

MTA Doktori Értekezés Tézisei

Régi és új támadáspontok a korai fájástevékenység gátlására



Dr. Gáspár Róbert

Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Tartalomjegyzék	
1. Rövidítések jegyzéke	2
2. Bevezetés és célkitűzés	4
3. Módszerek	6
3.1. Kísérleti állatok	6
3.2. Humán uterusz minták	7
3.3. Izolált szervi kontraktilitási vizsgálatok	7
3.4. Molekuláris farmakológiai vizsgálatok	7
3.5. Nemi hormon, adipokin és citokin mérések	8
3.6. Teljes oxidáns, antioxidáns státusz és a COX aktivitás mérése	8
3.7. In vivo kísérletek	8
3.8. Statisztikai analízis	10
5. Eredmények és diszkusszió	10
5.1. Adrenerg hatások az uteruszban	10
5.2. Adrenerg hatások a cervixben	11
5.3. β_2 -AR agonista kombinációk	12
5.4. α_1 -AR antagonistá kombinációk	15
5.5. α_2 -AR antagonistá kombinációk	16
5.6. Peptid támadáspontok	16
5.6.1. Nociceptin és nocistatin	17
5.6.2. Kisspeptin	18
5.6.3. Leptin, adiponectin	18
5.6.4. Obezitás és gyulladás: adipokinek és citokinek	19
5.7. Antioxidáns hatás jelentősége	21
5.7.1. β_2 -AR agonista hatás módosítása antioxidánssal	21
5.7.2. Az antioxidáns COX-gátló hatást módosító effektusa	21
6. Új megállapítások	23
7. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája	25
8. Tudománymetriai táblázat	25
9. Köszönetnyilvánítás	28

1. Rövidítések jegyzéke

α -AR: α -adrenerg receptor

AdipoR1: adiponectin 1 receptor

AdipoR2: adiponectin 2 receptor

AKAP: A-kináz horgonyzó fehérje

AUC: görbe alatti terület

β_2 -AR: β_2 -adrenerg receptor

BK_{Ca}: magas konduktanciájú Ca²⁺-szenzitív K⁺-csatorna

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid

COX: ciklooxigenáz

E2: 17 β -ösztadiol

EC₅₀: effektív koncentráció 50 (a maximális hatás felének kiváltáshoz szükséges hatóanyag koncentráció)

EFS: elektromos erőtér ingerlés

E_{max}: maximális hatás

FFT: gyors Fourier-transzformáció

GAPDH: gliceraldehyd-foszfát dehidrogenáz

GTT: glükóz tolerancia teszt

GTP γ S: guanozin-5'-O-gamma-tiotrifoszfát

HFHSD: magas zsír és cukor tartalmú diéta (High Fat High Sugar Diet)

IL: interleukin

i.p.: intraperitoneális

KC: keratinocita eredetű citokin

Kiss1R: kisspeptin receptor

LEPR: leptin receptor

LPS: lipopoliszacharid

mRNS: messenger ribonukleinsav

n-3 PUFA: omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavak

NA: noradrenalin

NX: naloxon

ORL1: orphan opioid receptor-like 1

OSI: oxidatív stressz index

P4: progeszteron

PAX: paxilline

PCR: polimeráz láncreakció

PDE: foszfodiészteráz

PG: prosztaglandin

PKA: protein-kináz A

PsDmax: teljesítményspektrum-sűrűség maximum (Power Spectrum Density maximum)

PTX: pertussis toxin

ROS: reaktív oxigén termékek

RT-PCR: valós idejű polimeráz láncreakció

s.c.: szubkután

SMEMG: simaizom elektromiográfia

TAS: teljes antioxidáns státusz

TEA: tetraetil-ammónium

TNF α : tumor nekrozis faktor α

TOS: teljes oxidáns státusz

WB: Western blot

17OHP: 17 α -hidroxi-progeszteron kapronát

5-HT: szerotonin

5-MU: 5-metilurapidil

2. Bevezetés és célkitűzés

A szülés beindulásakor a corpus uteri (továbbiakban uterusz) ritmikus kontrakciói fokozódnak, míg a cervix uteri (továbbiakban cervix) felpuhul, kitágul. E folyamatok mögött nagyon összetett szabályozás áll, a szabályozás zavara következtében akár túlhordás, akár koraszülés is bekövetkezhet.

A koraszülés (a 37. terhességi hét előtt bekövetkező születés) és annak következményei az a szülészeti gyakorlat legnagyobb kihívásai közé tartozik, mely jelentős egészségügyi kockázatot hordoz. Míg a világ kevésbé fejlett részét a globális túlnépesedés következményei fenyegetik, addig sok országnak az infertilitás problémájával kell szembe néznie, melynek okai sokszor feltáratlanok. Emellett számos országnak kell megküzdenie az emocionális, anyagi, politikai vagy akár nők karrierjét veszélyeztető okok miatti alacsony születési rátával. Ezeken a területeken megsokszorozódnak a koraszülésből adódó egészségügyi kihívások: az éretlen újszülött individuális egészségügyi terheit és a hosszan tartó betegségek lehetséges kockázatát tovább bonyolítja az idősödő társadalmak igénye a születendő és felnövekvő egészséges új generáció számának növelésére. A koraszülés mechanizmusa nem teljesen feltárt, megelőzése csak részben lehetséges, ugyanakkor következményei súlyosak, akár egész életre kihatóak lehetnek, melyek komoly anyagi terhet is rónak az egészségügyi ellátórendszerre.

Jelenleg a koraszülés terápiájában akut és preventív gyógyszeres megoldások léteznek. Az **akut kezelésben** a legrégebbi vegyületek közé tartoznak a β_2 -adrenerg receptor (β_2 -AR) agonisták, amelyek növelik az intracelluláris ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintet és csökkentik az intracelluláris Ca^{2+} koncentrációt, ami simaizom relaxációhoz vezet. Hatásosságuk nem kielégítő, hosszú távú hatásosságuk nem bizonyított, az újszülött életkilátásait javító effektusuk nem igazolható. Ezenkívül a β_2 -AR agonisták alkalmazott dózisa általában olyan magas, hogy a hatóanyag koncentrációja meghaladja a receptor szelektivitás határát, ezért ezek a vegyületek anyai és magzati tachikardiát, emellett hipokalémiát és a szénhidrát-anyagcsere zavart is okozhatnak. A *magnézium-szulfát* szintén egy régi gyógyszer a tokolitikus terápiában. Uterus relaxáló hatásának pontos hatásmechanizmusa nem ismert, valószínűleg csökkenti az extracelluláris és intracelluláris Ca^{2+} áramokat. A magnézium-szulfát alkalmazása ellentmondásos a koraszülés terápiájában, mivel egyrészt bebizonyosodott, hogy nem igazán hatékony a koraszülések késleltetésében vagy megelőzésében, másrészt viszont szülés előtti adagolása jelentős neuroprotektív hatást fejt ki a koraszülötteknél, különösen a koraszülöttség egyik következményének, a cerebrális

bénulás prevalenciájának csökkentésében. A *ciklooxygenáz (COX) gátlók* megakadályozzák a prosztaglandinok (PG) képződését, amelyek részt vesznek a terhes méhösszehúzóerők fenntartásában. Klinikailag évtizedek óta az indometacin a leggyakrabban alkalmazott COX-gátló szer. Sajnos tokolitikus hatása kb. 48 órára korlátozódik, hosszabb alkalmazása növeli az újszülötteknél a nekrotikus enterocolitis kockázatát, emellett nem adható a terhesség 32. hete után a magzati ductus arteriosus korai záródásának kockázata miatt. A Ca^{2+} -csatorna *blokkolók* hatásmechanizmusa az extracelluláris Ca^{2+} -áram gátlása, ami simaizom relaxációt okoz. Bár a Ca^{2+} -csatorna blokkolók jobban tolerálhatóak számos más tokolitikumhoz képest, hosszú távú terápiára nem alkalmazhatók a jelentős anyai mellékhatások (fejfájás és hipotenzió) és a hosszabb távon tapasztalható gyenge terápiás hatékonyság miatt. A *nitrodilatátorok* nem terjedtek el a klinikai gyakorlatban, azonban számos klinikai vizsgálatot végeztek a koraszülés akut kezelésében való hatékonyságuk tisztázására. A legtöbbet vizsgált nitrodilatátor a nitroglicerín, amely koraszülésben hatásosnak bizonyult, de hatékonysága nem volt jobb a többi tokolitikumhoz képest, bár a mellékhatások gyakorisága és súlyossága is -az anyai fejfájást kivéve- kisebb volt. Az *oxitocin antagonisták* az egyetlen gyógyszercsoport, amelyet eredetileg akut tokolízisre terveztek. Bár az oxitocin receptor szelektív blokkolása terápiásan ígéretesnek tűnt, a valóságban azonban ez sem jelent megoldást a koraszülés megállítására. A klinikai adatok nem támasztották alá az atosiban vagy más oxitocin antagonisták nagyobb hatékonyságát más tokolitikumokhoz képest.

A koraszülés **preventív terápiája** rendkívül nagy kihívás, mivel a legtöbb esetben a koraszülés oka ismeretlen. A koraszülés klasszikus megelőző terápiája a *progeszteronra* (P4) vagy P4 analógokra korlátozódik magas kockázatú várandósoknál. Bár a kezdeti várákosok nagyok voltak a P4 kezelés kapcsán, a klinikai bizonyítékok alapján hatása gyenge vagy nem igazolható. Úgy tűnik, hogy a P4 kezelésre jól reagáló várandósok speciális farmakogenetikai háttérrel rendelkeznek, de a részletek még nem tisztázottak. A koraszülés fokozott kockázatát összefüggésbe hozzák az anyai fertőzésekkel is. Az elsősorban húgyúti vagy vaginális anyai fertőzések kapcsán alkalmazott *antibiotikumok* nem voltak hatásosak. Az is nehezíti az antibiotikumos prevenció kivitelezését, hogy az urogenitális fertőzések polimikrobásak, ennek következtében nem tisztázott, hogy mely baktérium törzsek lehetnek felelősek a koraszülés beindulásért és hogy ezeknek a törzseknek milyen lokalizációja szükséges ahhoz, hogy a folyamatok elinduljanak. Mivel a normál flóra baktériumait tartalmazó orális *probiotikumok* bizonyítottan még a hüvelyben is megtelepednek, a megfelelő probiotikumok rendszeres fogyasztása megőrizheti a hüvelyi

mikrobiom egészséges állapotát és megelőzheti a koraszülést. Ezenkívül rendelkezésre állnak intravaginális probiotikumok is, melyek antibiotikumokkal való kombinált alkalmazása is megfelelő lehet a koraszülés megelőzésére. Az *omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavak* (n-3 PUFA) metabolikus útvonala kevesebb méhkontrakciót kiváltó PG-t termel. Az n-3 PUFA-hiány a koraszülés általános érendi kockázati tényezője lehet, az ajánlott napi bevitel minimum 600 mg/kg, mert ez alatt a koraszülés gyakorisága fordított korrelációt mutat az elfogyasztott n-3 PUFA-val. Így az n-3 PUFA a napi étrendben vagy táplálék-kiegészítő formájában történő rendszeres bevitele a koraszülés megelőzésének egyik nem gyógyszeres lehetősége lehet.

