

MTA Doktori Értekezés

# Régi és új támadáspontok a korai fájástevékenység gátlására



**Dr. Gáspár Róbert**

**Szegedi Tudományegyetem**

**Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar**

**Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

## Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke</b>	<b>4</b>
<b>2. Bevezetés</b>	<b>7</b>
2.1. A korai fájástevékenység és a koraszülés társadalmi és egészségügyi problémája	7
2.2. A korai fájástevékenység gyógyszeres terápiája	8
2.2.1. A koraszülés akut terápiája	9
2.2.1.1. $\beta_2$ -adrenerg receptor agonisták	9
2.2.1.2. Magnézium-szulfát	10
2.2.1.3. Ciklooxygenáz gátlók	10
2.2.1.4. $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkolók	11
2.2.1.5. Nitrodilatátorok	11
2.2.1.6. Oxitocin antagonisták	11
2.2.2. A koraszülés preventív terápiája	12
2.2.2.1. Progeszteron	12
2.2.2.2. Antibiotikumok	13
2.2.2.3. Probiotikumok	13
2.2.2.4. Omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavak	14
<b>3. Célkitűzés</b>	<b>15</b>
<b>4. Módszerek</b>	<b>16</b>
4.1. Kísérleti állatok	16
4.2. Humán vizsgálat	16
4.3. Izolált szervi kontraktilitási vizsgálatok	17
4.3.1. Patkány uterusz gyűrűk	17
4.3.2. Humán uterusz csíkok	18
4.3.3. Patkány cervix rezisztencia vizsgálatok	18
4.4. [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S kötési vizsgálatok	19
4.5. cAMP mérések	20
4.6. Reverz transzkripció PCR vizsgálatok	20
4.7. Real Time PCR vizsgálatok	21
4.8. Western blot analízis	21
4.9. Radioimmun mérések	22
4.9.1. Nociceptin mérések	22
4.9.2. Nocistatin mérések	22
4.9.3. $\beta_2$ -adrenerg receptor mérések	23
4.10. Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok	24
4.11. Plazma nemi hormon, adipokin és citokin mérések	24
4.12. Zsírszöveti citokin mérés	25

4.13. A teljes oxidáns és antioxidáns státusz mérése	25
4.14. COX aktivitás mérése	26
4.15. In vivo kísérletek	26
4.15.1. Női nemi hormon kezelések	26
4.15.2. Koraszülés modellek	26
4.15.2.1. Hormonálisan indukált koraszülés modell	26
4.15.2.2. Lipopoliszacharid indukált koraszülés	27
4.15.3. In vivo uterusz kontraktilitási vizsgálatok	27
4.15.3.1. Nyúlásmérő (strain gauge) mérések	27
4.15.3.2. Simaizom elektromiográfiás mérések	27
4.15.3.3. Ellési idő mérése COX-gátlók és tokoferol kezelés után	28
4.15.4. Vemhességi obezitás modell	28
4.15.4.1. Obez vemhes állatok létrehozása, mintavételek	28
4.15.4.2. Glükóz tolerancia teszt	29
4.16. Statisztikai analízis	29
<b>5. Eredmények</b>	<b>30</b>
5.1. $\alpha$ -adrenerg hatások vizsgálata patkány uteruszon	30
5.1.1. $\alpha_1$ -AR altípus szelektív hatások vizsgálata	30
5.1.2. $\alpha_{1A}$ -AR gátló hatások szerotonerg komponensének vizsgálata	31
5.1.3. $\alpha_2$ -AR altípus szelektív hatások vizsgálata	33
5.2. Adrenerg hatások vizsgálata patkány cervixen	37
5.2.1. A cervikális $\beta_2$ -AR hatások vizsgálata	37
5.2.2. A cervikális $\alpha_1$ -AR hatások vizsgálata	39
5.2.3. A cervikális $\alpha_2$ -AR hatások vizsgálata	43
5.3. Adrenerg kombinációk uterorelaxáns hatásának vizsgálata	48
5.3.1. Kombinációk $\beta_2$ -AR agonistákkal	48
5.3.1.1. P4 kombináció	48
5.3.1.2. $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló kombináció	52
5.3.1.3. PDE gátló kombináció	54
5.3.1.4. AKAP-PKA gátló kombináció	59
5.3.1.5. $\alpha_{1A}$ -AR antagonistákkal kombináció	60
5.3.2. Kombinációk $\alpha_1$ -AR antagonistákkal	62
5.3.3. Kombinációk $\alpha_2$ -AR antagonistákkal	66
5.4. Peptidek hatásai az uterusz kontrakciókra	72
5.4.1. Nociceptin és nocistatin hatása a méhkontrakciókra	72

5.4.2. Kisspeptin hatása a méhkontrakciókra	82
5.4.3. Leptin és adiponectin hatása a méhkontrakciókra	88
5.4.3.1. Leptin hatások	89
5.4.3.2. Adiponectin hatások	93
5.4.4. Obezitás és gyulladás hatása a méhkontrakciókra (adipokinek és citokinek)	98
5.4.4.1. Obezitás hatása a méhkontrakciókra	99
5.4.4.2. Gyulladás hatása a méhkontrakciókra	107
5.5. Antioxidáns és COX gátlók hatása az uterusz kontrakcióra és a cervix rezisztenciára	110
5.5.1. Tokoferol és terbutalin hatása a méhkontrakcióra és a cervix rezisztenciára	111
5.5.2. Tokoferol és COX-gátlók hatása a méhkontrakcióra és a cervix rezisztenciára	115
<b>6. Megbeszélés</b>	<b>121</b>
6.1. Az adrenerg hatások jelentősége az uterusz és a cervix kontraktilitásában	121
6.1.1. Adrenerg hatások az uteruszban	121
6.1.2. Adrenerg hatások a cervixben	123
6.2. Az adrenerg kombinációk jelentősége a vemhes uterusz kontrakciók gátlásában	125
6.2.1. $\beta_2$ -AR agonista kombinációk jelentősége	126
6.2.2. $\alpha_1$ -AR antagonisták kombinációk jelentősége	130
6.2.3. $\alpha_2$ -AR antagonisták kombinációk jelentősége	132
6.3. A peptid támadáspontok jelentősége a vemhes uterusz kontrakciók gátlásában	134
6.3.1. Nociceptin és nocistatin	135
6.3.2. Kisspeptin	139
6.3.3. Leptin, adiponectin	141
6.3.4. Obezitás és gyulladás: adipokinek és citokinek hatása a kontrakciókra	143
6.4. Antioxidáns hatás jelentősége az uterusz és cervix kontraktilitásában	146
6.4.1. $\beta_2$ -AR agonista hatás módosítása antioxidánssal	147
6.4.2. Az antioxidáns COX-gátló hatást módosító effektusa	147
<b>7. Összefoglalás</b>	<b>151</b>
<b>8. Új megállapítások</b>	<b>156</b>
<b>9. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája</b>	<b>158</b>
<b>10. Tudományometriai táblázat</b>	<b>161</b>
<b>11. Irodalomjegyzék</b>	<b>162</b>
<b>12. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>184</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

$\alpha$ -AR:  $\alpha$ -adrenerg receptor

ABTS: azino-bisz-etilbenzotiazolin-szulfonsav

AdipoR1: adiponectin 1 receptor

AdipoR2: adiponectin 2 receptor

AKAP: A-kináz horgonyzó fehérje

AUC: görbe alatti terület

$\beta_2$ -AR:  $\beta_2$ -adrenerg receptor

BK<sub>Ca</sub>: magas konduktanciájú Ca<sup>2+</sup>-szenzitív K<sup>+</sup>-csatorna

bp: bázispár

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

CGRP: kalcitonin gén-rokon peptid

COX: ciklooxigenáz

DAG: diacilglicerin

dCTP:  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-deoxicitidin-trifoszfát

dNTP: deoxinukleozid-trifoszfát

dT: deoxitimidin

E2: 17 $\beta$ -ösztadiol

EC<sub>50</sub>: effektív koncentráció 50 (a maximális hatás felének kiváltáshoz szükséges hatóanyag koncentráció)

ED<sub>50</sub>: effektív dózis 50 (a maximális hatás felének kiváltásához szükséges hatóanyag dózis)

EFS: elektromos erőtér ingerlés

E<sub>max</sub>: maximális hatás

eNOS: endogén nitrogén-monoxid-szintáz

FFT: gyors Fourier-transzformáció

FSH: folliculus stimáló hormon

GAPDH: gliceraldehyd-foszfát dehidrogenáz

GnRH: gonadotrop releasing hormon

GTT: glükóz tolerancia teszt

GTP $\gamma$ S: guanozin-5'-O-gamma-tiotrifoszfát

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

IL: interleukin

IFN $\gamma$ : gamma-interferon

i.p.: intraperitoneális

IP3: inozitol-trifoszfát

KC: keratinocita eredetű citokin

Kiss1R: kisspeptin receptor

LEPR: leptin receptor

LH: luteinizáló hormon

LPS: lipopoliszacharid

M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus

mRNS: messenger ribonukleinsav

n-3 PUFA: omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavak

NA: noradrenalin

NO: nitrogén-monoxid

NOS: nitrogén-oxid szintáz

NX: naloxon

ORL1: orphan opioid receptor-like 1

OSI: oxidatív stressz index

P4: progeszteron

PAX: paxilline

PCR: polimeráz láncreakció

PEG: polietilén-glikol

PDE: foszfodiészteráz

PG: prosztaglandin

PKA: protein-kináz A

PPNOC: prepronociceptin

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

PTX: pertussis toxin

ROS: reaktív oxigén termékek

RNS: ribonukleinsav

RT-PCR: valós idejű polimeráz láncreakció

s.c.: szubkután

SD: standard diéta

SMEMG: simaizom elektromiográfia

TAS: teljes antioxidáns státusz

TBS: TRIS-sel pufferelt sóoldat

TCA: triklór-ecetsav

TFA: trifluor-ecetsav

TNF $\alpha$ : tumor nekrozis faktor  $\alpha$

TOS: teljes oxidáns státusz

WB: Western blot

17OHP: 17 $\alpha$ -hidroxi-progeszteron kapronát

5-HT: szerotonin

5-HT-R: szerotonin receptor

5-MU: 5-metilurapidil

## 2. Bevezetés

### 2.1. A korai fájástevékenység és a koraszülés társadalmi és egészségügyi problémája

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, melynek zavara következtében akár túlhordás, vagy akár koraszülés is létrejöhet.

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 helyen az infertilitás problémájával kell szembe nézni. Emellett számos országnak kell megküzdenie az emocionális, anyagi, politikai vagy akár a nők karrierjét veszélyeztető okok miatti alacsony születési rátával [1]. Ezekben 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 nemcsak a modern kor problémája, a régi időkben is számos beszámoló áll rendelkezésre e tekintetben. A koraszülöttséget már az ókori Görögországban is ismerték, az ezzel kapcsolatos történetek többször is előfordulnak az ókori görög mitológiában [2]. A X. század végén a perzsa tudós Avicenna egy 6 hónapra született újszülött túléléséről számolt be. A nagy fizikus és matematikus, Isaac Newton is koraszülött volt, a feljegyzések szerint születési súlya olyan alacsony volt, hogy egy olyan fazékszerű edénybe tették, amelynek térfogata kevesebb volt, mint 1000 ml [3]. Ő azonban azon kevesek közé tartozott, akik nemcsak túléltek a súlyos koraszülöttséget, hanem utána teljes és sikeres életet éltek. Bár a koraszülöttek ellátása – különösen az elmúlt évtizedekben – ugrásszerűen fejlődött, a statisztikák mégis azt mutatják, hogy a koraszülöttek halálozása még mindig magas a közepes és alacsony jövedelmű országokban [4]. Becslések szerint világszerte évente 15 millió koraszülés van, ennek több mint fele Ázsiában és több mint egynegyede a szubszaharai afrikai régiókban történik [5].



A koraszülés továbbra is az újszülöttkori morbiditás és mortalitás és egyik fő oka, a kockázat mérésre metabolikus profil vizsgálatot dolgoztak ki [6]. A koraszülöttséggel leggyakrabban összefüggő magzati megbetegedések a légzési distressz szindróma, az intraventrikuláris vérzés, a periventrikuláris leukomalacia, a nekrotizáló enterocolitis, a bronchopulmonalis dysplasia, a szepszis, a nyitott ductus arteriosus, a cerebrális eredetű paralízis, a mentális retardáció és a retinopátia [7,8].

Mindezek mellett a koraszülöttek kezelése és gondozása hatalmas összeget emészt fel évente az egészségügyi ellátó rendszerben. Az Egyesült Államokban csak a 2016-os évben 25,2 milliárd dollárt költöttek a koraszülöttekkel kapcsolatos költségekre, ami magába foglalja a koraszülöttek orvosi sürgősségi ellátását és speciális gondozási igényeit, valamint a szülőket érintő, munkából való kiesés miatti támogatásokat [9].

Epidemiológiai vizsgálatok a koraszülés számos kockázati tényezőjét azonosították. A korábbi koraszülés, az afroamerikai rassz, a tizenéves vagy 30 év feletti kismamák, az alacsony iskolai végzettség és társadalmi-gazdasági státusz, a dohányzás, a nehéz fizikai munkával és/vagy súlyos stresszel járó foglalkozás, az alacsony anyai terhességi testtömegindex, valamint a várandóság alatt elmaradó vagy túlzott súlygyarapodás mind-mind növelik a koraszülés valószínűségét. Emellett az ikerterhesség, a gesztációs vagy már a terhesség előtt is fennálló diabetes mellitus, a magas vérnyomás, a placenta és cervikális elégtelenség, a poli- vagy oligohidramnion, a második vagy harmadik trimeszter végén végrehajtott hasi műtét, szisztémás vagy regionális fertőzés (mint például a tünetmentes bakteriuria), valamint a gyulladáskeltő citokinek plazmaszint emelkedése szintén szorosan összefüggenek a koraszülés kockázatával [10–14]. Ugyanakkor a fenti kockázati tényezők megléte nélkül is létrejöhet a koraszülés.

A fent említett adatok és tények alátámasztják, hogy egyrészt a koraszülés patomechanizmusa nem teljesen feltárt, megelőzése csak részben lehetséges, ugyanakkor következményei súlyosak, akár egész életre kihatóak lehetnek, melyek komoly anyagi terhet is rónak az egészségügyi ellátórendszerre. Ezek alapján mindenképpen indokolt a koraszülés akut és preventív terápiájának fejlesztése.

## **2.2. A korai fájástevékenység gyógyszeres terápiája**

A korai fájástevékenység gyógyszeres kezelésének két fő iránya az akut és a megelőző terápia. Az akut terápia fő célja a megindult koraszülés azonnali leállítása és a terhes

méhizomzat nyugalmi állapotának fenntartása. A preventív terápia abban az esetben indokolt, ha a koraszülés kockázata a terhesség alatt magas, főként korábbi koraszüléssel előzmény következtében [15]. A koraszülés terápiájának hatásosságát a neonatális halálozás, az intraventrális bevezetés, a respirációs distressz szindróma, a bronchopulmonális dysplasia, a nekrotizáló enterocolitis és a szepszis előfordulásának csökkenésével jellemzik [16].

### **2.1.1. A koraszülés akut terápiaja**

Az akut kezelésre használt gyógyszerek különböző hatásmechanizmussal rendelkeznek.

#### **2.2.1.1. $\beta_2$ -adrenerg receptor agonisták**

A legrégebbi vegyületek közé tartoznak a  $\beta_2$ -adrenerg receptor ( $\beta_2$ -AR) agonisták, amelyek növelik az intracelluláris ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szintet és csökkentik az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációt, ami simaizom relaxációhoz vezet. Bár a  $\beta_2$ -AR agonisták számos országban még mindig használatosak, hatásosságuk nem kielégítő. Hosszú távú hatásosságuk nem bizonyított, hatásuk általában 24-72 óráig tart, hatékonyságuk maximum 1 hétig tartható fenn. Ráadásul csak parenterálisan adagolva várható tőlük viszonylag rövid hatás, de az újszülött életkilátásait javító effektusuk nem mindig igazolható [17]. Történtek próbálkozások az agonisták szubkután (s.c.) pumpával történő bevitelére is, és bár az eredmények ígéretesek voltak [18], mégsem válhatott a napi gyakorlat részévé. Ennek egyik oka, hogy a folyamatos  $\beta_2$ -adrenerg stimuláció receptor deszenzitizációt vált ki, ami jelentősen csökkenti a gyógyszerhatást [19]. Ezenkívül a  $\beta_2$ -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 [20]. Egy klinikai tanulmány alapján a cAMP intracelluláris metabolizmusáért felelős foszfodiészteráz 4B (PDE4B) polimorfizmusa módosíthatja a  $\beta_2$ -AR agonisták klinikai hatásait és mellékhatásait a tokolitikus terápia során. Úgy tűnik, hogy a PDE4B rs17128809 AA genotípus variánsával rendelkező betegeknél sokkal nagyobb az intravénásan beadott ritodrin által kiváltott mellékhatások kockázata [21].

### 2.2.1.2. Magnézium-szulfát

A magnézium-szulfát szintén egy régi gyógyszer a tokolitikus terápiában. Uterus relaxáló hatásának pontos hatásmechanizmusa nem ismert, valószínűleg csökkenti az extracelluláris és intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  áramokat, ugyanakkor nem befolyásolja a  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin komplexet [22]. A magnézium-szulfát alkalmazása ellentmondásos a koraszülés terápiájában, mivel egyrészt bebizonyosodott, hogy nem igazán hatékony a koraszülések késleltetésében vagy megelőzésében [23], másrészt viszont szülés előtti adagolása jelentős neuroprotektív hatást fejt ki a koraszülötteknél, különösen a koraszülöttség egyik következményének, a cerebrális bénulás prevalenciájának csökkentésében. Sajnos a magnézium-szulfátos kezelés dózis- és időfüggése a neuroprotektió szempontjából még mindig nem teljesen tisztázott [24]. Ezenkívül a magnézium-szulfát terápia előnyös lehet a koraszülés ellen korai és súlyos preeclampsia esetén, amikor jelentős mértékben csökken az anyai trombocitaszám, ugyanakkor hatásmechanizmusa még ennek sem tisztázott [25]. Bár a magnézium-szulfát tokolitikus alkalmazása a legtöbb országban nem javasolt, alkalmazását nem szabad teljesen elvetni, figyelembe véve a lehetséges előnyöket. Nyilvánvaló azonban, hogy önmagában nem képes megoldani a koraszülés általános terápiás problémáját.

### 2.2.1.3. Ciklooxygenáz gátlók

A ciklooxygenáz (COX) gátlók megakadályozzák a prosztaglandinok (PG) képződését, amelyek részt vesznek a terhes méhösszehúzóadások fenntartásában a réskapcsolatok (gap junctions) expressziójának és az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint fokozása révén [15]. 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 [26]. A COX-gátlók terhesség alatti használhatóságát jelentősen korlátozza, hogy nem adhatók a terhesség 32. hete után a magzati ductus arteriosus korai záródásának kockázata miatt. Ezen túlmenően a COX enzimek szerepe a koraszülésben kétséges, a rendelkezésre álló bizonyítékok nem elegendőek a COX-gátlók rutinszerű alkalmazásának alátámasztására. Bár a COX-2 enzimaktivitás emelkedett lehet mind a koraszülött magzati membránban, mind a miometriumban, számos klinikai bizonyíték mégis azt támasztja alá, hogy a normál és a koraszülött mintákban nincs különbség a COX-2 aktivitásban [27].

#### 2.2.1.4. $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkolók

A  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkolók hatásmechanizmusa az extracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -áram gátlása, ami simaizom relaxációt okoz. Bár a  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkolók jobban tolerálhatóak, hosszú távú terápiára nem alkalmazhatók a jelentős anyai mellékhatások (fejfájás és hipotenzió) és a hosszabb távon tapasztalható gyenge terápiás hatékonyság miatt. Az anyai mellékhatások alapján kijelenthető, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkolók nem kedvezőbbek más tokolitikumokhoz képest (pl.  $\beta_2$ -AR agonisták, oxitocin antagonisták). Ezenkívül a  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkolók nagyobb dózisaik nemcsak a klinikai hatékonyságot csökkenthetik, hanem akár a tokolitikus terápia kimenetelét is ronthatják [28].

#### 2.2.1.5. Nitrodilatátorok

A nitrodilatátorok nem terjedtek el a klinikai gyakorlatban, azonban számos klinikai vizsgálatot végeztek a koraszülés akut kezelésében való hatékonyságuk tisztázására. Uterorelaxáns hatásukat a nitrogén-monoxid (NO) felszabadulása és a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) szint intracelluláris növekedése közvetíti, mivel aktiválják a guanil-ciklázt, ami az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint csökkenéséhez vezet. Az endogén nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) aktivitása magas marad a terhesség alatt, mely szignifikánsan csökken a szülés során. Mindez alátámasztja az eNOS és NO jelentőségét a terhes miometrium kontraktilitásában [29]. A legtöbbet vizsgált nitrodilatátor a nitroglicerin, 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. Mivel a nitrodilatátoroknak nincs egyértelmű előnyös hatása a perinatális mortalitásban és morbiditásban a többi tokolitikumhoz képest, ezért rutinszerű alkalmazásuk nem javasolt fenyegető koraszülés esetén [30].

#### 2.2.1.6. Oxitocin antagonisták

Az oxitocin antagonisták az egyetlen gyógyszercsoport, amelyet eredetileg akut tokolízisre fejlesztettek ki. Az oxitocin az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint növelésével, az intracelluláris inozitol-trifoszfát (IP3) és diacilglicerin (DAG) jelátviteli útvonal aktiválásán keresztül fokozza az összehúzódást. A humán miometriumban az oxitocin által kiváltott összehúzódás egy  $\text{Na}^+$ -aktivált  $\text{K}^+$  csatornán, az ún. SLO2.1-en keresztül is mediálódik. Az SLO2.1 csatorna döntő szerepet játszik a humán miometrium sejtek nyugalmi potenciáljának fenntartásában. Az oxitocin blokkolja ezt a csatornát a  $G_{\alpha q}$ -kapcsolt receptor jelátviteli

útvonalon keresztül és összehúzóást indukál. Következésképpen az oxitocin receptor blokkolása újra megnyitja az SLO2.1 csatornát és relaxációt eredményez [31]. Bár az oxitocin receptor szelektív blokkolása terápiásan ígéretesnek tűnt, a valóságban azonban ez sem jelent megoldást a koraszülés megállítására. Emberben a szülés hipofízis működése nélkül is beindulhat. Ismert egy olyan eset, amikor egy nő spontán szülni tudott teljes hypophysectomia után, oxitocin szubsztitúció nélkül. Ez a klinikai eset arra utal, hogy bár az oxitocin fontos, mégsem nélkülözhetetlen a terhesség végén a méhösszehúzóásokhoz [32]. Ezen felül a klinikai adatok sem támasztották alá az atosiban vagy más oxitocin antagonisták (pl. barusiban) nagyobb hatékonyságát a többi tokolitikumokhoz képest. Egyes vizsgálatok azt is megállapították, hogy az atosiban csökkentheti a születési súlyt. Így az oxitocin antagonisták nem hatékonyabbak más tokolitikumokhoz képest a fenyegető koraszülés leállításában, bár mellékhatásprofiljuk kedvező lehet [33].

### **2.2.2. A koraszülés preventív terápiája**

A koraszülés megelőzése rendkívül összetett feladat. A prevenció általánosságban akkor lehetséges, ha az adott betegség vagy állapot kialakulásához vezető okok tisztázottak. Sajnos ez nem igaz a koraszülésre. Bár a korai összehúzóásokért számos tényező felelős (pl. infekció, méh-placenta elégtelenség, alacsony anyai progeszteron plazmaszint, stresszhatás), a legtöbb esetben a koraszülés oka ismeretlen [34].

#### **2.2.2.1. Progeszteron**

A koraszülés klasszikus megelőző terápiája a progeszteronra (P4) vagy P4 analógokra korlátozódik magas kockázatú várandósoknál. Bár a kezdeti várakozások nagyok voltak a P4 kezelés kapcsán, a klinikai bizonyítékok alapján hatása gyenge vagy nem igazolható [35]. A P4 preventív hatásmechanizmusa sokrétű, beleértve a génexpressziót módosító (P4 receptorok, placenta) hatásait is, melynek eredményeként erős marad a cervix rezisztencia és gátlódik a méhkontrakció. E hatásban szerepet játszanak még a gyulladáscsökkentő és a nem genomikus mechanizmusok is [36]. Azt is kimutatták, hogy a P4 képes gátolni a tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) által kiváltott apoptózist a magzati membránban, ami szintén hozzájárulhat a preventív hatásához [37]. Úgy tűnik, hogy a P4 kezelésre jól reagáló várandósok speciális farmakogenetikai háttérrel rendelkeznek, de a részletek még nem tisztázottak [38]. Egyes adatok arra utalnak, hogy a csak hüvelyben alkalmazott P4

klinikailag jelentős hatással bír a koraszülés megelőzésében az egyetlen magzatot kihordó (singleton) terhesség esetén [39]. Összességében elmondható, hogy a P4 alkalmazása nem váltotta be a koraszülés megelőzésében előzetesen hozzá fűzött várakozásokat.

#### **2.2.2.2. Antibiotikumok**

A koraszülés fokozott kockázatát régóta összefüggésbe hozzák az anyai fertőzésekkel [40]. Vizsgálatok történtek arra vonatkozóan, hogy az elsősorban húgyúti vagy vaginális anyai fertőzések kapcsán csökkentsék a koraszülés kockázatát, ugyanakkor az alkalmazott antibiotikumok (pl. klindamicin) nem voltak hatásosak [41–43]. Egy vizsgálatban a kóros hüvelyflórát klindamicinnel, a tünetmentes húgyúti fertőzéseket pedig cefiximmal vagy nitrofurantoinnal kezelték a terhesség 20. hete előtt, de a koraszülések aránya nem különbözött a kezelésben nem részesült, szintén húgyúti és vaginális fertőzéssel diagnosztizált várandós anyákhoz képest, ami tovább erősíti, hogy a terhesség során fellépő urogenitális fertőzések korai kezelése nem jelent hatékony prevenciót a koraszülésekkel szemben [44]. Mindezekon felül az is nehezíti az antibiotikus prevenció kivitelezését, hogy az urogenitális fertőzések, főleg a vaginális infekciók polimikróbásak, ennek következtében nem tisztázott, hogy pontosan mely baktérium törzsek lehetnek felelősek a koraszülés beindulásért és hogy ezeknek a törzseknek milyen lokalizációja szükséges ahhoz, hogy a folyamatok elinduljanak [45].

#### **2.2.2.3. Probiotikumok**

A mikrobiom egészségben betöltött szerepével kapcsolatos ismereteink folyamatosan bővülnek. A mikrobiom fontossága az egészség megőrzésében számos területen bizonyított. Ugyanakkor viszonylag kevés információ áll rendelkezésre a hüvelyi mikrobiom és a koraszülés összefüggéseiről. Egyes hüvelyi baktériumok jelenléte vagy hiánya a terhesség korai szakaszában gyaníthatóan összefüggésbe hozható a későbbi gesztációs periódusban bekövetkező koraszülés megnövekedett kockázatával [46]. Mivel a normál flóra baktériumait tartalmazó orális probiotikumok bizonyítottan még a hüvelyben is megtelepednek [47], 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 [48].

**2.2.2.4. Omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavak**

Az omega-3 többszörösen telítetlen zsírsavak (n-3 PUFA) az étrend elengedhetetlen összetevői, melyek egészségmegőrzésben betöltött jelentőségéről folyamatosan bővülnek ismereteink. Az n-3 PUFA metabolikus útvonala kevesebb olyan méhkontrakciót kiváltó PG-t termel, mint például a  $PGF_{2\alpha}$  [49,50]. Az n-3 PUFA-hiány a koraszülés általános étrendi kockázati tényezője lehet az egész világon. Az ajánlott napi bevétel minimum 600 mg/kg, mert ez alatt a koraszülés gyakorisága fordított korrelációt mutat az elfogyasztott n-3 PUFA-val [51]. Mindez azt jelenti, hogy az n-3 PUFA a napi étrendben vagy táplálék-kiegészítő formájában történő rendszeres bevétele a koraszülés megelőzésének egyik nem gyógyszeres lehetősége lehet.

