat használtunk. Az uterus gyűrűket a fent leírt módon izolált szervfürdőbe helyeztük, és 25 mM KCl-dal ritmikus összehúzódásokat váltottunk ki. Mindegyik kísérletben nifedipin (10^{-11} - 10^{-6} M) és terbutalin (10^{-7} M) vagy terbutalin (10^{-10} – 10^{-4} M) és nifedipin (10^{-7} M) jelenlétében nem-kumulatív dózis-hatás görbét vettünk fel. A nifedipin–terbutalin kombináció hatását alacsony kalcium tartalmú pufferben is megvizsgáltuk. 0,5 mM kalcium tartalmú de Jongh puffert használtunk az alacsony kalcium tartalmú környezet kiváltására. Az inkubálás után a normál kalcium tartalmú de Jongh puffert lecseréltük az alacsony kalcium tartalmú de Jongh pufferre. A kombináció hatására a görbe alatti terület (AUC) változásából következtettünk a kontroll AUC-hez viszonyítva. Az eredmények statisztikai elemzését párosítatlan t-teszttel végeztük.

In vivo kísérletek

Hormonálisan indukált koraszülési modell

A kísérletek során vemhes Sprague-Dawley patkányokat használtunk.

A koraszülést 3 mg/0,1 ml mifepriszton kezeléssel és 0,5 mg/állat prosztaglandin E₂ kombinációval indukáltuk a vemhesség 19. napján. A progeszteron-antagonista mifeprisztont olívaolajban szuszpendáltuk, és sc. adagoltuk reggel 9 órakor. Ugyanezen a napon, délután 4 órakor az állatok PGE₂ kezelést is kaptak, melyet közvetlenül a cervixre vittünk fel. A kezelés során a mifepriszton-kezelés és az első utód megszületése közötti időtartamot órákban mértük és hasonlítottuk össze a különböző kezelési csoportok esetén.

Kezelések, kísérleti elrendezés

A nifedipin oldatot vagy annak oldószerét, valamint a szalmeterol-xinafoatot vagy annak oldószerét ozmotikus minipumpába töltöttük, és izoflurán anesztézia mellett a patkányok hátbőre alá ültettük a terhesség adott (16, 18) napjain. A progeszteront sc. adagoltuk a terhesség 15. napjától kezdve a szülés napjáig.

A kezelt terhes patkányokat csoportokra osztottuk aszerint, hogy milyen tokolitikus kezelést kaptak. Csoportonként 8 állatot vizsgáltunk. Az A csoportba (kontroll) kerültek azok a koraszülés indukált állatok, amelyek nem részesültek egyéb kezelésben, a B

csoporthoz pedig azok, amelyeket csak vivőanyagokkal kezeltünk. A C csoport nifedipin tartalmú minipumpát kapott. A D csoportba került állatok esetében nifedipin és szalmeterol-xinofolat kezelést alkalmaztunk. Az E csoport nifedipin tartalmú mini pumpát, továbbá minden reggel sc. progeszteront kapott.

Az egyes kezelések hatékonyságát a kontroll csoporthoz viszonyítottuk. A statisztikai analízis során az ANOVA Newman-Keuls-tesztet használtuk.

Humán szövetminták

A császármetszés a terhesség utolsó trimeszterében, a 34-40. gesztációs héten történt. A preparátumokat karbogénnel átáramoltatott Krebs-Henseleit oldatot tartalmazó, 37 °C-os szervfürdőbe helyeztük, inkubáltuk, majd 10^{-6} M oxitocinnal kontrakciókat váltottunk ki, és mindegyik kísérletben nifedipin (10^{-11} – 10^{-5} M) és terbutalin (10^{-7} M) vagy terbutalin (10^{-11} – 10^{-5} M) és nifedipin (10^{-7} M) jelenlétében nem-kumulatív dózis-hatás görbéket vettünk fel. A nifedipin és terbutalin hatására a görbe alatti terület (AUC) változásából következtettünk a kontroll AUC-hez viszonyítva. Az eredmények statisztikai elemzését párosítatlan t-teszttel végeztük.