A jelenleg elérhető akut és preventív terápiás lehetőségek összességében nem kielégítőek a korai fájástevékenység hatékony kezelésére, ezért mindenképpen indokolt a koraszülés terápiájának fejlesztése.

Mindezek alapján a kísérletes munkánk olyan terhes uterusz kontrakciót gátló és cervix rezisztenciát fokozó új támadáspontok, hatóanyagok és/vagy hatóanyag kombinációk keresésére irányult, melyek kiinduló pontjai lehetnek a klinikai alkalmazásnak.

Kutatásaink során az alábbi célkitűzéseket fogalmazzuk meg:

1. Az α -adrenerg receptoron (α -AR) (α_1 - és α_2 -AR altípusok) keresztüli uterusz és cervix, valamint a β_2 -AR-on keresztüli cervix hatások vizsgálata vemhes patkányban.
2. Az α - és β_2 -AR-on ható farmakonok uterusz kontrakciót gátló hatásának fokozása más szerekkel vemhes patkány és császármetszésből származó humán uterusz szöveten.
3. Peptid természetű endogén anyagok szerepének és hatásának vizsgálata a vemhes uterusz kontrakciókra és a cervix rezisztenciára patkányban.
4. Antioxidáns hatás vizsgálata a β_2 -AR agonisták és COX gátlók uterusz kontraktilitásra és cervix rezisztenciára gyakorolt effektusaira vemhes patkányban.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Vizsgálataink során ösztrusz fázisban lévő nem vemhes vagy különböző gesztációs napokon lévő vemhes Sprague-Dawley (CD) patkányokat használtunk. Az állatokat az Európai Közösségek Tanácsának irányelve (2010/63/EU) és a kutatás során az állatok védelméről szóló magyar törvény (XXVIII. törvény 32. cikk) szerint vontuk be a kísérletekbe. Valamennyi állatkísérletet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Bizottság jóváhagyásával

végeztünk (engedélyszámok: IV./1813-1/2002; IV./01758-2/2008; IV./198/2013; IV./3796/2015; IV./3071/2016).

3.2. Humán uterusz minták

A humán uterusz szövet biopsziás mintái a terhesség harmadik trimeszterében császármetszés során kerültek kimetszésre normál gesztációs idő (37-41 terhességi hét), illetve koraszülés (32-36 terhességi hét) esetén. A császármetszés indoka magzati distressz, növekedési elmaradás, korábbi császármetszéses előzmény, farfekvés vagy valószínűsíthető fej-medence aránytalanság volt. Egyik várandós anyát sem kezelték tokolitikus szerrel. A Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Etikai Bizottsága jóváhagyta a teljeskörűen tájékoztatott és beleegyező nyilatkozatot adó várandós anyák szöveti felhasználásának klinikai protokollját. A klinikai protokoll engedélyszáma: 114/2009.

3.3. Izolált szervi kontraktilitási vizsgálatok

Az izolált szervfűrdőben végzett uterusz kontraktilitási vizsgálatok során patkány és humán uterusz mintákkal dolgoztunk. A szöveteket izolált szervfűrdőkbe helyeztük, amelyek 10 ml, 37 °C-os puffert tartalmaztak. A szervfűrdőket folyamatosan karbogénnel (95% O₂ + 5% CO₂) áramoltattuk át. Az adatokat software segítségével rögzítettük és elemeztük. A ritmikus kontrakciókat vagy elektromos erőteringerléssel (EFS) vagy pedig farmakonokkal váltottuk ki. A regisztrátumok görbe alatti területét (AUC) értékeltük és hasonlítottuk össze. A koncentráció-kontrakció/relaxáció görbéket szemilogaritmikusan ábrázoltuk, és az eredményeket százalékos változásban fejeztük ki a kezdeti indukált összehúzódáshoz képest. A cervix rezisztenciát a szövetek feszülésének fokozatos növelésével vizsgáltuk. Az értékelése során a méhnyak kezdeti feszülését az 5 perc utáni relaxáció függvényében ábrázoltuk, melyre lineáris regresszióval egyenest illesztettünk, melynek meredeksége jellemzi rezisztencia nagyságát.

3.4. Molekuláris farmakológiai vizsgálatok

A [³⁵S]-guanozin-5'-O-gamma-tiotrifoszfát ([³⁵S]GTPγS) kötési vizsgálatokban [³⁵S]GTPγS alkalmaztunk a G-protein jelölésre. A teljes kötődést hatóanyagok nélkül mértük. A nem specifikus kötődést jelöletlen GTPγS segítségével határoztuk meg és kivontuk a teljes kötésből. A radioaktivitást folyadékszcintillációs számlálóval detektáltuk.

Az uteruszok cAMP szintjét Enzyme Immunoassay Kit segítségével mértük. A polimeráz láncreakció (PCR) vizsgálatok során vagy reverz transzkripció, vagy pedig valós idejű (RT) PCR méréseket végeztünk. Belső kontrollként vagy gliceraldehyd-foszfát dehidrogenázt (GAPDH) vagy pedig β-actint mértünk. Az amplifikált termék meghatározására α-³²P-deoxicitidin-trifoszfátot vagy fluoreszcencia intenzitás mérést alkalmaztunk.

A Western blot (WB) mérésekben az elektroforézist követően a fehérjéket a gélről nitrocellulóz membránra vittük át, az ellenanyag kötődést WB immunodetection kittel mutattuk ki, az immunreaktív sávok optikai sűrűségét elemző szoftverrel határoztuk meg. Az optikai sűrűségeket önkényes egységekben fejeztük ki a háttér kivonása után.

A radioimmun mérések során az uterusz nociceptin meghatározására [³H]Nociceptin-NH₂-t, az uterusz és a plazma nocistatin meghatározására pedig ¹²⁵I-Nocistatin RIA kit-et használtunk. Az uterusz β₂-adrenerg receptor (β₂-AR) mérése során [³H]ICI 118 551) szelektív ligandot alkalmaztunk. A radioaktivitást folyadékszintillációs számlálóval detektáltuk.

Az immunhisztokémiai mérésekben az uterusz mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A kétszeres vagy háromszoros jelölésű fluoreszcens immunhisztokémiához kriometszeteket készítettünk. TRIS -sóoldattal (TBS) puffertelt Triton X-100-ban történő mosást, valamint szarvasmarha-szérumalbumint és normál kecskeszérumot tartalmazó TBS-ben történő blokkolást követően a mintákat egy inkubáltuk az elsődleges antitestekkel. Egy vizsgálaton belül az összes receptort immunfestése egyszerre történt meg, de a jobb láthatóság és értelmezhetőség érdekében külön-külön kerültek bemutatásra.

3.5. Nemi hormon, adipokin és citokin mérések

A patkányoktól gyűjtött plazmamintákból a nemi hormonok (17β-ösztadiol – E2, P4) és az adipokinek (kisspeptin, leptin, adiponectin) szintjét ELISA kit-ekkel határoztuk meg. A plazmaminták citokin szintjeit digitális immunoassay-vel határoztuk meg Single Molecule Arrays (Simoa) módszert alkalmazva. A zsírszövet mintákban a gyulladáscitokinek meghatározásához ELISA kiteket használtunk.

3.6. Teljes oxidáns, antioxidáns státusz és a COX aktivitás mérése

Az uterusz és cervix teljes oxidáns (TOS) és a teljes antioxidáns státuszát (TAS) kitek segítségével mértük, a spektrofotometriásan mérhető színintenzitás arányos volt a mintában jelen lévő oxidáló vagy antioxidáns molekulák teljes mennyiségével. Az oxidatív stressz indexet (OSI) a TOS és a TAS arányaként határoztuk meg. Az OSI-t az $OSI = TOS (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{-egyenérték/l})/TAS (\text{mmol Trolox-egyenérték/l})$ képlettel számoltuk ki.

A COX aktivitást uterusz és cervix mintákban is mértük COX Activity Assay Kit segítségével, mely a COX peroxidáz aktivitását detektálja kolorimetriás módszerrel.

3.7. In vivo kísérletek

Az in vivo kísérletek során nemi hormon kezeléseket alkalmaztunk, koraszülés és obezitás modelleket használtunk, valamint uterusz kontraktilitási méréseket végeztünk.

A női hormon kezelések esetén a s.c. P4 kezelés a vemhesség 15-21. napján történt (0,5 mg/nap). A nem vemhes, nem-ovarietomizált nőtény patkányok s.c. E2 kezelését (5 µg/kg/nap) az ösztroz fázisban kezdtük el, míg vemhes állatok esetén a vemhesség 18-21. napján történt az adagolás.

A hormonálisan indukált koraszülés során az állatokat s.c. mifeprisztonnal (3 mg/állat) és vaginálisan PGE₂-vel (0,5 mg/állat) kezeltük a vemhesség 19. napján. Az ellés idejét a mifepriszton beadásától számítottuk és órában fejeztük ki. A bakteriális lipopoliszacharid (LPS) koraszülés modellben az LPS beadása a terhesség 16. napján történt közvetlenül az uterus lumenébe (szarvanként 100 g/kg) A vemhesség 21. napján a gyulladásban lévő uterusokat vagy eltávolítottuk és elvégeztük az in vitro vizsgálatokat, vagy pedig in vivo vizsgálatokat végeztünk.

A kontraktilitási vizsgálatok egy részében beültethető nyúlásmérő került felvarrásra a mechanikai összehúzódások kimutatására az uterus felszínére, az izom hossz tengely mentén. A kontrakciós hullámokat online szoftveresen regisztráltuk és a kontrakciókat a görbék AUC értéke alapján jellemeztük.

A simaizom elektromiográfia (SMEMG) során egy bipoláris ezüst-ezüst-klorid korongelektroda párt rögzítettünk s.c. a vemhes uterus felett a hasfal megnyitása nélkül. A SMEMG jeleket felerősítettük és szoftveresen rögzítettük. A rögzített jeleket gyors Fourier-transzformációval (FFT) elemeztük. Az elektromos aktivitás frekvenciáját cpm-ben jellemeztük, az aktivitás nagyságát pedig a teljesítményspektrum-sűrűség maximumaként (PsDmax) írtuk le. Az 1-3 cpm közötti frekvencia tartományban mért PsDmax értékek jól korrelálnak az uterus valós mechanikai kontrakcióival.