### 3. Célkitűzés

A Bevezetésben felsorolt számos akut és preventív terápiás lehetőség ellenére sem jelenthető ki, hogy a koraszülés gyógyszeres terápiája megoldott, sőt, továbbra is jelentős a klinikai igény az új megoldásokra. Különösen igaz ez Magyarországra, ahol a népesség számának csökkenése folyamatos kihívást jelent, ugyanakkor az életkilátásokat jelentősen csökkentő koraszülések gyakorisága 9% körüli [52], a koraszülöttek majdnem 20%-a az erőfeszítések ellenére sem éri meg az első életévét, különösen a 27. terhességi hétnél korábban születettek esetén [53].

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 fogalmaztuk meg:

1. Az  $\alpha$ -adrenerg receptoron ( $\alpha$ -AR) ( $\alpha_1$ - és  $\alpha_2$ -AR altípusok) keresztüli uterusz és cervix, valamint a  $\beta_2$ -AR-on keresztüli cervix hatások vizsgálata vemhes patkányban.
2. Az  $\alpha$ - és  $\beta_2$ -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  $\beta_2$ -AR agonisták és COX gátlók uterusz kontraktilitásra és cervix rezisztenciára gyakorolt effektusaira vemhes patkányban.



## 4. Módszerek

A Módszerek fejezetben a vizsgálataink során alkalmazott metodikák általános ismertetésére kerül sor, az egyes vizsgálatok speciális részleteinek megértéséhez szükséges információk az Eredmények fejezetben kerülnek bemutatásra.

### 4.1. Kísérleti állatok

Vizsgálataink során ösztrusz fázisban lévő nem vemhes vagy különböző gesztációs napokon lévő vemhes Sprague-Dawley (CD) patkányokat használtunk (legutóbbi beszerzési forrás: Animalab Hungary Kft, Vác, Magyarország). Az ivarzási fázist a vaginális impedancia alapján működő ösztrusz ciklus monitorral (IM-01, MSB-MET Kft., Balatonfüred, Magyarország) végeztük. A pároztatáshoz az ivarzási ciklus proösztrusz/ösztrusz fázisában lévő nőtény patkányokat választottuk ki (160-200 g), melyeket egy automatizált pároztató ketrecben helyeztünk el hím patkányokkal (240-260 g). A megtörtént nemi aktust natív hüvelykenet vizsgálatával vagy a vaginális spermadugó igazolásával állapítottuk meg. A pozitív eseteket 1. napos vemhes állatoknak tekintettük és elkülönítettük.

Valamennyi kísérleti állatot szabályozott hőmérséklet (20-23 °C), páratartalom (40-60 %, és fényviszonyok (12 óra fény, 12 óra sötét) között tartottuk. A táp (Altromin 1324, Charles-River Laboratories, Sulzfeld, Németország) és az itatóba töltött csapvíz ad libitum biztosítva volt. A kísérleti állatok feláldozása szén-dioxid kamrában történt. 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).

### 4.2. 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 vizsgálatba vont nők paritása 0 és 3 között változott, életkori eloszlásuk 21-43 év között volt.

A műtét minden esetben spinális érzéstelenítésben történt. 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.

### **4.3. Izolált szervi kontraktilitási vizsgálatok**

Az izolált szervfürdőben végzett uterusz kontraktilitási vizsgálatok során patkány és humán uterusz mintákkal dolgoztunk.

#### **4.3.1. Patkány uterusz gyűrűk**

A patkány uteruszt kimetszettük, a vemhes állatok esetén a magzatokat a placentával együtt eltávolítottuk, az uterusz szövetet megtisztítottuk és 3-5 mm hosszú gyűrűkre vágtuk. A gyűrűket függőlegesen izolált szervfürdőkbe helyeztük, amelyek 10 ml, 37 °C-os de Jongh puffert tartalmaztak (összetétel mM-ban: 137 NaCl, 3 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 12 NaHCO<sub>3</sub>, 4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 glükóz, pH: 7,40). A szervfürdőt folyamatosan karbogénnel (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) áramoltattuk át. A gyűrűk alsó részét szövettartó tuskóra, a felső részét pedig egy feszültség átalakító erőmérőhöz (SG-02; MDE Gmbh., Heidelberg, Németország) rögzítettük sebészeti varróanyag segítségével, az alaptónust 1,5 g-ra állítottuk be. Az adatokat SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System (MDE Gmbh., Heidelberg, Németország) segítségével rögzítettük és elemeztük. Az inkubációs idő 1 óra volt, és ezalatt a gyűrűket 15 percnként mostuk.

A ritmikus kontrakciókat vagy elektromos erőteringerléssel (EFS) vagy pedig farmakonokkal váltottuk ki. Az EFS esetén maximális ritmikus összehúzódásokat váltottunk ki egy digitális, programozható stimulátor (ST-02, MDE Gmbh., Heidelberg, Németország) segítségével, különböző impulzusszélesség és periódusidő értékekkel 40 V-on 240 másodpercig. A különböző vemhességi napokon a kontraktilitási készségnek megfelelő EFS került alkalmazásra, ahogyan azt korábban már meghatároztuk [54]. Az ingerlő paraméterek az alábbiak voltak: 18. napos vemhes uterusz esetén jelszélesség 75 ms, periódusidő 18,33 s; 20. napos vemhes uterusz esetén jelszélesség 62,5 ms, periódusidő 17,5 s; 21. és 22. napos vemhes uterusz esetén jelszélesség 150 ms, periódusidő 23,75 s. A farmakonok közül 25 mM KCl, illetve különböző koncentrációban oxitocin, noradrenalin (NA) és PGF<sub>2α</sub> került alkalmazásra. A kontrakcióra adott válaszokat 5 percig regisztráltuk (kivéve az oxitocint, ahol 4 percig), majd azt követően beadtuk a kontrakciók befolyásolására alkalmazott

hatóanyagokat, melyek esetében szintén 5, illetve 4 percig történt egy dózist követően a regisztráció. A peptid természetű hatóanyagoknál nem kumulatív, míg a nem peptid vegyületekénél kumulatív vizsgálatokat végeztünk. 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 összehúzóadáshoz képest.

#### **4.3.2. Humán uterusz csíkok**

Minden szövetminta ( $10 \times 10 \times 30$  mm) egy alsó szegmensű, keresztirányú metszés felső széléből származott, mely a közvetlenül szülés után, de még az anya oxitocin kezelése előtt lett kimetszve. A szöveteket  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os Krebs–Henseleit oldatban (összetétel mM-ban: 118 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0,5 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1 KHPO<sub>4</sub>, 10 glükóz; pH 7,4) tároltuk az izolált szervfűrdőben történő vizsgálatig, mely maximum 12 órával a mintagyűjtés után történt.

A hosszanti uterusz csíkokat ( $\sim 3 \times 5 \times 10$  mm) függőlegesen függesztettük fel a szervfűrdőbe, amely 10 ml Krebs–Henseleit oldatot tartalmazott. A szervfűrdőt  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk, és folyamatosan karbogént áramoltattunk át rajta. Az alaptónust 3,0 g-ra állítottuk be, a mintákat 90 percig inkubáltuk, 15 percenként cserélve az oldatot. A ritmikus kontrakciókat  $10^{-8}$  M oxitocinnal váltottuk ki. A vizsgált hatóanyagok humán uterusz kontrakciókra gyakorolt hatását nem kumulatív módon vizsgáltuk. A regisztrátumok AUC értékeit analizáltuk. A koncentráció-kontrakció/relaxáció görbéket szemilogaritmikusan ábrázoltuk, és az eredményeket százalékos változásban fejeztük ki a kezdeti indukált összehúzóadáshoz képest.

#### **4.3.3. Patkány cervix rezisztencia vizsgálatok**

Nem vemhes és vemhes patkányok cervixét eltávolítottuk. A preparált cervix gyűrűket 10 ml de Jongh puffert tartalmazó szervfűrdőben speciális, finom fémszálból készült horgok segítségével hossz tengelyükkel függőlegesen felfüggesztettük. A szervfűrdőt  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk, és folyamatosan karbogént áramoltattunk át rajta. A cervix gyűrűket 1 órán keresztül inkubáltuk 15 percenként cserélve a puffert a szervfűrdőben. A kezdeti feszítést 1,0 g-ra állítottuk be.

A cervix rezisztenciát a szövetek feszülésének fokozatos növelésével vizsgáltuk. A feszítést manuálisan növeltük a transzducer mérőfej vezérlőcsavarjával. A cervixeket fokozatosan

feszítettük 1 g-onként egészen 12 g-ig, és minden egyes feszítés után 5 percre hagytuk relaxálni a szöveteket. A cervix rezisztencia értékelése során a cervix gyűrű kezdeti feszülését az 5 perc utáni relaxáció függvényében ábrázoltuk. Az így kapott feszülés-relaxáció görbe fűrészfog alakú volt, melyre lineáris regresszióval egyenest illesztettünk. Az egyenes meredeksége jellemezte a cervix rezisztenciát, a nagyobb meredekség nagyobb rezisztenciát jelentett. Abban az esetben, ha a cervix rezisztencia vizsgálatok során hatóanyagot is adtunk a szervfürdőbe, a hatóanyag beadása 5 perccel hamarabb történt, mint a feszítési sor elindítása.

#### 4.4. [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési vizsgálatok

A [<sup>35</sup>S]-guanozin-5'-O-gamma-tiotrifoszfát ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S) kötési kísérleti protokollt publikált módszer alapján végeztük [55]. A patkány vemhes szövetmintákat -70 °C-on tároltuk a vizsgálat előtt. A mintákat szétaprítottuk, majd 20-szoros térfogatú jéghideg Tris-EDTA pufferrel (összetétel: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,6 mM MgCl<sub>2</sub> és 0,25 M szacharóz, pH 7,4) jégfürdőben homogenizáltuk Ultra-Turrax® homogenizátor segítségével. (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Breisgau, Németország) 2 × 30 másodpercig, majd 4 rétegű gézszűrőn szuszpendáltuk, ezután pedig 20 percre 4 °C-on 40000 g-vel centrifugáltuk. A keletkezett pelletet a Tris-EDTA pufferben szuszpendáltuk, a fehérjetartalmat Nanodrop™ 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) határoztuk meg, és 10 mg/ml koncentrációra hígítottuk mintánként.

A mintákat 900  $\mu$ l végső térfogatú Tris-EGTA pufferben (pH 7,4) 15 percre 30 °C-on előinkubáltuk (összetétel: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl), amely 20 mbq/0,05 cm<sup>3</sup> [<sup>35</sup>S] GTP $\gamma$ S (0,05 nM) tartalmazott. Ezt követően a vizsgált hatóanyagokat külön-külön adagoltuk egyszeri vagy növekvő dózisban 20 percre. A teljes kötést hatóanyagok nélkül mértük. A nem specifikus kötődést 10  $\mu$ M jelöletlen GTP $\gamma$ S segítségével határoztuk meg és kivontuk a teljes kötésből. Az inkubációs idő után vákuumszűréssel (Whatman GF/B szűrő, Brandel M24R cell harvester) a kötött és szabad [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-t megmértük. A szűrőket háromszor mostuk jéghideg pufferben (pH 7,4), a szűrők radioaktivitását Ultimagold™ MV szcintillációs koktélban mértük Packard Tricarb 2300TR (PerkinElmer, Inc., Illinois USA) folyadékszcintillációs számlálóval. A kísérletben három párhuzamos mérést használtunk, és a méréseket háromszor ismételtük meg.

#### 4.5. cAMP mérések

Az uteruszok cAMP szintjét cAMP Enzyme Immunoassay Kit (Cayman Chemical, USA) segítségével mértük. A patkányok szövetmintáit de Jongh pufferrel feltöltött szervfürdőben inkubáltuk. A mintákat az antagonistákkal vagy azok nélkül 10 percig inkubáltuk, és esetenként további, a kontrakciót kiváltó farmakonokat adtunk hozzá. Ezután hozzáadtuk a vizsgálandó anyagokat 5 percig, az adenil-cikláz aktiváló forskolinnal ( $10^{-5}$  M) további 10 percig inkubáltuk. Végül a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és  $-70$  °C-on tároltuk a minta előkészítéséhez. Az előkészítés során a fagyasztott szöveteket lemértük, porítottuk, összekevertük és homogenizáltuk 10-szeres térfogat 5%-os triklór-ecetsav (TCA) vizes oldatával ( $0-4$  °C), majd 1500 g-vel centrifugáltuk 15 percig. A felülúszókat összekevertük 5-szörös térfogatú vízzel telített éterrel, és 10 másodpercig ráztuk, majd az éteres felülúszót elvetettük, és ezt a folyamatot háromszor megismételtük. Végül, miután a maradék étert melegítéssel elpárologtattuk, a folyékony mintákat  $-70$  °C-on tároltuk a cAMP ELISA kitre való felvitelig, melynél követtük a gyártó utasításait. Minden mintát 2 párhuzamosban mértünk. A cAMP mennyiségét nmol/mg szövetben fejeztük ki.

#### 4.6. Reverz transzkripciós PCR vizsgálatok

A reverz transzkripciós polimeráz láncreakció (PCR) előkészítéseként az eltávolított uterusz mintákat RNAlater oldatba helyeztük (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország), majd  $-75$  °C-on tároltuk a teljes ribonukleinsav (RNS) kivonásáig. A teljes sejt RNS-t guanidinium-tiocianát-sav-fenol-kloroformos extrakcióval izoláltuk [56]

Az RNS-t (0,5 mg)  $70$  °C-on 5 percig denaturáltuk RNáz inhibitor (Hybaid Corp., Middlesex, UK), deoxinukleozid- trifoszfátot (dNTP) (Sigma-Aldrich) és oligo-deoxitimidint (dT) tartalmazó reakcióelegyben. Miután az elegyet  $48$  °C-ra hűtöttük, Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverz transzkriptázt, RNase H Minus-t (Promega, Madison, WI, USA.) adtunk hozzá, és az elegyet  $37$  °C-on 60 percig, majd  $72$  °C-on 10 percig inkubáltuk. A PCR-t 5 ml cDNS-sel, 25 ml ReadyMix REDTaq PCR reakciókeverékkel (Sigma-Aldrich) és 50 pM szensz és antiszensz primerrel végeztük a vizsgált receptorfehérjéknek megfelelően. Belső kontrollként minden mintában patkány gliceraldehyd-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) próbát használtunk.

A PCR-t PCR Sprint thermocycler-rel (Hybaid Corp.) végeztük, az amplifikált termék mennyiségi meghatározására  $\alpha$ - $^{32}$ P-deoxicitidin-trifoszfátot (dCTP) adtunk a reakcióelegyhez. A PCR-termékeket 1,8%-os agaróz gélen elektroforézisnek vetettük alá,

majd vákuum szárítást követően PhosphorImager (Molecular Dynamics, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK.) készülékbe helyezük. A mennyiségi analízist ImageQuant szoftverrel (MolecularDynamics) végeztük.

#### **4.7. Real Time PCR vizsgálatok**

A valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-PCR) mérések előkészítéseként az eltávolított uterusz mintákat RNAlater oldatba helyeztük (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország), majd  $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a teljes RNS kivonásáig. A teljes sejt RNS-t guanidinium-tiocianát/fenol/kloroform extrakcióval izoláltuk [56]. Izopropanollal történő kicsapás után az RNS-t 75%-os etanollal mostuk és dietil-pirokarbonátos vízben reszuszpendáltuk. Az RNS tisztaságát 260/280 nm optikai sűrűség mellett mértük BioSpec Nano készülékkel (Shimadzu Co., Kyoto, Japán). Valamennyi minta abszorpciós hányadosa 1,6–2,0 tartományban volt.

A PCR termékek reverz transzkripcióját és amplifikációját a TaqMan RNA-to-CT-Step One Kit és ABI StepOne Real-Time Cyler (mindkettő Thermo Fisher Scientific, Budapest, Magyarország) segítségével végeztük. A RT-PCR amplifikációk és a primerek az egyes kísérletekben a kívánalmaknak megfelelően különbözők voltak. A qPCR vizsgálatok mintái „sablon nélküli” kontrollt tartalmaztak. A specifikus PCR-termékek keletkezését olvadási görbe analízissel igazoltuk. Endogén kontrollként  $\beta$ -actint használtunk (Thermo, Fisher Hungary). Minden mintát három párhuzamosban futtattunk. A próbák fluoreszcencia intenzitását a PCR ciklusszám függvényében ábrázoltuk. A fluoreszcencia jel első jelentős növekedését mutató amplifikációs ciklust küszöbciklusként határoztuk meg.

#### **4.8. Western blot analízis**

A Western blot (WB) mérések előkészítéseként az uteruszokat Micro-Dismembrator (Sartorius AG, Göttingen, Németország) segítségével homogenizáltuk, és RIPA lízis- és extrakciós pufferben (Thermo Fisher Scientific, Budapest, Magyarország) proteáz és foszfatáz inhibitor koktéllal  $5000 \times g$ -vel centrifugáltuk 15 percig  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A felülúszó teljes fehérjemennyiségét spektrofotometriával határoztuk meg (BioSpec Nano).

Zsebenként  $25\text{ }\mu\text{g}$  fehérjét használtunk az elektroforézishez 4-12%-os NuPAGE Bis-Tris gélen (XCell SureLock Mini-Cell Units-ban) (Thermo Fisher Scientific, Budapest, Magyarország). A fehérjéket a gélről nitrocellulóz membránra vittük át az iBlot Gel Transfer System (Thermo Fisher Scientific, Budapest, Magyarország) segítségével. Az ellenanyag

kötődést WesternBreeze Chromogenic immunodetection kittel (Thermo Fisher Scientific, Budapest, Magyarország) mutattuk ki. A blotokat 4 °C-on, rázógépen inkubáltuk a megfelelő antitestekkel a blokkoló pufferben. A másodlagos antitest oldat inkubálása a WesternBreeze® Chromogenic Immunodetection Kit protokollja alapján történt. A képek EDAS290 képalkotó rendszerrel (Kodak Ltd. Budapest, Magyarország) készültek, az immunreaktív sávok optikai sűrűségét Kodak 1D Images elemző szoftverrel határoztuk meg. Az optikai sűrűségeket önkényes egységekben fejeztük ki a háttér kivonása után.

## **4.9. Radioimmun mérések**

### **4.9.1. Nociceptin mérések**

A radioligandum kötési kísérletek során az uterusz mintákat aprítottuk és jéghideg pufferben (0,05 M Tris-HCl, pH 7,4) homogenizáltuk teflon-üveg homogenizátorral, majd négy réteg gézen átszűrtük. A homogenizátumot 40 000 g-vel 20 percig 4 °C-on centrifugáltuk (Sorvall RC5C centrifuga, SS34 rotor, Kendro Lab. Asheville, NC, USA), majd a kapott pelletet friss pufferben szuszpendáltuk és 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. A centrifugálási lépést megismételtük, és a végső pelletet 0,32 M szacharózt tartalmazó 0,05 M Tris-HCl pufferben (pH 7,4) reszuszpendáltuk, és felhasználásig –70 °C-on tároltuk. A fehérjekoncentrációt Bradford módszerével határoztuk meg [57].

A homológ kiszorítási vizsgálathoz a reakcióelegy 100 µl membránpreparátumot (~ 0,3-0,4 mg fehérje/ml), 100 µl [<sup>3</sup>H]Nociceptin-NH<sub>2</sub>-t, vagy 100 µl jelöletlen ligandumot vagy 100 µl inkubációs puffert (0,05 M Tris-HCl, 0,01 M MgCl<sub>2</sub>, 2,5% etanol, pH 7,42) tartalmazott. Az inkubáció végén a megkötött radioligandumot gyors szűréssel Whatman GF/C szűrőkön (Semat Technical Ltd, St. Albans UK) keresztül Brandel M24R cell harvesterrel (Semat Technical Ltd.) elválasztottuk a maradék szabad radioligandumtól. A szűrőket 30 percig polietilén-iminbe áztattuk (0,3%, pH 10), majd 3x10 ml jéghideg pufferrel (0,05 M Tris-HCl, pH 7,42) mostuk. A szárított szűrők radioaktivitását UltimaGold™ F szcintillációs koktélban Packard Tricarb 2300TR folyadékszcintillációs számlálóval (mindkettő Packard Instrument Co., Meriden, CT, USA) határoztuk meg. Valamennyi mérést legalább háromszor végeztünk el két párhuzamosban.

### **4.9.2. Nocistatin mérések**

A nocistatin RIA vizsgálatok során vér- és uterusz mintákat használtunk. A vért K3-EDTA-t tartalmazó vacutainerbe (OMKER, Budapest, Magyarország) vettük, és proteázgátlóként

aprotinint (0,6 TIU/ml) adtunk hozzá. A plazmát centrifugálással választottuk el 3000 fordulat/perc sebességgel 10 percig, és a mintákat  $-80^{\circ}\text{C}$ -on a mérésekig lefagyasztottuk. A plazma minták 1000  $\mu\text{l}$ -ét azonos térfogatú 1 térfogatszázalékos trifluor-ecetsavval (TFA) kevertük, majd 1600 g-vel 20 percig  $4^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk. A savanyított mintákat C18 Sep-Pack kazettákba (ABL&E JASCO Hungary Kft., Budapest, Magyarország) töltöttük, kétszer mostuk TFA-val, majd 0,1% TFA-t tartalmazó 60%-os acetonitrilben eluáltuk. A mintákat centrifugálással fagyasztva szárítottuk (SAVANT, Instruments, Inc., Farmingdale, NY, USA). Az elkészített eluátumot  $^{125}\text{I}$ -Nocistatin RIA kittel (Phoenix Pharmaceuticals Inc. Burlingame, CA, USA) mértük. Az adatokat RIA-Mat 280 (Byk-Sangtec, Dietzenbach, Németország) segítségével értékeltük ki.

Az uterusz mintákat 1 M ecetsavval (250 mg/ml) kezeltük,  $95^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőbe helyeztük 5 percig, majd jéghideg vízfürdőben 10 percig hűtöttük, és Ultra Turrax T25 Janke&Kunkel homogenizátorral (IKA Labortechnik, Staufen, Németország) homogenizáltuk 20000 fordulat/perc sebességgel 10 másodpercig. Ezután a mintákat ultrahangosan homogenizáltuk (Labsonic 2000, B. Braun, AG, Melsungen Németország) 10 másodpercig, majd 5 perces,  $95^{\circ}\text{C}$ -os vízfürdőt követően jéghideg vízfürdőben lehűtöttük, és  $4^{\circ}\text{C}$ -on 10 percig 12000 g-vel Eppendorf centrifugában (A. Hettich, Tuttlingen, Németország) újra centrifugáltuk. A felülúszók 1000  $\mu\text{l}$ -ét a nocistatinos plazmamintáknál leírtak szerint kezeltük.

#### 4.9.3 $\beta_2$ -adrenerg receptor mérések

A  $\beta_2$ -AR radioligand-kötési vizsgálatokat vemhes patkányok uteruszának membránpreparátumain végeztük. A szöveteket feldaraboltuk és Tris pufferben Ultra-Turrax T25 homogenizátorral (Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik GmbH, Straufen Németország) homogenizáltuk, majd centrifugáltuk (20000 x g, 10 perc,  $4^{\circ}\text{C}$ ). A felülúszókat  $4^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk, a pelleteket újra szuszpendáltuk és újra centrifugáltuk. Keverés után a felülúszókat centrifugáltuk (50 000 x g, 60 perc,  $4^{\circ}\text{C}$ ). A pelleteket újra szuszpendáltuk és  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A reakcióelegy 100  $\mu\text{l}$  membránpreparátumot ( $\sim 0,5$  mg/ml fehérje), 100  $\mu\text{l}$  triciált  $\beta_2$ -AR szelektív ligandumot ( $^{3\text{H}}$ ICI 118 551), és 100  $\mu\text{l}$  nem jelölt ligandumot (izoproterenol) vagy 100  $\mu\text{l}$  inkubációs puffert tartalmazott. A fehérje koncentrációt Bradford-módszerrel határoztuk meg [57]. Az inkubáció végén ( $30^{\circ}\text{C}$ , 30 perc) a megkötött radioaktív anyagot a maradék szabad radioaktív anyagtól Brandell cell harvester (SEMAT) gyorszűrővel, Whatman GF/C szűrőkön (SEMAT) keresztül történő szűréssel választottuk el, majd 3 x 10 ml jéghideg pufferrel (Tris-HCl, pH 7,42) mostuk. A megkötött radioaktivitást HighSafe



szcintillációs koktélaban határoztuk meg Wallac 1409 folyadékszintillációs számlálóban (Wallac, Turku, Finnország).

#### **4.10. Fluoreszcens immunhisztokémiai vizsgálatok**

Az uterusz mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A kétszeres vagy háromszoros jelölésű fluoreszcens immunhisztokémiához 5 µm vastag kriometszeteket készítettünk. TRIS -sóoldattal (TBS) pufferezt 0,025% Triton X-100-ban (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) történő mosást, valamint 1% szarvasmarha-szérumalbumint és 10% normál kecskeszérumot (mindkettő Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) tartalmazó TBS-ben történő blokkolást (2 óra, szobahőmérsékleten) követően a mintákat egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitestekkel 4 °C-on. TBS-ben történő mosás után a mintákat fluoreszcens másodlagos antitestekkel inkubáltuk szobahőmérsékleten. A negatív kontrollokat az elsődleges antitestek kihagyásával végeztük, immunreaktivitást nem tapasztaltunk. A metszeteket Fluoroshield™ DAPI rögzítő közeggel (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország), AxioCam 506 mono kamerával felszerelt Zeiss Imager Z.2 fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss Technika Kft, Budapest, Magyarország) megfigyeltük és lefényképeztük. Egy vizsgálaton belül az összes receptort immunfestése egyszerre történt meg, de a jobb láthatóság és értelmezhetőség érdekében külön-külön kerültek bemutatásra.

#### **4.11. Plazma nemi hormon, adipokin és citokin mérések**

A patkányoktól gyűjtött plazmamintákból a nemi hormonok (17β-ösztadiol – E2, P4) az adipokinek (kisspeptin, leptin, adiponectin) plazmaszintjét ELISA kit-ekkel határoztuk meg (kisspeptin: R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; leptin, adiponectin: Biomatik, Kitchener, ON, Kanada; nemi hormonok: Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) a gyártó ajánlása szerint. Minden mintát 2 párhuzamosban mértünk

A plazmaminták citokin szintjeit digitális immunoassay-vel határoztuk meg Single Molecule Arrays (Simoa) módszert alkalmazva, Planar Array Rat Cytokine Panel 1 (Quanterix Corp., Billerica, MA, USA) segítségével. A vizsgálatok során 7 citokint mértünk: gamma-interferon (IFNγ), interleukin (IL)-1β, IL-2, IL-6, IL-10, keratinocita eredetű citokin (KC) és TNFα. A Planar Panel mintahígító puffert tartalmazott, és a vizsgálatokat a gyártó protokollja szerint végeztük. A panelt az SP-X Imaging and Analysis System (Quanterix Corp.) rendszerrel elemeztük. Minden mintát két párhuzamosban futtattunk.

#### 4.12. Zsírészlevei citokin mérés

A vemhes patkányokból nyert zsírészlevei mintákban a gyulladási citokinek, (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) meghatározásához a vizszerális, szubkután és barna zsírmintákat 10 térfogatnyi hideg 100 mM foszfátpufferben (pH 7,4) homogenizáltunk pengés homogenizátorral. A nyers homogenizátumot ezután 20000  $\times$  g-vel, 4 °C-on 10 percig centrifugáltuk, és a tiszta vizes fázist használtuk az ELISA mérésekhez (R&D Systems) a gyártó ajánlása szerint. A szlevei kivonatok fehérjetartalmát Bradford módszerrel mértük, és az ELISA eredmények korrigálására használtuk [57]. Az összes ELISA mérést Multiskan EX mikrolemezes spektrofotométeren (ThermoFisher Scientific) végeztük.

#### 4.13. A teljes oxidáns és antioxidáns státusz mérése

A patkányokból kinyert uterusz és cervix szleveket jéghideg sóoldattal átöblítettük, majd szlevei homogenizátumokat készítettünk, amelyeket Tris-HCl pufferben, pH 7,4, 4 °C-on, IKA Ultra-Turrax T-25 digitális homogenizátorral (Janke & Kunkel, Staufen, Németország) homogenizáltunk. A homogenizátumokat 5000 g-vel 10 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót használtuk meghatározáshoz [58].