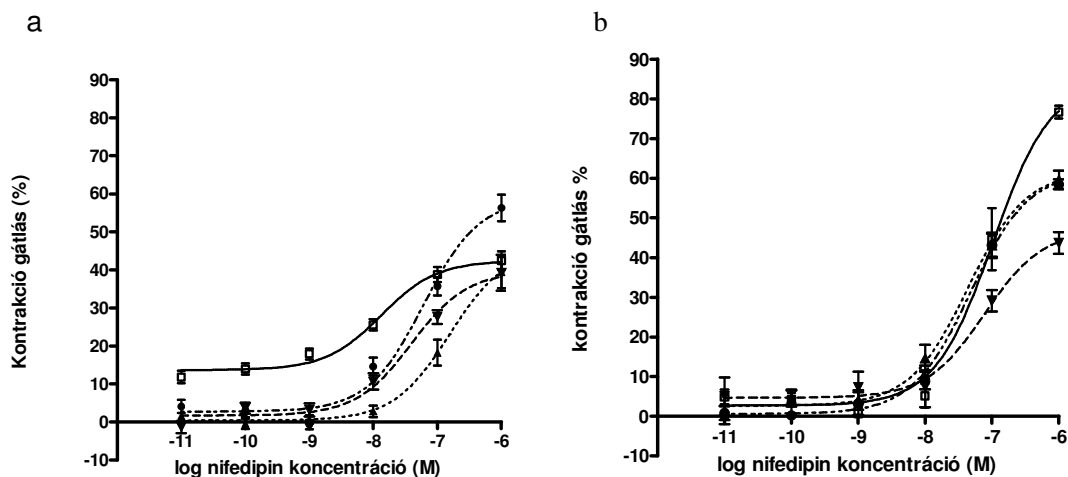
Eredmények

A patkánykísérletek eredményei

In vitro eredmények

Izolált szervben a nifedipin (10^{-11} – 10^{-6} M) dózisfüggően gátolta a 25 és 100 mM KCl-dal kiváltott méh kontrakciókat (1. ábra).

A BK_{Ca}-csatorna gátló paxillin és TEA nem befolyásolta a nifedipin maximális gátló hatását és nem módosította az EC₅₀ értékeket sem, habár a nifedipin dózis hatás görbéje paxillin jelenlétében nem szignifikánsan balra tolódott.



1. ábra: A nifedipin 100 mM (a) és (b) 25 mM KCl stimulálta patkány uterus kontrakciókra gyakorolt hatása a terhesség különböző napjain (15, 18, 20, 22) *in vitro* (●15. nap, ▲ 18. nap, ▼ 20. nap, ◆ 22. nap)

Az állandó koncentrációban adott terbutalin (10^{-7} M) a nifedipin dózis-hatás görbét balra tolta ($p < 0,05$), ugyanakkor csökkentette a nifedipin maximális gátló hatását. A felére csökkentett, 0,5 mM Ca^{2+} -tartalmú pufferben azonban a terbutalin nem befolyásolta a nifedipin maximális gátló hatását.

Az állandó koncentrációban adott nifedipin (10^{-7} M) szintén balra tolta a terbutalin dózis-hatás görbét, ugyanakkor ez a balratolódás nagyobb mértékű volt ($p < 0,01$), mint a nifedipin dózis-hatás görbéje esetében. Emellett a nifedipin fokozta a terbutalin maximális gátló hatását. Az alacsony Ca^{2+} -ion tartalmú pufferben a nifedipin csökkentette a terbutalin EC_{50} értékét, de nem befolyásolta a terbutalin maximális gátló hatását.

