

# P2-purinerge receptorer: regulation af knogleomsætningen og terapeutisk potentiale?

Stud.med. Marie Solgaard & læge Niklas Rye Jørgensen

H:S Hvidovre Hospital, Forskningsenheden for osteoporose og metaboliske knoglesygdomme, Klinisk Biokemisk Afdeling og Endokrinologisk Afdeling

## Resumé

Osteoporose er en invaliderende sygdom, og trods de seneste års fremskridt inden for behandling af sygdommen, er der stadig et stort behov for nye behandlingsmuligheder. Et potentielt mål for udvikling af stoffer, som kan regulere knoglemetabolismen, er de såkaldte purinerge receptorer. Disse er receptorer, som reagerer på binding af nukleotider, og der er gennem de senere år publiceret flere og flere studier, som beskriver deres rolle i regulationen af knogleomsætningen. De betegnes P2-receptorer, og der eksisterer to typer: P2Y og P2X, som yderligere kan underopdeles afhængigt af ligandspecificitet. Deres ekspresion er beskrevet i såvel osteoblaster som osteoklaster, og agonistbinding til receptorerne influerer både på proliferation, differentiering, aktivitet og apoptose af knoglecellerne. Med et større kendskab til disse receptors funktion i knoglebiologien, vil de formentlig i fremtiden være et oplagt mål for udvikling af stoffer, som kan anvendes i behandlingen af metaboliske knoglesygdomme, herunder osteoporose.

Der foregår til stadighed en søgen efter nye farmakologiske mål, ved hvilke man kan regulere knogleomsætningen og dermed behandle knoglemetaboliske lidelser, såsom osteoporose, som er et stadigt stigende problem, såvel for den enkelte patient som samfundsøkonomisk. Der er gennem de senere år publiceret flere studier, som belyser de P2-purinerge receptors rolle i knoglebiologien. Disse receptorer synes at være potentielle mål for farmakologisk regulering af knogleomsætningen.

Adenosin 5'-trifosfat (ATP) fungerer ikke kun som uundværlig enzym kofaktor og som cellernes vigtigste energikilde, men er også et potent ekstracellulært signalmolekyle, som udøver sine effekter via særlige receptorer på cellernes overflade. I 1972 foreslog *Burnstock* [1] eksistensen af en særlig receptor, som binder ATP, men ikke adenosin, og kaldte denne familie af receptorer for P2-purinerge receptorer, modsat de adenosinfølsomme P1-purinerge receptorer.

## Materiale og metoder

Litteraturgennemgangen er baseret på søgninger udført i marts 2004 i MEDLINE-baserede databaser ved brug af søgeordene: *P2 receptor*, *purinergic receptor* i kombination med *osteoblast* og *osteoclast*. Derudover er gennemgangen baseret på tidligere søgninger [2, 3] samt på litteratur fundet ved gen-

nemgang af referencelister i de fundne artikler. I gennemgangen er der kun inkluderet engelsksproget litteratur.

## P2-purinerge receptorer

P2-receptorerne udmærker sig ved hovedsageligt at respondere på ATP, adenosin 5'-difosfat (ADP), uridin 5'-trifosfat (UTP) og uridin 5'-difosfat (UDP). På baggrund af forskelle i den molekylære opbygning og forskelle i signaleringsmekanismerne opdeles P2-receptorerne i to væsentligt forskellige typer, nemlig P2X- og P2Y-receptorer [4], som begge er proteiner lokaliseret til cellemembranen.

P2X-receptorerne tilhører gruppen af ligand-gatede ionkanaler. På baggrund af virkningen af receptoragonister har man karakteriseret syv underklasser (1-7) af P2X-receptorerne, som senere er blevet klonet. Receptorproteinet er opbygget af mellem 379 og 472 aminosyrer fordelt på to transmembrane domæner forbundet ved et langt ekstracellulært loop [5] (Figur 1). Formentlig er selve ionkanalen opbygget af to eller flere strukturelt sammenlignelige receptorproteiner [4]. Efter binding af ATP til receptoren ses en depolarisering af membranen pga. natriums passage ind i cellen gennem ionkanalen. Depolariseringen aktiverer spændingsafhængige calciumkanaler i membranen, og der opnås en hurtig stigning i den intracellulære calcium koncentration [6]. Denne proces (koblingen mellem ligandbinding og intracellulært respons) er af millisekunders varighed, hvilket er hensigtsmæssigt, idet P2X-receptorerne har stor udbredning i nerve- og muskelfæv, hvor hurtig signalering er påkrævet [4].