A teljes oxidáns státuszt (TOS) a kit segítségével mértük (RelAssay Diagnostics, Gaziantep, Törökország). A mintában jelen lévő oxidálószer a vasion-o-dianizidin komplexet vasionná oxidálják. Az oxidációs reakciót a reakcióközegben nagy mennyiségben jelen lévő glicerin fokozza. A vasion savas közegben narancs színű komplexet ad. Az 530 nm-en spektrofotometriásan mérhető színintenzitás arányos a mintában jelen lévő oxidálószer-molekulák teljes mennyiségével. Az eredményeket  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ -egyenértékben/l-ben fejeztük ki [59].

A teljes antioxidáns státuszt (TAS) szintén kit (RelAssay Diagnostics) segítségével mértük. A mintában lévő antioxidánsok a sötétkék-zöld azino-bisz-etilbenzotiazolin-szulfonsav (ABTS) gyököt szintelen ABTS formára redukálták. A 660 nm-en mért abszorbancia változás arányos a minta teljes antioxidáns szintjével. A mérést standard stabil antioxidáns oldattal kalibráltuk Trolox-egyenértékben kifejezve [60]. Az oxidatív stressz indexet (OSI) a TOS és a TAS arányaként határoztuk meg, értékét az  $\text{OSI} = \text{TOS} (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{-egyenérték/l}) / \text{TAS} (\text{mmol Trolox-egyenérték/l})$  képlettel számoltuk ki.

#### **4.14. COX aktivitás mérése**

Az uterusz és cervix mintákat hideg Tris pufferrel (pH 7,4) perfundáltuk, majd folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -80 °C-on tároltuk a vizsgálatig. A mérés napján a mintákat grammonként 5 ml hideg pufferben (0,1M Tris-HCl, pH 7,8, 1 mM EDTA) homogenizáltuk, majd 4 °C-on 15 percig 10 000 g-vel centrifugáltuk, és a felülúszót mértük. A COX enzimek aktivitását COX Activity Assay Kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, Egyesült Államok) segítségével határoztuk meg, mely a COX peroxidáz aktivitását méri. A peroxidáz-aktivitást kolorimetriás módszerrel vizsgáltuk az oxidált N,N,N,N',N'-tetrametil-p-feniléndiamin 590 nm-en történő mérésével.

#### **4.15. In vivo kísérletek**

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

##### **4.15.1. Női nemi hormon kezelések**

A vemhes állatok P4 kezelését a vemhesség 15. napján kezdtük el. A P4-et olívaolajban oldottuk fel, és a 21. napig minden nap 0,5 mg/0,1 ml mennyiségben s.c. beadtuk. A 22. napon az uterusz mintákat begyűjtöttük, és elvégeztük az in vitro kontraktilitási és molekuláris farmakológiai vizsgálatokat.

A nem vemhes, nem-ovarietomizált nőstény patkányok ösztrogénkezelését az állatok ösztrusz fázisában kezdtük el. Az állatoknak 4 napon keresztül naponta egyszer 5 µg/kg, olívaolajban oldott E2-t adtunk s.c. injekcióban. A kezelést megkezdését követő 5. napon az állatok uteruszát eltávolítottuk további vizsgálatokra.

A vemhes állatok E2 kezelését a vemhesség 18. napján kezdtük meg. Az E2 olívaolajban került feloldásra és beadásra. Az állatoknak 4 napon keresztül naponta egyszer 5 µg/kg E2-t adtunk s.c. injekcióban. A 22. napon az uterusz mintákat begyűjtöttük, és elvégeztük az in vitro kontraktilitási és molekuláris farmakológiai vizsgálatokat.

##### **4.15.2. Koraszülés modellek**

###### **4.15.2.1. Hormonálisan indukált koraszülés modell**

A hormonálisan indukált koraszülést a szakirodalomban már leírt módszer szerint hajtottuk végre [61]. Az állatokat az antigesztagén hatású mifeprisztonnal (3 mg/0,1 ml/állat) és a

cervix érését elősegítő PGE<sub>2</sub>-vel (0,5 mg/állat) kezeltük a vemhesség 19. napján. A mifeprisztont olívaolajban szuszpendáltuk és s.c. injekció formájában adtuk be reggel 9 órakor. Délután 4 órakor a patkányokat intravaginálisan PGE<sub>2</sub>-vel kezeltük. Az ellés (vér vagy az első magzat megjelenése az almozó anyagban) idejét a mifepriszton beadásától számítottuk és órában fejeztük ki.

#### **4.15.2.2. Lipopoliszacharid indukált koraszülés**

A bakteriális lipopoliszacharid (LPS) beadása a terhesség 16. napján történt. A patkányokat ketamin/xilazin (45/5 mg/kg) intraperitoneális (i.p.) injekció kombinációval érzéstelenítettük, majd hasi középvonali bemetszést végeztünk, és feltártuk az uterusz szarvakat. Közvetlenül az uterusz lumenébe szarvanként 100 g/kg LPS-t fecskendeztünk a magzatmembránok közötti rést megcélozva [62]. A hasi bemetszést ezután sebészeti varratokkal zártuk, és az állatokat a narkózisból való felébredésig temperáltuk. A vemhesség 21. napján a gyulladásban lévő uteruszokat vagy eltávolítottuk és elvégeztük az in vitro kontraktilitási és molekuláris farmakológiai vizsgálatokat, vagy pedig in vivo vizsgálatokat végeztünk.

#### **4.15.3. In vivo uterusz kontraktilitási vizsgálatok**

##### **4.15.3.1. Nyúlásmérő (strain gauge) mérések**

A 22 napos vemhes patkányok esetén izoflurán narkózisban, laparotómiát követően egy beültethető nyúlásmérő (SEN-04-FSG2; MDE GmbH, Walldorf, Németország) került felvarrásra a mechanikai összehúzódások kimutatására a bal uterusz szarv felszínére, az izom hossz tengelye mentén. A kontrakciós hullámokat online szoftveresen regisztráltuk (SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System (MDE)) és a kontrakciókat a görbék AUC értéke alapján jellemeztük.

##### **4.15.3.2. Simaizom elektromiográfiás mérések**

A simaizom elektromiográfia (SMEMG) során izoflurán narkózisban a hasbőr középvonali megnyitását követően egy bipoláris ezüst-ezüst-klorid korongelektroda párt (SEN-15-2; MDE GmbH, Walldorf, Németország) rögzítettünk s.c. a vemhes uterusz felett a hasfal megnyitása nélkül. A két elektróda közötti távolság 20 mm volt. A SMEMG jeleket felerősítettük és szoftveresen rögzítettük. Minden analóg jelet egy elsőrendű, Bessel-típusú sávszűrővel szűrtünk 0-30 ciklus per perc (cpm) frekvenciával, és 2 Hz-es mintavételi

sebességgel alakítottuk át digitális jelekké. 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 uterusz valós mechanikai kontrakcióival [63].

#### **4.15.3.3. Ellési idő mérése COX-gátlók és tokoferol kezelés után**

A vemhes patkányokat négy csoportra osztottuk. Az állatok egyszeri kezelést kaptak per os gyomorszondán keresztül 1 ml térfogatban a vemhesség 21. napján 16:00 órakor. A kontroll csoport vizet, a második csoport 250 mg/kg tokoferolt [64], a harmadik csoport 5 mg/kg rofecoxibot [65], míg a negyedik csoport 250 mg/kg tokoferolt+5 mg/kg rofecoxibot kapott. A kezelést követően figyeltük az ellés megindulását és órában fejeztük ki a kezelések óta eltelt időhöz viszonyítva. A vér vagy az első magzat megjelenését az almozó anyagban az ellés megindulásának tekintettük.

#### **4.15.4. Vemhességi obezitás modell**

##### **4.15.4.1. Obez vemhes állatok létrehozása, mintavételek**

A hím és nőstény patkányokat pároztattuk, a vemhesülés után a nőstények megellettek. Az utódokat 3 hetes korukban leválasztottuk és a nőstény utódokat 2 csoportra osztottuk. Az egyik csoport 4 hetes korától a kísérlet végéig (12 hetes korig, a vemhesség 22. napja) magas zsír- és cukortartalmú diétán (HFHSD) (C1011, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Németország), míg a másik csoport ugyanilyen időeloszlásban standard diétán (SD) (Altromin 1314) tartottuk, az ivóvíz ad libitum állt rendelkezésre. Az állatok súlyát és a táplálékfogyasztást hetente mértük. A 9 hetes SD- és HFHSD nőstény állatokat nemileg érett hímekkel pároztattuk. A HFHSD vemhesült állatokat obez vemhes állatoknak tekintettük, míg a kontroll csoport az SD vemhesült állatok voltak. A vemhesség alatt a patkányok a vemhesség előtt meghatározott étrendjüket folytatták. A kísérlet végén, a vemhesség 22. napján az állatokat izoflurán altatásban, kisállat-altatógép (R550, RWD, Shenzhen, Kína) segítségével túlaltattuk, a szerveket eltávolítottuk, és a szervek nedves súlyát analitikai mérlegen (Kern ABJ-NM, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Németország) mértük, illetve az uterusz és cervix esetében izolált szervi kontraktilitási vizsgálatokat végeztünk. A vérmintákat szívpunkcióval vettük. A plazma-mintákat a zsírszövetmintákkal együtt (viszcerális, barna, pink és gonadális) -80 °C-on tároltuk a további vizsgálatokig.

#### **4.15.4.2. Glükóz tolerancia teszt**

A glükóztolerancia-tesztet (GTT) a vemhes obezitás modell során a 9 hetes állatokon végeztük, akik ekkor már 6 hete SD vagy HFHSD alatt voltak és vemhesülés előtt álltak. A méréseket újra elvégeztük 12 hetes korukban a vemhesülés után, a gesztációs idő végén (20. vemhességi nap). A glükózsztinteket glükózmérővel (OneTouch® UltraMini®Milpitas, CA, USA) mértük. Az állatokat a GTT előtt 16 órán át éhezettük. Az éhezési glükózsztinteket először reggel 8 órakor mértük, majd minden patkány i.p. 25%-os, 2 mg/kg glükózoldatot kapott. A vér glükózsztintjét 15, 30, 45, 60, 90 és 120 perccel az injekció beadása után határoztuk meg. A GTT-ben az egyes mintavételi időpontokban mért glükózsztinteket és a plazma glükóz koncentráció-idő görbe AUC értékeit hasonlítottuk össze az SD és a HFHSD csoportok között.

#### **4.16. Statisztikai analízis**

A statisztikai elemzést minden esetben Prism 5.01 szoftver (GraphPad Software, San Diego, CA, RRID:SCR\_002798) segítségével végeztük. 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. A szignifikancia szint küszöbértékének a nemzetközileg elfogadott 5%-ot állítottuk be, így szignifikánsnak fogadtuk el az analízis eredményét, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

## 5. Eredmények

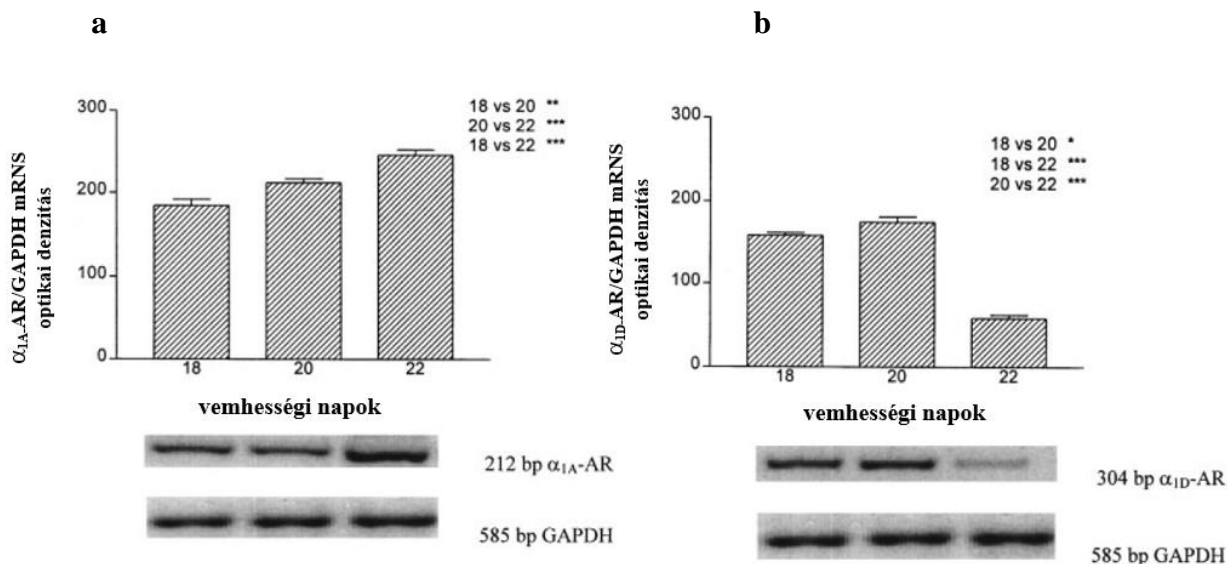
### 5.1. $\alpha$ -adrenerg hatások vizsgálata patkány uteruszon

A vizsgálatok során az  $\alpha$ -adrenerg altípus szelektív vegyületek uterusz kontrakcióra gyakorolt hatásait mértük vemhes állatokon, illetve megmértük az egyes altípusok expresszióját az uterusz szövetben.

#### 5.1.1. $\alpha_1$ -AR altípus szelektív hatások vizsgálata

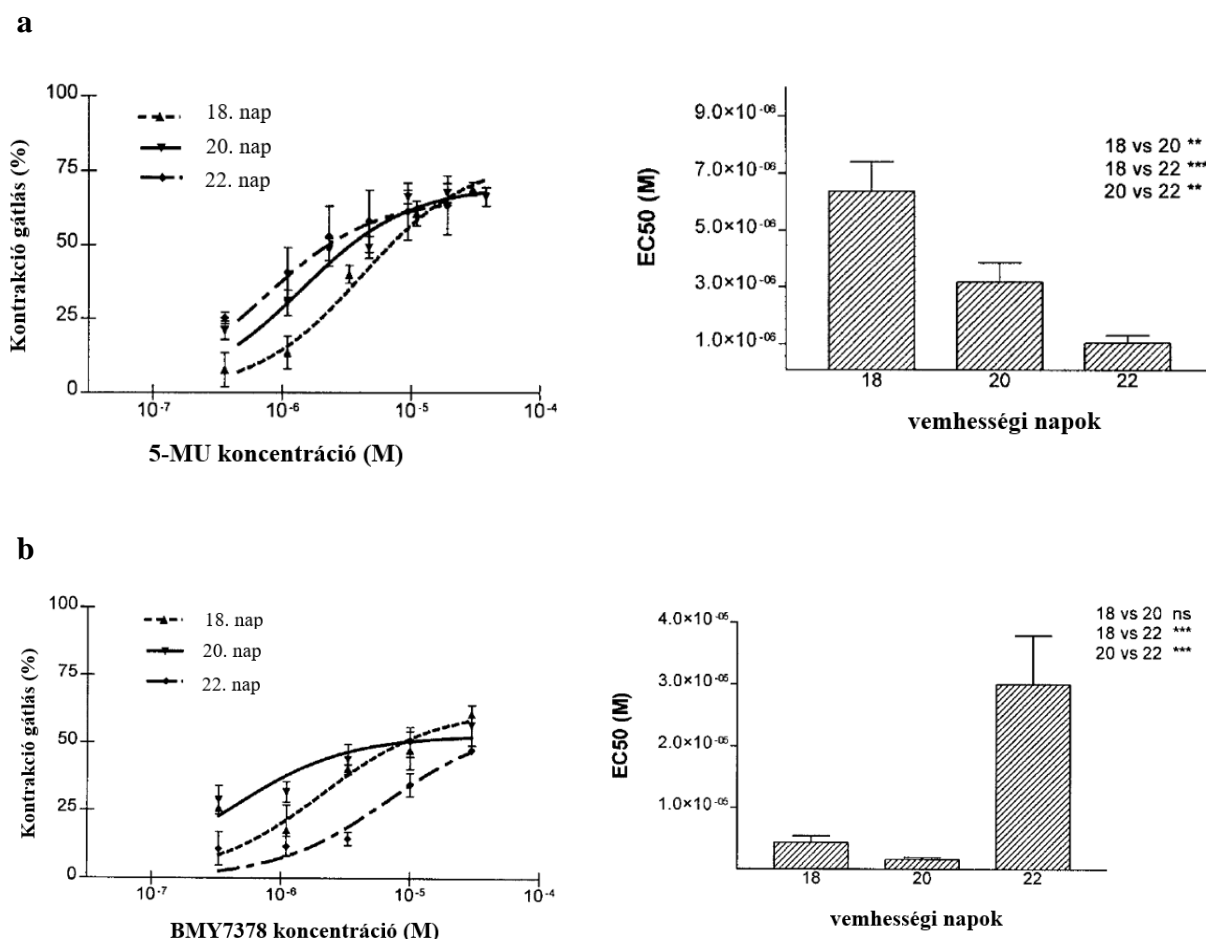
Az  $\alpha_1$ -AR három altípusa ismert: az  $\alpha_{1A}$ -,  $\alpha_{1B}$ -, és  $\alpha_{1D}$ -AR [66]. Reverz transzkripció PCR technikával megmértük a három  $\alpha_1$ -AR altípus expresszióját 18., 20. és 22. napos vemhes patkány uteruszban, majd izolált szervfűrdőben az altípus szelektív gátló farmakonok EFS által kiváltott kontrakció gátló hatását is vizsgáltuk [67].

Az  $\alpha_1$ -AR altípusok közül az  $\alpha_{1A}$ - és  $\alpha_{1D}$ -AR-okat tudtuk azonosítani, melyek közül az  $\alpha_{1A}$ -AR mRNS expressziója a vemhesség előrehaladtával fokozatos növekedést mutatott, míg az  $\alpha_{1D}$ -AR mRNS expresszió a gesztációs időszak utolsó napjára csökkent (**1. ábra**). Az  $\alpha_{1B}$ -AR nem volt kimutatható, így a továbbiakban ennek a receptornak a vizsgálatát nem folytattuk.



**1. ábra.** A patkány uterusz (a)  $\alpha_{1A}$ - és (b)  $\alpha_{1D}$ -AR mRNS expressziójának változása a késői vemhességben (n=6). Az  $\alpha_{1B}$ -receptorok expressziója nem volt kimutatható. A reverz transzkripció PCR során az  $\alpha_{1A}$ -AR amplifikálásához használt szekvenciák: 50-GTA GCC AAG AGA AGA GAA AGC CG-30 (forward primer) és 5'-CAA CCC ACC ACG ATG CCC AG-3' (reverse primer); a PCR termék 212 bázispár (bp) volt. Az  $\alpha_{1B}$ -AR esetén 5'-GCT CTT CTA CAT CCC CCC GCT CG-3' (forward primer), 5'-AGG GGA GAG CCA ACA CAT AAG ATG A-3' (reverz) primer, 300 bp PCR-termék;  $\alpha_{1D}$ -AR esetén pedig 5'-CGT GTG CTC CTT CTA CTA CCT ACC-3' (forward primer) és 5'-GCA CAG GAC GAA GAC ACC CAC-3' (reverz primer), 375 bp PCR termék. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Az izolált szervi uterusz kontrakciókat az  $\alpha_{1A}$ -AR altípus szelektív antagonistája 5-metilurapidil (5-MU) a vemhesség előrehaladtával egyre csökkenő  $EC_{50}$  értékkel gátolta, míg az  $\alpha_{1D}$ -AR szelektív antagonistája BMY7378  $EC_{50}$  értéke a vemhesség végére jelentősen megnőtt. (2. ábra).



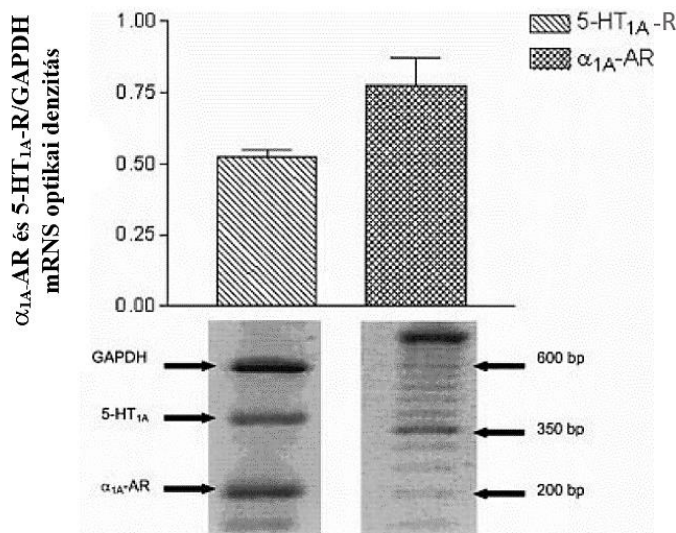
2. ábra. Az (a)  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistája 5-MU és az (b)  $\alpha_{1D}$ -AR antagonistája BMY 7378 gátló hatása és  $EC_{50}$  értékei az EFS kiváltott összehúzódásokra a késői vemhességben izolált patkány uteruszon (n=8). A mérések izolált szervfürdőben történtek. ns: nem szignifikáns; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

### 5.1.2. $\alpha_{1A}$ -AR gátló hatások szerotonerg komponensének vizsgálata

Az előző vizsgálat alapján a vemhes patkány uterusz kontraktilitásában az  $\alpha_1$ -AR-ok közül az  $\alpha_{1A}$ -AR játssza a legjelentősebb szerepet. Ismert, hogy az  $\alpha_{1A}$ -AR funkcionális kapcsolatban állhat a szerotonin receptor (5-HTR) altípusok közül az 5-HT<sub>1A</sub>-R-ral [68], valamint az  $\alpha_{1A}$ -AR blokkolók 5-HTR hatásokkal is bírhatnak [69]. Így kísérletek végeztünk a két receptor altípus uterusz kontrakciókban betöltött szerepének egyidejű vizsgálatára [70]. Elsőként reverz transzkripció PCR méréssel vizsgáltuk az  $\alpha_{1A}$ -AR és az 5-HT<sub>1A</sub>-R mRNS

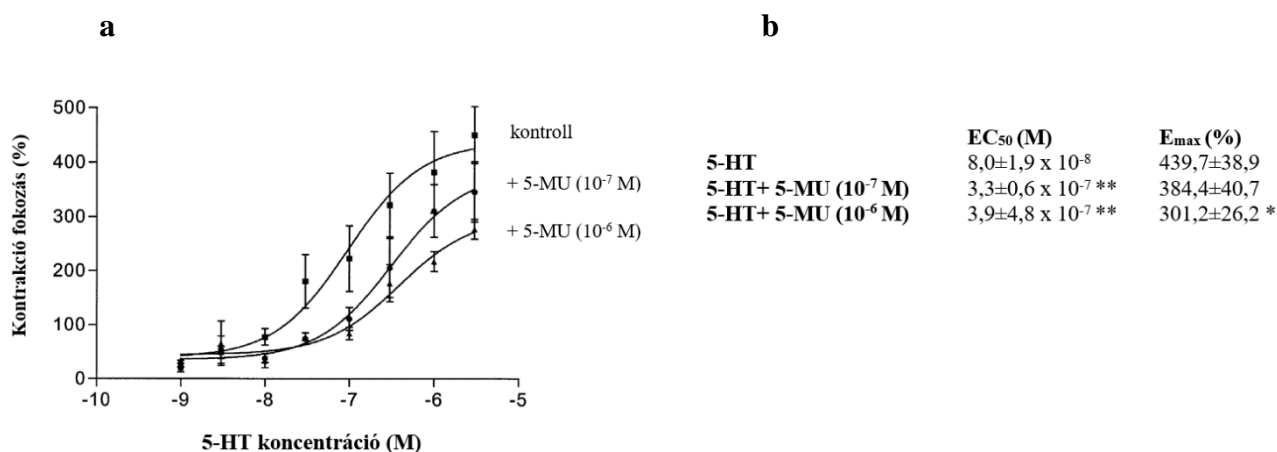


expressziót, mely során a 22 napos vemhes uterusból mindkét receptor altípust sikerült kimutatni (3. ábra).



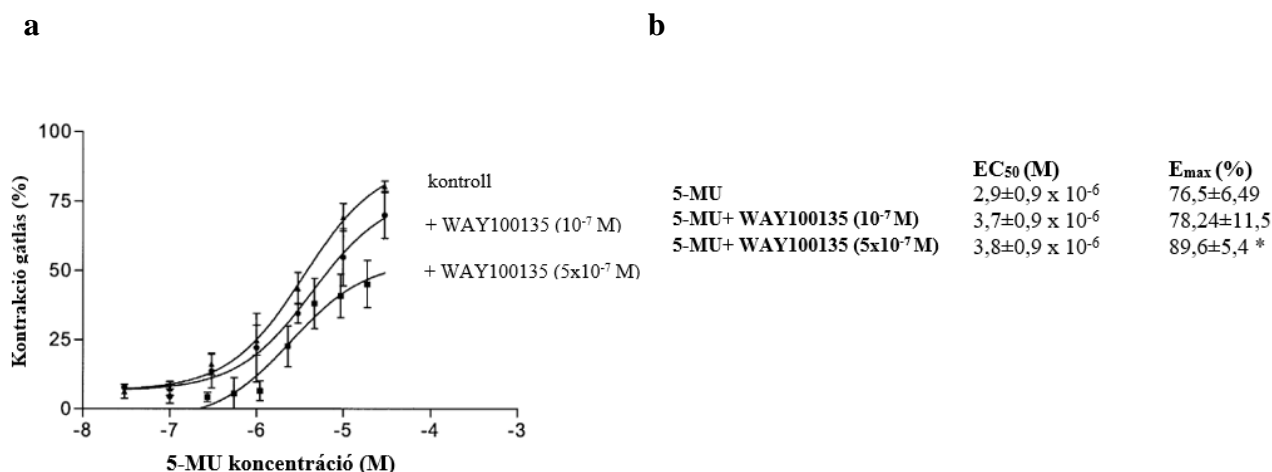
3. ábra. A patkány uterusz  $\alpha_{1A}$ -AR és 5-HT $_{1A}$ -R mRNS expressziója 22. napos vemhes uteruszban (n=6). A reverz transzkripciós PCR során az  $\alpha_{1A}$ -AR és a GAPDH amplifikálásához használt szekvenciákat és PCR terméket ld. 1. ábra, az 5-HT $_{1A}$ -AR amplifikálásához használt szekvenciák: 5'-CCA AAG AGC ACC TTC CTC TG-3' (forward primer) és 5'-TAC CAC CAC CAT CAT CA-3' (reverse primer); a PCR termék 350 bp volt.

Az 5-HT indukált koncentráció-hatás görbét a szeletív  $\alpha_{1A}$ -AR gátló 5-MU jobbra tolta, mely nagyobb koncentrációban ( $10^{-6}$ M) jelentősebb jobbra tolódást eredményezett, mint a kisebb koncentrációban ( $10^{-7}$ M). A nagyobb 5-MU koncentrációnál az 5-HT maximális hatása ( $E_{max}$ ) is csökkent (4. ábra).



4. ábra. Az 5-HT koncentráció-hatás görbájének változása 5-MU ( $10^{-7}$  és  $10^{-6}$  M) jelenlétében 22. napos vemhes uteruszon (n=7). A mérések izolált szervfürdőben történtek. (a) Az 5-MU az 5-HT koncentráció-hatás görbét dózis függően jobbra tolta. (b) A jobbratolódás mértéke mindkét koncentráció esetén szignifikáns volt. A nagyobb koncentrációjú 5-MU csökkentette az 5-HT  $E_{max}$  értékét is. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  a kontrollhoz viszonyítva (5-HT).