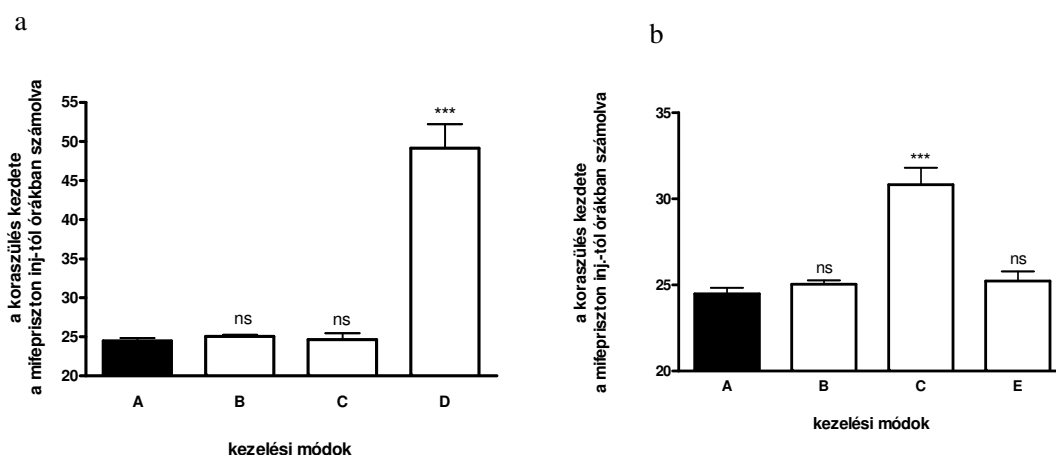
In vivo eredmények

A kontroll (A) csoportban az állatok a mifepriszton kezeléstől számítva 24 óra múlva koraszültek, a 20. vemhességi napon reggel 9 óra körül. A vivőanyagok (B csoport) önmagukban nem késleltették a hormonálisan indukált koraszülést a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A vemhesség 16. napján kezdett nifedipin (C csoport) kezelés hatékonyan, 6,6 órával késleltette a koraszülés kezdetét. A D csoportban (nifedipin – szalmeterol kombináció) a kezelés kifejezetten hatékonynak bizonyult, a kontroll (A) csoporthoz képest a kombináció 24 órával tolta el a szülés kezdetét.

A vemhesség 18. napjától adagolt nifedipin (C csoport) kezelés nem volt hatásos. Ezzel ellentétben a nifedipin – szalmeterol kombináció (D csoport) hatásos volt, a szülés kezdete 25 órával tolódott. A kombináció (C és D csoport) hatékonysága közötti különbség a 18. napon kezdett kezelés esetében volt a legmarkánsabb (2.a ábra).

A nifedipin – progeszteron (E csoport) kombináció esetében a progeszteron kezelés csökkentette a nifedipin (C csoport) hatását (2.b ábra).



2. ábra: A terhesség 18. napján kezdett nifedipin, nifedipin – szalmeterol (a) és nifedipin – progeszteron (b) kezelések eredményei patkány koraszülési modellen.

Az egyes oszlopok jelentése: átlag SEM, 8 kísérletből számítva. A statisztikai összehasonlítást a kontroll csoporthoz viszonyítva tüntettük fel. A kontroll csoportba a nem kezelt koraszült állatok kerültek.

A: kontroll csoport; B: vivóanyag-kezelt (PEG400 : etanol : fiziológias sóoldat = 6 : 6 : 4 ozmotikus pumpában + kukorica olaj sc.); C: nifedipin-kezelt; D: nifedipin – progeszteron kombináció

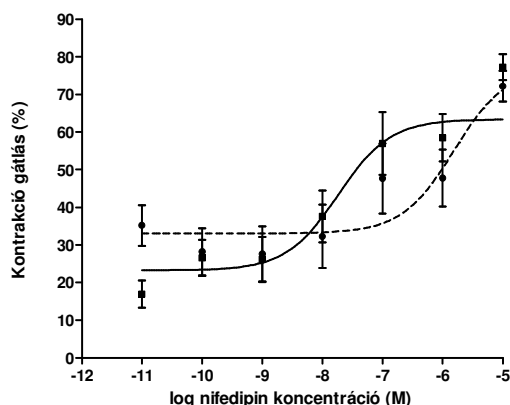
A szignifikancia jelölése: ns: nem szignifikáns; ***: $p < 0.001$.

