

Pravastatin hatása preeclampsziás placenták NO szintáz aktivitására

Doktori tézisek

dr. Pánczél Zita

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Valent Sándor, Ph.D., egyetemi docens
Hivatalos bírálók: Dr. Surányi Andrea, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Szabó István Ph.D., egyetemi docens
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nyirády Péter, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Majoros Attila, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Kozma Bence, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2020

Bevezetés

A preeclampsia egy gyakori és súlyos terhességi kórkép, a terhességek 4,5– 11,2%-ában alakul ki. Jelentőségét jól mutatja, hogy világszerte, éves szinten több, mint félmillió magzat- illetve újszülött-, valamint több, mint 70000 anyai halálozásért felelős.

Az utóbbi évtizedek intenzív kutatásai ellenére a preeclampsia pontos etiológiája továbbra is tisztázatlan, ahogy oki kezelése és hatékony megelőzése sem kielégítően megoldott. Ismert, hogy az elégtelen NO termelés hozzájárulhat a preeclampsia kialakulásához.

A placenta elsősorban endothelialis nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) izoenzimet expresszál. A nitrogén-monoxid szabadon diffundál a sejtek között, az endotélből átjut az érfal simaizomsejtekben gazdag médiájába. A NO hatékony vérnyomáscsökkentő, a placenta ereinek vasodilatációját okozza, parakrin úton átjut a myometriumba is, és hozzájárul a méhizomzat relaxációjának fenntartásához a terhesség alatt. Szerepet játszik a trofoblasztok endovaszkuláris inváziójában, amely az élettani placentáció elengedhetetlen része.

A csökkent hatékony NO szint kialakulásának több oka lehet. Hozzájárul a preeclampsias nők oxidatív stressze. Az eNOS aktivitását gyorsan több módon is lehet módosítani. Egyrészt a plazmamembránhoz, ezen belül a caveolákhoz kötött eNOS szubsztrátellátottságát arginin transzporterekkel lehet biztosítani. Az enzim aktivitását fokozza az intracelluláris Ca^{2+} és BH4 koncentráció emelkedése és csökkenti az enzim endogén kompetitív inhibitora, az aszimmetrikus dimetil-

arginin (ADMA). Az eNOS-t aktiváló Ser1177 aktiváló foszforiláció és Thr495 defoszforiláció a két legjelentősebb foszforilációhoz köthető szabályozási mód. Az eNOS aktivitását fehérje-fehérje kapcsolatok is módosítják. A Hsp90 kötődése aktiválja, a caveolin gátolja az eNOS-t. Az intracelluláris Ca^{2+} szint emelkedése a caveolin disszociációját okozza, ezzel aktiválja az eNOS-t.

A NOS működése BH4-t igényel. A placenta BH4 koncentrációja a féltelítési tartományban (0,11 μM) található, így a BH4 szintje jelentősen módosíthatja az enzimaktivitást. Preeclampsziás placenták eNOS aktivitását mérve igazolódott néhány esetben, hogy preeclampsziás placenták eNOS aktivitása nem emelkedik fiziológiás BH4 szintnél, a maximális aktivitás eléréséhez nagyon magas BH4 koncentráció szükséges. (BH4 rezisztensek)

A NOS aktivitás növelésével a NO szint emelkedik, így a preeclampsia kezelésének egyik lehetséges módja a NOS aktivitásának, a NO szintjének növelése. A pravastatin hatékony lehet a NO szint normalizálásában is.

A statinok (3-hidroxi-3-metil-glutaril-KoA reduktáz inhibitorok) a leggyakrabban használt koleszterinszint-csökkentő gyógyszerek. Gazdasági jelentőségüket mutatja, hogy a világ legnagyobb forgalmú gyógyszerei közé tartoznak. Elsődleges hatásukon kívül pleiotróp hatásokkal is rendelkeznek. A pleiotróp hatásaik közé proangiogén, antiinflammatorikus, antioxidáns, neuroprotektív és antitrombotikus tulajdonságok is tartoznak, beleértve az endotélium védelmét is. A statinok fokozzák az eNOS expresszióját az eNOSmRNS féléletidejének meghosszabbításával, csökkentik a caveolin-1 fehérje expresszióját, és így annak az eNOS-t gátló hatását.

Aktiválhatják a foszfatidil-inozitol-3-foszfát (PI3K)/Akt útvonalat és elősegítik az eNOS működését Ser1177 foszforilációval és Thr495 defoszforilációval.