Az 5-MU koncentráció függően gátolta az EFS kiváltotta kontrakciókat 22 napos vemhes uteruszon. Az 5-HT<sub>1A</sub>-R szelektív antagonistája WAY100135 jelenlétében az 5-MU relaxáló hatása erősödött, ami azt sejteti, hogy az 5-MU 5-HT<sub>1A</sub>-R izgató hatással bír, ami 5-HT antagonisták nélkül csökkenti relaxáló hatékonyságát (**5. ábra**)

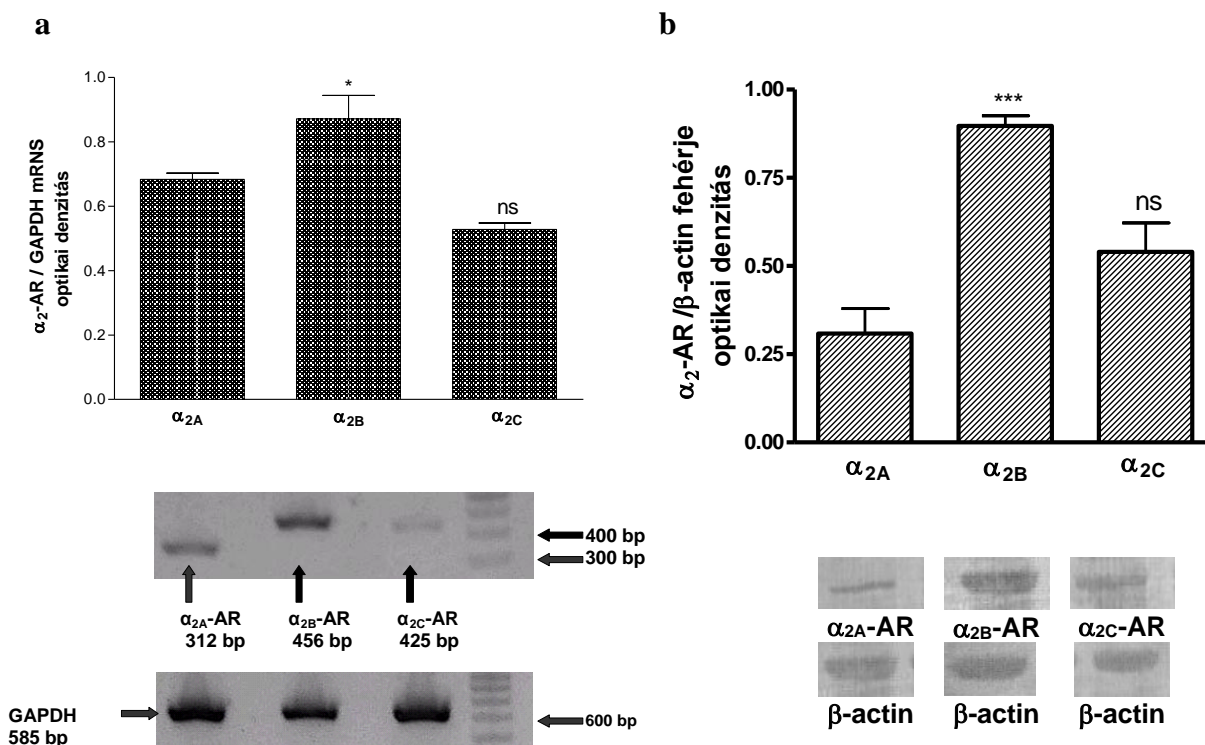


**5. ábra.** Az 5-MU koncentráció-hatás görbéjének változása az 5-HT<sub>1A</sub>-R antagonistája WAY100135 (10<sup>-7</sup> és 5x10<sup>-7</sup> M) jelenlétében 22. napos vemhes uteruszon (n=8). A mérések izolált szervfürdőben történtek, a kontrakciókat EFS segítségével váltottuk ki (ingerlési paraméterek: jelszélesség 150 ms, periódus idő 23,75 s, ingerlő feszültség 40 V). (a) A WAY100135 nagyobb koncentrációja csökkentette 5-MU gátló hatását. (b) Az E<sub>max</sub> csökkenés mértéke szignifikáns volt. \*p<0,05, az 5-MU-hoz (kontroll) viszonyítva.

### 5.1.3. α<sub>2</sub>-AR altípus szelektív hatások vizsgálata

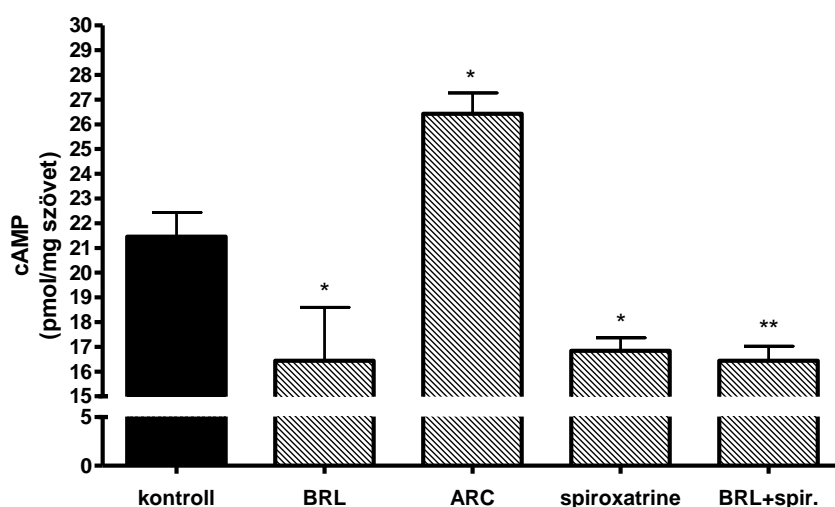
Az α<sub>2</sub>-AR három altípusa ismert: α<sub>2A</sub>-, α<sub>2B</sub>-, és α<sub>2C</sub>-AR [66]. Reverz transzkripció PCR technikával α<sub>2</sub>-AR altípusok mRNS expresszióját, míg Western blot technikával a fehérje expresszióját mértük 22. napos vemhes patkány uteruszban. Izolált szervfürdőben az α<sub>2</sub>-AR altípus szelektív hatóanyagok noradrenalin (NA) által kiváltott uterusz kontrakciót módosító hatását vizsgáltuk, valamint hormonális koraszülés modellből származó uterusz mintákon is teszteltük az altípus szelektív farmakonok hatását. A farmakonok okozta szöveti cAMP változásokat is mértük az uterusz mintákban, mivel az α<sub>2</sub>-AR másodlagos hírvivője a cAMP [71], melynek magas szöveti szintje a simaizom relaxációját eredményezi [72]. A NA kontrakciókat doxazosin (10<sup>-7</sup> M) és propranolol (10<sup>-5</sup> M) jelenlétében váltottuk ki annak érdekében, hogy az α<sub>1</sub>- és β-AR-on keresztüli hatásokat blokkoljuk, így a NA kontrakciók csak az α<sub>2</sub>-receptorokon keresztül közvetítődtek. [73].

Mindhárom α<sub>2</sub>-AR altípus mRNS-ét és fehérjéjét kimutattuk a 22. napos vemhes uteruszban, a legnagyobb mennyiségben az α<sub>2B</sub>-AR expresszáldott (**6. ábra**).



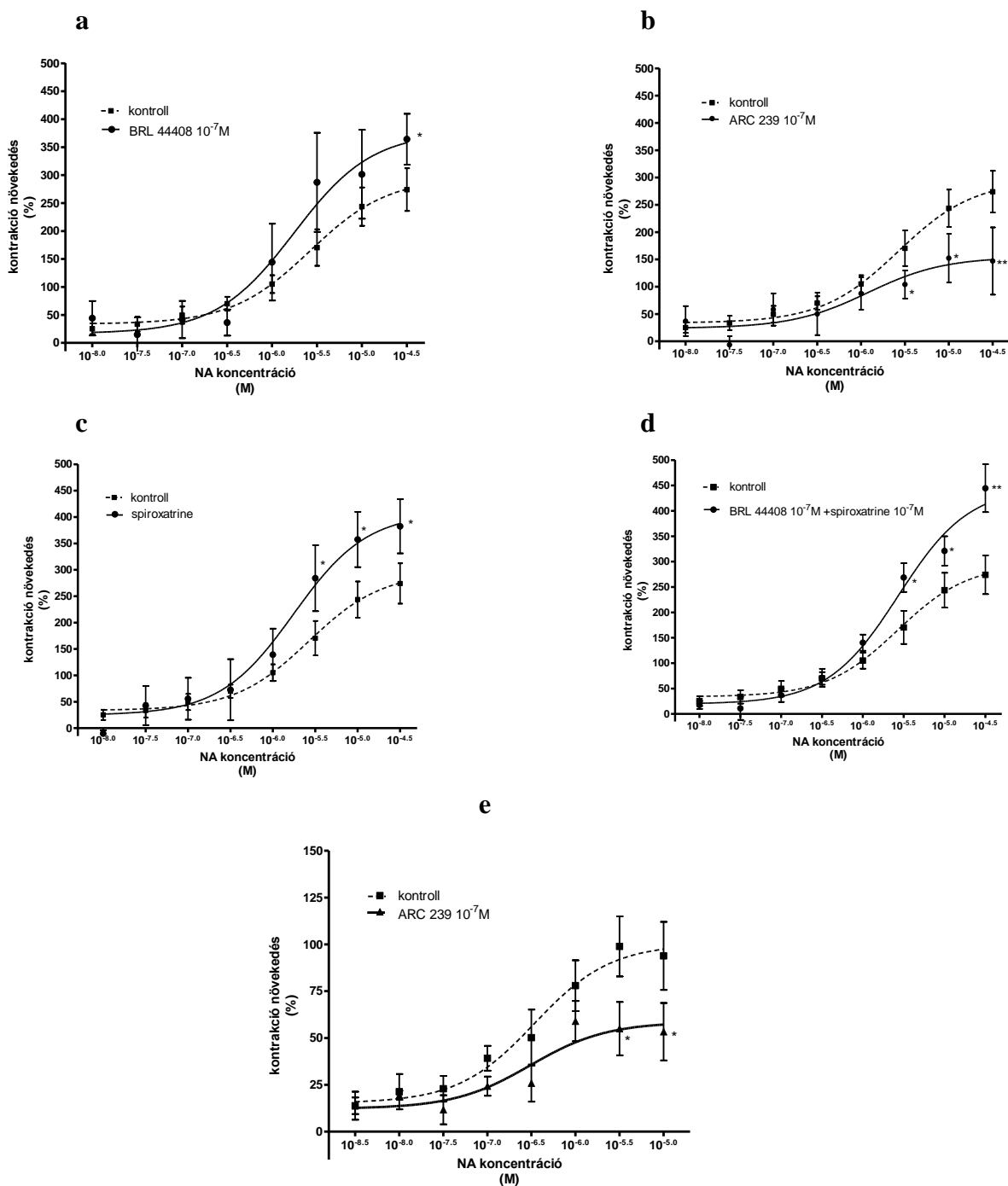
**6. ábra.** 22. napos vemhes patkány uterusz  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$  és  $\alpha_{2C}$ -AR mRNS és fehérje expressziója (n=6). (a) A reverz transzkripció PCR során a  $\alpha_2$ -AR altípusok sense és antisense primereinek GeneBank kódjai: NM\_012739 ( $\alpha_{2A}$ -AR); AF366899 ( $\alpha_{2B}$ -AR); NM\_138506 ( $\alpha_{2C}$ -AR); GAPDH ld. 1. ábra. (b) A Western blot vizsgálat során  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ -, és  $\alpha_{2C}$ -AR, valamint  $\beta$ -actin poliklonális antitesteket alkalmaztunk (Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Mind az mRNS, mind pedig a fehérje mérések során az  $\alpha_{2B}$ -AR dominanciája figyelhető meg. ns: nem szignifikáns; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 az  $\alpha_{2A}$ -AR-hez viszonyítva

A kísérletek során a NA által kiváltott  $\alpha_2$ -AR hatásokat altípus szelektív gátlószerekkel befolyásoltuk: BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ ), ARC239 ( $\alpha_{2B}$  és  $\alpha_{2C}$ ), és spiroxatrine ( $\alpha_{2C}$ ). Mindhárom hatóanyagot  $10^{-7}$  M koncentrációban alkalmaztuk az in vitro vizsgálatok során. A szöveti cAMP mérések során azt találtuk, hogy az  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2C}$ -, valamint a két receptor együttes gátlása (BRL44408 és spiroxatrine kombinációval) csökkenti a 22. napos vemhes uteruszban keletkező cAMP mennyiségét, míg az  $\alpha_{2B}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR együttes gátlása (ARC239) jelentős szöveti cAMP szint emelkedést eredményez (7. ábra).



7. ábra. Altípusszelektív  $\alpha_2$ -AR antagonisták hatása a NA ( $3 \times 10^{-6}$  M) által stimulált cAMP-szintre 22. napos vemhes patkány uteruszban (n=6). A mérések propranolol és doxazosin jelenlétében történtek. Jelentős cAMP emelkedés mérhető, ha a NA csak az  $\alpha_{2A}$ -receptorokon keresztül fejt ki hatását (ARC oszlop), a többi receptor gátlásával csökken a szöveti cAMP mennyiség; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 a kontrollhoz viszonyítva. BRL: BRL44408; ARC: ARC239; spir.: spiroxatrine

Az altípusszelektív  $\alpha_2$ -AR gátlók NA által kiváltott uterusz kontrakciókat befolyásoló hatását is vizsgáltuk a szervfürdőben in vitro (8. ábra). A BRL44408, a spiroxatrine és a BRL44408-spiroxatrine kombináció jelenlétében a NA kiváltott kontrakciók fokozódtak (8. ábra a,c,d), míg az ARC239 jelenlétben jelentősen csökkentek (8. ábra b). Mindez megerősíti a cAMP mérések eredményét és ezek alapján feltételezzük, hogy az  $\alpha_2$ -AR altípusok közül az  $\alpha_{2B}$ -AR aktivációja lehet felelős a vemhes uterusz kontrakciókért, míg a másik két altípus stimulációja relaxációt eredményez. Az ARC298 hatékonyságát hormonális koraszülés modellből származó uterusz mintákon is teszteltük, a szöveteket úgy nyertük, hogy a metodikai részben leírt (ld. 4.13.2.1. fejezet) módon elvégeztük a kezeléseket, de a kezelés másnapján reggel 9 órakor az állatokat feláldoztuk és nem engedjük, hogy az ellési folyamat beinduljon. Így hiperkontraktilis uterusz szöveteket nyertünk, melyeken a NA nem volt képes olyan mértékű kontrakció fokozásra, mint a normál vemhességből származó szöveteken, ugyanakkor az ARC298 ebben az esetben is jelentős gátló hatást tudott kifejteni (8. ábra e) Mindez megerősíti az  $\alpha_{2B}$ -AR gátlásának jelentőségét, mint lehetséges tokolitikus hatásmechanizmust.



**8. ábra.** Altípusselektív  $\alpha_2$ -AR antagonisták hatása a NA által kontrakciókra 22. napos vemhes patkány uteruszon *in vitro* (n=8). A mérések propranolol és doxazosin jelenlétében történtek. A kontroll (NA) koncentráció-hatás görbék szaggatott, míg az altípus szelektív antagonisták jelenlétében kapott görbék folyamatos vonallal vannak jelölve. (a) A kontrakciók kismértékben növekednek, ha a NA az  $\alpha_{2B}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR-okon egyszerre fejt ki hatását (BRL44408 jelenlétében), míg nagymértékű kontrakció fokozódás észlelhető, ha (c) a NA az  $\alpha_{2A}$ - és  $\alpha_{2B}$ -AR-okon (spiroxatrine jelenlétében), vagy pedig (d) az  $\alpha_{2B}$ -AR-on fejt ki hatását (BRL44408+spiroxatrine jelenlétben). (b) Jelentős relaxáció mérhető, ha a NA csak az  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztül fejt ki hatását (ARC239 jelenlétében). (e) A hormonális koraszülés modellből származó uteruszon a NA kontrakciófokozó hatása kisebb, ugyanakkor az ARC239 gátló hatása ebben az esetben is jelentős. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  a kontroll görbe azonos koncentrációhoz tartozó értékéhez viszonyítva.

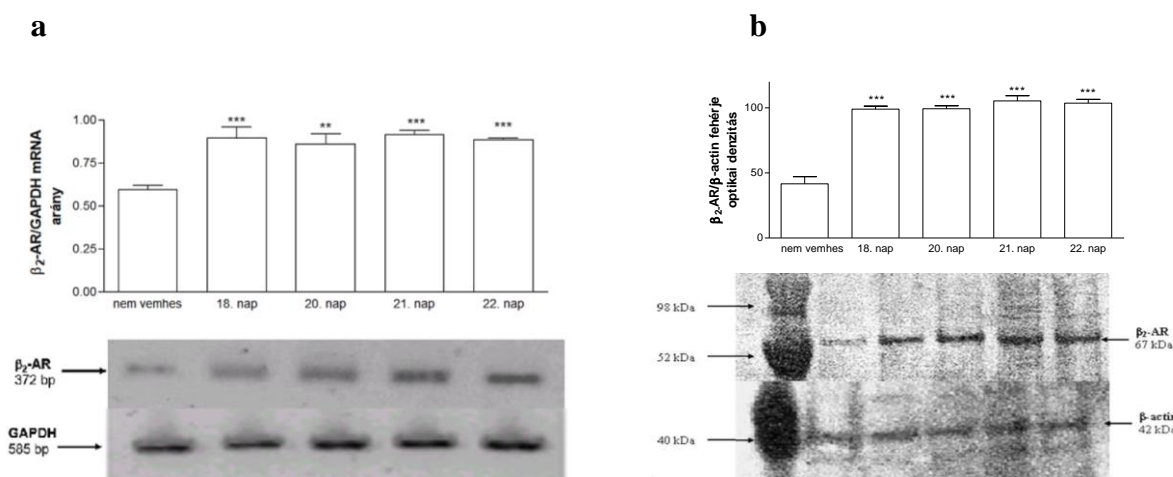
## 5.2. Adrenerg hatások vizsgálata patkány cervixen

A szülés beindulásához nem csupán a miometrium kontrakciókra van szükség, hanem arra is, hogy a cervix megérjen, felpuhuljon és így a magzat át tudjon jutni a méhszájon keresztül a szülőcsatornába, elindítva kitolási szakaszt [74]. Éppen ezért az adrenerg tokolitikus lehetőségek keresése során meg kellett vizsgálni azok cervikális hatásait is. A cervix adrenerg farmakológiai válaszkészsége jórészt feltáratlan volt, ezért mind a  $\beta_2$ -AR, mind pedig az  $\alpha_1$ - és  $\alpha_2$ -AR altípusok cervix rezisztenciára gyakorolt hatásait is megmértük.

### 5.2.1. A cervikális $\beta_2$ -AR hatások vizsgálata

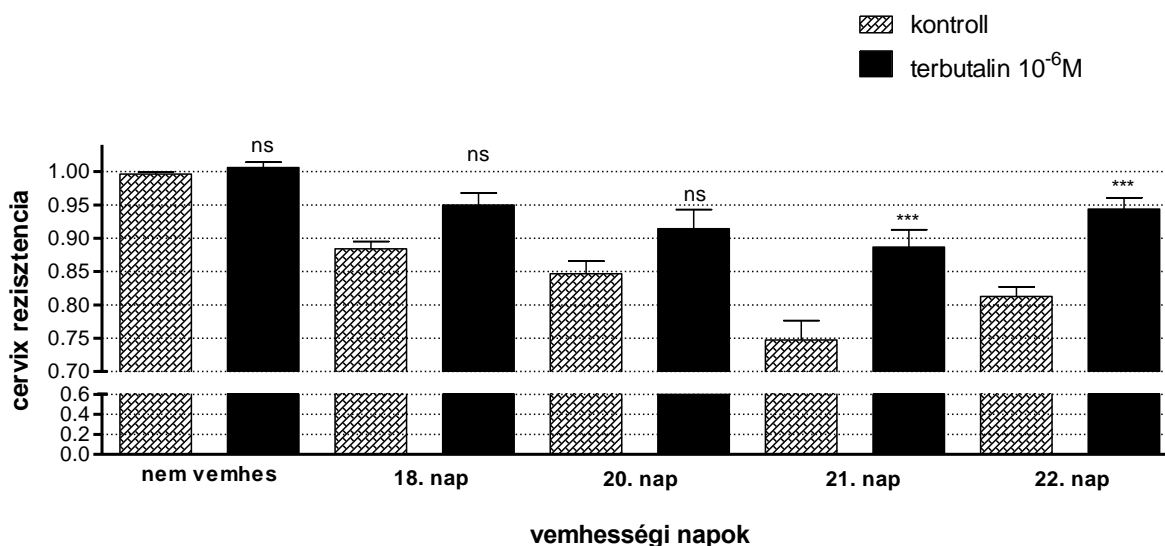
Megvizsgáltuk, hogy nem vemhes, illetve különböző vemhességi idejű patkányokból származó cervixekben hogyan változik a  $\beta_2$ -AR-ok mRNS és fehérje expressziója. Ezek után megmértük a  $\beta_2$ -AR agonista terbutalin hatását a cervix rezisztenciára izolált szervfűrdőben, majd pedig vizsgáltuk a  $\beta_2$ -AR izgatás következtében létrejövő G-protein aktiválódást a nem vemhes és különböző vemhességi idejű cervixeken [75].

Reverz transzkripció PCR vizsgálattal kimutattuk, hogy a nem vemhes cervixhez képest a vemhesség 18. napján egy jelentős emelkedés mérhető a  $\beta_2$ -AR mRNS szöveti mennyiségében, ugyanakkor a vemhesség további napjain változás nem történt (9. ábra a). A WB vizsgálatokban a PCR mérésekkel teljesen megegyező változásokat mértünk a  $\beta_2$ -AR fehérje expressziójában (9. ábra b).



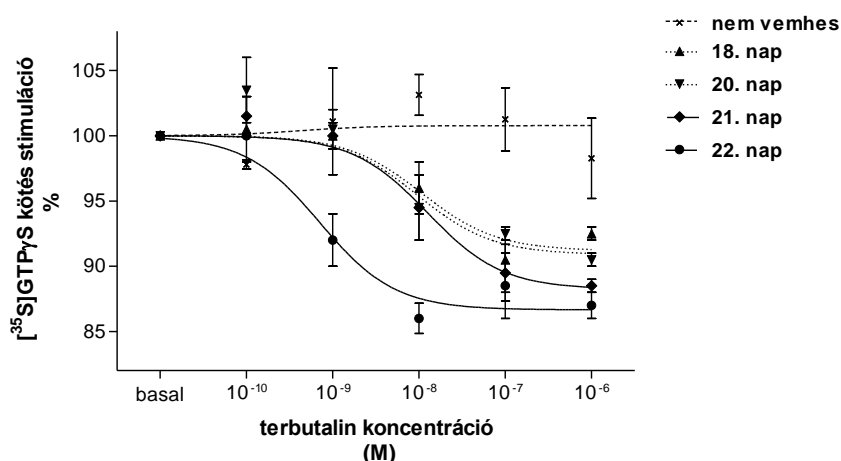
**9. ábra.** Nem vemhes és késői vemhes patkány cervixek  $\beta_2$ -AR mRNS és fehérje expressziója (n=6). (a) A reverz transzkripció PCR során a  $\beta_2$ -AR amplifikálásához használt szekvenciák: 5'- TCT TCG AAA ACC TAT GGG AAC GGC-3' (forward primer) és 5'-GGA TGT GCC CCT TCT GCA AAA TCT-3' (reverse primer); a PCR termék 372 bp volt; a GAPDH szekvenciákat ld. 1. ábra. (b) A Western blot vizsgálat során  $\beta_2$ -AR, valamint  $\beta$ -actin poliklonális antitesteket alkalmaztunk (Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Mind az mRNS, mind pedig a fehérje mérések során az  $\beta_2$ -AR 18. napi fokozott expressziója figyelhető meg, mely tovább nem változott a vemhesség végéig. ns: nem szignifikáns; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , a nem vemhes értékéhez viszonyítva

A terbutalin a nem vemhes, illetve a 18. és 20. napos vemhes cervixeken nem befolyásolta a rezisztenciát. A 21. és 22. vemhességi napokon, amikor patkányban a cervix rezisztencia értéke az érési folyamatoknak köszönhetően csökken, a terbutalin jelentős mértékben fokozta az értékét (10. ábra).



**10. ábra.** A  $\beta_2$ -AR agonista terbutalin cervix rezisztenciát befolyásoló hatása nem vemhes és késői vemhes cervixeken *in vitro* (n=6). A cervix rezisztencia a vemhesség előrehaladtával folyamatosan csökkent, a 21. és 22. nap között nem volt szignifikáns különbség (mintázott oszlopok). A terbutalin ( $10^{-6}$  M) a vemhesség végén jelentős mértékben fokozta a cervix rezisztenciát (fekete oszlopok). ns: nem szignifikáns; \*\*\* $p < 0,001$ , a kontroll (terbutalinnal nem kezelt) cervix rezisztencia értékéhez viszonyítva.

Megmértük nem vemhes és késői vemhes cervix szöveteken, hogy a terbutalin emelkedő koncentrációi ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  M) hogyan befolyásolják a G-protein aktivációt. Az alkalmazott [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S módszerrel elsősorban a G<sub>s</sub>-fehérjék aktiválódását lehet detektálni, melyek felelősek a cAMP aktiválódásért. A terbutalin a nem vemhes cervixen semmilyen G-protein aktiválódást nem tudott kiváltani, míg a késői vemhes cervixeken a vemhesség előrehaladtával csökkenő G-protein aktiváció volt mérhető (11. ábra). Ez azt jelenti, hogy a terbutalin csökkenti a cAMP keletkezését és ezáltal növeli a cervikális simaizom tónusát, ami megmagyarázza a cervix rezisztencia növelő képességét.



Vemhességi napok	Terbutalin	
	$EC_{50} \pm SEM$ (M)	$E_{max} \pm SEM$ (%)
18.	$1,1 \pm 0,4 \times 10^{-8}$	$91,2 \pm 0,8$
20.	$9,6 \pm 1,8 \times 10^{-9}$ (ns)	$89,9 \pm 1,0$ (ns)
21.	$1,3 \pm 0,5 \times 10^{-8}$ (ns)	$88,2 \pm 0,9$ (*)
22.	$7,1 \pm 0,9 \times 10^{-10}$ (***)	$86,7 \pm 1,1$ (*)

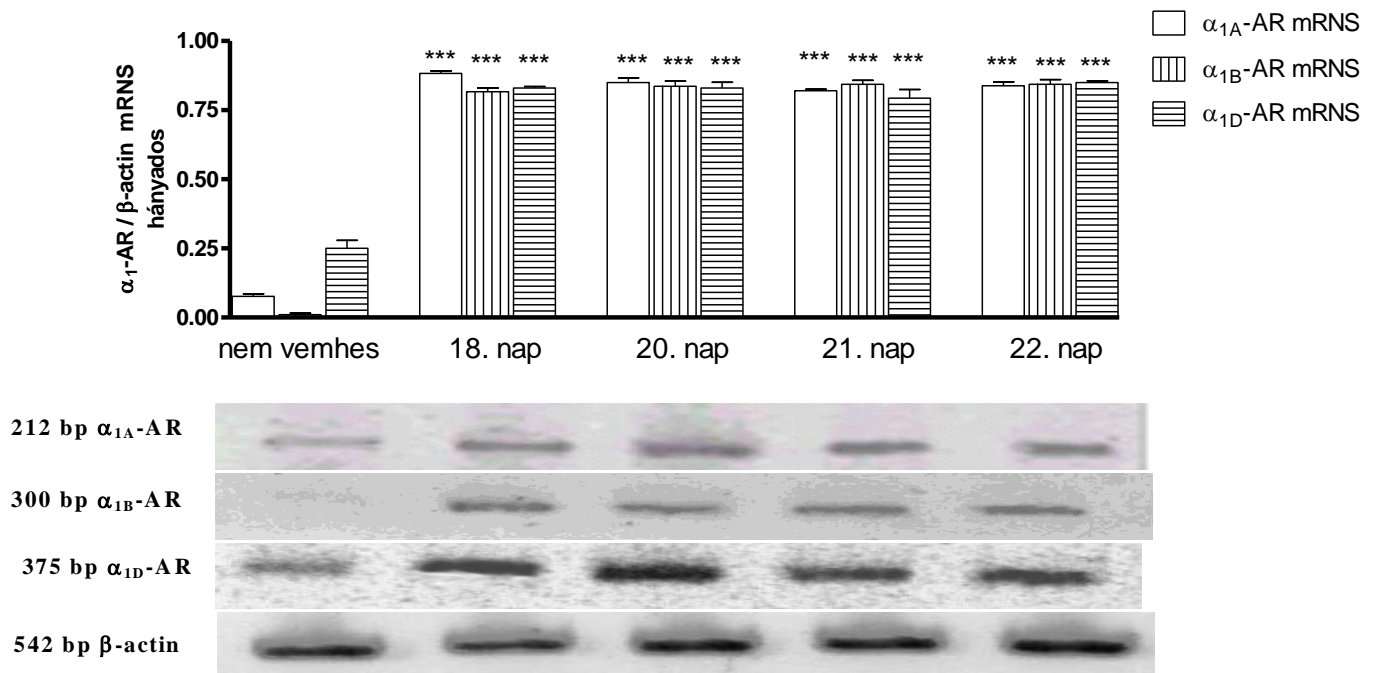
**11. ábra.** A  $\beta_2$ -AR agonista terbutalin G<sub>s</sub>-protein aktiváló hatása nem vemhes és késői vemhes cervixeken *in vitro* (n=6). A terbutalin a vemhesség előrehaladtával egyre kisebb G-protein aktiválódást eredményezett, a 21. és 22. napon szignifikáns változást okozva (ld. táblázatos rész, sárga oszlop). Mindez feltehetően kisebb cervikális cAMP termeléssel jár, ami fokozza a cervix simaizomzatának tónusát. ns: nem szignifikáns; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001, a 18. napi értékekhez viszonyítva.