P2Y-receptorerne er G-protein-koblede receptorer, og otte forskellige undertyper er blevet karakteriseret (P2Y1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14), ligeledes på baggrund af agonisternes potens [6]. Proteinet består af syv transmembrane kæder forbundet ved intra- og ekstracellulære loop (Figur 1). Efter ligandbinding aktiveres inositol 1,4,5-trifosfat (IP3)-systemet. IP3 virker som anden budbringer (*second messenger*) og medierer mobilisering af calcium fra intracellulære lagre. Derved opnås der, ligesom for P2X-receptorerne vedkommende, en stigning i den intracellulære calciumkoncentration og en heraf følgende effekt i cellen afhængig af celletype [4, 7]. For P2Y-receptorerne gælder det, modsat for P2X-receptorerne, at der er et længere tidsinterval fra ligandbinding til effekt. Dette skyldes, at P2Y-receptorerne aktiverer den nævnte signalkaskade, som involverer produktion og syntese af second messengers [4].

## Nukleotider

Nukleotider (f.eks. ATP, ADP, UTP, UDP) er af stor vigtighed i mange af kroppens processer bl.a. i energimetabolismen,

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

nukleinsyresyntesen og enzymreguleringen. Langt de fleste organer og væv er under påvirkning af ekstracellulære nukleotider [8]. Dette gælder også knoglevævet.

For at P2-receptorerne kan modulere celleaktiviteten, må koncentrationen af nukleotider i det omgivende miljø være stor nok til at aktivere receptorerne [9]. Den intracellulære ATP-koncentration ligger normalt på 3-5 mM, mens den ekstracellulære under normale omstændigheder bliver holdt på meget lave niveauer. Dette skyldes to mekanismer; 1) cellemembranens lipiddobbeltlag er så godt som impermeabelt for ATP og 2) tilstedeværelsen af enzymer (ektonukleotidaser og fosfataser), der hurtigt nedbryder ekstracellulært ATP [8] til f.eks. ADP, AMP, adenosin og uorganisk fosfat [10].

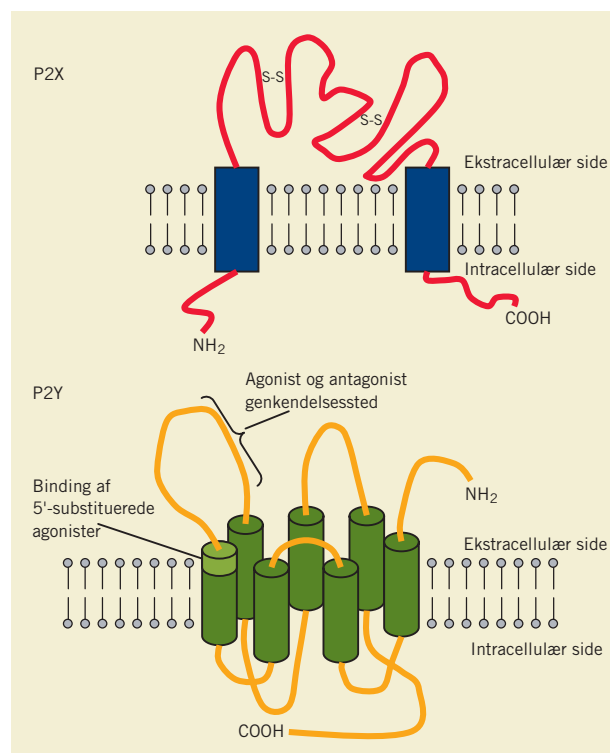
Den ekstracellulære ATP-koncentration kan under specifikke fysiologiske og/eller patologiske omstændigheder stige kortvarigt pga. frigivelse fra det intracellulære rum [10]. Denne frigivelse kan ske på tre principielt forskellige måder; 1) fra ødelagte eller døende celler, hvor cellemembranen ikke længere er intakt, 2) ved vesikulær frigivelse fra f.eks. nerve-terminaler eller fra aktiverede blodplader eller leukocytter under en inflammatorisk proces og 3) ved frigivelse via specifikke transmembrane kanalproteiner som respons på et givet stimulus [8].