A statinok közül preeclampsia kezelésére leggyakrabban a pravastatint alkalmazzák, mert előnyös hatásai mellett a megfigyelt káros mellékhatások száma ennél a statinnál volt a legkedvezőbb.

Célkitűzések

1. A pravastatin gyors hatásmechanizmusának vizsgálata egészséges és preeclampsias placénták NOS aktivitására.
2. Új metodikai módszer kidolgozása preeclampsias placénták NOS-ának tetrahydrobiopterin érzékenységének megállapításához.
3. Annak vizsgálata, hogy a pravastatin alkalmas lehet-e tetrahydrobiopterin rezisztens preeclampsias placénták NOS aktivitását fiziológias mértékűre emelni.

Módszerek

A pravastatin és eNOS kapcsolatának vizsgálatánál azt a stratégiát követtük, hogy megvizsgáltuk, hogy pravastatinnal módosítható-e az eNOS-caveolin, eNOS- Hsp90 kapcsolata, változik-e a mikroszóma arginin felvétele, illetve változik-e az eNOS Ser1177 foszforilációja? Az eNOS Ser1177 és Thr495 foszforilációs állapota reciprok módon változik, így elegendő egyikük, jelen esetben a Ser1177 foszforilációs állapotának vizsgálata. A caveolin és Hsp90 pravastatinnal történő

feltételezett kapcsolatát gátlószerek (caveolin-Ca és Hsp90-geldanamycin) jelenlétében vizsgáltuk.

A preeclampsias placentak NOS aktivitásának esetleges BH4 inszenzitivitása 2000 óta ismert. A Kukor és mtsai által placenta homogenizátummal végzett vizsgálatban kb. 70 %-os volt a preeclampsias minták BH4 inszenzitivitása. A preeclampsias placentak fokozott oxidatív stressze a redukálószer által biztosított védelem ellenére hatástalaníthatja a mérés során alkalmazott fiziológias koncentrációjú BH4-t, ezzel az enzimaktivitás csökkenését okozva. Emiatt a valós BH4 inszenzitivitás megállapításához a használt metodikai módszert módosítani kellett.

Résztevők kiválasztása és klinikai adatainak felvétele

A vizsgálatba olyan egészséges és preeclampsias terhes nőket vontunk be, akiknek gondozása a Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának 2. telephelyén (korábban: Semmelweis Egyetem II. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján, Budapest, Üllői út 78/A) zajlott. A vizsgálatához az etikai engedélyt az ETT TUKEB adta meg (engedély száma:48995–2016/EKU). A klinikai adatokat a résztvevő páciensek kórlapjaiból, a MedSol rendszerből gyűjtöttük.

Placenta mikroszóma preparálás

Közvetlenül szülés után jég között a placentából a szülőszobán ollóval különböző helyekről legalább 30 gramm mintát vettünk és haladéktalanul átszállítottuk a biokémiai laboratóriumba. Mivel a humán placenta mikroszóma frakciójának van a legmagasabb specifikus NOS aktivitása, késlekedés nélkül mikroszómát preparáltunk belőle. A

kísérletekhez ezt a mikroszóma frakciót használtuk. A mikroszóma frakcióból fehérje meghatározásra mintákat különítettünk el, majd azonnal meghatároztuk a NOS aktivitását, a maradék mintákat több részre -80 °C-on tároltuk a NOS BH4 szenzitivitás megállapításához és Western blot analízishez való felhasználásig. Az arginin felvétel vizsgálatához a mintákat folyékony nitrogénben tároltuk.

Fehérje meghatározása

A mikroszóma fehérjetartalmát Lowry módszerével határoztuk meg. A kalibrációs görbét marha szérum albuminnal készítettünk (0,005-0,2 mg/ml tartományban).

NO-szintáz aktivitás mérése

A NO-szintáz aktivitását maximális enzimaktivitást biztosító körülmények között határoztuk meg különböző BH4 koncentrációknál, 37 °C-on, 10 percig inkubálva. A NOS aktivitását placenta mikroszómában mértük C14 arginin szubsztráttal egészséges (n=6-9) és preeclampsias (n=6-9) minták felhasználásával. Az aktivitást jég hideg NAME-oldattal állítottuk le. A C14 arginint az enzimreakció végtermék C14 citrullintól Dowex 50-W kationcserélő Na⁺ ciklusú gyantán választottuk el. 3*1 ml eluátum radioaktivitását mértük meg, miután 5-5 ml szcintillációs folyadékkal összekevertük. Háttérként 1 mM NAME tartalmú mintát használtunk.