Az ellési idő mérése során a vemhesség 21. napján 16:00 órakor a vizsgált hatóanyagokkal kezeltük az állatokat per os. A kezelést követően figyeztük az ellés megindulását és órában fejeztük ki a kezelések óta eltelt időre nézve.

A vemhességi obezitás modellben nőtény patkányokat 4 hetes kortól a kísérlet végéig (12 hetes korig, a vemhesség 22. napja) magas zsír- és cukortartalmú diétán (HFHSD) diétán tartottunk. A 9 hetes HFHSD nőtény állatokat nemileg érett hímekkel pároztattuk. A kísérlet végén, a vemhesség 22. napján az állatok vizsgálandó szöveteit, szerveit eltávolítottuk, nedves súlyukat mértük, illetve az uterus és cervix esetében izolált szervi kontraktilitási vizsgálatokat végeztünk. A glükóztolerancia-tesztet (GTT) a vemhes obezitás modell során a 9. és 12. hetes (20. vemhességi nap) állatokon végeztük. A glükózszinteket glükózmérővel mértük. Az állatokat a GTT előtt 16 órán át éhezettük. Az éhezési glükózszinteket először reggel 8 órakor mértük, majd i.p. 25%-os, 2 mg/kg glükózoldatot

adtunk. A GTT-ben a plazma glükóz koncentráció-idő görbe AUC értékeit hasonlítottuk össze.

3.8. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzést azokban az esetekben, amikor a vizsgálatban csak 2 kísérleti csoport vett részt, az analízist párosítatlan t-próbával végeztük, míg a kettőnél több csoportot magába foglaló vizsgálatoknál egyszempontos varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk Tukey post hoc tesztet alkalmazva.

5. Eredmények és diszkusszió

5.1. Adrenerg hatások az uterusban

Vemhes patkányban kimutattuk, hogy az α_1 -AR altípusok közül csak az α_{1A} - és α_{1D} -AR játszik szerepet az összehúzódásokban, míg az α_{1B} -AR nem expresszálódik. A két azonosított altípus gátlásával csökkennek a kontrakciók, mely hatás az α_{1A} -AR esetén a vemhesség előrehaladtával egyre érzékenyebb lett a specifikus antagonistá 5-metilurapidilre (5-MU). Az α_{1D} -AR esetén a vemhesség utolsó, 22. napján kifejezett érzékenység csökkenés volt megfigyelhető. Ezek alapján az α_{1A} -AR lehet az egyik olyan célpont, amivel késői vemhes méhkontrakció eredményesen gátolható, ráadásul az α_{1A} -AR gátlása nem jár hatás csökkenéssel. Az inverz agonista 5-MU gátolta a szerotonin (5-HT) kiváltotta vemhes uterus kontrakciókat, valamint az EFS kiváltotta kontrakció gátló hatása tovább fokozódott 5-HT_{1A}-receptor (5-HT_{1A}-R) gátló (WAY100135) jelenlétében. Ezek alapján az 5-MU gyenge 5-HT agonista hatással is bír, amely gyengítheti az uterorelaxáns hatását, ezért a fejlesztendő altípus-szelektív α_{1A} -AR antagonistáknak minél kisebb 5-HT_{1A}-R agonista aktivitással kell rendelkeznie.

Mindhárom α_2 -AR altípust azonosítottuk a 22. napos vemhes patkány uterusban, melyek közül az α_{2C} -AR altípust elsőként identifikáltuk ebben a szövettípusban. A kontraktilitási vizsgálatok során noradrenalinnal (NA) váltottunk ki kontrakciókat, egy vagy két altípusra szelektív hatóanyagokkal gátoltunk. A BRL44408 az α_{2A} -AR, az ARC239 az $\alpha_{2B/C}$ -AR, a spiroxatrine pedig az α_{2C} -AR szelektív antagonistájának tekinthető. Az α_{2A} -AR-on keresztül gyenge összehúzódások jöttek létre, az α_{2B} -AR stimulációja erős kontrakciókat eredményezett, míg az α_{2C} -AR is csökkentette a kontrakciókat. A relaxációs válaszokhoz kapcsolódóan emelkedett szöveti cAMP szint is. Úgy tűnik, hogy a vemhesség a G-protein aktivációt megváltoztatja. Mivel az ARC239 kifejezett relaxáló hatást fejtett ki a NA által stimulált kontrakciókra; ezért hatékonyságát kipróbáltuk hormonális koraszülés modellből

származó uterusz szöveten is, amelyben felére csökkentette a kontrakciókat. Ezek alapján 22 napos vemhes patkányok uteruszában az α_{2B} -AR-ok dominálnak és közvetítik a kontrakciót, míg az α_{2A} - és α_{2C} -AR-okon keresztül a NA összehúzó hatása csökken. Az α_{2A} - és α_{2C} -AR-ok stimulálása vagy az α_{2B} -AR gátlása új támadáspontot kínál a tokolitikus terápia számára.

5.2. Adrenerg hatások a cervixben

Kísérleteinkben arra is kerestük a választ, hogy a már terápiában használt, valamint potenciálisan tokolitikus adrenerg hatóanyagok milyen hatást gyakorolnak a cervix rezisztenciára. Elsőként terápiában már alkalmazott β_2 -AR agonista hatás cervikális következményeit vizsgáltuk a vemhesség 18., 20., 21 és 22. napjain in vitro cervix rezisztencia modellen terbutalinnal. A 18. és 20. napon a terbutalin mérsékelten növelte a cervix rezisztenciát, míg a 21. és 22. napon jelentős mértékben fokozta azt. Ez utóbbi vemhességi napokon a cervix rezisztenciája jelentősen csökken patkányban, amelyet a β_2 -AR agonista hatás jól ellensúlyoz. A hatás hátterében igazoltuk a β_2 -AR receptorok jelenlétét, valamint a cervix szövetekben a G-protein aktiváció csökkenését a gesztációs idő előrehaladtával. A terbutalin felfedezett cervix rezisztencia növelő hatása hozzájárulhat a β_2 -AR agonisták klinikai alkalmazásának további mérlegeléshez a szülészetben.

Az α_1 -AR altípusok közül valamennyit sikerült kimutatnunk a cervixben a vemhesség 18., valamint 20-22. napjain. A nem vemhes cervixhez képest mindegyik altípus expressziója jelentősen megemelkedett a vemhesség 18. napjára, ugyanakkor további változást nem tapasztaltunk. Az inverz agonista altípus szelektív szerek közül csak az α_{1A} -AR antagonistá WB4101 volt képes fokoznia cervix rezisztenciát, a többi altípuson keresztül hatást nem tudtunk kiváltani. Az α_{1A} -AR-ok gátlásával a cervix rezisztencia a vemhesség előrehaladtával egyre erősödött, a legintenzívebb hatást a vemhesség utolsó két napján tapasztaltuk, mely változást a cervix szövetben mért, pertussis toxin (PTX) szenzitív G-protein aktiválódás is igazolt. Az α_{1A} -AR gátlása fokozza a cervix rezisztenciát és ez hozzáadódik az uterusz kontrakciót gátló hatáshoz.

Mindhárom α_2 -AR altípust azonosítottuk a vemhesség 18. és 20-22. napjain. A receptor fehérje expresszió változásai hozzávetőlegesen 1 napos késéssel követték az mRNS-szintek változásait. A különböző α_2 -AR altípusok stimulációjának cervix rezisztenciára kifejtett hatásait a szöveti cAMP szint változással párhuzamosan mértük az uterusz esetén már alkalmazott altípus szelektív gátló vegyületek jelenlétében. Az α_{2A} -AR stimulálása a cAMP-szint csökkenésével együtt növelte cervix rezisztenciát, míg ugyanez a 20. napon ellentétes

hatást eredményezett. A spiroxatrine jelenlétében a NA hatása megszűnt. A 18. vemhességi napon a PTX jelenlétében a szöveti cAMP szint fokozódott és a cervix rezisztencia csökkent. A NA önmagában és ARC239 jelenlétében kifejtett hatását a PTX megszüntette, ami az α_{2A} -AR-ok (és esetleg az α_{2C} -AR-ok) G_i -kapcsoltságát jelzi a vemhesség 18. napján. A 20. vemhességi napon a PTX előkezelés nem változtatta meg a cervix rezisztenciát, a cAMP-szintet vagy a NA önálló, illetve az ARC 239 jelenlétében kifejtett hatását, ami arra utal, hogy a 20. napon az α_{2A} -AR (és α_{2C} -AR) G_s -fehérje kapcsolatos lehet. Az α_2 -AR-ok hajlamosak a homo- és heterodimerizációra, illetve, ha az α_{2A} -és α_{2C} -AR-ok egyidőben expresszálódnak, akkor nagyobb a valószínűsége annak, hogy a két AR inkább heterodimereket képez. Eredményeink azt mutatták, hogy az ezen altípusokon keresztül közvetített hatások azonosak; ezért feltételezzük ezen altípusok dimerizációját a vemhes patkány cervixben. A 21. vemhességi napon a NA cervix rezisztenciát növelt, és meglepő módon ez a hatás a spiroxatrine jelenlétében is megmaradt. Ebből arra lehet következtetni, hogy ezen a vemhességi napon a hatás közvetítésében valószínűleg az α_{2A} - és α_{2B} -AR-ok játszanak szerepet, míg az α_{2C} -AR nem vesz részt hatásban. PTX-kezelést követően a NA önálló, illetve spiroxatrine jelenlétében kifejtette hatása megszűnt, azaz a 21. vemhességi napon az agonista hatás túlnyomórészt G_i -fehérje kapcsolatosan valósul meg.

A 22. napon azonban a NA nem tudta befolyásolni az egyébként jelentősen csökkent cervix rezisztenciát, valamint nem volt hatással a cAMP termelésre sem. Feltételezzük, hogy α_2 -AR-ok G -fehérje kapcsoltsága a vemhesség utolsó napján megszűnik. Mindezek alapján a patkányban a vemhesség végén a vemhességi napoktól függően változhat az altípus szelektív α_2 -AR antagonisták hatása, az $\alpha_{2B/C}$ -AR gátlók a cervix rezisztencián keresztül összességében kedvező hatást fejthetnek ki a koraszülés megakadályozására.