### P2 og osteoblastbiologi

I flere studier er det påvist, at ATP og andre nukleotider virker på osteoblaster med dannelse af IP<sub>3</sub> og stigninger i den intracellulære calciumkoncentration [11, 12]. Et varierende antal af disse receptorer er udtrykt i humane osteoblaster, bl.a. P2Y1, P2Y2, P2Y4 og P2Y6 [13] og P2X1, P2X4-P2X7 [14]. Der sker dog en ændring i receptorekspressionen under osteoblasterens udvikling [15], hvorfor ikke alle receptorerne vil være at finde på et givet tidspunkt. Endvidere bliver nogle af receptorerne udelukkende udtrykt i form af mRNA, men findes ikke som funktionelle proteiner på celleoverfladen [2].

For at nukleotiderne kan have en relevant fysiologisk effekt på knogleremodellering under normale omstændigheder, må de være til stede i knoglemiljøet [9]. Det er påvist, at nukleotiderne kan virke autokrint eller parakrint på knoglecellerne [3], formentlig som en frigivelse fra osteoblaster som respons på mekanisk stimulering af cellen [3]. Resultaterne af andre in vitro-studier tyder på, at der i osteoblasterens nærmiljø sker en ekstracellulær omdannelse af ADP til ATP ved hjælp af det membranbundne enzym, ektonukleosiddifosfokinase [16]. Endelig er det også sandsynligt, at der sker en kontinuerlig ATP frigivelse fra osteoblasteren via specifikke membranproteiner [8].

I funktionelle studier er det påvist, at ekstracellulære nukleotider, bl.a. ATP og UTP, kan reducere formationen af knoglerelaterede proteiner fra osteoblaster in vitro [17, 18], og at P2Y2-receptoren formentlig er årsag til denne effekt [19]. Endvidere har visse nukleotider en indirekte stimulerende effekt på osteoblasteres deling og proliferation, formentlig medieret via prostaglandin E [10].