### 5.2.2. A cervikális $\alpha_1$ -AR hatások vizsgálata

A továbbiakban az  $\alpha_1$ -AR altípusok szerepét vizsgáltuk a cervix rezisztencia fenntartásában nem vemhes és késői vemhes szöveteken. A cervikális  $\alpha_1$ -AR altípusok esetén is először reverz transzkripciós PCR és WB technikákkal azonosítottuk az egyes altípusokat, majd altípus szelektív antagonisták (inverz agonisták) jelenlétében megvizsgáltuk, hogy az egyes altípusok gátlása hogyan módosítja cervix rezisztenciát, végül pedig mértük a G-protein aktiválódásban bekövetkező változásokat [76].

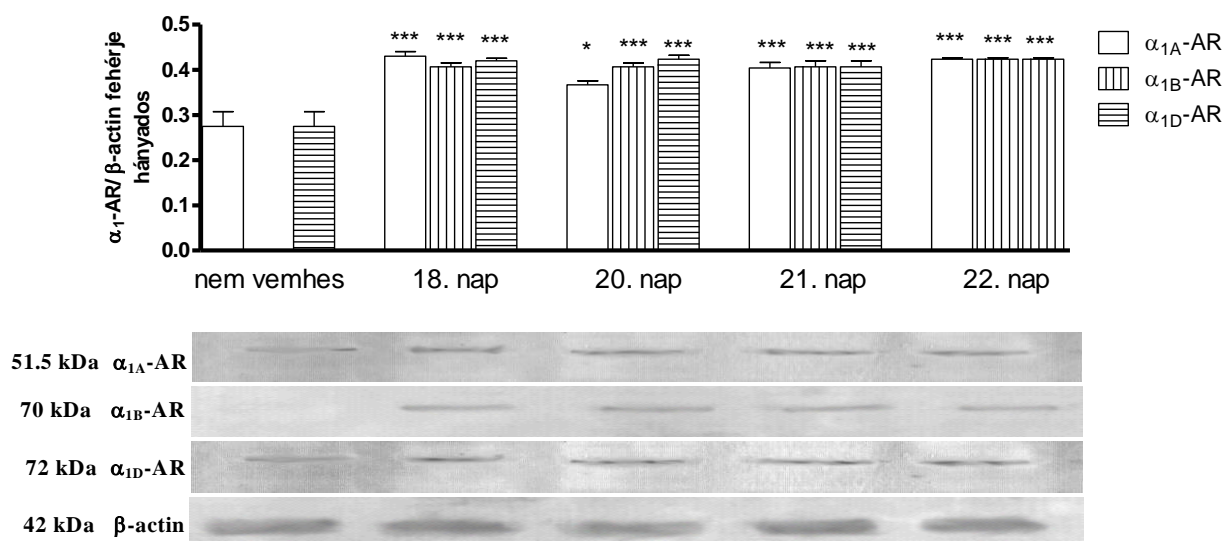
Mindhárom  $\alpha_1$ -AR altípus mRNS kimutatható volt mind a nem vemhes, mind pedig a késői vemhes cervix szövetekből, habár a nem vemhes esetben az  $\alpha_{1B}$ -AR mRNS expressziója alig volt detektálható. Valamennyi altípus mRNS expressziója jelentősen megemelkedett a 18. vemhességi napon, utána azonban további változás nem történt (**12. ábra**).





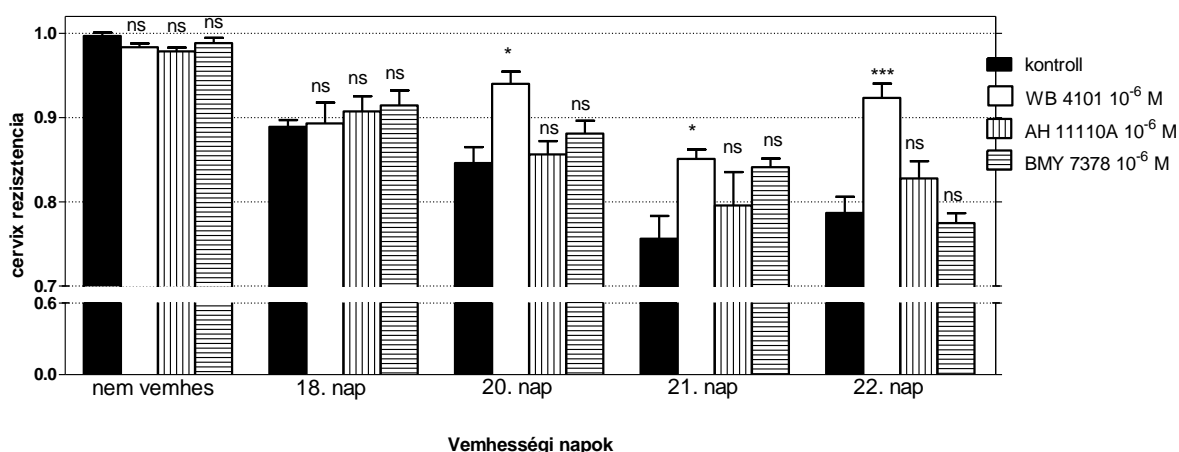
**12. ábra.** Nem vemhes és késői vemhes patkány cervixek  $\alpha_1$ -AR altípusainak mRNS expressziója (n=6). A reverz transzkripciós PCR során az  $\alpha_1$ -AR altípusok amplifikálásához használt szekvenciákat ld. 1. ábra. Minden mintában patkány  $\beta$ -actin próbát használtunk belső kontrollként (Genebank kód: NM031144) [77]. Mindhárom receptor altípus mRNS szignifikánsan megemelkedett a 18. vemhességi napon, mely expresszió megmaradt a vemhesség végéig. \*\*\*p<0,001, az adott altípus nem vemhes mRNS expressziójához viszonyítva.

A WB mérések során hasonló eredményeket kaptunk. A nem vemhes cervixben az  $\alpha_{1B}$ -AR fehérje egyáltalán nem volt kimutatható, a 18. vemhességi naptól azonban mindhárom altípus expressziója jelentős volt, habár az emelkedés mértéke az  $\alpha_{1A}$ -és  $\alpha_{1D}$ -AR fehérjék esetében elmaradt arányaiban az mRNS esetében tapasztaltól. A megnövekedett fehérje expresszió mindhárom altípus esetében megmaradt a vemhesség végéig (**13. ábra**).



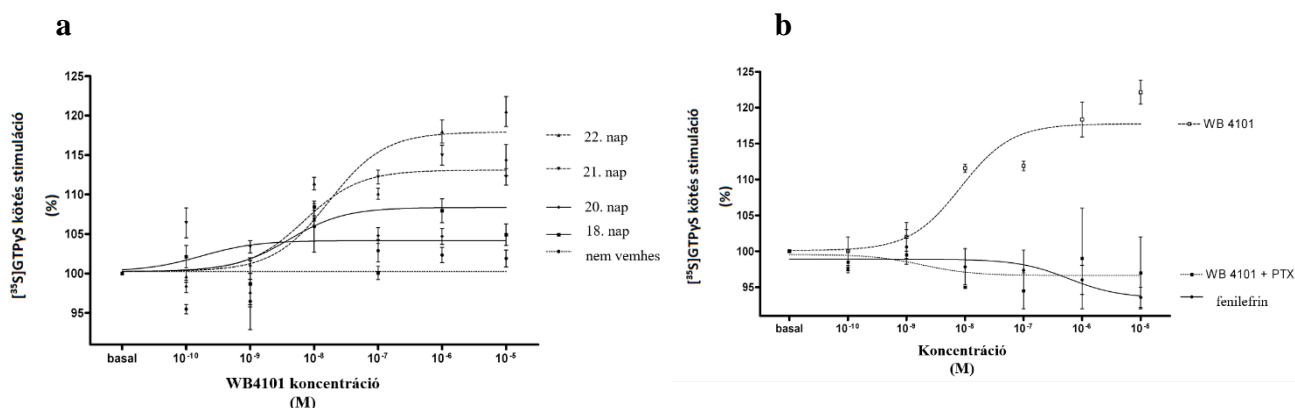
**13. ábra.** Nem vemhes és késői vemhes patkány cervixek  $\alpha_1$ -AR altípusainak fehérje expressziója (n=6). A WB során  $\alpha_1$ -AR altípus és  $\beta$ -actin poliklonális antitesteket alkalmaztunk (Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Mindhárom receptor altípus szignifikánsan megemelkedett a 18. vemhességi napon, mely megemelkedett expresszió megmaradt a vemhesség végéig. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 az adott altípus nem vemhes fehérje expressziójához viszonyítva.

A szervfürdőben elvégzett cervix rezisztencia vizsgálat során az  $\alpha_{1B}$ -AR altípus szelektív AH11110A és az  $\alpha_{1D}$ -AR altípus szelektív BMY7378 semmilyen hatást nem fejtett ki. Az  $\alpha_{1A}$ -AR altípus szelektív WB4101 nem vemhes, valamint a 18. napos vemhes cervix esetén hatástalan volt, ugyanakkor a vemhesség 20., 21. és 22. napján jelentősen növelte a rezisztenciát, a legkifejezettebb hatást vemhesség utolsó napján fejtette ki (**14. ábra**).



**14. ábra.** A  $\alpha_1$ -AR altípus szelektív vegyületek cervix rezisztenciát befolyásoló hatása nem vemhes és késői vemhes cervixeken *in vitro* (n=6). Az AH11110A (függőleges csíkos oszlopok) és a BMY7378 (vízszintes csíkos oszlopok) nem fejtett ki hatást, míg az  $\alpha_{1A}$ -AR szelektív WB4101 (10<sup>-6</sup> M) (fehér oszlopok) a vemhesség 20. napjától jelentős mértékben fokozta a cervix rezisztenciát. ns: nem szignifikáns; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 az adott nap kontroll értékéhez (fekete oszlop) viszonyítva.

Mivel az  $\alpha_{1B}$ - és  $\alpha_{1D}$ -AR altípusokon keresztül nem sikerül befolyásolni a cervix rezisztenciát, így a G-protein aktiváló képességet csak az  $\alpha_{1A}$ -AR altípuson keresztül vizsgáltuk meg az inverz agonista WB4101 jelenlétében. A WB4101 a nem vemhes és 18. napos vemhes cervixeken nem tudta aktiválni a G-proteineket, míg a 20. naptól kezdve egyre nagyobb G-protein aktivációt ért el (**15. ábra a**). Megmértük a 22. napos vemhes cervixen az  $\alpha_1$ -AR agonista fenilefrin G-protein aktiváló képességét, valamint azt, hogy a  $G_i$ -protein inhibitor pertussis toxin (PTX) jelenlétében hogyan változik a WB4101 hatása. A fenilefrin hatástalan volt, míg a PTX teljes mértékben megszüntette a WB4101 G-protein aktiváló hatását (**15. ábra b**). Ezek alapján feltételezzük, hogy a WB4101 hatásai - legalábbis részben – összefüggésben állnak a PTX-érzékeny G-fehérjékkel, feltehetően a  $G_i$ -proteinekkal, bár a  $G_{q/11}$ -fehérjék sem zárható ki [78].



Vemhességi napok	WB 4101
	$E_{max} \pm SEM$ (%)
nem vemhes	$102,8 \pm 0,6$
18.	$105,0 \pm 0,6$ (ns)
20.	$108,4 \pm 0,5$ (*)
21.	$113,2 \pm 0,5$ (***)
22.	$117,5 \pm 0,7$ (***)

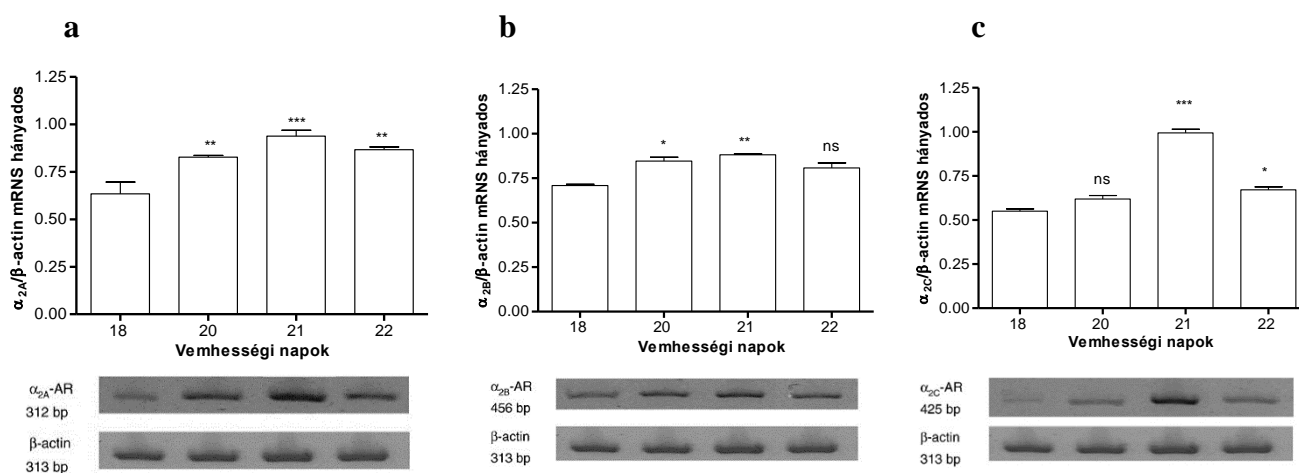
Vemhességi nap	WB 4101	fenilefrin	WB 4101 + PTX
	$E_{max} \pm SEM$ (%)	$E_{max} \pm SEM$ (%)	$E_{max} \pm SEM$ (%)
22.	$117,7 \pm 1,2$	$93,5 \pm 2,2$ **	$96,6 \pm 1,6$ **

**15. ábra.** A  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistá WB4101 G-protein aktiváló hatása nem vemhes és késői vemhes cervixeken *in vitro* (n=6). (a) Az inverz agonista vegyület a vemhesség 20. napjától fokozta a G-protein aktiváció maximumát (ld. táblázatos rész). (b) A fenilefrin nem tudta befolyásolni a G-protein aktivációt, ugyanakkor a  $G_i$ -fehérje gátló PTX (500 ng/ml) kivédte a WB4101 G-protein aktiváló hatását (ld. táblázatos rész), ami azt feltételezi, hogy vegyület elsősorban a  $G_i$ -protein aktivációjával csökkenti a cAMP szintet a cervixben. ns: nem szignifikáns; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001, a nem vemhes (a), illetve a WB4101 (b) értékéhez viszonyítva.

### 5.2.3. A cervikális $\alpha_2$ -AR hatások vizsgálata

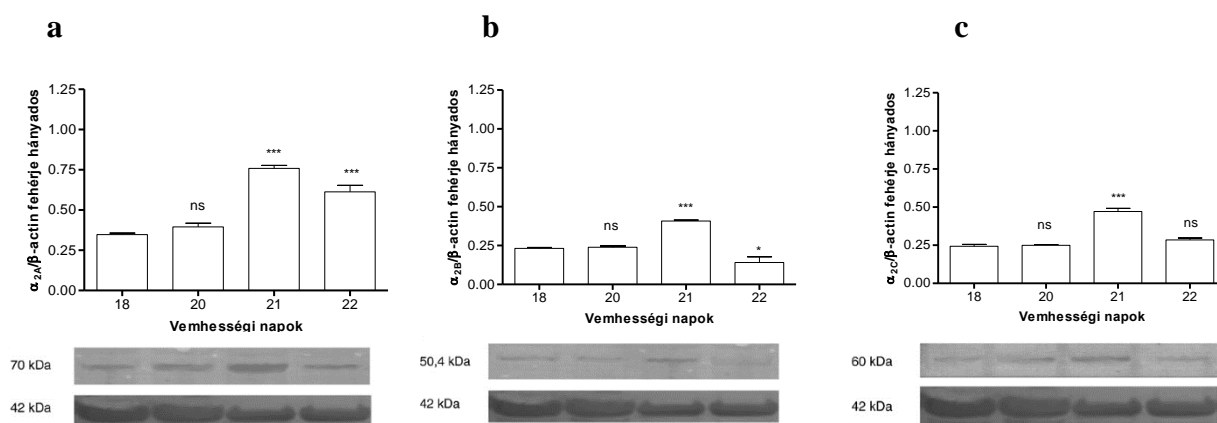
Az  $\alpha_1$ -AR altípusokhoz hasonlóan megvizsgáltuk az  $\alpha_2$ -AR altípusok szerepét is a cervix rezisztencia fenntartásában. Ebben az esetben a nem vemhes cervixet nem vizsgáltuk, mivel a korábbi tapasztalatok alapján annak olyan nagy a rezisztenciája, hogy azt az adrenerg receptorokon keresztül nagy valószínűséggel nem lehet befolyásolni. Így az  $\alpha_2$ -AR-ok esetén kísérleteink csak a késői vemhes cervixekre (18-22. vemhességi nap) fókuszáltak. A cervikális  $\alpha_2$ -AR altípusokat reverz transzkripciós PCR és WB technikákkal azonosítottuk, majd altípus szelektív antagonisták hatását mértük NA jelenlétében a cervix rezisztenciára, végül pedig megvizsgáltuk a cervix szövetben végbemenő, cAMP termelésben bekövetkező változásokat [79].

Mindhárom  $\alpha_2$ -AR altípus mRNS kimutatható volt a késői vemhes cervix szövetekben és valamennyi altípus esetében a 21. napon mértük a legmagasabb mRNS expressziót. A 22. napra valamennyi altípus expressziója csökkent, melyek közül az  $\alpha_{2C}$ -AR csökkenése volt a legnagyobb mértékű (16. ábra)



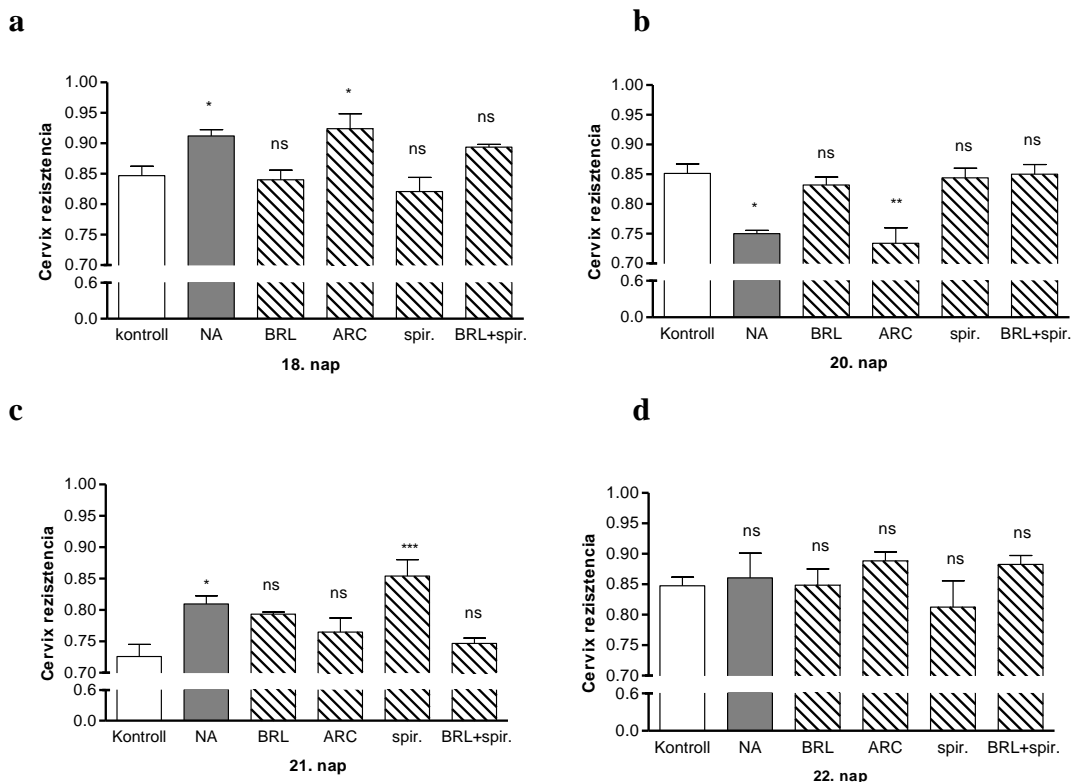
**16. ábra.** Késői vemhes patkány cervixek  $\alpha_2$ -AR altípusainak mRNS expressziója (n=6). A reverz transzkripciós PCR során az  $\alpha_2$ -AR altípusok amplifikálásához használt primereket ld. 6. ábra,  $\beta$ -actin esetén ld. 12. ábra. Mindhárom receptor altípus mRNS expressziója 21. vemhességi napon volt a legmagasabb, ugyanakkor a 22. napra minden esetben egy kisebb mértékű csökkenés volt tapasztalható. ns: nem szignifikáns, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , az adott altípus 18. vemhességi napon mért mRNS expressziójához viszonyítva.

A WB vizsgálatokban a PCR mérésekhez hasonló eredményeket kaptunk abban a tekintetben, hogy a legmagasabb fehérje expressziót mindhárom altípus esetén a 21. vemhességi napon mértük, ugyanakkor a 20. vemhességi napon egyik esetben sem volt szignifikáns az expresszió emelkedése a 18. naphoz képest, illetve a legintenzívebb csökkenést az  $\alpha_{2B}$ -AR 22. napi expressziója esetén tapasztaltuk (17. ábra).



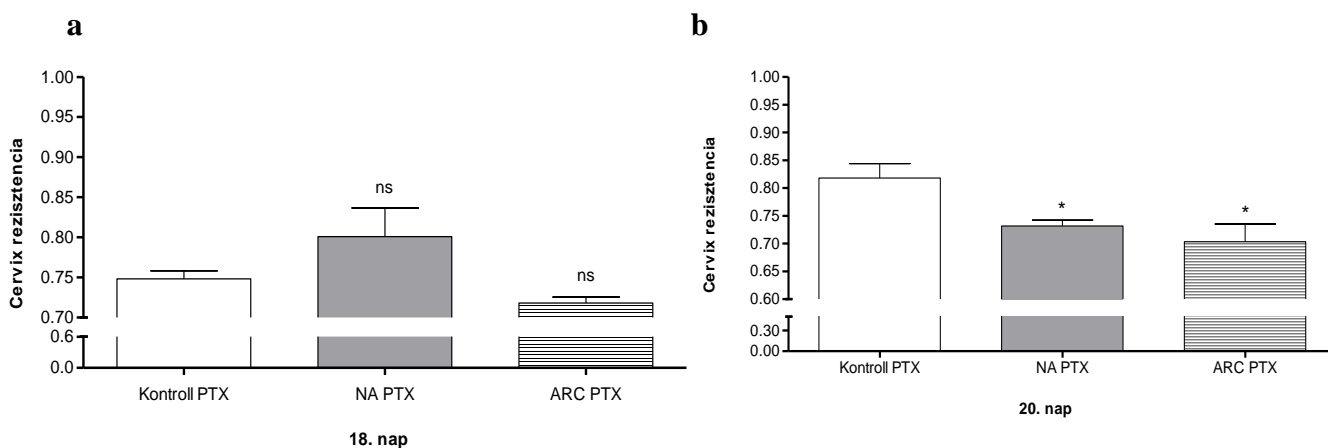
**17. ábra.** Késői vemhes patkány cervixek  $\alpha_2$ -AR altípusainak fehérje expressziója (n=6). A WB során  $\alpha_2$ -AR altípus és  $\beta$ -actin poliklonális antitesteket alkalmaztunk (Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Mindhárom receptor altípus fehérje expressziója szignifikánsan megemelkedett a 21. vemhességi napra, azonban a vemhesség utolsó napjára (22.) mindhárom altípus expressziója csökkent, az  $\alpha_{2B}$ -AR esetén az expresszió mértéke kisebb volt, mint a 18. napon. ns: nem szignifikáns, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , az adott altípus 18. vemhességi napon mért fehérje expressziójához viszonyítva.

A cervix rezisztencia mérések során 18., 20., 21. és 22. napos vemhes cervixeken vizsgáltuk a NA ( $10^{-5}$  M) hatását altípus szelektív antagonisták jelenlétében (**18. ábra**). A 18. napon a NA növelte a cervix rezisztenciát, hatása csak az  $\alpha_{2B/C}$ -AR antagonistá ARC239 jelenlétében maradt meg, így a cervix rezisztenciát az  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztül fokozta (**18. ábra a**). A 20. napon a NA csökkentette a cervix rezisztenciát, melyet szintén csak az ARC239 nem szüntetett meg, így meglepő módon a csökkentő hatás is nagy valószínűséggel az  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztül közvetítődött (**18. ábra b**). A 20. napon a NA újra fokozta a cervix rezisztenciát, amely hatását csak az  $\alpha_{2C}$ -AR antagonistá spiroxatrine nem gátolt, így ezek alapján valószínű, hogy ezt a hatást az  $\alpha_{2A}$ -és  $\alpha_{2B}$ -AR-ok közvetítették (**18. ábra c**). A vemhesség utolsó, 22. napján a NA nem befolyásolta a cervix rezisztenciát és az alkalmazott altípus szelektív antagonisták jelenléte sem változtatott ezen (**18. ábra d**).