A nifedipin és a nifedipin – progeszteron kombinációs kezelés között a különbség szignifikáns volt ($p < 0.001$).

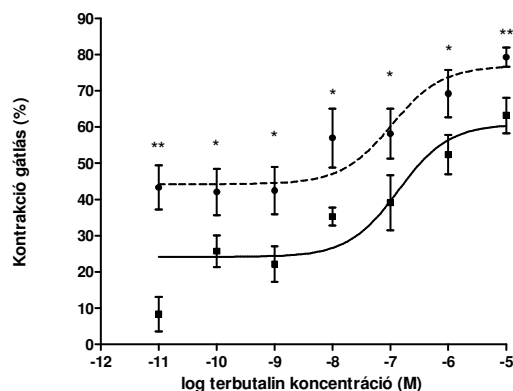
A humán miometriumon végzett kísérletek eredményei

A nifedipin (10^{-5} – 10^{-11} M) és terbutalin (10^{-5} – 10^{-11} M) koncentrációfüggően gátolta a 10^{-6} M oxitocin által kiváltott humán miometrium kontrakciókat. Az állandó koncentrációban adott terbutalin (10^{-7} M) nem befolyásolta a nifedipin maximális gátló hatását, de az EC_{50} értékét $1,8 \times 10^{-8}$ M-ról $1,5 \times 10^{-6}$ M-ra ($p < 0.05$) csökkentette. Az állandó koncentrációban adott nifedipin (10^{-7} M) fokozta a terbutalin maximális gátló hatását, az E_{max} érték 60,8%-ról 76,8 %-ra növekedett ($p < 0.01$), de nem befolyásolta a terbutalin EC_{50} -értékét (3.a,b ábra).

a



b



3. ábra: A nifedipin–terbutalin kombináció hatása az oxitocinnal kiváltott humán miometrium kontrakciókra *in vitro* (a) ■ nifedipin (10^{-11} - 10^{-5} M); ● terbutalin (10^{-7} M) + nifedipin (10^{-11} - 10^{-5} M)
(b) ■ terbutalin (10^{-11} - 10^{-5} M); ● nifedipin (10^{-7} M) + terbutalin (10^{-11} - 10^{-5} M)

Az eredmények értékelése, következtetések

A terhesség során végbemenő folyamatok eredményeként az uterus struktúrája drámai változáson megy keresztül. A terhesség végén a fájástevékenység beindulásáig a miometrium kontraktilitása enyhén fokozódik, majd szüléskor ugrásszerűen megnő. Patkányban a vemhesség 22 napos, így terminusban, vagyis a vemhesség utolsó napján végeztük a kísérleteket. A humán terhes méhkontrakciókhoz hasonlóan ritmikus összehúzódásokat váltottunk ki. Így kísérleti összeállításunkban *in vitro* körülmények között modelleztük a szülés során fellépő kontrakciókat.

A BK_{Ca} -csatorna gátló paxillin és nem-szelektív blokkoló TEA hatásának vizsgálatára az uterus kontrakciókat oxitocinnal váltottuk ki, ugyanis ebben az esetben a KCl nem alkalmas a kontrakciók kiváltására. Az eredmények azt mutatják, hogy a BK_{Ca} -csatorna, sem más K^{+} -csatornák nem befolyásolják a nifedipin uterus kontrakciókra gyakorolt hatását.