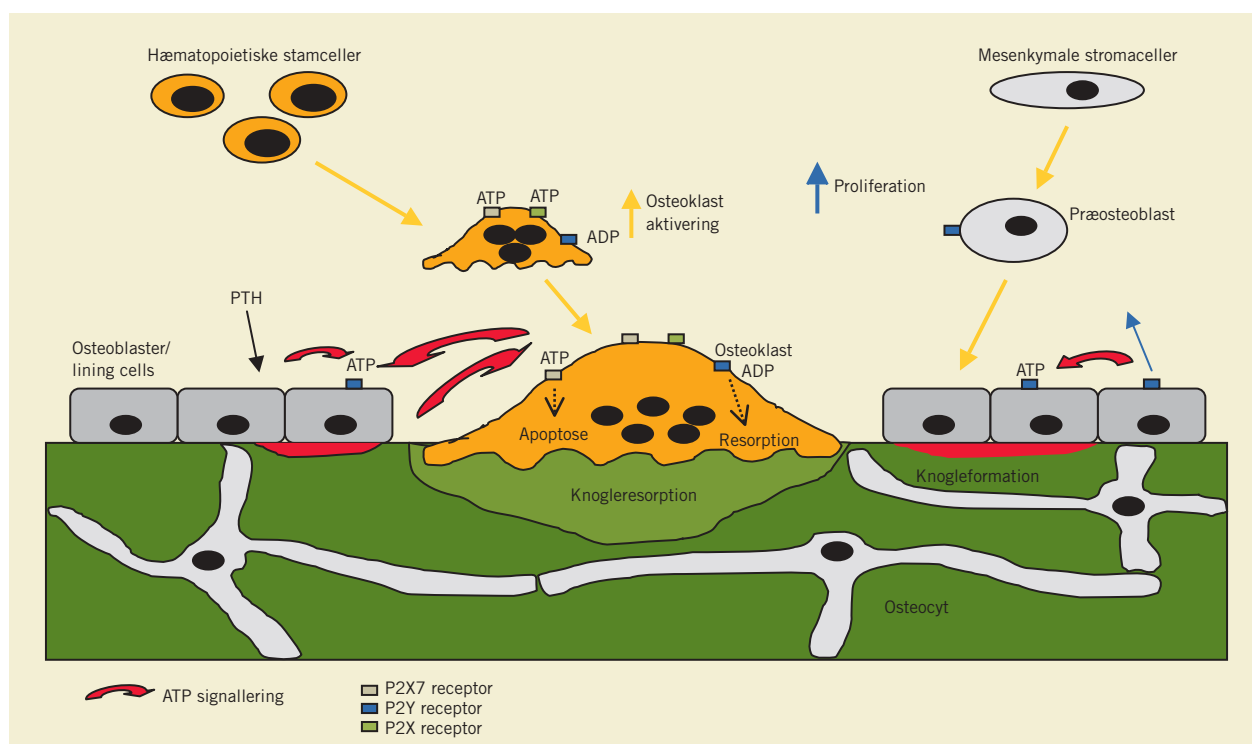
**Figur 1.** Schematisk præsentation af P2X- og P2Y-receptorernes struktur. P2X er ligand-gatede ionkanaler opbygget af to transmembrane domæner med NH- og COOH-enderne intracellulært. I det ekstracellulære loop er der flere disulfidbindinger. P2Y-receptorerne er G-protein-koblede bestående af syv transmembrane domæner med NH-enden og nukleotidbindingsstedet ekstracellulært og med COOH-enden intracellulært.

Nogle af de ovennævnte effekter kan tilskrives nukleotidernes evne til, via P2-receptorerne, at øge den intracellulære calciumkoncentration og dermed aktivere/regulere bl.a. ionkanaler og gentranskription. I denne kontekst er det også vist, at nukleotider in vitro har en additiv effekt på PTH's resorptive evner, fordi nukleotiderne forstærker stigningen i intracellulært calcium [20], og dette kan trigge osteoblasteren til at frigive mediatorer, der stimulerer osteoklastens knogleresorption.

En sammenhæng mellem disse effekter og knoglerens fysiologi kan være, at PTH vha. nukleotider i knoglemiljøet initierer knogleresorption og dermed knogleremodellering. Nukleotiderne er enten til stede i lokalmiljøet på grund af lokal frigivelse fra ødelagte celler eller frigivelse som respons på mekanisk stimulering af cellen [21], som man kan forestille sig knoglevævet bliver belastet under fysiologiske forhold. Endvidere er der formentlig et samspil mellem lokale nukleotider og vækstfaktorer/prostaglandiner frigivet i forbindelse med vævsødelæggelse, ledende til proliferation og differentiering af osteoblaster.

### P2 og osteoklastbiologi

Ligesom for osteoblasterens vedkommende udtrykker humane osteoklaster både P2Y-receptorer og P2X-receptorer.



**Figur 2.** Schematisk præsentation af beskrevne effekter af nukleotider på purinerge receptorer på knogleceller. Nukleotider virker via P2Y- og P2X-receptorer på osteoklastfusion og -apoptose og medvirker dermed til reguleringen af osteoklastmedieret knogleresorption. Denne effekt kan yderligere moduleres af indirekte virkning af PTH via osteoblasterne. P2Y-receptorer på osteoblasterne er involveret i osteoblastproliferationen og osteoblasternes aktivitet og er dermed delvist ansvarlig for reguleringen af knogleformation.