5.3. β_2 -AR agonista kombinációk

Legelőször azt vizsgáltuk, hogy a P4 előkezelés képes-e fokozni a terbutalin vemhesség végére csökkenő relaxáló hatását. Az 1 hétig végzett P4 kezelés megemelte a plazma P4 szintjét, de nem változtatta meg az E2 szintet, amivel a vemhesség 22. napjára csökkent az E2/P4 arányt. A megemelkedett P4 szint jelentősen fokozta a terbutalin relaxáló hatását a vemhesség 22. napján. A fokozódás háttérében részben a P4 β_2 -AR expressziót fokozó hatása áll, valamint igazoltuk, hogy P4 kezelés képes módosítani a terbutalin kiváltotta β_2 -AR-on keresztüli G -fehérje aktivációt a vemhesség utolsó napján. Ennek további igazolására in vivo koraszülés modellben vizsgáltuk meg a kombináció hatásosságát. Vizsgálatainkban β_2 -AR agonistaként salmeterolt használtunk. A salmeterollal kombinációban mind P4-t,

mind pedig a terápiában preventív céllal sok évig használt 17α -hidroxi-progeszteron-kapronátot (17OHP) használtunk ozmotikus minipumpában, mely 7 napon keresztül folyamatos hatóanyagleadást biztosított. A hormonálisan kiváltott koraszülést a gesztagén kezelés önmagában nem akadályozta meg, azonban a salmeterol kezelés hatékonyan késleltette a koraszülést, és ez a hatás megkétszereződött a gesztagénnel való kombináció során függetlenül a kezelés kezdő napjától: már a mifepristone és a PGE_2 beadása előtti egynapos gesztagénkezelés is potenciozta a salmeterol hatását. Feltételezzük, hogy a hormonálisan indukált koraszülésmodellben a salmeterol és a gesztagén vegyületek kombinációi által kifejtett gátló hatás érvényesülhet klinikai körülmények között is. Ha figyelembe vesszük, hogy mind β_2 -AR agonisták, mind a gesztagének farmakokinetikájuk és toxicitásuk tekintetében jól ismertek, akkor a kombinációjuk várható terápiás kockázata viszonylag alacsonynak tűnik. A kombináció alkalmas lehet a fenyegető koraszülés preventív terápiájára, de az akut terápia sikere sem zárható ki.

A β_2 -AR agonistákat **Ca^{2+} -csatorna blokkolókkal** is kombináltuk, melyre nifedipint használtunk, vizsgálatainkat a vemhesség utolsó, 22. napján végeztük. Emellett lehetőségünk volt humán császármetszéses szöveteken is mérni, illetve a kombináció hatásosságát hormonális koraszülésmodellben is teszteltük patkányban. A nifedipin potenciozta a terbutalin uterorelaxáns hatását mind patkányban, mind a humán szöveten. Humán uteruszon a nifedipin jelenlétében a terbutalin relaxáló hatása már nagyon alacsony koncentrációban is megnőtt. A nifedipin-salmeterol kombináció hatékonyságát hormonálisan indukált koraszülés modellben is megvizsgáltuk patkányokban in vivo. A 16. vemhességi napon megkezdett, csak nifedipinnel történő kezelés hatékonyabban késleltette a koraszülést, mint a salmeterol, és a salmeterol-nifedipin kombináció is lényegesen nagyobb hatást fejtett ki, mint a salmeterol-gesztagén kombináció. A salmeterol-nifedipin kombináció 18. vemhességi napon megkezdett rövid távú hatásvizsgálata során ugyanolyan hatásos volt, mint a 16. vemhességi napon megkezdett kezelés esetén. A koraszülés kiváltása előtt egy nappal elindított kombinációs kezelésben a nifedipin a salmeterol önálló hatását mintegy megháromszorozta, és az ellés idejét kitolta a 21. vemhességi nap végéig. Ez patkány esetében a leghosszabb időtartamú ellést késleltető hatásnak bizonyult eddigi koraszüléssel vizsgálataink során.

A **foszfodiészteráz (PDE)-gátlókkal** való kombináció során a patkány kísérletekben a normál vemhességből származó uterusz mellett az LPS indukált, gyulladásszerű koraszülés modellből származó szöveteken is végeztünk vizsgálatokat. Vizsgálatainkban a rolipram

fokozta a terbutalin relaxáló hatását mind az intakt, mind pedig az LPS-kezelt patkányokban. A legintenzívebb hatást az LPS-kezelt patkány uteruszon észleltük, ami megerősítése annak, hogy a cAMP-függő mechanizmusok gyulladás esetén jelentős szerepet játszanak a méhben. A terbutalin és a rolipram kombinációjának jelentős uterorelaxáns hatását a szöveti cAMP-szint emelkedés is igazolta, a legmagasabb értékeket az LPS-kezelt patkányoknál találtuk. Gyulladás esetén a késői vemhes uterusz nagyobb érzékenységgel reagál a cAMP-függő relaxációs mechanizmusokra, ami a tokolitikus terápia szempontjából előnyös lehet. Ezt az előnyt igazoltuk a humán uteruszon végzett vizsgálatainkban, mely során normál terminusból és koraszülésből származó császármetszéses mintákon teszteltük a kombináció hatékonyságát, illetve megmértük a cAMP mennyiségét és a PDE4 altípusok expresszióját is. A rolipram a humán uteruszban is fokozta a terbutalin relaxáló hatását a normál és koraszüléssel terhességből származó mintákon, potenciáló hatása alacsonyabb terbutalin koncentráció és koraszülés esetén volt a legkifejezettebb. A szöveti cAMP-szintek összhangban voltak az *in vitro* kontraktilitási vizsgálatok eredményeivel. A PDE4B expresszió növekedését mutattuk ki koraszüléssel mintákban a normál terminusból származó szövetekhez képest, ami a koraszüléshez vezető gyulladásos folyamatok következménye lehet. A PDE4D expressziója kisebb volt a normál terhességből származó mintákban a PDE4B-hez képest, ugyanakkor az expressziója jelentősen csökkent a koraszüléssel mintákban. Ezek alapján a PDE4D gátlása valószínűleg nem célravezető a hatékony tokolízishez, ugyanakkor a PDE4B-szelektív gátlók fejlesztése indokolt lehet, mely azzal az előnnyel járhat, hogy megszűnik a nemkívánatos hányást okozó mellékhatás.

Az egyik különleges β_2 -AR agonista kombináció az **A-kináz horgonyzó fehérje-protein kináz A (AKAP-PKA) gátlóval** történő együttes alkalmazás volt vemhes patkány uteruszon. Az FMP-API-1 gátolja az AKAP-PKA interakciót, és ezáltal hatással van az adenil-cikláz aktivitásra, fokozta a β_2 -AR-okon keresztül indukált cAMP-termelődést a 22. napos vemhes patkány uteruszban. A terbutalin koncentrációjának növelése az AKAP-PKA inhibitor jelenlétében ugrásszerű emelkedést eredményezett a szöveti cAMP szintben, ami a maximális kontrakció gátló hatás jelentős emelkedésében is megnyilvánult. A szinergizmus hátterében feltehetően az AKAP150-PKA kapcsolódás gátlása áll, mely felelős a miometriális kontrakciók erősítéséért. Így az AKAP-PKA rendszerre ható inhibitorok a β_2 -AR izgatókkal adva szintén egy lehetséges új kombináció a tokolízis terápiájában.

Az α_{1A} -AR antagonistákkal (5-MU, WB4101) való kombináció jelentősen növelte a β_2 -AR agonisták (terbutalin, ritodrin) uterorelaxáns hatását. A kombinációban tapasztalt β_2 -AR agonista EC_{50} érték jelentős csökkenése és a maximális hatás (E_{max}) növekedése lehetőséget

adhat β_2 -AR agonista dózis csökkentésére, így kisebb lehet a tokolitikus terápia súlyos mellékhatásainak kockázata. Az α_{1A} -AR antagonistákkal való kombináció előnyös lehet a terhességi toxémia esetén, valamint gesztációs hipertóniában is.

5.4. α_1 -AR antagonisták kombinációk

Megvizsgáltuk az E2 és a P4 előkezelés hatását az α_1 -AR altípusok működésére és expressziójára a késői vemhes patkány uterusban *in vitro*. Az E2 előkezelés csökkentette az α_1 -AR-okon keresztül a NA maximális összehúzó hatását és jobbra tolta a NA koncentráció-válasz görbét, ami a receptorok NA iránti csökkent érzékenységét jelzi. A P4 előkezelés több mint felére csökkentette a NA maximális összehúzó hatását. Mindez megerősíti, hogy mind az α_{1A} -AR, mind pedig az α_{1D} -AR részt vesz az uterusz kontrakciók létrehozásában.

A WB 4101 jelenlétében sem az E2, sem a P4 nem változtatta meg az α_{1D} -AR-ok mRNS expresszióját, ugyanakkor ez nem magyarázza, hogy a P4 előkezelés miért csökkenti a NA hatását. Az E2 előkezelés nem okozott semmilyen változást, míg a P4 előkezelés az α_{1D} -AR-on keresztül csökkentette a NA EC_{50} és E_{max} értékeit. A WB 4101 jelenlétében a NA mérsékelten növelte a [35 S]GTP γ S aktiválódást, amit a P4 előkezelést tovább fokozott. PTX és WB 4101 jelenlétében a NA G-protein kötődést serkentő hatása csökkent, sőt gátlásba fordult át, mely a P4 előkezelést követően volt a legmarkánsabb. Ebből arra következtetünk, hogy a P4 dominancia esetén az α_{1D} -AR G_i -proteinhez is kapcsolódik. A P4 előkezelés az α_{1D} -AR $G_{q/11}$ -protein kapcsolódás gátlásához vezet, ami az intracelluláris Ca^{2+} és a NA által kiváltott kontrakciók csökkenését eredményezheti.

A BMY 7378 jelenlétében a NA csak az α_{1A} -AR-okat tudta stimulálni. A P4 előkezelés nem változtatta meg az α_{1A} -AR expresszióját, azonban az E2 előkezelés csökkentette azt, ami magyarázatot adhat a NA csökkent összehúzó hatására, ugyanakkor nem magyarázza a P4 kontrakciót gátló hatását. A [35 S]GTP γ S-kötési vizsgálatokban az α_{1A} -AR keresztül a NA fokozta a G-protein aktiválódást. Az E2 előkezelés nem változtatta meg a NA hatását, míg a P4 növelte azt. A PTX a P4 előkezelés kiváltotta G-fehérje stimulációt gátlássá változtatta, ami azt jelenti, hogy a P4-kezelést követően az α_{1A} -AR esetében is csökken a $G_{q/11}$ -protein kapcsoltság. A nemi hormonok szintjének változása jelentősen befolyásolhatja az α_1 -AR altípusokon végbemenő jelátviteli folyamatokat, a P4 előkezelés erősíti a potenciálisan tokolitikus antagonisták uterorelaxáns hatását.