Kísérletes munkánk további célja az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon az izolált szervben lejárott folyamatok élő szervezetben is működnek-e. *In vivo* progeszteron előkezelés és szalmeterol hozzáadásával vizsgáltuk a nifedipin hatását hormonálisan indukált patkány koraszülési modellen. Kísérleteinkben 19 napos terhes Sprague-Dawley patkányokat használtunk, mely körülbelül a humán terhesség 34-35. hetének felelnek meg. Mivel a

patkányoknál nincs koraszülés, a vizsgálandó kórfolyamatot mifepriszton és prosztaglandin E₂ kombinációjával indukáltuk. A mifepriszton-PGE₂ kombinációs kezelés hatására minden kísérleti állat a progeszteron-antagonista beadásától számítva 24 óra múlva koraszült.

Korábban intézetünkben már kimutatták, hogy a progeszteron kezelés önmagában nem késleltette a hormonálisan indukált koraszülést, szemben a szalmeterol és a szalmeterol – progeszteron kombinációs kezeléssel. A mostani kísérletsorozatban önmagában a nifedipinnel is sikerült még jobb hatást elérni a 16. vemhességi napon kezdett tokolitikus kezeléssel, mint korábban a szalmeterol és a szalmeterol – progeszteron kombinációval, melyet a szalmeterol még tovább fokozott.

A nifedipin és nifedipin – szalmeterol kombináció gyors hatásait is megvizsgáltuk. A 18. vemhességi napon kezdett nifedipin kezelés önmagában nem volt hatásos, de a nifedipin – szalmeterol kombináció ugyanolyan hatásosnak bizonyult, mint a 16. vemhességi napon kezdett kezelésnek. A nifedipin hatását a β_2 -agonista adása megháromszorozta.

Kísérleteink során a progeszteron előkezelés csökkentette a nifedipin uterus relaxáló hatását *in vitro*. A nifedipin *in vivo* hatását az állatok egy hétig tartó progeszteron előkezelése is rontotta. Feltételeztük, hogy a progeszteron hatására bekövetkező hatáscsökkenés lehetséges oka az lehet, hogy progeszteron jelenlétében az L-típusú Ca²⁺-csatornák aktivitása csökken.

A β_2 -receptor agonisták együttes adása Ca²⁺-antagonistákkal kifejezett szinergizmust mutatott izolált terhes patkány miometriumon, habár a potenciáló hatás mértéke a két hatóanyag adagolásának sorrendjétől függött. A kis dózisban adott terbutalin a nifedipin dózis-hatás görbáját balra tolta, ugyanakkor csökkentette a nifedipin maximális gátló hatását. Az állandó koncentrációban adott nifedipin szintén balra tolta a terbutalin dózis-hatás görbáját, ugyanakkor ez a balratolódás nagyobb mértékű volt, mint a nifedipin dózis-hatás görbéje esetében. Emellett a nifedipin fokozta a terbutalin maximális gátló hatását. Az eltérő mértékű szinergizmust magyarázhatja az az ismert tény, hogy a β_2 -adrenerg receptorok izgatása aktiválja a G-proteineket, mely az intracelluláris cAMP szint emelkedéséhez vezet. A cAMP aktiválja a protein kináz A-t, ezáltal nyitja az L-típusú Ca²⁺-csatornákat. A kalcium ionok belépése a sejtbe a feszültségfüggő Ca²⁺-csatornán keresztül kontrakcióhoz vezet. Ez a mechanizmus a szívizomban jól ismert, és valószínűleg hasonlóan zajlik a terhes miometriumban is. A terbutalin aktiválhatja az L-típusú Ca²⁺-csatornákat, mely a nifedipin maximális hatásának csökkenéséhez vezethet.

Azonban ha a kis dózisú nifedipin adása megelőzi a terbutalint, a terbutalin már kisebb valószínűséggel aktiválja a csatornát a nifedipin okozta gátlás miatt.