Osteoklasterne synes at udtrykke en lang række underklasser af P2-receptorer: P2Y(1, 2, 4, 6, 11) og P2X(1, 4, 5, 6, 7) [22]. For osteoklasterne gælder det ligeledes, at ikke alle typer receptorer finder vej som funktionelle proteiner til celleoverfladen, idet der er diskrepans mellem receptorekspressionen ved RT-PCR og ved proteinbestemmelse med Western blotting og immunhistokemiske farvninger.

Effekterne på osteoklasten er mangeartede. ATP givet *in vitro* i lave koncentrationer (op til 2  $\mu\text{M}$ ) har en stimulerende effekt på osteoklasternes knogleresorption, og denne effekt forstærkes, når cellerne gror i et miljø med lavt pH. Dette indikerer, at P2X2-receptoren forårsager denne effekt, da potensen af ATP på P2X2-receptoren i udtalt grad er pH-sensitiv [23].

Det er foreslået, at ATP's effekt på knogleresorptionen er indirekte via en opregulering af receptoraktivator af nukleær faktor  $\kappa\text{B}$ -ligand (RANK-ligand) i osteoblaster [22]. RANK-ligand er et molekyle, der delvist giver anledning til osteoklasternes differentiering. ADP spiller også, via den ADP-selektive P2Y1-receptor, en stor rolle i osteoklastbiologien. Herigennem har ADP en stimulerende effekt på knogleresorption, formentlig både direkte via receptorer på den modne osteoklast og indirekte via receptorer på osteoblasten [24], som begge udtrykker P2Y1-receptorer. Derudover synes ADP at stimulere dannelsen af osteoklaster ud fra hæmatopoietiske stamceller [25].

P2X7-receptoren menes at have en særlig funktion i osteoklasten. Karakteristisk for receptoren er, at den ved normal ligandbinding fungerer som en ionkanal, som de øvrige P2X-receptorer. Ved længere tids ATP-binding sker der imidlertid konformationelle ændringer i proteinet, og der dannes en nonselektiv pore i membranen, hvorigennem store hydrofile molekyler kan passere. Denne egenskab spiller en rolle i fusionen af makrofagforstadier og dermed i dannelsen af den multinukleære makrofag [26]. Selvsamme egenskab synes dog også at kunne initiere celledød ved langvarig stimulation med ATP i høj koncentration. I dette tilfælde øges membranpermeabiliteten nemlig så meget, at der kommer excessiv transmembran ionpassage, og cellen mister vigtige intracellulære metabolitter, hvilket leder til celledød i form af nekrose eller apoptose [27]. Ovennævnte karakteristika og effekter er beskrevet for makrofagen. Osteoklaster udvikles fra forstadier fælles med makrofager og monocytter, og det er således sandsynligt, at P2X7-receptoren spiller en lignende rolle i osteoklastens udvikling og aktivitet. Forsøg tyder på dette, idet det er fundet, at osteoklasten efter ATP-stimulation udvikler store permeable porer i cellemembranen [4].

Også *in vivo* synes P2X7 receptoren at spille en væsentlig rolle i omsætningen af knoglevæv. I et musestudie, hvor man sammenlignede normale mus (vildtype) med lignende mus, hvor genet, der koder for P2X7, var fjernet, fandt man, at de genetisk manipulerede mus havde en lavere knoglemasse end

## VIDENSKAB OG PRAKSIS | OVERSIGTSARTIKEL

vildtypemusene, og histologisk undersøgelse af knoglemerne tydede på en øget knogleresorption sammenlignet med vildtypemusene [28]. Dette tyder det på, at P2X7-receptoren under normale forhold har en vigtig rolle i begrænsningen af osteoklasternes aktivitet ved at inducere celledød i disse celler.