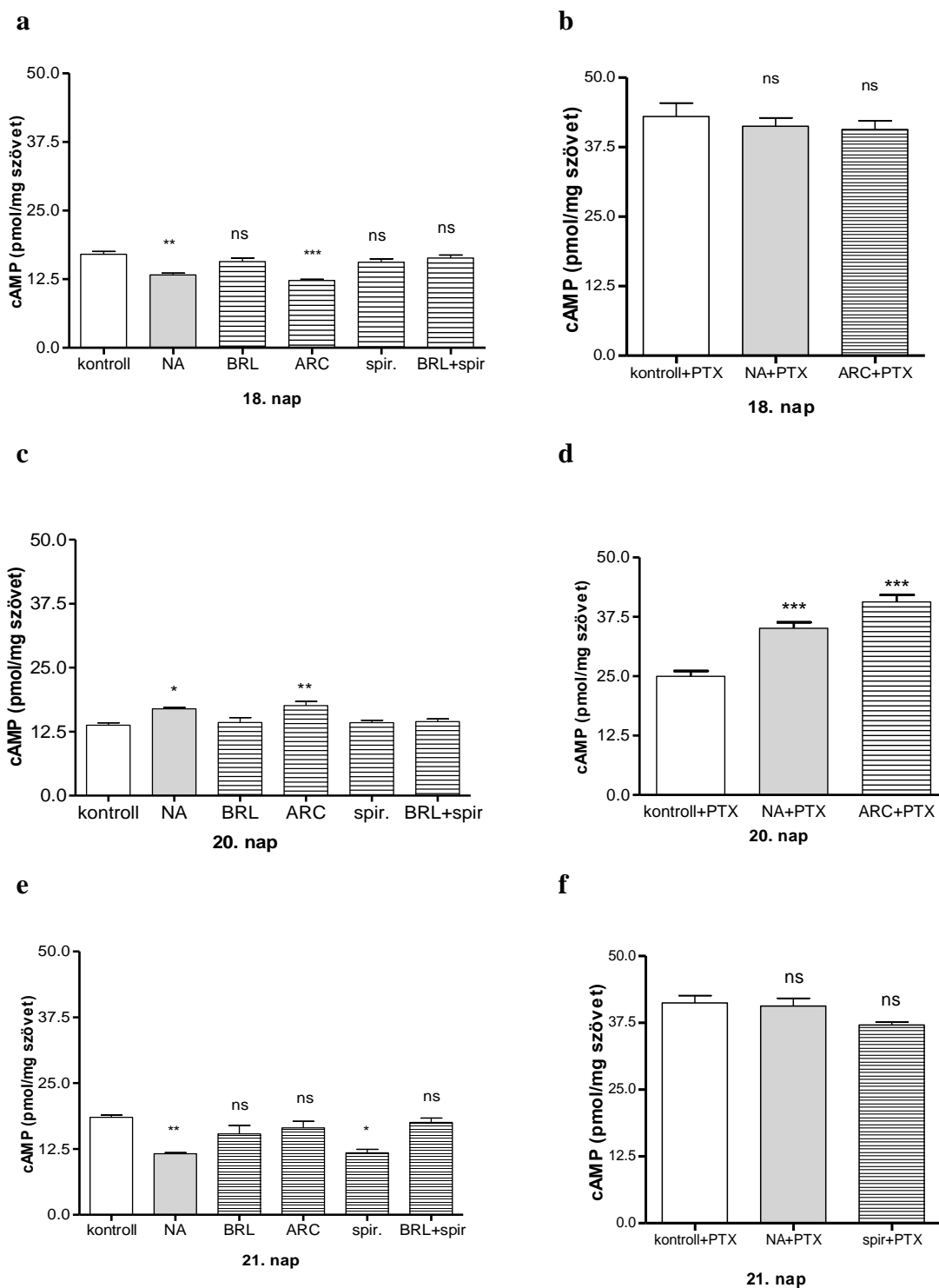
**18. ábra.** A  $\alpha_2$ -AR altípus szelektív vegyületek cervix rezisztenciát befolyásoló hatása késői vemhes (18-22. vemhességi napok) cervixeken *in vitro* (n=6). A méréseket propranolol ( $10^{-5}$  M) és doxazosin ( $10^{-6}$  M) jelenlétében végeztük annak érdekében, hogy az NA ( $10^{-5}$  M) által kifejtett hatások csak az  $\alpha_2$ -AR-okon keresztül alakuljanak ki. A NA (szürke oszlop) a 18. és 21. napon fokozta (a, c), míg a 20. napon csökkentette (b) a rezisztenciát. A 18. és 20. napi hatását az ARC239, míg a 21. napi hatását a spiroxatrine nem védte ki. A 22. napon a NA sem önmagában, sem pedig az antagonisták jelenlétében nem tudta befolyásolni a cervix rezisztenciát (d). BRL: BRL44408; ARC: ARC239; spir.: spiroxatrine; ns: nem szignifikáns; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , az adott nap kontroll értékéhez (fehér oszlop) viszonyítva.

A cervix rezisztencia méréseket megismételtük 2 órás PTX inkubációt (500 ng/ml) követően is 18. és 20. napos vemhes cervixeken, mivel ezen a két vemhességi napon a NA esetében ellentétes hatást mértünk önmagában és ARC239 jelenlétében is. A PTX jelenlétében a NA fokozó hatása megszűnt 18. napon (ARC239 jelenlétben is), (19. ábra a), ugyanakkor gátló hatásuk megmaradt a 20. napon (19. ábra b). Mivel a PTX a  $G_i$ -fehérje gátlója, ezért ezek alapján arra következtethetünk, hogy a 18. napon az  $\alpha_{2A}$ -AR-ok  $G_i$ -fehérje kapcsoltak, míg a 20. napon ez a kapcsoltság inkább  $G_s$ -fehérjével valószínűsíthető.



**19. ábra.** A PTX hatása a NA cervix rezisztenciát befolyásoló effektusára ARC239 jelenlétében 18. és 20. napos vemhes cervixeken *in vitro* (n=6). A méréseket propranolol ( $10^{-5}$  M) és doxazosin ( $10^{-6}$  M) jelenlétében végeztük. (a) A NA rezisztencia fokozó hatása önmagában és az ARC239 jelenlétében is megszűnt a 18. napon. (b) A PTX (500 ng/ml) jelenlétében a NA rezisztencia csökkentő hatása önmagában és ARC239 jelenlétében is megmaradt. PTX: pertussis toxin; ARC: ARC239; ns: nem szignifikáns; \* $p < 0,05$ ; az adott nap kontroll értékéhez (fehér oszlop) viszonyítva.

A G-protein kapcsoltság változás igazolása érdekében cAMP méréseket is végeztünk a 18., 20. és 21. napos vemhes cervixeken NA, az altípus szelektív antagonisták, valamint PTX jelenlétében. A 18. napon a NA önmagában és ARC239 jelenlétében is csökkentette a cervikális cAMP szintet (**20. ábra a**), amit a PTX kivédett (**20. ábra b**). A 20. napon a NA önmagában és ARC239 jelenlétében növelte a szöveti cAMP szintet (**20. ábra c**), mely PTX rezisztens volt (**20. ábra d**). A 21. napon a NA önmagában és spiroxatrine jelenlétében újra csökkentette a cAMP szintet (**20. ábra e**), melyet a PTX gátolt (**20. ábra f**). Mindez megerősíti, hogy a 18. és 21. napon PTX szenzitív, feltehetően  $G_i$ -protein közvetített cAMP csökkenés, míg 20. napon PTX rezisztens  $G_s$ -protein közvetítette cAMP emelkedés játszódik le az  $\alpha_{2A}$ -és részben az  $\alpha_{2B}$ -AR-okon keresztül.



**20. ábra.** Altípusselektív  $\alpha_2$ -AR antagonisták hatása a NA ( $3 \times 10^{-6}$  M) által stimulált cAMP-szintre késői vemhes patkány cervixben ( $n=6$ ). A mérések propranolol és doxazosin jelenlétében történtek. A 18. (a) és 21. (e) napon tapasztalható NA indukált cAMP csökkenés megszűnik ARC239 vagy spiroxatrine jelenlétében, és PTX érzékeny is (b,e). A 20. napon mért NA indukált cAMP szint növekedés ARC239 jelenlétében megmarad (c), és PTX rezisztens (d); BRL: BRL44408; ARC: ARC239; spir.: spiroxatrine; ns: nem szignifikáns; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  a kontrollhoz viszonyítva (fehér oszlop).



### 5.3. Adrenerg kombinációk uterorelaxáns hatásának vizsgálata

Az egyes adrenerg receptorok és hatóanyagok uterorelaxáns és cervix rezisztenciát befolyásoló hatásainak vizsgálatát követően arra kerestük a választ, hogy az adrenerg hatóanyagok vemhes méhkontrakciót gátló hatását lehet-e fokozni más hatásmechanizmusú vagy éppen egy más támadáspontú adrenerg hatóanyag együttes alkalmazásával.

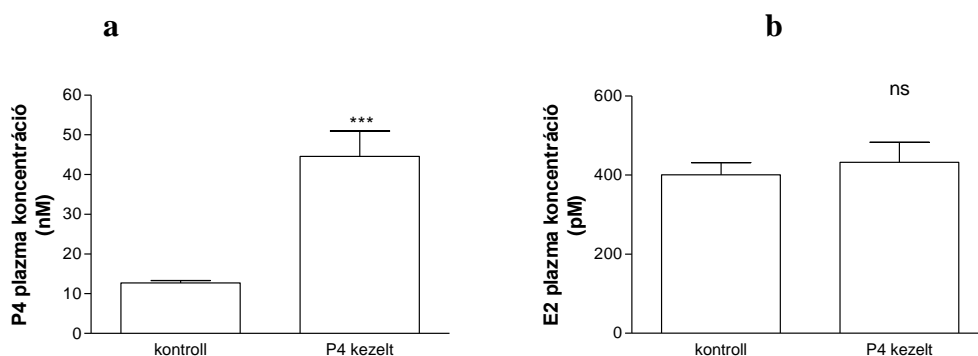
#### 5.3.1. Kombinációk $\beta_2$ -AR agonistákkal

A  $\beta_2$ -AR agonisták vemhes uterusz kontrakciót gátló hatását P4,  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló, PDE-gátló, A-kináz horgonyzó fehérje (AKAP)-protein-kináz A (PKA) gátló, valamint  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistá jelenlétében vizsgáltuk.

##### 5.3.1.1. P4 kombináció

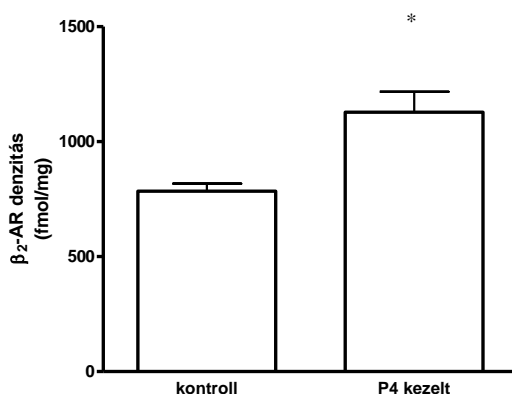
Korábban igazoltuk, hogy patkányban a vemhesség előrehaladtával a terbutalin EFS indukált uterusz kontrakciót gátló hatása egyre csökken és feltételeztük, hogy ebben szerepet játszik a vemhesség végi plazma P4 szint csökkenés [80]. Ezért felmerült annak a lehetősége, hogy P4 adagolással helyreállítható a  $\beta_2$ -AR agonista hatás. Kísérleteinkben a vemhes patkányok a vemhesség 15-21. napjain 0,5 mg/nap s.c. P4 kezelést kaptak, majd a vemhesség 22. napján az uterus eltávolítását követően EFS ingerléssel izolált szervfűrdőben kontrakciókat váltottunk ki, amelyeket terbutalinnal gátoltunk. Radioligand kötési technika segítségével jellemeztük a  $\beta_2$ -AR expressziót, mértük a G-protein aktiválódást, valamint radioimmunassay segítségével az állatok plazma P4 és E2 szintjének változását is követtük [81].

A 7 napig tartó P4 kezelés fokozta a vemhes patkányok plazma P4 szintjét a 22. vemhességi napra, míg az E2 szint változatlan maradt (**21. ábra**)



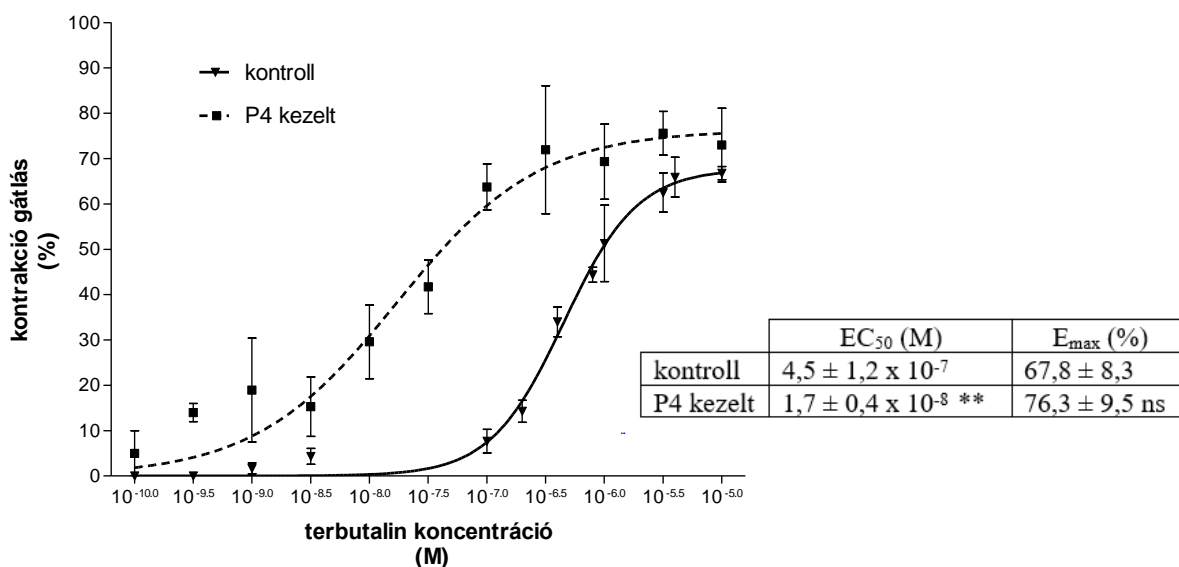
**21. ábra.** Vemhes patkányok (22. vemhességi nap) P4 és E2 plazma szintjének változása 7 napos P4 kezelést követően (n=6). A P4 0,5 mg/állat/nap dózisa megnövelte a plazma P4 szintet (a), de nem befolyásolta az E2 szintet (b). ns: nem szignifikáns; \*\*\*: p<0,001

A P4 kezelés fokozta a  $\beta_2$ -AR fehérje expressziót is (22. ábra).



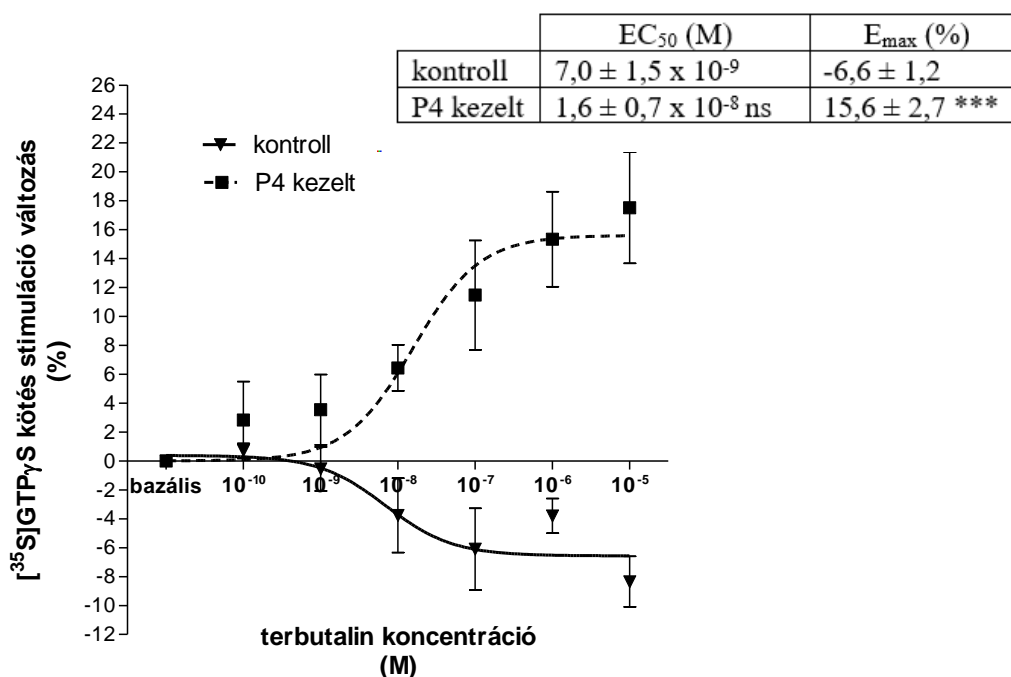
22. ábra. Vemhes patkány (22. vemhességi nap) uterusz  $\beta_2$ -AR fehérje expresszió változása 7 napos P4 kezelést követően (n=6). A P4 0,5 mg/állat/nap dózisa fokozta a  $\beta_2$ -AR expressziót. \*:p<0,05

A P4 kezelés következtében a terbutalin EFS kiváltotta uterusz kontrakciót gátló koncentráció-hatás görbéje nagymértékben balra tolódott ( $EC_{50}$  érték jelentős csökkenése), ami a hatékonyság növekedését jelenti (23. ábra)



23. ábra. Terbutalin kontrakció gátló hatásának változása 7 napos P4 kezelést követően 22 napos vemhes uteruszon *in vitro* (n=6). A P4 0,5 mg/állat/nap dózisa csökkentette a terbutalin gátló hatásának  $EC_{50}$  értékét, ami a vegyület relaxáló hatékonyságának növekedésére utal. Ugyanakkor a P4 kezelés az  $E_{max}$  értéket nem befolyásolta (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*\*:p<0,01

A G-protein aktiváció vizsgálata során azt találtuk, hogy a P4 kezelés hatására a vemhesség utolsó (22.) napján a terbutalin uteruszban mért aktivált G-protein csökkentő hatása megfordult és G-fehérje aktivációt mértünk. (24. ábra)



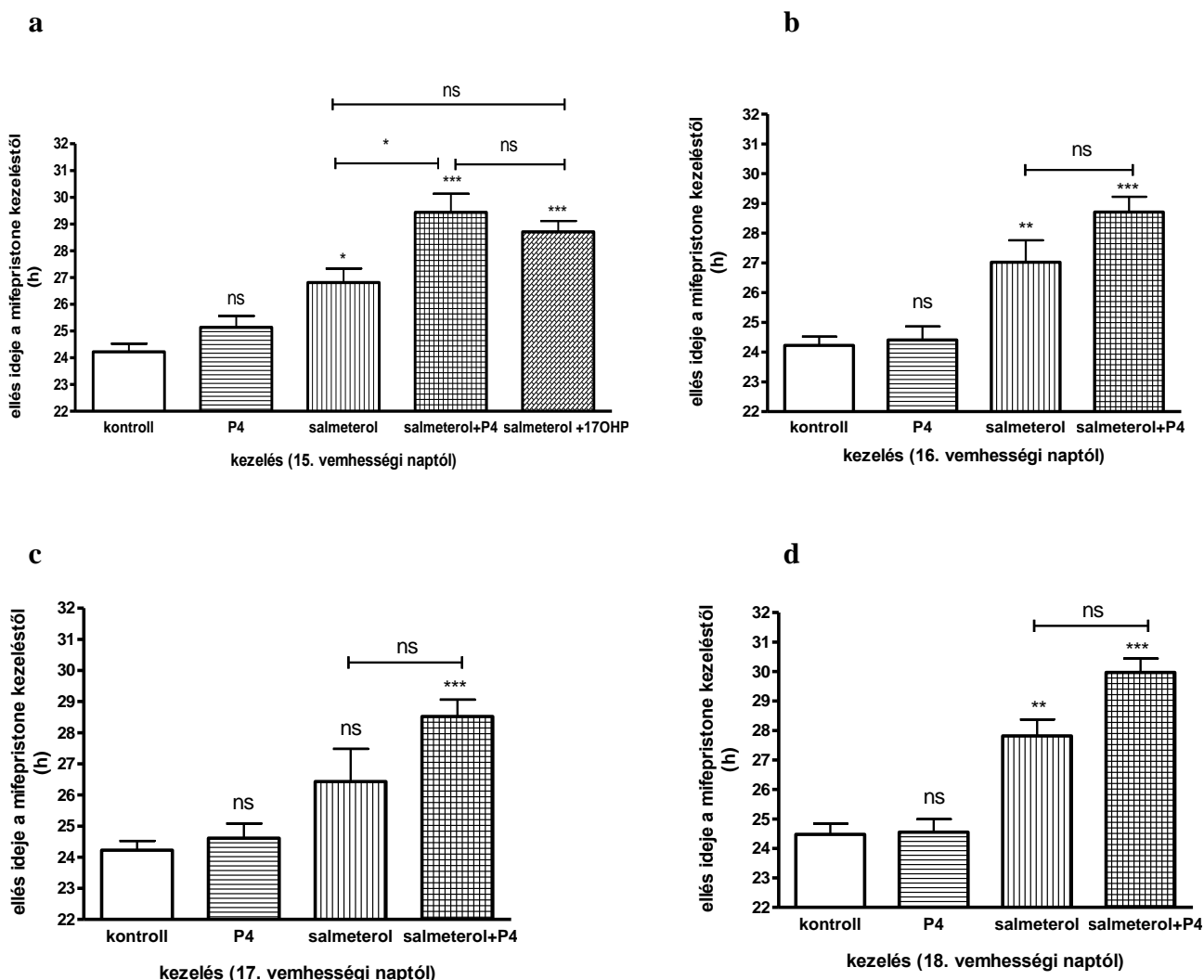
**24. ábra.** Terbutalin G-protein aktiváló hatásának változása 7 napos P4 kezelést követően 22 napos vemhes uteruszon *in vitro* (n=6). A P4 0,5 mg/állat/nap dózisa jelentősen megnövelte a terbutalin G-protein aktiváló képességét, melyet az E<sub>max</sub> érték növekedése mutat (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*\*\*: p<0,001

Azt is megvizsgáltuk, hogy a P4 előkezelés  $\beta_2$ -AR agonista hatást erősítő tulajdonsága érvényesül-e *in vivo* körülmények között hormonális koraszülés modellben [82]. A kísérletekben  $\beta_2$ -AR agonistaként salmeterolt használtunk, mivel a szakirodalomban ismertek voltak patkányban a farmakokinetikai paraméterei [83], melyek segítségével meg tudtuk tervezni az ozmotikus minipumpán keresztüli adagolását. A P4 mellett  $17\alpha$ -hidroxiprogesztéron kapronát (17OHP) előkezelést is alkalmaztunk, mivel 2022-ben történt visszavonásáig ezt a gesztagént alkalmazták a klinikumban a koraszülés prevenciók terápiajára [84].

A kísérletekben 4 állatcsoport volt. Az első (kontroll) csoport vivőanyag (metanol:víz 1:1 arányú keveréke s.c. beültetett ozmotikus minipumpában + 0,1 ml olíva olaj/nap s.c.), a második csoport P4 (0,5 mg/0,1 ml/nap sc.), a harmadik csoport salmeterol (130  $\mu$ g/nap, ozmotikus minipumpában), a negyedik csoport salmeterol és P4 kombinációs, az ötödik csoport pedig salmeterol és 17OHP kombinációs kezelést kapott. A salmeterol/gesztagén/vivőanyag kezelések a vemhesség különböző napjain (15., 16., 17. vagy 18.) kezdődtek, kivéve az 17OHP csoportba tartozó állatokat, ahol a kezelés a kizárólag

vemhesség 15. napján indult. A hormonális koraszülést a vemhesség 19. napján indítottuk a Módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően (ld. 4.13.2.1. fejezet).

A P4 kezelés egyik esetben sem befolyásolta a koraszülés időpontját. A salmeterol a 15. és 18. napon indított kezelés esetén nyújtotta meg a koraszülés időpontját, míg a salmeterol-P4 kombináció valamennyi esetben jelentősen, mintegy 5-6 órával eltolta az ellés időpontját. A salmeterol-17OHP kombináció a 15. napon szintén jelentősen megnyújtotta a hormonálisan indukált koraszülés időpontját, ugyanakkor hatása nem volt jobb, mint a salmeterol-P4 kombináció esetén (számértékileg gyengébb hatást mutatott), így a további napokon ezt a kombinációt már nem vizsgáltuk. A 16. naptól a salmeterol és a salmeterol-P4 hatása között nem volt szignifikáns különbség (25. ábra).

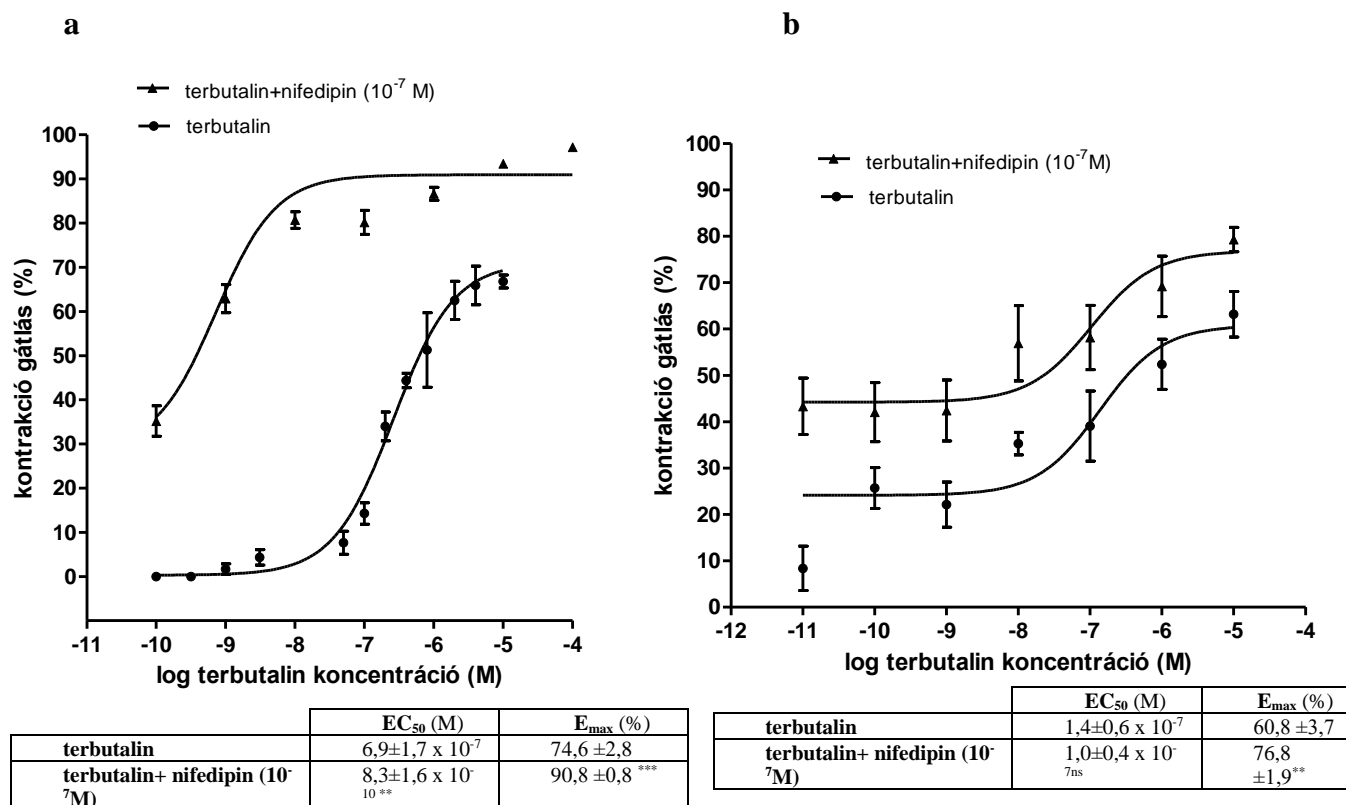


25. ábra. A P4 (0,5 mg/0,1 ml/nap), a salmeterol (130 µg/nap) és a kombinált P4-salmeterol és 17OHP (0,5 mg/0,1 ml/nap) salmeterol kezelés hatása a hormonálisan indukált koraszülésre patkányban (n=8/csoport). A kezelések a vemhesség 15. (a), 16. (b), 17. (c) vagy 18. (d) napjától kezdődtek. ns: nem szignifikáns; \*:p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*:p<0,001 a kontroll csoporthoz, illetve a szakaszjelölt oszlopok között viszonyítva

### 5.3.1.2. Ca<sup>2+</sup>-csatorna blokkoló kombináció

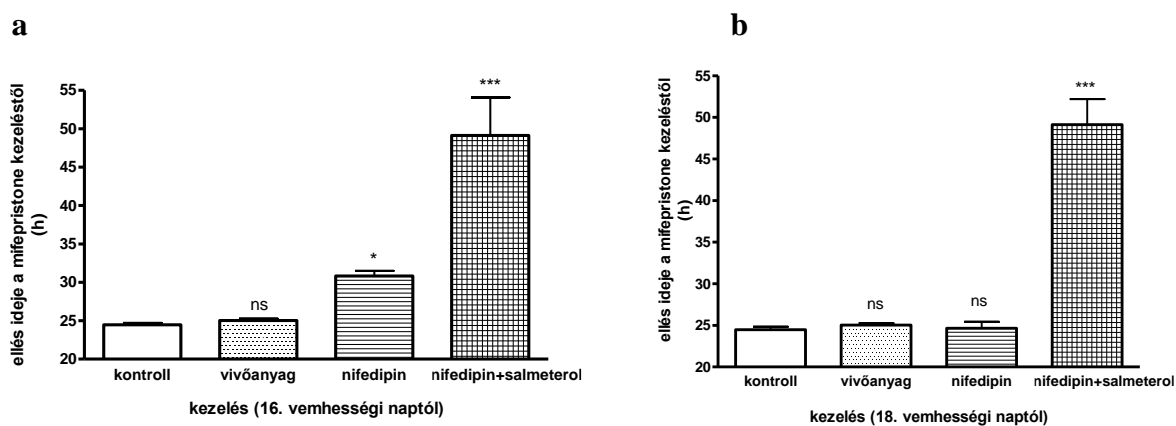
A Ca<sup>2+</sup>-csatornák, mint minden simaizomzatban, így az uterusz kontraktilitásában is kulcsszerepet játszanak [85]. A dihidropiridin szerkezetű nifedipin a feszültségfüggő, L-típusú Ca<sup>2+</sup>-csatornákon keresztül gátolja az akciós potenciált és a méhösszehúzódást. A dihidropiridin szerkezetű vegyületek a méhkontrakciók egyik leghatásosabb gátlói, ezért a tokolitikus terápiában történő alkalmazhatóságuk régóta ismert [86]. Egy klinikai vizsgálat alapján a β-AR agonisták és a Ca<sup>2+</sup>-csatorna gátlók kombinációja várhatóan hatás fokozódással jár a simaizom kontrakciók gátlása tekintetében [87]. Éppen ezért a kombinációs vizsgálataink során megvizsgáltuk a terbutalin és nifedipin kombináció relaxáló hatását a KCl indukált vemhes patkány méhkontrakciókra, valamint a kombináció hatásosságát humán, császármetszésből származó szöveteken is teszteltük in vitro.