5.5. α_2 -AR antagonisták kombinációi

Megvizsgáltuk a női nemi hormonok hatását az α_2 -AR altípusok uterus kontraktilitásában játszott szerepére is. Az E2 előkezelés csökkentette az α_2 -AR altípusainak mRNS- és fehérjeexpresszióját, és az α_2 -AR-okon keresztül csökkentette a NA által kiváltott kontrakciót is. Az E2 előkezelés csökkentette az α_2 -AR-okon keresztül a NA által kiváltott kontrakciók nagyságát, de nem módosította az α_{2A} -AR-okon keresztül a relaxáló hatást. Ugyanakkor megszüntette az α_{2B} -AR-okon keresztül az összehúzó hatást fokozó hatást. Valószínűsíthető, hogy az E2 nem módosította az α_{2C} -AR-okon keresztüli relaxáló hatást sem. Az E2 előkezelés nem módosította a NA indukált cAMP-szint változást az α_{2A} -AR-on keresztül, ugyanakkor fokozta azt az α_{2B} -AR-okon keresztül, ami magyarázatot adhat a NA gyengébb kontrakciós hatására. Az E2 nem módosította a NA α_{2A} -AR-on keresztüli [³⁵S]GTP γ S aktivációját, azonban PTX jelenlétében az α_{2A} - és α_{2B} -AR-okon keresztül csökkent a NA [³⁵S]GTP γ S aktiválódásra gyakorolt hatása, lényegében a stimuláció gátlásba fordult át. Ezek alapján az E2 előkezelés elsősorban az α_{2B} -AR G-protein kapcsoltságát módosítja, míg az α_{2A} -AR G-fehérje kötődését nem változtatja meg. A P4 előkezelés fokozta a 22 napos vemhes uterusban az α_2 -AR altípusok mRNS és fehérje expresszióját, csökkentette a NA által kiváltott kontrakciókat, megszüntette a NA α_{2A} -AR-on keresztüli kontrakciós hatását, emellett gátolta az α_{2B} -AR-on keresztüli összehúzó hatását is. Feltételezzük, hogy a P4 az α_{2C} -AR megnövekedett száma és fokozott működése révén idézi elő a NA hatásában tapasztalható csökkenést. A P4 előkezelés megnövelte az uterusban a cAMP-szintet, ami az α_2 -AR-okon keresztüli csökkent NA hatást magyarázza. Az α_{2A} -AR-on keresztül nem változtatta meg, azonban az α_{2B} -AR-on keresztül növelte a cAMP-szintet, ami magyarázhatja a NA gyengébb kontrakciós hatását. Azt is megvizsgáltuk, hogy a P4 módosítja-e az α_2 -AR altípusok [³⁵S]GTP γ S aktiváló képességét PTX jelenlétében a vemhesség végén. A P4 nem változtatta meg az α_{2A} -AR-on keresztüli, PTX érzékeny [³⁵S]GTP γ S aktivációt, ugyanakkor kifejezetten gátolta az α_{2B} -AR-on keresztüli aktivációt. A P4 túlsúlya esetén az α_{2B} -AR -legalább részben- G_s-fehérjéhez kapcsolódik, ami az adenilcikláz aktiválódásához vezet, és csökkenti a NA által kiváltott kontrakciót. Összességében úgy gondoljuk, hogy az α_{2C} -AR agonisták P4-nal való együtt adása lehet terápiás értékű egy kombinációs tokolitikus fejlesztés során.

5.6. Peptid támadáspontok

A peptid támadáspontok vizsgálata során a nociceptin, nocistatin, kisspeptin, leptin, adiponectin és a gyulladáscsökkentő citokinek vemhes patkány uteruszra, illetve a nociceptin és

nocistatin esetén humán terhes uteruszra gyakorolt gátló hatását, illetve ezek lehetséges mechanizmusait vizsgáltuk.

5.6.1. Nociceptin és nocistatin

A nociceptin gátolta a KCl által kiváltott ritmikus összehúzódásokat. A naloxon (NX) jelentősen növelte a nociceptin relaxáló hatását, ami felvetette annak a lehetőségét, hogy az NX önmagában is uterorelaxáns lehet, azonban önálló relaxáló hatása nem volt. A nociceptin receptor (ORL1) G_i -protein kapcsolt receptor, a nociceptin G-protein-aktiváló hatását megvizsgáltuk késői vemhességéből származó patkány uteruszokon. Azt találtuk, hogy a nociceptin az ORL1 receptorokon keresztül fokozza az aktivált G-proteinek mennyiségét. A NX jelenléte csökkentette a G-protein aktivációt és növelte a nociceptin uterusz relaxáló hatását és a szöveti cAMP szintet is. A NX és a G_i -protein gátló PTX együttes jelenlétében a nociceptin G-protein aktiváló képessége tovább csökkent, a szöveti cAMP szint pedig tovább emelkedett. Mindez azt sejteti, hogy az ORL1 valószínűleg mind G_i -, mind pedig G_s -fehérjékhez is kapcsolódik a késői vemhes patkány uteruszban. Feltételezzük, hogy a nociceptin és a NX verseng az intracelluláris G_i -fehérje aktiválásáért. A K^+ csatornák tetraetil-ammónium (TEA) vagy paxilline (PAX) általi blokkolása csökkentette a nociceptin vagy a nociceptin és NX relaxáló hatását, ami arra utal, hogy a nociceptin vemhes patkány uteruszra gyakorolt hatását részben a magas konduktanciájú Ca^{2+} -szenzitív K^+ -csatorna (BK_{Ca}) közvetíti.

A nocistatin nem befolyásolta az oxitocinnal kiváltott uterusz kontrakciókat, ugyanakkor gátolta a KCl által kiváltott összehúzódásokat, melyet a nociceptin tovább erősített, így a központi idegrendszerben tapasztalt antagonista viszony helyett szinergizmust tapasztaltunk az uterusz simaizomzatán a két peptid között. A nocistatin önálló gátló hatása nagyobb volt, mint a nociceptiné. További érdekesség, hogy a NX gátolta a nocistatin hatását önmagában és a nociceptin jelenlétében is, ami azért is meglepő, mert a nocistatin nem kötődik sem a klasszikus ópiát receptorokhoz, sem pedig az ORL1-hez. A PAX a nocistatin esetén is gátolta a relaxációt, így a BK_{Ca} a nocistatin esetén is szerepet játszik az intracelluláris jelátvitelében.

Mivel a gyulladáshoz vezető mediátorok is szerepet játszanak a szülés megindulásában, melyek közül a calcitonin gén-rokon peptid (CGRP) relaxáló hatással rendelkezik, ezért a CGRP lehetséges szerepét is megvizsgáltuk a nocistatin relaxáló hatásában. Vizsgálatainkban a kapszaicin kezelés blokkolta nocistatin relaxáló hatását, amely azonban helyreállt, miután a szövetmintákat CGRP-vel inkubáltuk. Feltételezzük, hogy nocistatin elősegítheti a neuropeptid felszabadulását az érzőidegekből.

A nociceptin és nocistatin relaxáló hatását megvizsgáltuk humán szövetmintákon is. Mind a nociceptin, mind pedig a nocistatin gátolta az oxitocin kiváltotta kontrakciókat, de egymás hatást csak úgy tudták fokozni, ha a nocistatin jelenlétében vettük fel a nociceptin dózis-hatás görbét. Ez jelentős eltérés a patkány eredményekhez képest és felveti annak lehetőségét, hogy humán uteruzson a CGRP mediált hatás nem igazán jelentős. A nociceptin és nocistatin analógok új hatásmechanizmussal szolgálhatnak a tokolitikus terápia számára.

5.6.2. Kisspeptin

A kisspeptin mind a nem vemhes, mind pedig a vemhes uteruzson koncentráció függően gátolta a kontrakciókat, relaxáló hatása a nem vemhes és a korai vemhes (5. nap) uteruzokban volt a legerősebb, míg a vemhesség előrehaladtával a gátló hatása fokozatosan csökkent. Hasonló csökkenést találtunk a kisspeptin receptor (Kiss1R) mRNS és fehérje expressziójában, valamint az immunfestődés intenzitásának változásában is. A legintenzívebb Kiss1R festődést a nem vemhes szöveteken tapasztaltuk, míg a legalacsonyabb receptor-expressziót az utolsó vemhességi napon találtuk. Eredményeink arra utalnak, hogy a Kiss1R relaxáló hatást közvetíti a nem vemhes és vemhes patkány uteruzban. Ahogy a vemhesség előrehaladtával az összehúzódások intenzívebbek lesznek, a Kiss1R expressziója fokozatosan csökken, ami az uteruz nyugalmi állapotának fenntartásában betöltött szerepére utal. A Kiss1R aktivációjának fenntartása a terhesség alatt csökkentheti a vetélés vagy a korai összehúzódások kockázatát, és a jövőben új gyógyszercélpontként szolgálhat a koraszülés megakadályozása érdekében, valószínűleg preventív céllal.

5.6.3. Leptin, adiponectin

A molekuláris (RT-PCR, Western blot) és az immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a leptin receptor (LEPR) főként a nem vemhes méh miometriális rétegében expresszálódik. A vemhesség korai szakaszában a LEPR expressziója jelentősen megnövekedett, különösen az endometriumban. A vemhesség közepén (15. és 18. nap) azonban az expresszió csökkent, a receptorok többsége a miometriumban helyezkedik el. A leptin által kiváltott relaxáló hatás az uteruzban a vemhesség vége felé fokozatosan csökkent. A leptin relaxáló hatásának változása nem áll párhuzamban a LEPR expressziójának változásával a vemhességi alatt, ami arra utal, hogy a jelátviteli utak vagy a LEPR érzékenységének megváltozása lehet a felelős a gyengébb gátló hatásért a terminusban.

Az adiponectin hatása összetettebb a leptinhez képest, mivel két receptor is közvetíti. Ezeknek a receptoroknak a stimulálása elsősorban az AMPK és a PPAR α útvonalakat

aktiválja. Az adiponectin-1 receptor (AdipoR1) expressziója jelentősen csökkent az endometrium eltávolítása után a nem vemhes mintákban, míg az AdipoR2 főként a nem vemhes miometriumban expresszáldott. Az adiponectin relaxáló hatása az endometrium hiányában csökkent, ami azt sugallja, hogy az AdipoR1 kulcsfontosságú a hatáshoz, és az endometriális AdipoR1 jelentős szerepet játszik a nem vemhes méh relaxációjában. Vemhességben az adiponectin relaxáló hatása megmarad, azonban a vemhesség utolsó napján relaxáló hatása megszűnik. Ezzel párhuzamosan mindkét AdipoR expressziója csökken a vemhesség előrehaladtával, a változások immunhisztokémiai módszerrel is egyértelműen kimutathatók.

Ezek alapján feltételezzük, hogy mindkét vizsgált adipokinnek szerepe van az uterusz nyugalmi állapotának fenntartásában a vemhesség elején és közepén. A leptin és adiponectin analógok is alkalmasak lehetnek a koraszülés megelőzésében, mint új hatásmechanizmusú hatóanyagok.

5.6.4. Obezitás és gyulladás: adipokinek és citokinek

Az obezitás és a gyulladás vemhes uterusz kontrakciókra gyakorolt következményeit, illetve az adipokinek és a terbutalin hatásmódosulását kétféle vemhes patkány modellben vizsgáltuk.