A nifedipin – terbutalin kombináció hatását humán miometriumból nyert szöveten is megvizsgáltuk. Az állatkísérletekhez hasonlóan mind a nifedipin, mind a terbutalin dóziszfüggően gátolta az oxitocinnal kiváltott miometrium kontrakciókat. Az állandó koncentrációban adott terbutalin rontotta a nifedipin EC_{50} -értékét (a nifedipin dózis-hatás görbe jobbra tolódott), habár a nifedipin maximális gátló hatását nem befolyásolta. Ellenkező esetben, amikor a nifedipin adása megelőzte a terbutalin adását, fokozta a terbutalin maximális gátló hatását, de az EC_{50} értékekben nem volt változás. Mindezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy a patkány miometriumban lezajló változások hasonlóan mennek végbe a humán miometriumban is.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy sem a BK_{Ca} -csatorna, sem más K^+ -csatornák nem játszik meghatározó szerepet a nifedipin uterus kontrakciókra gyakorolt hatásában. A nifedipin uterus kontrakciót gátló hatása progeszteron előkezelést követően csökkent, ugyanakkor β_2 -mimetikum adása a hatást fokozta. A nifedipin és a β_2 -agonisták kombinációja terápiás jelentőségű lehet, a terbutalin adása azonban nem előzheti meg a nifedipint, mert aktiválja a Ca^{2+} -csatornákat. A kombináció humán kipróbálását elősegítheti az a tény, hogy mind a nifedipin, mind a terbutalin farmakodinámiás, farmakokinetikai és toxikológiai paraméterei ismertek, tehát kombinációjuk terápiás kockázata elméletileg igen alacsony.

Függelék

Az értekezés alapját képező közlemények:

1. **Hajagos-Tóth J**, Falkay G, Gáspár R. Modification of the effect of nifedipine in the pregnant rat myometrium: The influence of progesterone and terbutaline. Life Sci 2009; 85:568–572. **IF: 2.56**
2. **Hajagos-Tóth J**, Kormányos Zs, Falkay G, Pál A, Gáspár R. Potentiation of the uterus-relaxing effects of beta-adrenergic agonists with nifedipine: studies on rats and the human myometrium. Acta Obstetricia et Gynecologica Scan 2010; 89:1284-1289 **IF: 1.618**
3. **Hajagos-Tóth J**, Kormányos Zs, Falkay G, Pál A, Gáspár R. Nifedipin myometrium relaxáló hatásának vizsgálata terbutaline és K⁺-csatorna gátlók jelenlétében in vitro. Acta Pharm Hung 2010;3: 109-114

Egyéb közlemények:

1. 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 **IF: 3,300**

Egyéb kivonatok:

1. **Hajagos-Tóth J**, Gáspár R, Falkay G. Investigation of uterine-relaxing effect of nifedipine on late-pregnant rat myometrium *in vitro*. The First Conference of PhD Students in Medicine and Pharmacy, July 9-11, 2008, Targu Mures, Romania
2. **Hajagos-Tóth J**, Falkay G, Gáspár R. Nifedipin uterusz kontrakciót gátló hatásának vizsgálata *in vitro*. A Magyar Tudomány Ünnepe; Szeged, 2008. November 28.

3. **Hajagos-Tóth J**, Falkay G, Gáspár R. Investigation of uterus-relaxing effect of nifedipine on late pregnant myometrium *in vitro*. 2nd Meeting of the Egon & Ann *Diczfalussy* Foundation; Szeged, 2008.09.30-10.01.
4. **Hajagos-Tóth J**, Falkay Gy, Gáspár R. Nifedipin uterusz kontrakciót gátló hatásának módosítása ptogeszteronnal és terbutalinnal *in vitro*. XIV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus; Budapest, 2009. november 13-15.
5. **Hajagos-Tóth J**, Kormányos Zs, Falkay Gy, Gáspár R. A nifedipin tocolyticus hatásának módosítása béta-mimetikumokkal. A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXIV. Vándorgyűlése és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság (MFT) II. Közös tudományos konferenciája; Szeged, 2010. június 16-18.
6. **Hajagos-Tóth J**, Kormányos Zs, Falkay G, Gáspár R. Potentiation of uterus-relaxing effects of nifedipine with β -adrenergic agonists: Studies on rats and human myometrium. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology , 17-23 July, 2010, Copenhagen, Denmark