Először 22. napos vemhes patkányokból származó mintákon kísérleteztünk [88], majd a kombináció hatásosságát hormonális koraszülés modellen és humán császármetszésből származó szöveteken is teszteltük [89]. A 22. napos vemhes patkány esetén a terbutalin uterusz kontrakció gátló hatásának maximumát a nifedipin jelentősen fokozta, emellett a terbutalin EC<sub>50</sub> értékét is csökkentette, ami összességében egy igen jelentős hataserősödést jelent (**26. ábra a**). A császármetszésből, 37-40 terhességi hétről származó uterusz minták esetén a nifedipin szintén fokozta a terbutalin relaxáló hatását, ugyanakkor az EC<sub>50</sub> értéket nem változtatta meg (**26. ábra b**).



**26. ábra.** A terbutalin és nifedipin kombinációjának uterusz kontrakciót gátló hatása (a) 22. napos vemhes patkány (n=7) és (b) császármetszésből származó terhes humán uteruszon (n=13) *in vitro*. A kontrakciókat a vemhes patkány uterusz esetén 25 mM KCl-dal, míg a terhes humán uterusz esetén 10<sup>-8</sup> M oxitocinnal váltottuk ki. Patkány esetén a nifedipin a terbutalin koncentráció hatás görbáját balra tolta és maximumát fokozta, míg a terhes humán uterusznál csak a maximum értéket növelte (ld. táblázatos részek). ns: nem szignifikáns; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001 a terbutalinhoz viszonyítva

Hormonális koraszülés modellben a vemhesség 16. és 18. napján indítottuk a nifedipin-salmeterol kombinációs kezelést ozmotikus minipumpában. Mivel a nifedipin oldhatósága vízben nagyon rossz, ezért két minipumpát ültettünk be az állatok hátbőre alá, az egyikben salmeterol oldat, a másikban pedig a nifedipin oldat (oldószer 6:6:4 arányú polietilén-glikol (PEG) 400:etanol:fiziológiás sóoldat) volt. A 16. napon indított kezelés során a vivőanyagok nem fejtettek ki semmilyen hatást az ellés idejére. A nifedipin 3,89 mg/nap adagja kismértékben megnyújtotta, míg a nifedipin (3,89 mg/nap)-salmeterol (130µg/nap) kombinációja mintegy 25 órával nyújtotta meg az ellés átlagos idejét, lényegében a vemhességet kitolta a 21. napig, ami már terminus közeleink számít (**27. ábra a**). A 18. napon indított kezelés esetén a nifedipin nem mutatott hatást, míg a kombináció ugyanolyan hatékonyságúnak bizonyult, mint a 16. napon indított kezelés esetén (**27. ábra b**).

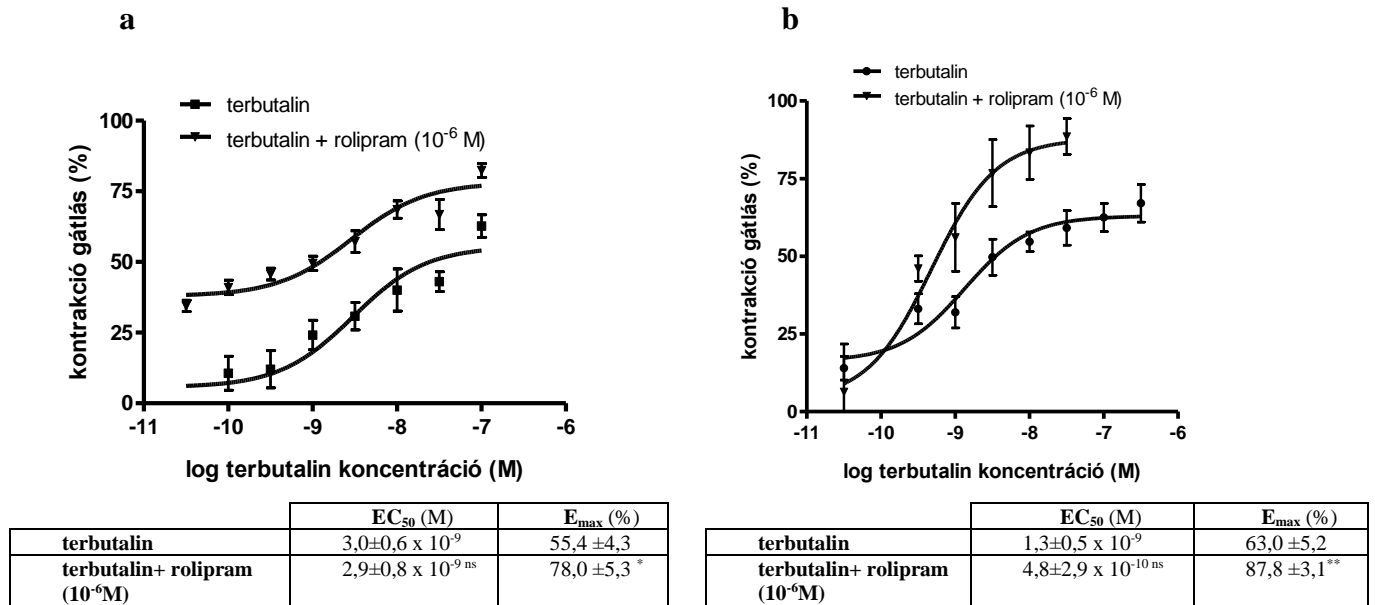


**27. ábra.** A nifedipin (3,89 mg/nap), és a nifedipin-salmeterol (130 µg/nap) kombináció hatása a hormonálisan indukált koraszülésre patkányban (n=8/csoport). Az ozmotikus minipumpás kezelések a vemhesség 16. (a) és 18. (b) napjától kezdődtek. ns: nem szignifikáns; \*:p<0,05; \*\*\*:p<0,001 a kontroll csoporthoz viszonyítva

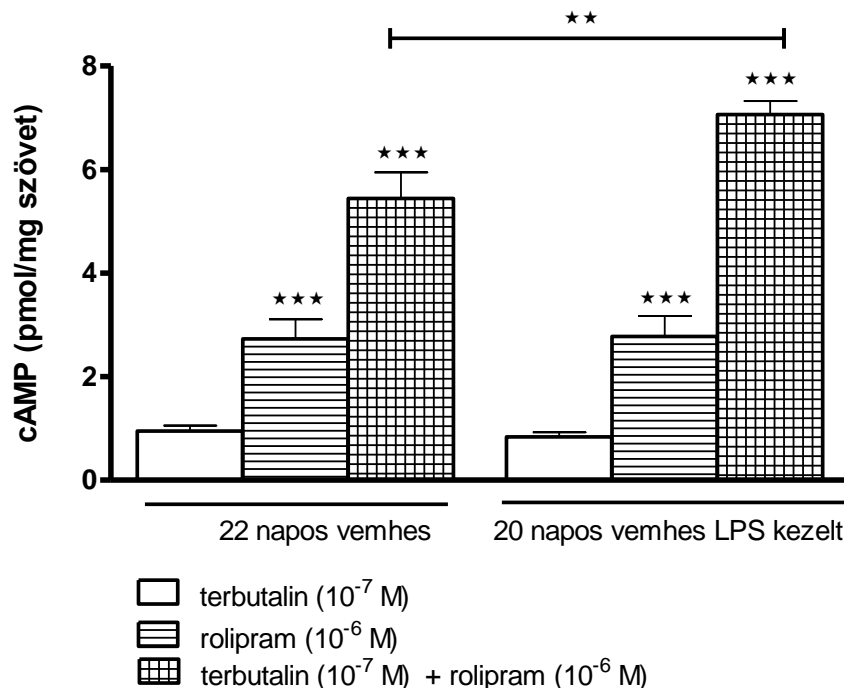
### 5.3.1.3. PDE gátló kombináció

A PDE-enzimeket 11 rokon géncsalád kódolja, melyek közül a PDE4 alkotja a legnagyobb családot, 4 génnel és számos splice variánssal, melyek közel 40 különböző PDE4 izoenzimet kódolnak [90]. A rolipram a PDE4 ismert gátlója [91] de nincs olyan szelektív inhibitor, amely különbséget tudna tenni a PDE4 izoenzimek között, bár a számítógépes molekulatervezés során már találtak szelektivitásra esélyes molekula jelöltek [92]. A  $\beta_2$ -AR agonistákkal való újabb kombinációként megvizsgáltuk, hogy a rolipram hogyan befolyásolja a relaxáló hatásukat vemhes patkány és terhes humán méhen terminusban és koraszülés esetén in vitro, illetve patkányok esetén in vivo is. Az in vitro kontraktilitási vizsgálatokat izolált szervi rendszerben, a szöveti cAMP szint változást ELISA módszerrel, míg a humán PDE4 izoenzimek expresszióját Western blot módszerrel vizsgáltuk. A patkányokban a koraszülést LPS kezeléssel váltottuk ki [93,94].

A KCl-dal kiváltott kontrakciókat a terbutalin mind a 20. napos LPS-sel indukált koraszüléses, mind pedig a 22. napos vemhes uteruszokon gátolta. A rolipram  $10^{-6}$  M-os koncentrációja mindkét esetben megnövelte a terbutalin relaxáló hatását, mely növekedés az LPS-indukált koraszülés esetén nagyobbak bizonyult (28. ábra). A szöveti cAMP szint változás alátámasztotta a relaxáló hatásban mért különbséget, az LPS kezelt szövetekben a rolipram ( $10^{-6}$  M) jelenlétében a terbutalin ( $10^{-7}$  M) által kiváltott cAMP szint emelkedés nagyobb mértékű volt, míg a terbutalin és a rolipram önmagukban ugyanolyan mértékű változást eredményeztek a kétféle állapotú szöveten (29. ábra).



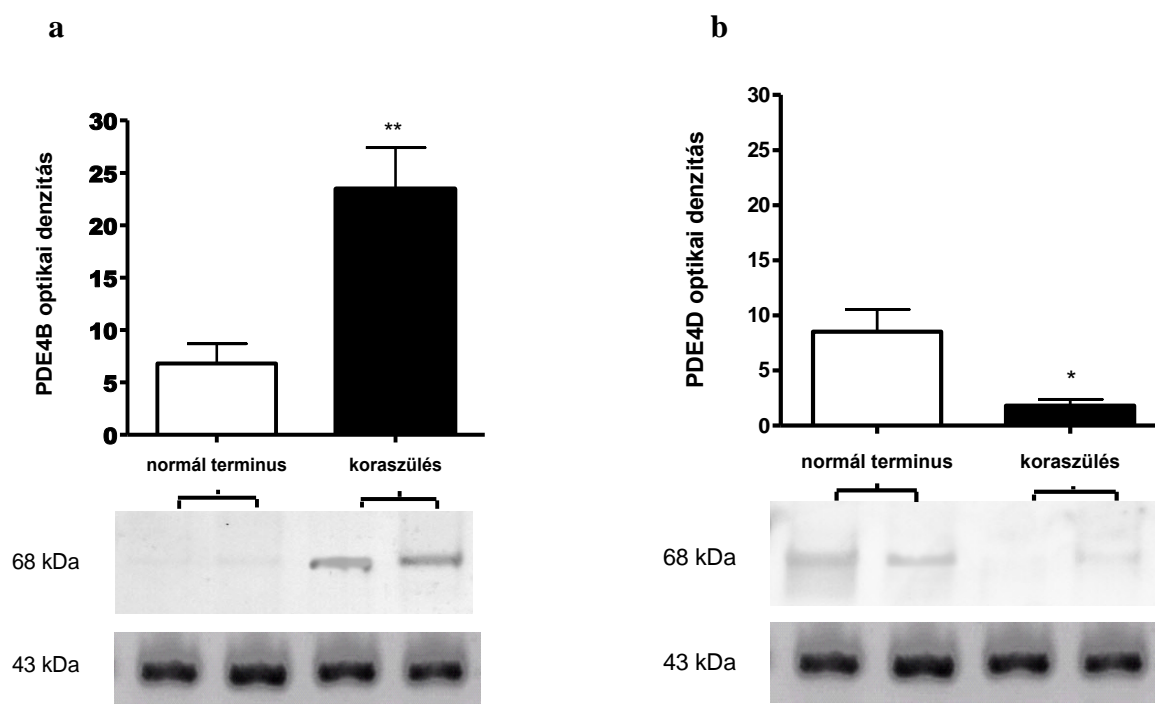
28. ábra. A terbutalin és rolipram kombinációjának uterusz kontrakciót gátló hatása (a) 22. napos és (b) LPS-koraszülés indukált 20. napos vemhes patkány uteruszon *in vitro* (n=7). A kontrakciókat 25 mM KCl-dal váltottuk ki. A rolipram jelenléte mindkét esetben fokozta a terbutalin E<sub>max</sub> értékét, ugyanakkor nem befolyásolta szignifikánsan az EC<sub>50</sub> értéket (ld. táblázatos részek). ns: nem szignifikáns; \*: p<0,05; \*\*:p<0,01 a terbutalinhoz viszonyítva



29. ábra. Terbutalin és rolipram kombinációjának hatása a cAMP-szintre 22. napos és LPS kezelt 20. napos vemhes patkány uteruszban (n=6). A terbutalin és a rolipram külön-külön mindkét vemhességi idejű szövetben egyforma cAMP emelkedést eredményezett, a rolipram hatása szignifikánsan nagyobb volt a terbutalinhoz képest. A két szer kombinációja tovább fokozta a cAMP szint emelkedést, melynek mértéke nagyobb volt az LPS indukált koraszüléses szövetben. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 az adott szövet terbutalin értékéhez viszonyítva, illetve a szakaszjelölt oszlopok között.

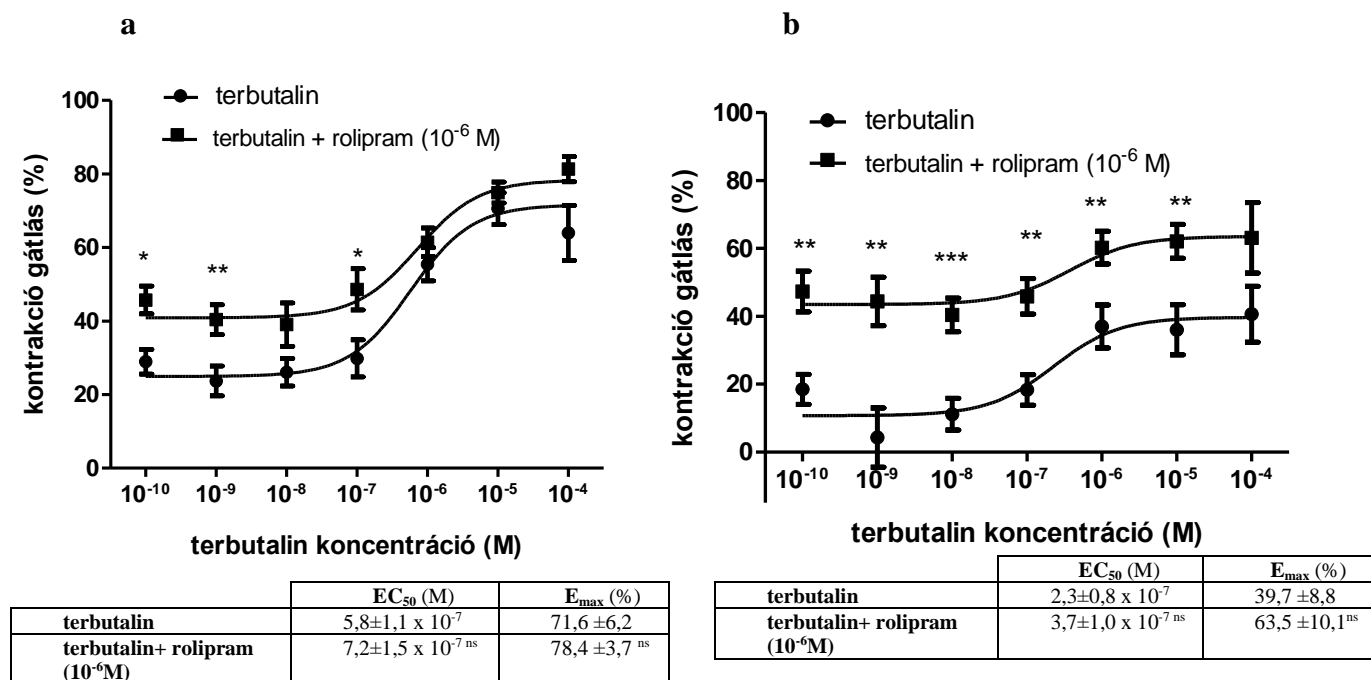


Hasonló méréseket végeztünk humán koraszülésből és normál terminusból származó császármetszéses uterusz mintákon. Az in vitro kontraktilitási mérésekkel párhuzamosan meghatároztuk a mintákban a humán uteruszban jellemzően domináló PDE4B és PDE4D izoformák expresszióját. A normál terminus végéről származó mintákban nem volt különbség a két izoenzim expressziójában, azonban a koraszüléssel mintákban a PDE4B expressziója drasztikusan emelkedett, míg a PDE4D expressziója jelentősen csökkent a normál terminushoz képest (**30. ábra**)



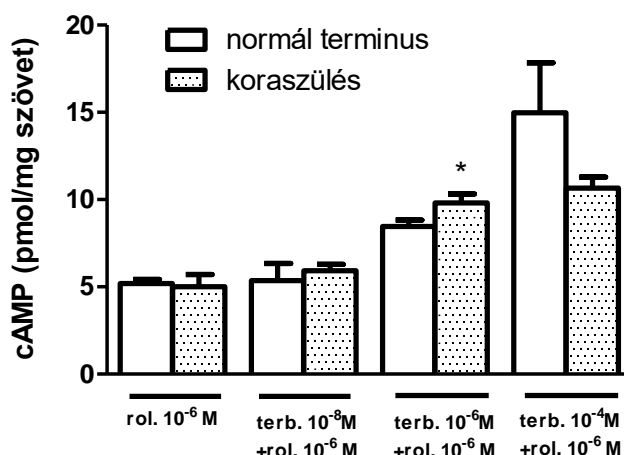
**30. ábra.** A PDE4B és PDE4D enzimek expressziója (a) normál terminusból és (b) koraszülésből származó humán császármetszéses uteruszokban (n=4). A WB vizsgálat során PDE4B, PDE4D, valamint  $\beta$ -actin poliklonális antitesteket alkalmaztunk (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) A PDE termékek 68 kDa, míg a  $\beta$ -actin 43 kDa tömegűek voltak. A koraszüléssel szövetben a PDE4B expressziója emelkedik, míg a PDE4D expressziója csökken. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  a normál terminushoz viszonyítva

A humán uterus csíkok oxitocinnal indukált kontrakcióit a terbutalin nagyobb mértékben gátolta a terminusból származó minták esetén a koraszüléssel mintákhoz képest. A rolipram jelenléte egyik esetben sem változtatta meg szignifikánsan a terbutalin  $EC_{50}$  értékét és maximális hatását, ugyanakkor a normál terminus esetén jelentősen fokozta az alacsonyabb koncentrációjú terbutalin ( $10^{-10}$ - $10^{-7}$  M) relaxáló hatását, míg a koraszüléssel minták esetén - a legmagasabb terbutalin koncentráció ( $10^{-4}$  M) kivételével - fokozta a gátló hatást (**31. ábra**)



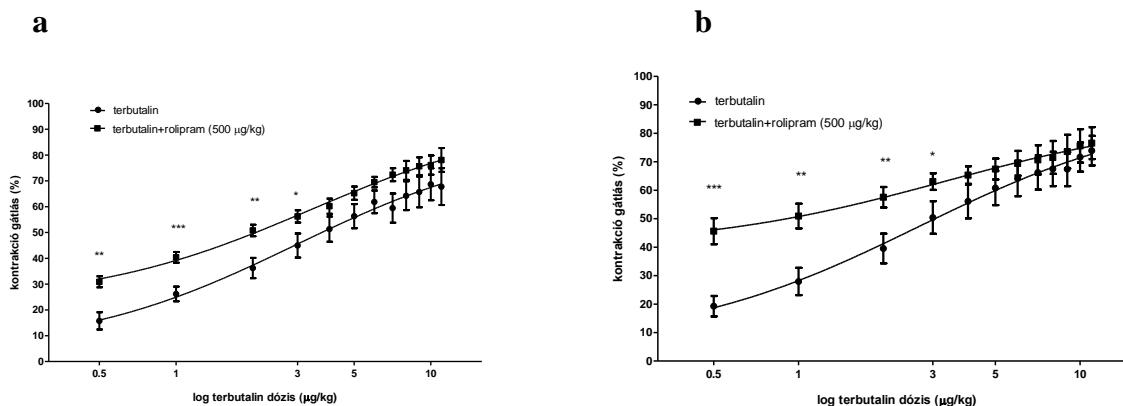
**31. ábra.** A terbutalin és rolipram kombinációjának uterusz kontrakciót gátló hatása (a) normál terminusból és (b) koraszülésből származó, császármetszésből nyert terhes humán uteruszon ( $n=4$ ). A kontrakciókat  $10^{-8}$  M oxitocinnal váltottuk ki. A rolipram jelenléte nem befolyásolta sem a terbutalin EC<sub>50</sub>, sem pedig E<sub>max</sub> értékét (ld. táblázatos részek), ugyanakkor jelentősen fokozta a terbutalin relaxáló hatását az alacsonyabb koncentrációkban. ns: nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  a terbutalinhoz viszonyítva

A humán szöveti cAMP mérések során azt találtuk, hogy a rolipram ( $10^{-6}$  M) cAMP emelő hatását nem befolyásolta az alacsony koncentrációjú ( $10^{-8}$  M) terbutalin sem a normál terminusból, sem pedig a koraszülésből származó humán uterusz szövetekben. A terbutalin koncentráció emelésével ( $10^{-6}$  M) a kombináció fokozta a cAMP szintet, mely nagyobb mértékű volt a koraszülésem mintákban. A magas koncentrációjú terbutalin ( $10^{-4}$  M) kis mértékben tovább fokozta szöveti cAMP szintet, de nem volt szignifikáns különbség a normál terminusból és a koraszülésből származó minták között. Összességében a kombináció hatásossága alig különbözött a cAMP szint emelés tekintetében a normál és koraszülésem uteruszok között. A közepes terbutalin koncentrációnál tapasztalt szignifikáns különbség a koraszülésem mintákban részben alátámasztja a kontraktilitási vizsgálatokban a legnagyobb terbutalin koncentráció kivételével tapasztalt erősödést a relaxációs válaszokban (32. ábra).



32. ábra. A terbutalin és rolipram kombinációjának cAMP szintet emelő hatása normál terminusból és koraszülésből származó terhes humán uterusz mintákban (n=4). A közepes koncentrációjú terbutalin esetén a koraszüléses uteruszban nagyobb mértékű cAMP szint emelkedést eredményez a kombináció. terb.: terbutalin; rol.: rolipram; \*: p<0,05; a normál terminushoz viszonyítva

A terbutalin és rolipram kombinációját 22. napos és LPS-kezelt koraszüléses 21. napos vemhes patkányokon in vivo is teszteltük. Mindkét esetben a rolipram (500 µg/kg) adása fokozta a kis dózisban alkalmazott terbutalin (0,5-3,0 µg/kg) relaxáló hatását, mely lényegesen nagyobb mértékű volt az LPS kezelt állatokban. Ugyanakkor a rolipram nem befolyásolta sem a terbutalin ED<sub>50</sub>, sem pedig az E<sub>max</sub> értékét (33. ábra).



	ED <sub>50</sub> (µg/kg)	E <sub>max</sub> (%)
terbutalin	2,9±0,6 x 10 <sup>-3</sup>	86,1 ±2,8
terbutalin+ rolipram (500µg/kg)	3,4±1,1 x 10 <sup>-3</sup> ns	95,2 ±3,3 ns

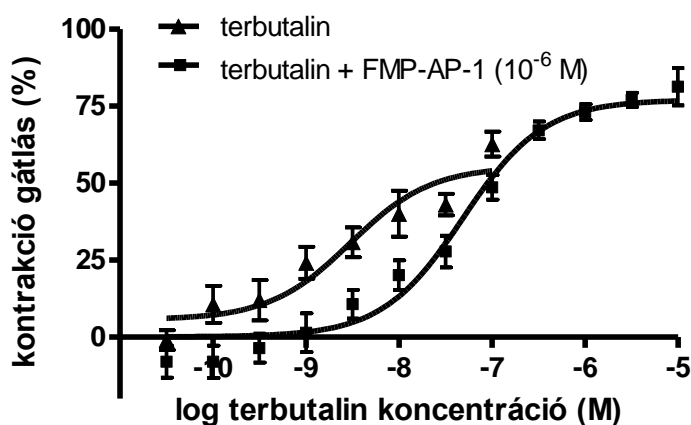
	ED <sub>50</sub> (M)	E <sub>max</sub> (%)
terbutalin	2,7±0,5 x 10 <sup>-3</sup>	89,0 ±6,2
terbutalin+ rolipram (500µg/kg)	3,3±0,9 x 10 <sup>-3</sup> ns	86,1 ±5,4 <sup>ns</sup>

33. ábra. A terbutalin és rolipram kombinációjának uterusz kontrakciót gátló hatása (a) 22. napos vemhes és (b) LPS-kezelt, 21. napos vemhes patkányokban in vivo (n=8). A kontrakciókat nyúlásmérő bélyegek uteruszra helyezésével, izoflurán altatásban mértük. A rolipram jelenléte nem befolyásolta sem terbutalin ED<sub>50</sub>, sem pedig E<sub>max</sub> értékét (ld. táblázatos részek), ugyanakkor jelentősen fokozta a terbutalin relaxáló hatását az alacsonyabb koncentrációkban, melynek mértéke az LPS kezelt állatokban nagyobb volt. ns: nem szignifikáns; \*: p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001 a terbutalinhoz viszonyítva

### 5.3.1.4. AKAP-PKA gátló kombináció

A cAMP-függő PKA egy szerin/treonin-kináz, amely számos sejtfunciót irányít. A cAMP kötődése a PKA-hoz konformációs változást indukál, katalitikus alegységek aktiválódnak, melyek különböző szubsztrátokat foszforilálnak [95]. A PKA hatás specifikussága az intracelluláris lokalizáció szabályozásával érhető el az AKAP fehérjecsaldon keresztül, mely megköti a PKA-t [96], illetve közvetlenül is kötődhetnek kinázokhoz, foszfatázokhoz, vagy PDE-okhoz, így koordinálják a peptid jelátviteli komplexeket [97,98].