Az elhízást HFHSD segítségével váltottuk ki. A 9 hetes HFHSD növelte a testtömeget és csökkentette a glükóztoleranciát, fokozta a magzat/placenta tömeg arányt, módosította a teljes zsírtömeget és a különböző típusú zsírszövetek eloszlását is. A viscerális és a pink zsírszövetek jelentős, míg a gonadális zsírszövetek mérsékelt növekedést mutattak, a pink zsír aránya csökkent a viscerális vagy gonadális zsírokhoz képest. Mivel a pink zsírszövet döntő fontosságú a tejelválasztás fenntartásához, így az elhízás kedvezőtlenül befolyásolhatja patkányoknál a laktációt is. A HFHSD növelte a Kiss1R és LEPR, de nem változtatta meg az AdipoR-ok expresszióját a 22. napos vemhes uteruszban. Az adipokinek közül csak a leptin plazmaszintje emelkedett. Mindez arra utal, hogy a leptin útvonalnak van a legerősebb, míg az adiponectin útvonalnak lehet a leggyengébb hatása a HFHSD által kiváltott méhösszehúzódnások módosításában. Emellett a HFHSD jelentősen megnövelte a 22. napos vemhes patkányok P4 szintjét, ami az uterusz relaxációt támogatja. A gyulladáscsökkentő citokin IL-10 plazmaszintje csökkent, két másik proinflammatorikus citokin (KC és TNF α) szintje is mérséklődött. A proinflammatorikus citokinek (IL-1 β , IL-6 és TNF α) szintje is jelentősen csökkent a zsírszövetekben. Összességében e citokinek együttes változása inkább a gyulladáscsökkentő folyamatok túlsúlyára utal.

A HFHSD hatására a spontán vemhes uterusz összehúzódások csökkentek, míg az oxitocin vagy a $\text{PGF}_{2\alpha}$ által kiváltott válaszok nem változtak, ami arra utal, hogy az elhízás csökkenti az alapaktivitást, de nem befolyásolja a vemhes uterusz stimulálhatóságát. Az oxitocin által kiváltott összehúzódások esetében a HFHSD megszüntette a kisspeptin relaxáló és a leptin kontraháló hatását. A $\text{PGF}_{2\alpha}$ kontrakciók esetében a kisspeptin relaxáló hatása erősebb volt a HFHSD csoportban. Az adiponectin csak a HFHSD csoportban váltott ki relaxáló hatást. A kisspeptin és az adiponectin a kontroll patkányokban csökkentette a cervix rezisztenciát, míg a leptin hatástalan volt. Az elhízás csökkentette patkányokban a cervix rezisztenciát, amit a kisspeptin jelenléte fokozott. A HFHSD csoportban az adiponectin hatástalan volt, míg a leptin rezisztenciacsökkentő hatással bírt. Ezek alapján az elhízás és az adipokinek cervix rezisztenciára gyakorolt eredő hatása komplexitásuk miatt nehezen meghatározható. Összességében az elhízás a vizsgált adipokinek uterusz relaxáló és cervix rezisztencia növelő hatását nem erősíti, sőt, kifejezetten gyengítheti. Így ezen adipokin célpontok valószínűleg nem élveznek prioritást az elhízással járó terhességek során fellépő koraszülési komplikációk csökkentésében. Azonban azt is hangsúlyozni kell, hogy patkány esetén a gesztációs obezitás nem teljesen jól modellezi a humán változásokat.

Azt is megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja az intrauterin gyulladás a β_2 -AR agonisták relaxáló hatását vemhes patkány modellen. Az LPS-kezelt patkányok uterusza érzékenyebb volt terbutalinra, amit a koncentráció-hatás görbe balra tolódása jelzett. A β_2 -AR expressziója nem változott a gyulladás következtében, azonban megnövekedett a terbutalin hatására keletkező intracelluláris cAMP mennyisége. Feltételeztük, hogy az LPS indukált gyulladásban is szerepet játszó $\text{TNF}\alpha$ lehet a felelős a terbutalin hatás érzékenyítésért, ezért a méréseket elvégeztük a $\text{TNF}\alpha$ gátló thalidomide jelenlétében is. A thalidomide előkezelés kivédte a $\text{TNF}\alpha$ LPS által kiváltott emelkedését és megakadályozta a terbutalin koncentráció-hatás görbéjének balra tolódását, valamint a cAMP szint növekedését is. A $\text{TNF}\alpha$ valószínűleg nem az egyetlen citokin, amely részt vesz ebben a szabályozási folyamatban. Ezek alapján a tokolitikus terápia során a gyulladás indukálta koraszülés kapcsán a $\text{TNF}\alpha$ gátlás biztosan csökkenti a gyulladás intenzitását, de egyúttal csökkentheti a tokolitikumok hatékonyságát, legalábbis a β_2 -AR agonisták esetén. Autoimmun kórképekben a $\text{TNF}\alpha$ gátló antitestek terhesség alatti alkalmazása lehetséges, az első trimeszterben nem jutnak át a placentán, így az esetleg tokolitikus kezelés során fellépő interakciónak lehet klinikai jelentősége.

5.7. Antioxidáns hatás jelentősége

A reaktív oxigén termékek (ROS) egyes ligandumok, köztük különböző növekedési faktorok és az adrenerg szignálmechanizmus másodlagos hírvivőjeként is működnek, melyek szerepet játszanak a vemhes méh simaizomzatának szabályozásában is. Ezért feltételeztük, hogy az antioxidánsok kölcsönhatásba léphetnek a β -AR-ok szignálmechanizmusával.

5.7.1. β -AR agonista hatás módosítása antioxidánsal

Az antioxidáns tokoferol jelenléte nem befolyásolta a β -AR agonista terbutalin uterusz relaxáló és cervix rezisztenciát fokozó hatását. A 7 napig tartó P4 előkezelés megnövelte terbutalin hatását mind az uteruszon, mind pedig a cervixen, melyet a szöveti cAMP szint változás is igazolt. A tokoferol azonban jelentősen csökkentette a P4 előkezelt szöveteken a terbutalin cervix rezisztenciát növelő hatását, ami a cAMP szintben csökkenésben is megmutatkozott. Ezek alapján a ROS szükséges a β -AR-hoz kötött cAMP-szint emeléshez a P4 indukált cervixben, míg a vemhes uteruszban jelentősége elhanyagolható. Mindez felveti a ROS-termelés β -AR-stimulációt követő szövetspecifikus szabályozását a simaizomzatban. Érdekes módon a terbutalin által kiváltott hatást a tokoferol csak a cervixben gátolta, ahol az OSI nagyobb volt, míg hatástalan maradt az uteruszban. Feltételezzük, hogy a magasabb szöveti OSI érték a ROS/szabad gyökök nagyobb jelentőségét vetíti előre a β -AR szignálmechanizmusában. Eredményeink alapján az antioxidáns hatás ronthatja a β -AR agonisták cervix rezisztenciát fokozó hatását a terhesség végén, ami csökkentheti tokolitikus hatékonyságukat.

5.7.2. Az antioxidáns COX-gátló hatást módosító effektusa

Azt is megvizsgáltuk, hogy a COX-gátlók uterusz és cervikális hatását hogyan befolyásolja az antioxidáns jelenléte. Méréseink alapján patkányban a nem vemhes méhben a COX-1 és COX-2 aktivitás nagyjából azonos volt, míg a vemhes uteruszban a COX-2 aktivitása kisebbnek mutatkozott. Emellett a vemhes méh COX összaktivitása magasabb volt a nem vemheshez képest. A szelektív COX-2 gátló rofecoxib relaxáló hatása nagyobb volt a diklofenákhöz hasonlítva mind a vemhes, mind pedig a nem vemhes szöveteken. Az eredmények arra utalnak, hogy mind a COX-1, mind a COX-2 enzimek szerepet játszanak a méhösszehúzóerőkben, de a relaxációs hatás kifejezettebb a COX-2 gátlásán keresztül. A tokoferol nem befolyásolta a diklofenák és a rofecoxib relaxáló hatását a nem vemhes uteruszon, azonban vemhes szöveteken mindkét COX-gátló hatását fokozta. A tokoferol önmagában indukálta a COX enzimeket, nagyobb mértékben fokozva a COX-2 aktivitását. Amikor a COX-1-et szelektív inhibitorral (SC-560) blokkoltuk, a rofecoxib relaxáló hatása önmagában is megnőtt, ami tovább fokozódott tokoferol jelenlétében. Amikor azonban a

COX-2-t a rofecoxib gátolta, a diklofenák koncentráció-hatás görbéje balra tolódott, a tokoferollal történő előkezelés után a görbék közötti szignifikáns különbség gyakorlatilag megszűnt. Mindez azt sejteti, hogy a vemhes méhösszehúzóásban a COX-2 termékek dominálnak, a tokoferol COX-2 aktivitást növelő képessége pedig a COX-gátlók relaxációs hatásának növekedéséhez vezethet.

Az antioxidáns tokoferol módosító hatását megvizsgáltuk cervixen is. A korábbi eredmények alapján azt vártuk, hogy a COX-gátlók a PG-ok szintjének csökkentése révén fokozni fogják a vemhes méhnyak rezisztenciáját. Meglepő módon azonban az SC-560 nem volt hatásos, míg a diklofenák és a rofecoxib csökkentette a rezisztenciát a vemhes mintákon. Mivel méréseinket a 22. vemhességi napon végeztük el, így a cervix minták már átestek az érési folyamaton. A cervix érése kapcsán korábban elsősorban a kollagéntartalomra fókuszáltak és alábecsülték a simaizomzat jelentőségét, a cervikális elégtelenséget kizárólag a kollagénhálózat zavaraként értelmezték. Ugyanakkor felmerült, hogy a cervikális simaizomzat szerepet játszik az érés során lejátszódó remodelling folyamatában is. A COX-gátlók hatásában mutatkozó különbségek is arra utalnak, hogy a COX felelős a cervikális simaizomzat működéséért is. Úgy tűnik, hogy a cervix érés és a spontán ellés szempontjából a COX-2 fontosabb, mint a COX-1, a COX-1/COX-2 arány a COX-2 irányába tolódott el. A tokoferol önmagában is csökkentette a vemhes cervix rezisztenciáját, és fokozta mind a diklofenák, mind pedig a rofecoxib rezisztencia csökkentő hatását, mely hatás a COX-1 szelektív gátló SC-560 jelenlétében is megmaradt. Mindez arra utal, hogy a COX-2 által közvetített PG felszabadulásnak döntő szerepe lehet a cervikális simaizom összehúzóadásában a szülés során.