### P2-receptorer som mål for terapi

Det fremgår således tydeligt, at der efterhånden foreligger en del studier, som delvist belyser P2-receptorernes rolle i knoglebiologien (Figur 2), og ikke mindst i regulationen af såvel knogleformation som -resorption. Efterhånden som vi opnår bedre forståelse for disse receptors rolle i knogleomsætningen, vil det også være indlysende at udnytte disse effekter ved at søge at udvikle nye knogleaktive medikamenter, som kan vise sig nyttige i behandlingen af metaboliske knoglesygdomme såsom osteoporose, inflammatoriske sygdomme (arthritis rheumatoides og periodontitis) samt tumor-induceret osteolyse. Endelig ville man måske oven i købet kunne forhindre udvikling af knogletab i forbindelse med tab af mekanisk stimulation som følge af *micro-gravity*. På grund af de forskellige receptorer involveret og de øjensynlige effekter på både knogleformation og resorption har vi her potentialet for udvikling af både antiresorptive og anabole stoffer.

Der er imidlertid nogle forhindringer, som skal overvindes i forbindelse med udviklingen af disse stoffer. De fleste af de kendte agonister er relativt uspecifikke og virker således ikke kun på en, men på flere af receptorerne. Dernæst er de endogene agonister meget ustabile som følge af enzymatisk nedbrydning via ekstracellulære ektonukleotidaser.

BenzoylbenzoylATP (BzATP) er dog relativt specifik for P2X7-receptoren, og da den medfører akut cytolyse i osteoklaster, kunne den være et logisk udgangspunkt for udvikling af stoffer, som kan reducere antallet af osteoklaster in vivo. Også andre P2X-receptorer er som nævnt involveret i regulationen af knoglenedbrydning. Lave doser af ATP stimulerer som beskrevet ovenfor osteoklasternes dannelse og aktivitet [23]. Disse effekter synes medieret via andre P2X-receptorer end P2X7, og selektive antagonist mod disse P2X-receptorer ville således kunne anvendes som antiresorptive stoffer.

Mindre bisfosfonater, såsom clodronat og etidronat, anvendes i behandlingen af osteoporose. De bliver i organismen metaboliseret til svært hydrolyserbare ATP-analoger, som forårsager celledød af osteoklaster. Det er således nærliggende at forestille sig, at effekten af disse mindre bisfosfonater kunne være medieret via interaktion af deres ATP-lignende metabolitter med P2-receptorer på osteoklasterne, medførende celledød af disse. Siden bisfosfonater binder sig specifikt til knogler, ville det være muligt at designe analoger således, at de efter metabolisering i osteoklaster bliver omdannet til potente P2-agonister eller antagonist, som så udøver deres virkning direkte på formation eller resorption i knoglemiljøet.

Der foreligger allerede studier, hvori man har påvist vir-

ningen af visse antagonist på knogleomsætningen. Suramin er en P2-antagonist, som primært virker på P2X-receptorer, men i mindre grad også på P2Y-receptorer. Suramin er både vist at hæmme knogleresorption in vitro og in vivo [23, 29-31]. Suraminlignende stoffer er blevet udviklet, som har yderligere specificitet over for P2X, men kun ringe binding til P2Y-receptorerne. Efterhånden som der udvikles nyere og mere specifikke antagonist til P2-receptorerne, vil det være yderst interessant at undersøge deres effekter på såvel knogleformation som -resorption.

### Konklusion

P2-receptorerne udgør en stor familie for farmakologiske mål, som sammen med nukleotiderne spiller en væsentlig rolle i knogleomsætningen. De enkelte receptorer og nukleotiderne har varierende effekter på knogleomsætningen. Disse mekanismer er sandsynligvis involveret i såvel knoglenes respons på mekaniske stimuli som under inflammatoriske tilstande og vil formentlig i fremtiden vise sig at være et terapeutisk mål for udvikling af nye knogleaktive substanser. Yderligere forskning på området er dog påkrævet, og undersøgelsen af in vivo-genetiske musemodeller er et kraftfuldt værktøj i den videre udforskning af receptorernes rolle i knogleomsætningen, hvor kun P2X7-knockoutmodellen er tilgængelig på nuværende tidspunkt.

Tilstedeværelsen af forskellige receptorer samt receptorfølsomhed på osteoblaster og osteoklaster kan vise sig som en mulighed for uafhængigt at kontrollere aktiviteten af de to celletyper, og dermed danne baggrund for behandlingen af en række metaboliske knoglesygdomme.