A mikroszóma preparálásakor a vízdékony, kis molekulatömegű anyagok nagy része a citoszól frakcióban marad, így a BH4 is. A BH4 érzékeny oxidációra, dihidrobiopterinné alakul (BH2), mely már nem kötődik az enzimhez, aktivitását nem emeli. Az aktivitás meghatározását

az oxidáció okozta artefaktum elkerülése végett mindig BH4 érzékeny, egészséges szülésből származó standard mikroszóma minta használata mellett végeztük. Az enzimaktivitást az alapaktivitást biztosító 20 nM, fiziológias 200 nM és farmakológias 50 μ M BH4 mellett mértük. A BH4-oxidáció minimalizálása érdekében azt közvetlenül a reakció elindítása előtt mértük a reakcióelegybe. A pravastatin hatását 10 μ M koncentrációnál vizsgáltuk.

Az eNOS Ser1177 foszforilációjának vizsgálata

Az eNOS Ser 1177 foszforilációjának vizsgálata Western blot módszerrel történt. A teljes eNOS és Ser1177-en foszforilált eNOS western blot analízisét ugyanazon a membránon végeztük el.

Placenta mikroszóma arginin felvételének meghatározása

A placenta mikroszóma arginin felvételét rapid filtrációs metodikával végeztük. A módszert arginin felvételre optimalizáltuk. A mikroszóma minták arginin felvételét 1 percig mértük, C14 arginin használatával. A mérést elvégeztük alamethicin (50 μ g/mg protein) jelenlétében is, hogy az intravezikulárisan membránhoz kötött radioaktivitást meghatározhassuk. A mikroszóma arginin felvételét az alamethicin nélküli és az alamethicines minták radioaktivitásának különbségéből számoltuk.

Statisztikai analízis

Az eredmények statisztikai analízise Excel Data analízis szoftverrel történt. Szignifikancia vizsgálatot t-tesztel végeztünk. Statisztikailag szignifikánsnak abban az esetben fogadtuk el a különbséget, ha $p < 0,05$. Az adatokat

közéérték \pm SD formában adtuk meg, kísérletenként általában 3-6 különböző mintát használtunk.

Eredmények

A pravastatin eNOS aktivitásra kifejtett hatásának vizsgálata

A vizsgálathoz 6 preeclamsiás és 6 egészséges placentát gyűjtöttünk a Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján (Budapest, Üllői út, 78/A részleg). Kísérleteinkhez a 6 egészséges mintát kontrollként és a 6 preeclamsiás placentából preparált mikroszómát használtuk fel. A két csoport között szignifikáns különbség a vérnyomás, fehérvérsejt, gesztációs kor a szüléskor illetve a születési súly tekintetében mutatkozott. Az anyák kora nem tért el szignifikánsan a kontroll és a beteg csoportban.

A placenta mikroszóma NOS aktivitásának vizsgálata

A placenta NOS aktivitásának nagy része (kb. 85 %) Ca-dependens eNOS. A preeclamsiára jellemző gyulladásos állapot miatt felmerült, hogy preeclamsiában indukálódik az iNOS. Pár éve kimutatták, hogy az iNOS indukciója mellett jelentősen emelkedik az eNOS mRNA szintje is emiatt preeclamsiás állapotban is az eNOS határozza meg a placenta NO szintézisét.

Az eNOS aktivitását 50 μ M BH4 2,0-2,5- szeresére növelte a kontroll és a preeclamsiás mintákban is a 20 nM BH4 mellett mért alapaktivitáshoz képest.

A maximális eNOS aktivitást 10 μ M pravastatin tovább növelte az egészséges esetben 28% -kal, a preeclamsiás mintákban 32%-kal. A pravastatin hatása az egészséges és

preeclampsziás mintákban hasonlóan bizonyult, pravastatinnal a placenta mikroszóma aktivitását kb. 30 %-kal lehet növelni. Megfigyelhető, hogy 50 μM BH4 jelenlétében a pravastatin hatás kifejezettebb, mint 20 nM BH4 mellett. Ez a hatás a kontroll és a beteg csoportban is jelentkezett, de egyiknél sem volt szignifikáns. Ennek a minimális hatásnak a magyarázata lehet a BH4 oxidációja. A pravastatin hatása koncentrációfüggő, a maximális pravastatin hatás 10 μM koncentráció mellett mérhető 1 mM Ca^{2+} és 50 μM BH4 mellett. 100 és 500 μM pravastatinnak már gátló hatása van. Az eNOS-t gátló caveolin 1 mM Ca^{2+} mellett disszociál az eNOS-ról, ezért a pravastatin hatását a caveolintól függetlennek tetelezhetjük fel.