In vivo ellési modellben a tokoferol és a rofecoxib együttes hatása a vemhességi időt átlagosan 16 órával rövidíti meg, ami arra utal, hogy a két vegyület közös hatásában a cervix rezisztencia csökkentés dominál az uterusz relaxációval szemben.

Összegezve megállapíthatjuk, hogy az antioxidáns tokoferol a terbutalin uterusz relaxáló hatását nem befolyásolja, viszont gyengíti a cervix rezisztenciát fokozó hatását. A COX-gátlók uterusz relaxáló hatását fokozza, ugyanakkor fokozza a cervix rezisztenciát csökkentő effektusukat is, ami összességében patkányban az ellési idő lerövidüléséhez vezet. Az, hogy ezek a hatások mennyiben függenek össze a tokoferol antioxidáns vagy esetleg egyéb más effektusával, további vizsgálatokat igényel. Valószínű, hogy a tokoferol terhesség alatti antioxidánsként való használata, különösen gyulladásozó folyamatok esetén, hozzájárulhat a gesztációs idő lerövidüléséhez, és akár a koraszüléshez vagy a koraszülés terápiájának gátlásához.

6. Új megállapítások

1. Patkányban a vemhesség végén β_2 -AR agonista hatásra fokozódik a cervix rezisztencia, melynek háttérében a β_2 -AR G_i -protein kapcsoltságának dominanciája áll.
2. Patkányban a vemhesség előrehaladtával az α_{1A} -AR gátlók uterusz relaxáló és cervix rezisztencia növelő hatása erősödik. A szerotonerg hatással nem rendelkező α_{1A} -AR-blokkolók relaxáló hatása erősebb.
3. Patkány uteruszban a vemhesség végén α_{2B} -AR gátlása uterorelaxáns és cervix rezisztencia növelő hatással bír. A kontrakciók gátlására az α_{2A} - és α_{2C} -AR izgatók is alkalmasak, az egyes α_2 -AR altípusok G-protein kapcsoltsága a vemhesség utolsó napjain jelentős diverzitást mutat.
4. A P4 előkezelés jelentősen megnöveli a β_2 -AR agonisták uterorelaxáns hatását, melynek háttérében a vemhesség utolsó napján a G_s -protein kapcsoltság fokozása áll.
5. A β_2 -AR agonisták uterorelaxáns hatása patkányban Ca^{2+} -csatorna blokkolók jelenlétében nagymértékben fokozódik, koraszüléssel modellen a kombináció a normál vemhességi terminus végéig nyújtja a gesztációs időt.
6. A β_2 -AR agonisták PDE4 gátlókkal kombinálva elsősorban gyulladáscsökkentő patkány koraszülés modellben, illetve koraszülésből származó humán mintákon hatékonyak. Utóbbi szövetekben PDE4B izoenzim dominancia mérhető.
7. A β_2 -AR agonisták AKAP-PKA gátlóval való kombinációja során a vemhes patkány uteruszban nagymértékben fokozódik a β_2 -AR-okon keresztüli cAMP termelődés és relaxáció.
8. A β_2 -AR agonisták α_{1A} -AR antagonistákkal való kombinációja patkányban növeli az uterorelaxáns hatást, mely előnyös lehet preeclampsia és terhességi hipertónia esetén.
9. A P4 előkezelés feltételezhetően a receptorok csökkent $G_{q/11}$ -protein kapcsoltságán keresztül fokozza a α_{1A} - és α_{1D} -AR antagonisták uterorelaxáns hatását.

10. Valamennyi α_2 -AR altípus expressziója csökken E2 előkezelés következtében, ami csökkenti az α_{2B} -AR mediált kontrakciót, melynek háttérében feltehetően a G_i -protein alegységek változó aktiválása állhat. A P4 előkezelés hatására valamennyi receptor altípus expressziója fokozódik és kontrakció csökkenés tapasztalható, melynek háttérében a megváltozott G-protein kapcsoltság és a megemelkedett szöveti cAMP szint igazolható.

11. A nociceptin és a nocistatin a gesztációs időszakban mind a patkány, mind pedig a humán uterusban szintetizálódik és szerepet játszik a méhkontrakciók gátlásában. A nociceptin az ORL1 receptoron, míg a nocistatin a CGRP felszabadulásán keresztül emeli az uterusban cAMP szintet.

12. A kisspeptin, leptin és adiponectin gátolják a vemhes patkány uterusz kontrakciókat, mely hatásuk a vemhesség előrehaladtával gyengül, szerepük valószínűleg az uterus nyugalmi állapotának fenntartásában van. A cervixen a kisspeptin és az adiponectin a vemhesség végén csökkenti a rezisztenciát. Patkány vemhességi obezításban a megemelkedett P4 és gyulladáscsökkentő citokin szint következtében a spontán kontraktilitás csökken, a vizsgált adipokinek relaxáló hatása nagymértékben függ a kontrakciót kiváltó ágenstől, a cervix rezisztenciára pedig egyedül a leptin van hatással, melyet csökkent.

13. Gyulladásos koraszülés modellben igazoltuk, hogy a megnövekedett TNF α szint szerepet játszik a β_2 -AR agonista terbutalin megnövekedett relaxációs hatásában, melynek háttérében a fokozott cAMP termelődés állhat.

14. Az antioxidáns tokoferol a terbutalin cervix rezisztenciát fokozó hatását gyengíti, míg a COX-gátlók cervix rezisztenciát csökkentő hatást erősíti, ami patkányban a gesztációs idő rövidüléséhez vezet.

7. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája

1. Ducza E, **Gaspar R**, Falkay G: Altered levels of mRNA expression and pharmacological reactivity of alpha(1)-adrenergic receptor subtypes in the late-pregnant rat myometrium. *MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT* 62: 3 pp. 343-347., 5 p. (2002)
2. Mihályi A, Ducza E, **Gaspar R**, Falkay G: Investigation of the role of the serotonergic activity of certain subtype-selective alpha(1A) antagonists in the relaxant effect on the pregnant rat uterus in vitro. *MOLECULAR HUMAN REPRODUCTION* 9: 8 pp. 475-480., 6 p. (2003)
3. Mihályi A, **Gáspár R**, Csonka D, Falkay G: Synergism between beta2-adrenoceptor agonists and subtype-selective alpha1A-adrenoceptor antagonists in the tocolytic effect on pregnant rat uterus in vitro. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY* 30: 3 pp. 164-167., 4 p. (2003)
4. **Gaspar R**, Kolarovszki Sipiczki Z, Ducza E, Paldy E, Benyhe S, Borsodi A, Falkay G: Terbutaline increases the cervical resistance of the pregnant rat in vitro *NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY* 371 pp. 61-71., 11 p. (2005)
5. **Gaspar R**, Ducza E, Mihályi A, Marki A, Kolarovszki-Sipiczki Zoltán, Paldy E, Benyhe S, Borsodi A, Foldesi I, Falkay G: Pregnancy-induced decrease in the relaxant effect of terbutaline in the late-pregnant rat myometrium: role of G-protein activation and progesterone. *REPRODUCTION* 130 pp. 113-122., 10 p. (2005)
6. **Gaspar R**, Gal A, Galik M, Ducza E, Minorics R, Kolarovszki-Sipiczki Z, Klukovits A, Falkay G: Different roles of alpha(2)-adrenoceptor subtypes in non-pregnant and late-pregnant uterine contractility in vitro in the rat. *NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL* 51: 5 pp. 311-318., 8 p. (2007)
7. Kolarovszki-Sipiczki Z, **Gaspar R**, Ducza E, Paldy E, Benyhe S, Borsodi A, Falkay G: Effect of alpha(1)-adrenoceptor subtype-selective inverse agonists on non-pregnant and late-pregnant cervical resistance in vitro in the rat. *CLINICAL AND EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY AND PHYSIOLOGY* 34: 1-2 pp. 42-47., 6 p. (2007)
8. Gálík M, **Gáspár R**, Kolarovszki-Sipiczki Z, Falkay G: Gestagen treatment enhances the tocolytic effect of salmeterol in hormone-induced preterm labor in the rat in vivo. *AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY* 198: 3 pp. 319.e1-319.e5., 5 p. (2008)
9. Gal A, Ducza E, Minorics R, Klukovits A, Galik M, Falkay G, **Gaspar R**: The roles of α 2-adrenoceptor subtypes in the control of cervical resistance in the late-pregnant rat. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY* 615: 1-3 pp. 193-200., 8 p. (2009)
10. 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 SCIENCES* 85: 15-16 pp. 568-572., 5 p. (2009)
11. Klukovits A, Marki A, Paldy E, Benyhe S, Galik M, Falkay G, **Gaspar R**: Inflammatory processes enhance camp-mediated uterus relaxation in the pregnant rat: the role of tnf-alpha. *NAUNYN-SCHMIEDEBERGS ARCHIVES OF PHARMACOLOGY* 379: 5 pp. 501-510., 10 p. (2009)
12. Hajagos-Tóth J, Kormányos Zs, Falkay G, Pál A, **Gáspár R**: Potentiation of the uterus-relaxing effects of B-adrenergic agonists with nifedipine: studies on rats and the human myometrium. *ACTA OBSTETRICIA ET GYNECOLOGICA SCANDINAVICA* 89: 10 pp. 1284-1289., 6 p. (2010)
13. 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 SCIENCES* 87: 23-26 pp. 733-737., 5 p. (2010)
14. Klukovits A, Tekes K, Gündüz Çınar Ö, Benyhe S, Borsodi A, Deák B H, Hajagos-Tóth J, Verli J, Falkay G, **Gáspár R**: Nociceptin inhibits uterine contractions in term-pregnant rats by signaling through multiple pathways. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 83: 1 pp. 36-41., 6 p. (2010)
15. Christian F, Szaszak M, Friedl S, Drewianka S, Lorenz D, Goncalves A, Furkert J, Vargas C, Schmieder P, Goetz F, Zuehlke K, Moutty M, Goetter 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, Klussmann E: Small molecule AKAP/PKA interaction disruptors that activate PKA interfere with compartmentalized cAMP signaling in cardiac myocytes. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 286: 11 pp. 9079-9096., 18 p. (2011)
16. Deak BH, Klukovits A, Tekes K, Ducza E, Falkay G, **Gaspar R**: Nocistatin inhibits pregnant rat uterine contractions in vitro: Roles of calcitonin gene-related peptide and calcium-dependent potassium channel. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY* 714: 1-3 pp. 96-104., 9 p. (2013)