Korrespondance: *Niklas Rye Jørgensen*, Klinisk Biokemisk Afdeling, H:S Hvidovre Hospital Kettegård Allé 30, DK-2650 Hvidovre.  
E-mail: niklas@dadlnet.dk

Antaget: 6. august 2004  
Interessekonflikter: Ingen angivet

Taksigelser: Projektet er støttet af H:S Forskningsfond (skolarstipendiat til *Marie Solgaard*) og Statens Sundhedsvidenskabelige Forskningsråd.

### Litteratur

1. Burnstock G, Dumsday B, Smythe A. Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Br J Pharmacol* 1972;44:451-61.
2. Jørgensen NR, Henriksen Z, Sørensen OH et al. Intercellular calcium signaling occurs between human osteoblasts and osteoclasts and requires activation of osteoclast P2X7 receptors. *J Biol Chem* 2002;277:7574-80.
3. Jørgensen NR, Geist ST, Civitelli R et al. ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Cell Biol* 1997;139:497-506.
4. Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 1998;50:413-92.
5. Buell G, Collo G, Rassendren F. P2X receptors: an emerging channel family. *Eur J Neurosci* 1996;8:2221-8.
6. Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M. Purine and pyrimidine (P2) receptors as drug targets. *J Med Chem* 2002;45:4057-93.
7. Harden TK, Boyer JL, Nicholas RA. P2-purinergeric receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:541-79.
8. Dubyak GR, el MC. Signal transduction via P2-purinergeric receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 1993;265:C577-606.
9. Bowler WB, Buckley KA, Gartland A et al. Extracellular nucleotide signaling:

- a mechanism for integrating local and systemic responses in the activation of bone remodeling. *Bone*, 2001;28:507-12.
10. Dixon SJ, Sims SM. P2 purinergic receptors on osteoblasts and osteoclasts: Potential targets for drug development. *Drug Dev Res* 2000;49:187-200.
  11. Schofl C, Cuthbertson KS, Walsh CA et al. Evidence for P2-purinergic receptors on human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 1992;7:485-91.
  12. Boarder MR, Weisman GA, Turner JT et al. G protein-coupled P2 purinergic receptors: from molecular biology to functional responses. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:133-9.
  13. Maier R, Glatz A, Mosbacher J et al. Cloning of P2Y6 cDNAs and identification of a pseudogene: comparison of P2Y receptor subtype expression in bone and brain tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;240:298-302.
  14. Nakamura E, Uezono Y, Narusawa K et al. ATP activates DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C510-9.
  15. Dixon CJ, Bowler WB, Walsh CA et al. Effects of extracellular nucleotides on single cells and populations of human osteoblasts: contribution of cell heterogeneity to relative potencies. *Br J Pharmacol* 1997;120:777-80.
  16. Buckley KA, Golding SL, Rice JM et al. Release and interconversion of P2 receptor agonists by human osteoblast-like cells. *FASEB J* 2003;17:1401-10.
  17. Jones SJ, Gray C, Boyde A et al. Purinergic transmitters inhibit bone formation by cultured osteoblasts. *Bone* 1997;21:393-9.
  18. Doty SB, Schofield BH. Metabolic and structural changes within osteocytes of rat bone. I: Talmage RV, Munson PL, eds. *Calcium, parathyroid hormone and the calcitonins*. Amsterdam: Excerpta Media, 1972: 353-64.
  19. Hoebertz A, Mahendran S, Burnstock G et al. ATP and UTP at low concentrations strongly inhibit bone formation by osteoblasts: a novel role for the P2Y2 receptor in bone remodeling. *J Cell Biochem* 2002;86:413-9.
  20. Kaplan AD, Reimer WJ, Feldman RD et al. Extracellular nucleotides potentiate the cytosolic Ca<sup>2+</sup>, but not cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response to parathyroid hormone in rat osteoblastic cells. *Endocrinology* 1995;136:1674-85.
  21. Jorgensen NR, Henriksen Z, Brot C et al. Human osteoblastic cells propagate intercellular calcium signals by two different mechanisms. *J Bone Miner Res* 2000;15:1024-32.
  22. Buckley KA, Hipskind RA, Gartland A et al. Adenosine triphosphate stimulates human osteoclast activity via upregulation of osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. *Bone* 2002;31:582-90.
  23. Morrison MS, Turin L, King BF et al. ATP is a potent stimulator of the activation and formation of rodent osteoclasts. *J Physiol* 1998;511:495-500.
  24. Steinberg TH, Jorgensen NR, Bong JS et al. P2-mediated responses in osteoclasts and osteoclast-like cells. *Drug Dev Res* 2000;49.
  25. Rabadjija L, Brown EM, Swartz SL et al. H(+)-stimulated release of prostaglandin E2 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphoric acid and their relationship to bone resorption in neonatal mouse calvaria cultures. *Bone Miner* 1990;11:295-304.
  26. Chiozzi P, Sanz JM, Ferrari D et al. Spontaneous cell fusion in macrophage cultures expressing high levels of the P2Z/P2X7 receptor (published erratum appears in *J Cell Biol* 1997 Oct 20;139:following 571). *J Cell Biol* 1997;138:697-706.
  27. Murgia M, Pizzo P, Steinberg TH et al. Characterization of the cytotoxic effect of extracellular ATP in J774 mouse macrophages. *Biochem J* 1992;288:897-901.
  28. Ke HZ, Qi H, Weidema AF et al. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol* 2003;17:1356-67.
  29. Walther MM, Kragel PJ, Trahan E et al. Suramin inhibits bone resorption and reduces osteoblast number in a neonatal mouse calvarial bone resorption assay. *Endocrinology* 1992;131:2263-70.
  30. Farsoudi KH, Pietschmann P, Cross HS et al. Suramin is a potent inhibitor of calcemic hormone- and growth factor-induced bone resorption in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:579-83.
  31. Yoneda T, Williams P, Rhine C et al. Suramin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer. *Cancer Res* 1995;55:1989-93.