Pravastatin hatás és Hsp90

Az eNOS aktivitását a Hsp90 hőszokk fehérje növeli. A pravastatin Hsp90-tól független hatását gátlószere, a geldanamycin jelenlétében vizsgáltuk. Az eNOS aktivitása 10 μM pravastatin hatására 100nM geldanamycin jelenlétében is nő. Ha a geldanamycin jelenlétében mért eNOS aktivitás a viszonyítási alap (100 %), akkor az egészséges placenta mikroszóma átlagos eNOS aktivitását 10 μM pravastatin 30 %-kal emelte 1 mM Ca^{2+} , 20 nM BH4 (alapaktivitás); 25 %-kal 1 mM Ca^{2+} , 50 μM BH4 mellett ($p < 0,05$). Preeclampsziás mintákat vizsgálva hasonló pravastatin hatást tapasztalunk. A NOS alapaktivitását 37 %-kal; a BH4-stimulált aktivitást 28 %-kal emelte.

Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a pravastatin hatás a Hsp90 hatásától független lehet.

A pravastatin hatása az eNOS Ser1177 foszforilációjára

A mintákat az eNOS aktivitás mérésénél használt azonos körülmények között inkubáltuk C14 arginin használata nélkül. A minták eNOS Ser1177 foszforiláltságát Western blot analízissel vizsgáltuk. Mérésünk szerint a mérési körülmények között 10 perces inkubálás alatt 10 μ M pravastatin nem változtatta meg az eNOS Ser1177 foszforiláltsági állapotát.

A pravastatin hatása a placenta mikroszóma arginin felvételére

Az eNOS a sejtmembránban kapcsolatban van pozitív töltésű aminosav transzporterekkel (y^+ , y^+L , B^{0+}) is. Így az eNOS arginin ellátottsága az extracelluláris térből, a vérből is biztosított. Preeclampsias esetekben megfigyelték a vérérum arginin szintjének csökkenését, ami hozzájárulhat a vérnyomás emelkedéséhez. Az eNOS elégtelen arginin ellátottságát súlyosbíthatja a preeclampsiasban megfigyelt emelkedett ADMA szint is. Az ADMA ugyanis nem csak a NOS kompetív inhibitora, hanem az aminosav transzporter kötőhelyéért az argininnel kompetál, gátolva az arginin felvételét is. A placenta mikroszóma arginin felvétele az első percben az idővel lineárisan változik. Az arginin felvételt 10 μ M pravastatin egészséges (38 ± 9 %, $p < 0,05$) és preeclampsias (34 ± 11 %, $p < 0,05$) placenta mikroszómákban is növelte. A hatás azonosnak bizonyult az egészséges és preeclampsias mintákban is.

Preeclampsias placenták BH4 rezisztenciájának vizsgálata

A placenták BH4 rezisztenciájának meghatározásához 9 egészséges és 9 preeclampsias terhességből származó placenta eNOS aktivitását vizsgáltuk. A kontroll és preeclampsias

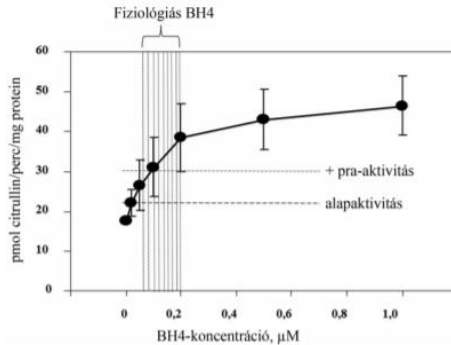
csoport között szignifikáns különbség a vérnyomás, fehérjevizelés, a terhességi kor szüléskor és a születési súly tekintetében mutatkozott. Az anyák kora nem tért el szignifikánsan a két csoportban, ahogy a terhesség alatti átlagos súlygyarapodás sem.

A BH4 rezisztencia vizsgálata a korábban ismertetett eNOS aktivitás mérési módszerrel történt. A 9 preeclampsziás minta NOS aktivitásából egy volt BH4 rezisztens. A BH4 rezisztens páciens klinikai képe nem tért el a vizsgált preeclampsziás esetektől. Ennek a mintának fiziológias, 0,20 μM BH4 koncentráció nem növelte szignifikánsan a NOS aktivitását, míg az egészséges placenta mikroszómák aktivitását átlagosan 60 %-kal ($p < 0,01$), a BH4 szenzitív preeclampsziás minták NOS aktivitását 67 %-kal ($p < 0,01$) növelte a 0,02 μM BH4 mellett mért alapaktivitáshoz képest.