17. Deák BH, Klukovits A, Kormányos Z, Tekes K, Ducza E, **Gáspár R**: Uterus-Relaxing Effects of Nociceptin and Nocistatin: Studies on Preterm and Term-Pregnant Human Myometrium In vitro. *REPRODUCTIVE SYSTEM AND SEXUAL DISORDERS* 2: 1 Paper: 1000117, 5 p. (2013)
18. Verli J, Klukovits A, Kormányos Z, Hajagos-Tóth J, Ducza E, Seres AB, Falkay G, **Gáspár R**: Uterus-relaxing effect of $\beta(2)$ -agonists in combination with phosphodiesterase inhibitors: Studies on pregnant rat in vivo and on pregnant human myometrium in vitro. *JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNAECOLOGY RESEARCH* 39: 1 pp. 31-39., 9 p. (2013)
19. **Gaspar R**, Hajagos-Tóth J: Calcium Channel Blockers as Tocolytics: Principles of Their Actions, Adverse Effects and Therapeutic Combinations. *PHARMACEUTICALS* 6: 6 pp. 689-699., (2013)
20. Hodi A, Foldesi I, Ducza E, Hajagos-Toth J, Seres AB, Klukovits A, **Gaspar R**: Tocopherol inhibits the relaxing effect of terbutaline in the respiratory and reproductive tracts of the rat: The role of the oxidative stress index. *LIFE SCIENCES* 105: 1-2 pp. 48-55., 8 p. (2014)
21. Bóta J, Hajagos-Tóth J, Ducza E, Samavati R, Borsodi A, Benyhe S, **Gáspár R**: The effects of female sexual hormones on the expression and function of $\alpha 1A$ - and $\alpha 1D$ -adrenoceptor subtypes in the late-pregnant rat myometrium. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY* 769 pp. 177-184., 8 p. (2015)
22. **Gáspár R**, Deák BH, Klukovits A, Ducza E, Tekes K: Effects of Nociceptin and Nocistatin on Uterine Contraction In: Gerald, Litwack (szerk.) *Vitamins and Hormones: Nociceptin opioid*. Waltham (MA), Amerikai Egyesült Államok: Academic Press (2015) 394 p. pp. 223-240., 18 p.
23. Hajagos-Tóth J, Bóta J, Ducza E, Csányi A, Tiszai Z, Borsodi A, Samavati R, Benyhe S, **Gáspár R**: The effects of estrogen on the $\alpha 2$ - adrenergic receptor subtypes in rat uterine function in late pregnancy in vitro. *CROATIAN MEDICAL JOURNAL* 57: 2 pp. 100-109., 10 p. (2016)
24. Hajagos-Tóth J, Bóta J, Ducza E, Samavati R, Borsodi A, Benyhe S, **Gáspár R**: The effects of progesterone on the alpha2-adrenergic receptor subtypes in late-pregnant uterine contractions in vitro. *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY* 14: 1 Paper: 33, 9 p. (2016)
25. Hajagos-Tóth J, Ducza E, Samavati R, Vari SG, **Gaspar R**: Obesity in pregnancy: a novel concept on the roles of adipokines in uterine contractility. *CROATIAN MEDICAL JOURNAL* 58: 2 pp. 96-104., (2017)
26. Kothencz A, Hajagos-Tóth J, Csányi A, **Gáspár R**: Alpha-tocopherol succinate increases cyclooxygenase-2 activity: Tissue-specific action in pregnant rat uterus in vitro. *LIFE SCIENCES* 192 pp. 199-204., 6 p. (2018).
27. Kothencz A, Hajagos-Toth J, Szucs KF, Schaffer A, **Gaspar R**: α -Tocopherol potentiates the cervical resistance decreasing effects of cox inhibitors in pregnant rats: The putative role of cyclooxygenase-2 inhibition. *JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS* 368: 2 pp. 292-298., 7 p. (2019)
28. Schaffer A, Hajagos-Tóth J, Ducza E, Bódi N, Bagyánszki M, Szalai Z, **Gáspár R**: The ontogeny of kisspeptin receptor in the uterine contractions in rats: Its possible role in the quiescence of non-pregnant and pregnant uteri. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY* 896 Paper: 173924, 9 p. (2021)
29. Schaffer A, Ducza E, Bódi N, Bagyánszki M, Szalai Z, Mirdamadi M, Barna T, Szűcs KF, **Gáspár R**: The ontogenies of endometrial and myometrial leptin and adiponectin receptors in pregnant rats: Their putative impact on uterine contractility. *LIFE SCIENCES* 297 Paper: 120465, 12 p. (2022)
30. **Gáspár R**, Hajagos-Tóth J, Schaffer A, Kothencz A, Siska-Szabó L, Ducza E, Csányi A, Tábi T, Bagaméry F, Szökő É, Kovács O, Barna T, Samavati R, Mirdamadi M, Sztojkov-Ivanov A, Szűcs KF, Vari SG: High fat high sucrose diet modifies uterine contractility and cervical resistance in pregnant rats: The roles of sex hormones, adipokines and cytokines. *LIFE-BASEL* 12: 6 Paper: 794, 17 p. (2022)

8. Tudománymetriai táblázat

Gáspár Róbert (Reprodukciós farmakológia) tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztálya (2023.06.13)

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk²	120			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		96	668	976
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		15	6	12
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		1	61	89
összefoglaló közlemény		6	66	72
rövid közlemény		2	2	10
II. Könyvek	1			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	1			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		1	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	3			
idegen nyelvű		2	1	1
magyar nyelvű		1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvrészlet		0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	1		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		1	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV)		124	804	1160
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	125		804	1160

V. További tudományos művek	9			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is		9	0	1
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		0	0	0
Óltalmak (szabadalmak)		0	0	0

VI. Hivatkozott absztraktok⁵	0		0	0
Összes hivatkozás¹			804	1161
Hirsch index⁶	19			
g index⁶	28			

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	12	127
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	39	280
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2000) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	114	1099
Az utolsó 10 év (2013-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	70	591
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	89	7,67%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		188 + 0
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

9. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm néhai témavezetőm és mentorom, **Prof. Dr. Falkay György** támogatását és segítségét, melyet 2016-ban bekövetkező haláláig élvezhettem. Neki köszönhetem, hogy a terhes uteruszal kapcsolatos reprodukciós farmakológiai vizsgálatokat elkezdhettem, és több mint 20 évig együtt dolgozhattunk, a disszertációt alkotó 30 közleményből 16-ban szerzőtársam.

Hálásan köszönöm állandó szerzőtársamnak és feleségemnek, **Dr. Ducza Eszternek** (a 30 közleményből 19-ben társszerző), hogy az elmúlt 25 évben együtt kutathattunk, köszönöm, hogy a molekuláris farmakológiai mérésekben nélkülözhetetlen támogatást nyújt szakértelmével és precizitásával, és emellett harmóniában élhetjük a magánéletünket gyermekeinkkel.

Közvetlen volt munkatársaim közül köszönöm **Dr. Márki Árpád, Dr. Klukovits Anna, Dr. Sztojkov-Ivanov Anita, Dr. Mihályi Attila, Dr. Csonka Dénes, Dr. Kolarovszki-Sipiczki Zoltán, Dr. Seres Adrienn, Dr. Hajagos-Tóth Judit, Dr. Reza Samavati, Dr. Csányi Adrienn és Dr. Kothencz Anna** segítségét, ötleteit, szorgalmát és kitartását a közös kutatás során, többen közülük TDK és/vagy PhD hallgatóim is voltak.

Köszönöm volt PhD hallgatóimnak (**Dr. Gálik Márta, Dr. Gál Adrienn, Dr. Verli Judit, Dr. Deák Beáta, Dr. Bóta Judit, Dr. Hódi Ágnes, Dr. Schaffer Annamária és Dr. Barna Tamara**), hogy becsületesen, szorgalmasan és tudásuk legjavát nyújtva végezték a kutatómunkát, igen jelentősen hozzájárulva a célok megvalósításához és a közös eredmények, publikációk megszületéséhez.

Köszönöm jelenlegi közvetlen munkatársaimnak, **Dr. Szűcs Kálmánnak és Dr. Seyedmohsen Mirdamadinak**, hogy idáig kitartottak mellettem és hogy a kutatómunkában mindig számíthatok alaposságukra, segítségükre és bizalmukra, valamint, hogy a disszertáció anyagához tartozó legutóbbi közlemények elkészítésében közösen dolgozhattunk.

Külön köszönöm **Csiszár Zoltánné** laboratóriumi asszisztensnek, hogy tudományos diákkörös korom óta együtt dolgozhatunk és még jelenleg, nyugdíj mellett is számíthatok a munkájára és szakértelmére. Nagyon sok kísérleti probléma technikai megoldásában nyújtott nélkülözhetetlen segítséget.

Köszönöm **Prof. Dr. Benyhe Sándor és Prof. Dr. Borsodi Anna** segítségét (*Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet*) és szakértelmét a G-protein aktiválódási vizsgálatok során.

Köszönöm **Dr. Földesi Imre** segítségét (*Szegedi Tudományegyetem Laboratóriumi Medicina Intézet*) a nemi hormon, valamint az oxidatív stressz index mérések során.

Köszönöm **Dr. Kormányos Zsolt** (*Szegedi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika*) együttműködését a humán uterusz minták biztosításában és az in vitro humán kísérletekben.

Köszönöm **Prof. Dr. Tekes Kornélia, Prof. Dr. Szökő Éva, Dr. Tábi Tamás, Dr. Bagaméry Fruzsina** (*Semmelweis Egyetem Gyógyszerhatástani Intézet*) együttműködését a nociceptin és nocistatin vizsgálatokban, valamint az elhízásos vemhességi modell során az adipokin, citokin és nemi hormon mérésekben.

Köszönöm **Dr. Szaszák Márta** (*Leibniz Institute for Molecular Pharmacology, Berlin*) együttműködését, mely során munkacsoportunk összekapcsolódott az AKAP-PKA antagonistá vizsgálatokkal foglalkozó kutatócsoporttal és kooperációs partnerek lehettünk.

Köszönöm **Dr. Bagyánszki Mária, Dr. Bódi Nikolett és Dr. Szalai Zita** (*Szegedi Tudományegyetem Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék*) együttműködését az adipokinek immunhisztokémiai vizsgálata során.

Köszönöm **Grosz György** igazgatónak és **Süle Miklós** mérnöknek (MSB-MET Metodikai- Szoftver-Biotechnológiai- Kutató és Fejlesztő Korlátolt Felelősségű Társaság) az izolált szervi és in vivo mérési metodikák fejlesztését és támogatását az uterusz kontraktilitási mérésekben.

Köszönöm **Dr. Sandor G. Vari** (*RECOOP HST, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles*) a vemhes elhízásos patkánymodell és a hozzá kapcsolódó citokin mérésekben való együttműködését és támogatását, valamint a RECOOP HST Senior Grant támogatást.

Köszönettel tartozom munkahelyem volt és jelenlegi tanszékvezetőinek **Prof. Dr. Varró Andrásnak és Prof. Dr. Baczkó Istvánnak**, hogy 2018. óta nyugodt és támogató környezetet biztosítanak a kutatási tevékenységemhez.