# Eksperimentel kræftbehandling med elektrokemoterapi, elektrokemoimmunoterapi og elektrogentransfektion

1. reservelæge Julie Gehl

Herlev Amtssygehus, Onkologisk Afdeling

Det er svært nok at udtale elektroporation, og situationen er ikke blevet nemmere efter elektrokemoterapi, elektrokemoimmunoterapi og nu elektrogentransfektion er kommet på banen. Her følger en forklaring på disse nye begreber i dansk eksperimentel kræftbehandling.

## Hvad er elektroporation?

En cellemembran har en vis elektrisk kapacitans. Ved elektroporation påtrykkes et elektrisk felt udefra, så membranens kapacitans overstiges, hvorved membranen midlertidigt destabiliseres og bliver permeabel (**Figur 1**). Elektroporation er en reversibel proces, hvor cellemembranens integritet genskabes i løbet af få minutter. Elektroporation anvendes til at introducere

ioner, farvestoffer, farmaka, antistoffer, oligonukleotider, RNA og DNA - kort sagt molekyler, der har det til fælles, at de vanskeligt af sig selv finder vej over cellemembranen [1].

De elektriske pulser, som anvendes, kan elektronisk tilrettes til firkantede pulser. Dermed kan pulsamplituden uafhængigt reguleres i forhold til pulslængden. Dette har stor betydning, idet et større område af cellemembranen permeabiliseres ved høj amplitude, mens f.eks. DNA transporteres bedst ved lange pulser [1]. Således anvendes høj amplitude, hvis målet er influks af små molekyler (f.eks. kemoterapi), og en kombination med elektroforetisk virkende pulser, hvis målet er gentransfektion. En pulsserie er afviklet i løbet af få sekunder. Typisk anvendes der til elektrokemoterapi otte pulser a 0,1 ms med 1 kV pr. cm (elektrisk spænding målt i V/afstand mellem elektroder målt i cm), mens man ved DNA-transfektion anvender en enkelt permeabiliserende puls og derefter en elektroforetisk virkende puls på f.eks. 0,4 s med 0,1 kV pr. cm.

Oftest anvendes der elektroder med en afstand på under