50 μM BH4 mindhárom csoport (egészséges, BH4 szenzitív és BH4 inszenzitív preeclampsziás) NOS aktivitását több, mint kétszeresre növelte.

10 μM pravastatin 32-38 %-kal növelte a NOS aktivitását mind az egészséges, mind a BH4 szenzitív és BH4 inszenzitív mintákban. A hatás hasonló volt mindhárom BH4 koncentráció mellett.

A vizsgált esetben a BH4 inszenzitív placentának van NOS alapaktivitása, az enzim tehát képes megkötni a BH4-t. Az alapaktivitás nem emelhető fiziológias koncentrációjú (60-180 nM) BH4-nel, az egészséges placentákban mért K_M értéknél (100 nM) jóval magasabb, 50 μM BH4 viszont megemeli. Ez arra utal, hogy az enzim BH4 affinitása csökkent ebben az esetben. A pravastatin viszonylag enyhe (34 %-os) NOS aktivitást növelő hatása elegendő ahhoz, hogy az enzim aktivitását fiziológias tartományba emelje.



Egészséges placenta mikroszóma NOS aktivitásának BH4 koncentráció függése és a pravastatin hatása a NOS aktivitására

A vonalkázással jelölt rész az egészséges primordiális és érett placenták átlagos BH4 koncentrációját jelzi. $n=9 \pm \text{SD}$

Következtetések

A kutatások alapján a pravastatin kezelés preeclampsia tekintetében nagy kockázatú várandósokban eredményes lehet.

1. A vizsgálat célja volt annak megállapítása, hogy a pravastatin milyen mechanizmussal tudja humán placenták NOS aktivitását gyorsan emelni. Ennek eredményeként a pravastatin eddig nem ismert tulajdonságát sikerült leírni, miszerint a pravastatin növelheti a placenta arginin felvételét.
2. Kidolgozásra került egy új metodikai módszer preeclampsias placenták NOS-ának tetrahydrobiopterin érzékenységének megállapításához.
3. A vizsgált tetrahydrobiopterin rezisztens esetben megállapítást nyert, hogy a pravastatin alkalmas lehet a placenta NOS aktivitását fiziológiás mértékűre emelni.

Ahhoz, hogy a pravastatint preeclampszában terápiás céllal használni lehessen, még számos vizsgálatot kell elvégezni, beleértve a hatásmechanizmust, a terápia előnyeinek és hátrányainak nagy betegszámon történő felmérését, a kezelés indikációját. A fenti eredmények alapkutató szintűek, de megalapozhatják a későbbiekben a pravastatin terápiába bevonható személyek kiválasztását (BH4 rezisztens preeclampsziások), illetve a terápia pontosítását (pravastatin kezelés + arginin szupplementáció).

Saját publikációk jegyzéke

A dolgozat témájában megjelent közlemények

1. Alasztics B, Kukor Z, **Pánczél Z**, Valent S. A praeclampsia kórélettana a kétlépcsős modell tükrében [The pathophysiology of preeclampsia in view of the two-stage model]. Orv Hetil. 2012; 153(30): 1167-1176
2. **Pánczél Z**, Kukor Z, Supák D, Kovács B, Kecskeméti A, Czizel R, Djurecz M, Alasztics B, Csomó KB, Hrabák A, and Valent S. Pravastatin induces NO synthesis by enhancing microsomal arginine uptake in healthy and preeclamptic placentas. BMC Pregnancy Childbirth. 2019; 19(1): 426 IF: 2,239
3. **Pánczél Z**, Supák D, Kovács B, Kukor Z, Valent S. Pravasztatin hatása tetrahidrobiopterin érzékeny és -rezisztens praeclampsziás placénták NO szintáz aktivitására [Effect of pravastatin on tetrahydrobiopterin sensitive and resistant NO synthase activity of preeclamptic placentas]. Orv Hetil. 2020; 161(10): 395–401. IF: 0,564

Egyéb közlemények

- 1. Pánczél Z, Sára L, Tóth P, Hubay M, Keller E, Langmár Z, Pajor A.** Spontán aortaruptura várandósság alatt [Spontaneous aortic rupture during pregnancy]. *Orv Hetil.* 2011; 152(23): 929-933