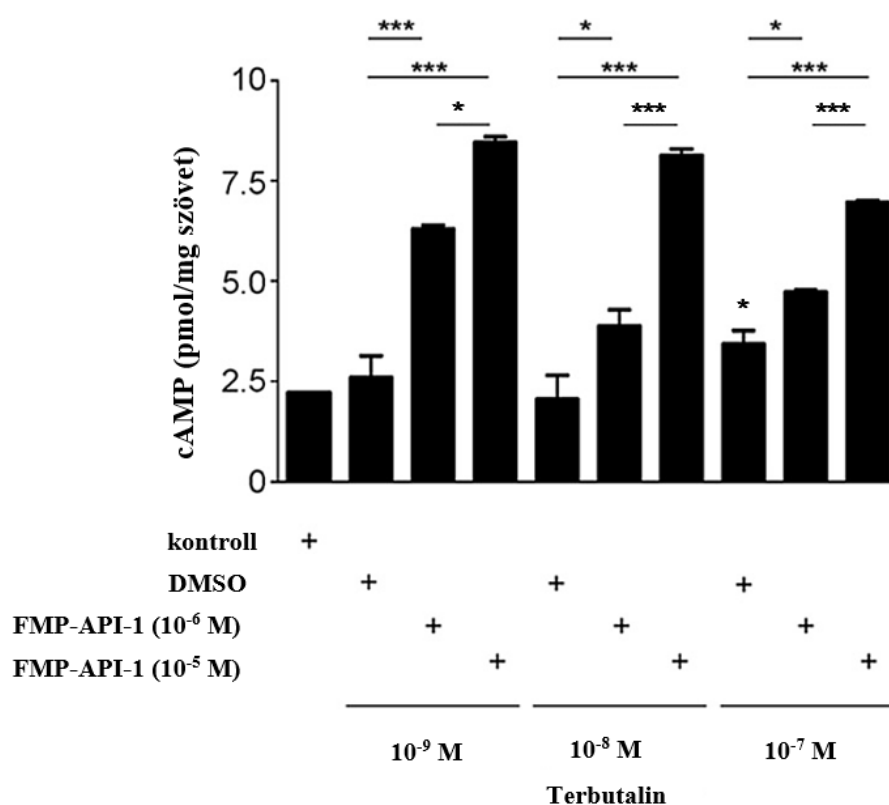
A szívizom és simaizom sejtekben az AKAP-PKA kölcsönhatás szükséges a  $\beta$ -AR által közvetített kontraktilitást befolyásoló hatásokhoz, melyek a szívizomzatban kontrakcióhoz, a simaizomzatban pedig relaxációhoz vezetnek [99,100]. Az uterusban a molekuláris mechanizmus a foszfolipáz C gátlását foglalja magában, amely a AKAP-PKA plazmamembrán-asszociált kölcsönhatásától függ [101]. Ezek alapján egy nemzetközi kooperációban, mely elsősorban az AKAP-PKA gátlók kardiális hatásaira fókuszált, megvizsgáltuk, hogy az AKAP-PKA gátló FMP-API-1 hogyan befolyásolja a terbutalin uterorelaxáns hatását és szöveti cAMP szint emelő képességét vemhes patkány uteruszon in vitro [102]. A 22. napos vemhes patkány uteruszon a KCl indukálta kontrakciókat a terbutalin gátolta. Az FMP-API-1 ( $10^{-6}$  M) jelenlétében a terbutalin maximális gátló hatása fokozódott, ugyanakkor az  $EC_{50}$  értéke kis mértékben jobbra tolódott (**34. ábra**).



	$EC_{50}$ (M)	$E_{max}$ (%)
terbutalin	$3,0 \pm 0,3 \times 10^{-9}$	$55,5 \pm 4,2$
terbutalin+ FMP-API ( $10^{-6}$ M)	$4,9 \pm 0,8 \times 10^{-8}$ *	$77,1 \pm 2,6$ **

**34. ábra.** A terbutalin és FMP-API-1 kombinációjának uterusz kontrakciót gátló hatása 22. napos vemhes patkány uteruszon in vitro (n=8). A kontrakciókat 25 mM KCl adásával váltottuk ki. Az FMP-API-1 jelenléte megnövelte mind a terbutalin  $EC_{50}$ , mind pedig  $E_{max}$  értékét (ld. táblázatos részek). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  a terbutalinhoz viszonyítva

A terbutalin csak a cAMP mérés során alkalmazott legnagyobb koncentrációban ( $10^{-7}$  M) fokozta szignifikánsan a szöveti a cAMP szintet, alacsonyabb koncentrációkban hatástalan volt (ez egybevág az izolált szervi kontrakciók esetén tapasztalt hatásokkal). Mind a kisebb ( $10^{-6}$  M), mind pedig a nagyobb ( $10^{-5}$  M) koncentrációjú FMP-API-1 jelenléte képes volt fokozni a terbutalin által indukált cAMP szintet, azonban nagyobb terbutalin koncentrációnál kisebb mértékű volt az FMP-API-1 általi fokozó hatás (**35. ábra**).



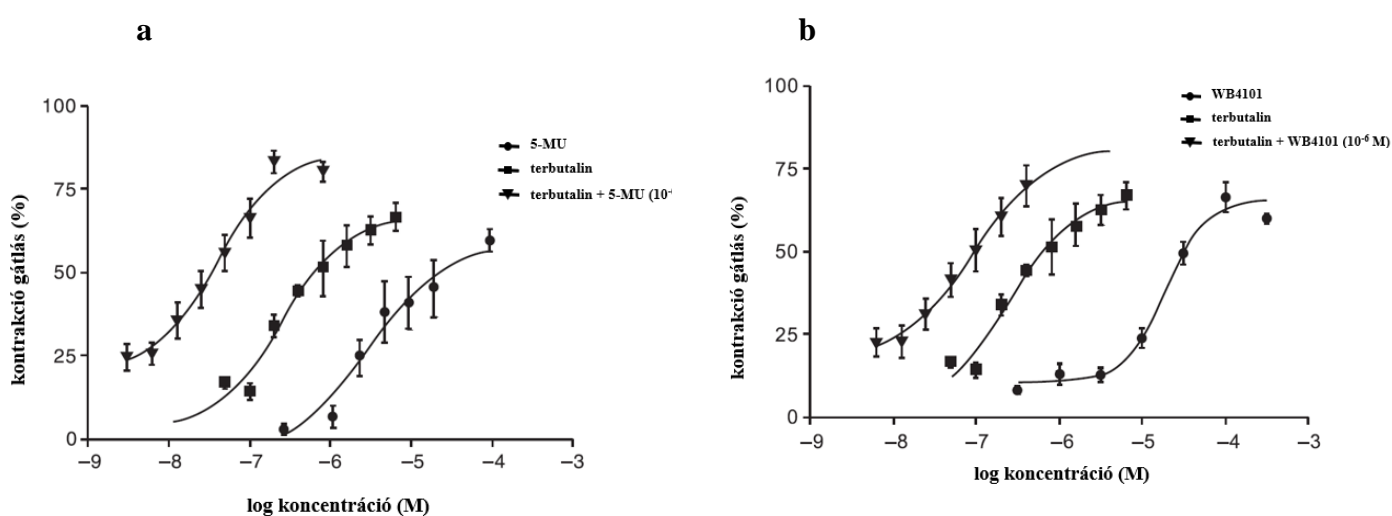
**35. ábra.** Terbutalin és FMP-API-1 kombinációjának hatása a cAMP-szintre 22. napos vemhes patkány uteruszban (n=8). A terbutalin csak a  $10^{-7}$  M-os koncentrációban emelte a cAMP szintet, az FMP-API-1 minden esetben jelentősen fokozta a terbutalin hatását, mely fokozódás a terbutalin koncentráció emelésével csökkent. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  kontroll értékhez viszonyítva, illetve a szakaszjelölt oszlopok között.

### 5.3.1.5. $\alpha_{1A}$ -AR antagonisták kombináció

A  $\beta_2$ -AR agonisták uterorelaxáns kombinációs lehetőségei kapcsán felmerült, hogy megkíséreljük az önállóan már tesztelt és hatásosnak talált  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistákkal való együttes alkalmazásukat, hiszen a kétféle adrenerg receptor egyidejű befolyásolása elméletileg erősebb gátló hatás kifejtésére lehet képes. Ebből kiindulva 22. napos vemhes patkányból származó uterusz gyűrűkön izolált szervfürdőben, EFS alkalmazásával két  $\beta_2$ -

AR agonista (terbutalin, ritodrin) és két  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistá (5-MU, WB4101) kombinációjának relaxáló hatását vizsgáltuk [103]. A ritodrin korábban a klinikumban tokolízisre alkalmazott  $\beta_2$ -AR agonista vegyület.

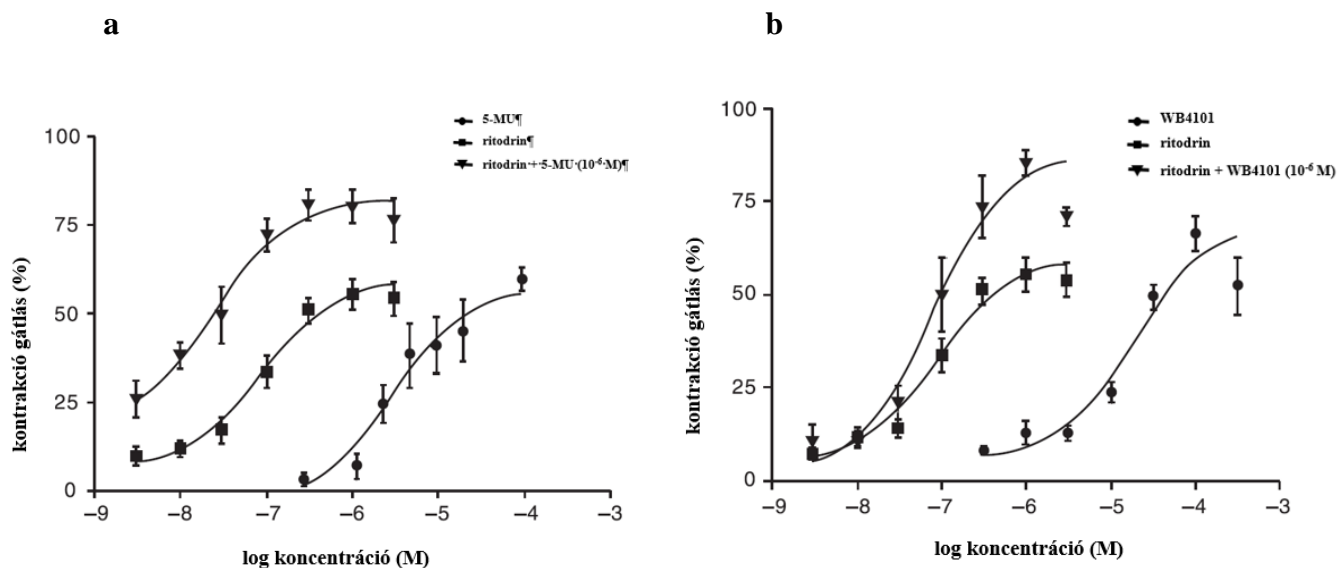
A terbutalinhoz képest az 5-MU és WB4101 nagyobb  $EC_{50}$  értékkel bírtak a kontrakció gátlás tekintetében, ugyanakkor a szerek maximális gátló hatásában nem volt különbség. A két  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistá (mindkettő  $10^{-6}$  M koncentrációban) jelentősen, mintegy egy nagyságrenddel balra tolta a terbutalin  $EC_{50}$  értékét és 80% fölé emelte maximális hatását is. A két kombináció koncentráció-hatás görbéi között nem volt szignifikáns különbség (36. ábra).



	$EC_{50}$ (M)	$E_{max}$ (%)
terbutalin	$4,0 \pm 0,5 \times 10^{-7}$	$73,3 \pm 1,3$
5-MU	$5,3 \pm 2,7 \times 10^{-6}$ *	$62,4 \pm 4,4^{ns}$
WB4101	$2,2 \pm 0,6 \times 10^{-5}$ **	$71,5 \pm 9,1^{ns}$
terbutalin + 5-MU ( $10^{-6}$ M)	$5,1 \pm 1,9 \times 10^{-8}$ *	$86,3 \pm 4,7$ *
terbutalin + WB4101 ( $10^{-6}$ M)	$4,3 \pm 1,1 \times 10^{-8}$ *	$82,5 \pm 3,0$ *

36. ábra. A terbutalin 5-MU (a) és WB4101 (b) kombinációjának kontrakciót gátló hatása 22. napos vemhes patkány uteruszon *in vitro* (n=6). A kontrakciókat EFS segítségével váltottuk ki. Az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonisták jelenléte csökkentette a terbutalin  $EC_{50}$ , illetve növelte az  $E_{max}$  értékét (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  a terbutalinhoz viszonyítva

Az 5-MU és WB4101 a ritodrinhez képest is nagyobb  $EC_{50}$  értékkel bírt, és az önálló maximális gátló hatásokban sem volt különbség. Az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonisták jelentősen csökkentették a ritodrin  $EC_{50}$  értékét, bár a csökkenés (főleg a WB4101 jelenlétében) mérsékeltebb volt, mint a terbutalin esetén, a maximális gátlás azonban ebben az esetben is 80% fölé erősödött. A két  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistá kombináció koncentráció-hatás görbéi között itt sem volt szignifikáns különbség (37. ábra).

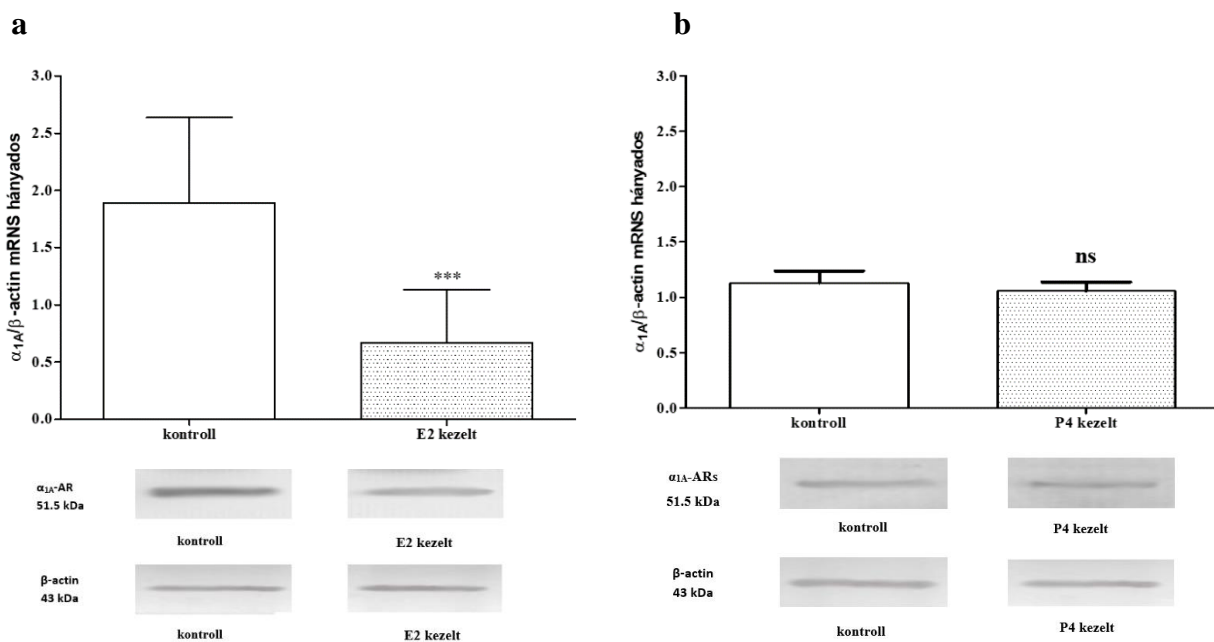


	EC <sub>50</sub> (M)	E <sub>max</sub> (%)
<b>ritodrin</b>	1,1±0,2 x 10 <sup>-7</sup>	60,7 ±3,7
<b>5-MU</b>	5,3±2,7 x 10 <sup>-6</sup> *	62,4 ±4,4 ns
<b>WB4101</b>	2,2±0,6 x 10 <sup>-5</sup> **	71,5 ±9,1 ns
<b>ritodrin + 5-MU (10<sup>-6</sup> M)</b>	3,4±1,2 x 10 <sup>-8</sup> **	84,2 ±3,3 *
<b>ritodrin + WB4101 (10<sup>-6</sup> M)</b>	8,1±1,4 x 10 <sup>-8</sup> *	87,3 ±7,2 *

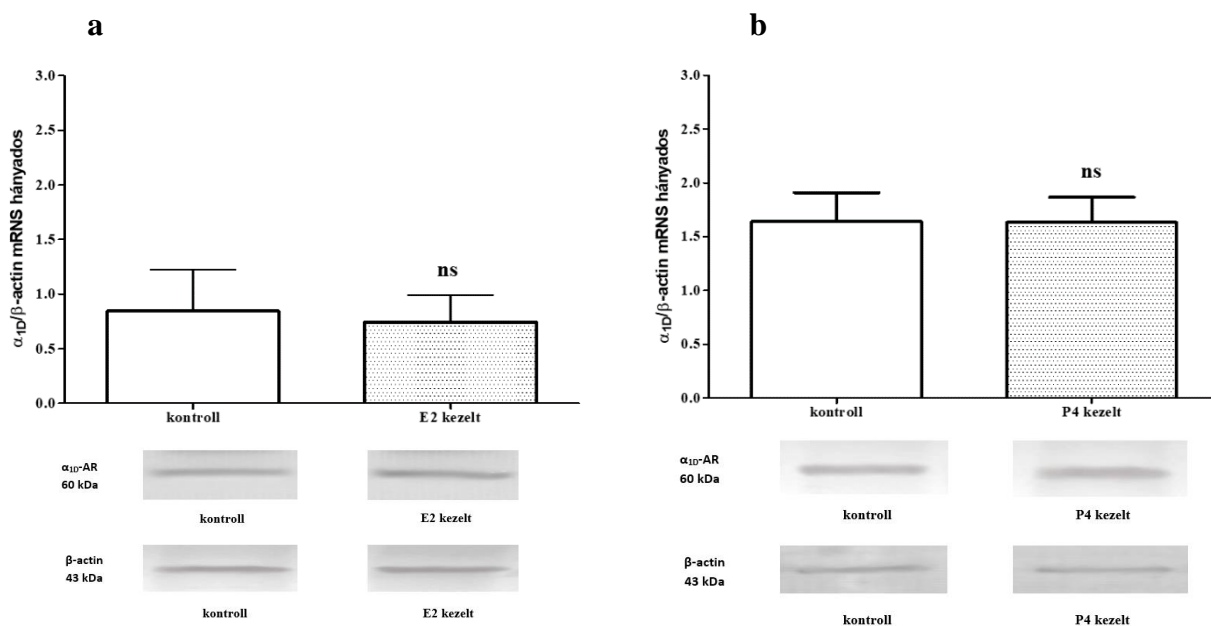
**37. ábra.** A ritodrin 5-MU (a) és WB4101 (b) kombinációjának kontrakciót gátló hatása 22. napos vemhes patkány uteruszon *in vitro* (n=6). A kontrakciókat EFS segítségével váltottuk ki. Az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonisták jelenléte csökkentette a ritodrin EC<sub>50</sub>, illetve növelte az E<sub>max</sub> értékét (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*: p<0,05; \*\*:p<0,01 a ritodrinhez viszonyítva

### 5.3.2. Kombinációk $\alpha_1$ -AR antagonistákkal

A  $\alpha_1$ -AR antagonisták vemhes uterusz kontrakciót gátló hatásának változását *in vivo* E2 és P4 előkezelést követően vizsgáltuk. A kísérletek során mind az  $\alpha_{1A}$ -, mind pedig az  $\alpha_{1D}$ -AR antagonisták hatásának változását mértük a hormonkezeléseket követően. A vemhes állatok E2-vel történő előkezelését a vemhesség 18. napján kezdtük, az állatoknak 4 napon keresztül naponta s.c. egyszer 5 µg/kg/nap E2-t adagoltunk. A P4 kezelés esetén az előkezelését a vemhesség 15. napján kezdtük, és a vemhesség 21. napjáig 7 napon keresztül s.c. adagoltuk 0,5 mg/állat/nap dózisban. A 22. vemhességi napon az uteruszokat kimetszettük és *in vitro* kontraktilitási méréseket végeztünk izolált szervfürdőben, a receptor expresszió változást reverz transzkripció PCR és Western blot technika segítségével mértük, illetve detektáltuk a G-protein aktiválódás változását is [104]. A hormon kezeléseik közül csak az E2 kezelés csökkentette az  $\alpha_{1A}$ -AR mRNS expresszióját, más szignifikáns változást nem tapasztaltunk (38-39. ábra).



**38. ábra.** 22. napos vemhes patkány uterusz  $\alpha_{1A}$ -AR mRNS és fehérje expressziója E2 és P4 kezelést követően (n=6). A reverz transzkripciós PCR során az  $\alpha_{1A}$ -AR amplifikálásához használt primer TaqMan assay ID: Rn00567876\_m1,  $\beta$ -actin esetén pedig Rn00667869\_m1. A WB mérésekhez poliklonális antitesteket használtunk. A 4 napos E2 kezelés jelentősen csökkentette az  $\alpha_{1A}$ -AR expresszióját. ns: nem szignifikáns, \*\*\*p<0,001 a hormonnal nem kezelt (kontroll) mRNS expresszióhoz viszonyítva.

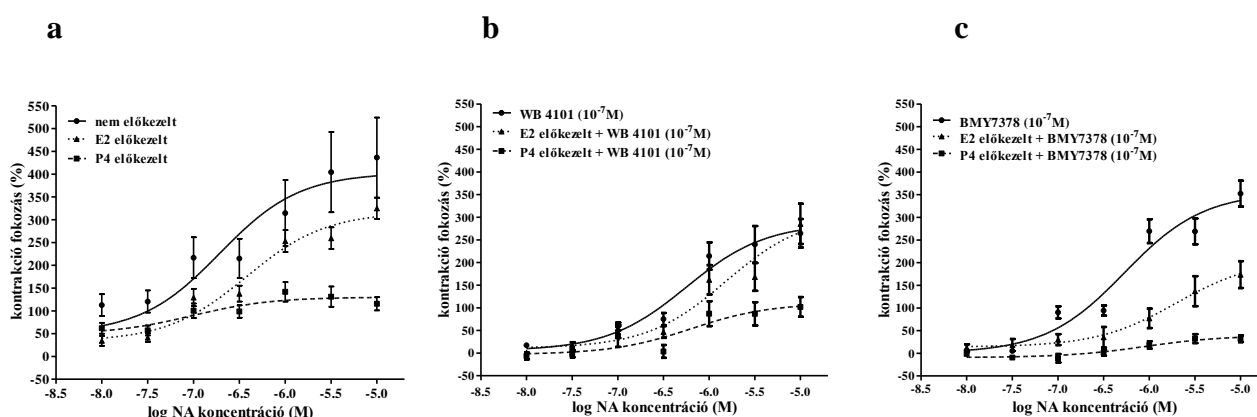


**39. ábra.** 22. napos vemhes patkány uterusz  $\alpha_{1D}$ -AR mRNS és fehérje expressziója E2 és P4 kezelést követően (n=6). A reverz transzkripciós PCR során az  $\alpha_{1D}$ -AR amplifikálásához használt primer TaqMan assay ID: Rn00577931\_m1,  $\beta$ -actin esetén ld. 38. ábra. A WB mérésekhez poliklonális antitesteket használtunk. A hormon előkezelések nem változtatták meg az uterusz  $\alpha_{1D}$ -AR expresszióját. ns: nem szignifikáns a hormonnal nem kezelt (kontroll) mRNS expresszióhoz viszonyítva.

Az izolált szervi kontrakciós vizsgálatokat propranolol és yohimbin jelenlétében végeztük a  $\beta$ - és  $\alpha_2$ -AR-on megvalósuló NA hatás kizárása érdekében. A 22. napos vemhes uteruszokon



a NA koncentráció függően ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$  M) fokozta az összehúzódásokat. E2 előkezelés után a NA koncentráció-válasz görbe jobbra tolódott. P4 előkezelés után a NA  $E_{max}$  értéke nagymértékben csökkent. Az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistá WB4101 és az  $\alpha_{1D}$ -AR antagonistá BMY7378 jelenlétében a NA koncentráció-válasz görbe jobbra tolódott, az  $E_{max}$  értéke csak a WB4101 esetén csökkent. Az E2 előkezelés WB4101 jelenlétében nem változtatott a NA hatásán. A P4 előkezelés a WB4101 jelenlétében csökkentette az NA  $E_{max}$  értékét. E2 előkezelés után a BMY7378 jelenlétében a NA  $E_{max}$  értéke csökkent, ami a P4 előkezelés után még nagyobb mértékű volt. Az E2-kezelés a NA  $EC_{50}$ -értékét a BMY7378 jelenlétében is jobbra tolta. (40. ábra).

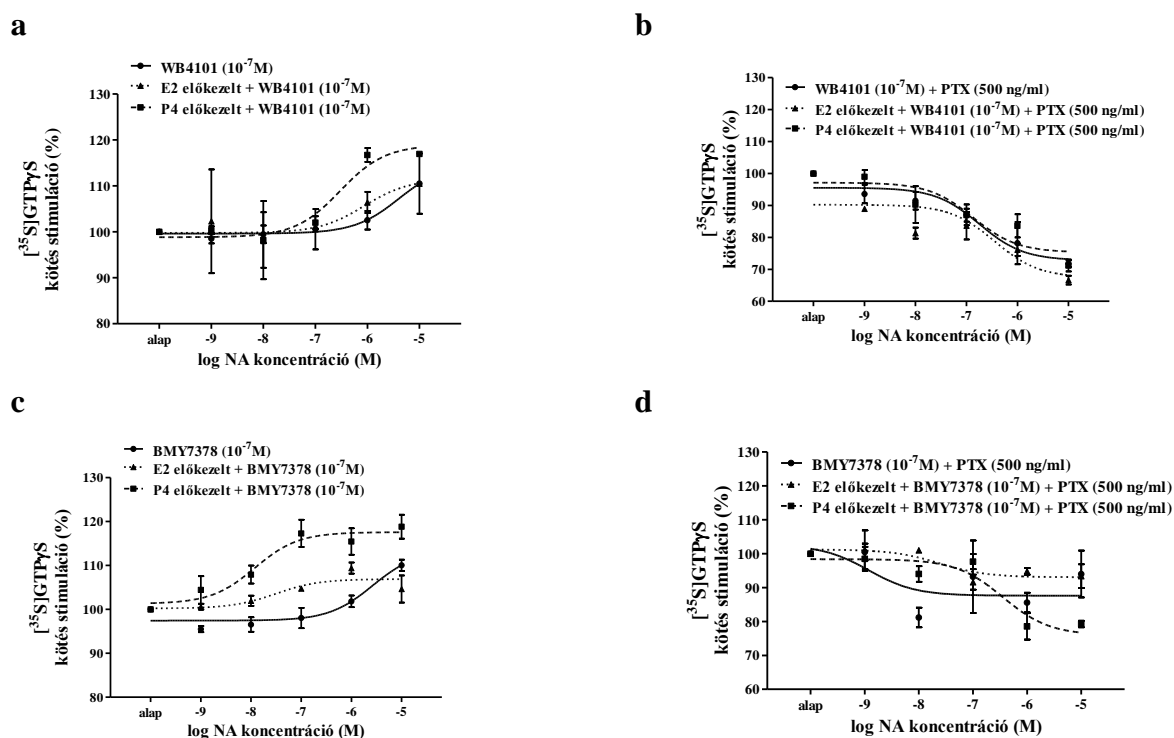


	NA $EC_{50}$ (M)	NA $E_{max}$ (%)
nem előkezelt	$1,9 \pm 0,3 \times 10^{-7}$	$436,4 \pm 53,0$
E2 előkezelt	$3,8 \pm 0,5 \times 10^{-7}$ *	$325,0 \pm 22,4$ ns
P4 előkezelt	$9,6 \pm 1,7 \times 10^{-8}$ ns	$115,5 \pm 18,7$ **
WB4101 ( $10^{-7}$ M)	$5,6 \pm 1,2 \times 10^{-7}$ *	$264,6 \pm 49,4$ **
E2 előkezelt + WB4101 ( $10^{-7}$ M)	$1,5 \pm 0,3 \times 10^{-6}$ *	$285,3 \pm 53,9$ **
P4 előkezelt + WB4101 ( $10^{-7}$ M)	$6,3 \pm 6,7 \times 10^{-7}$ ns	$101,9 \pm 26,0$ ***
BMY7378 ( $10^{-7}$ M)	$5,3 \pm 0,9 \times 10^{-7}$ *	$352,3 \pm 30,5$ ns
E2 előkezelt + BMY7378 ( $10^{-7}$ M)	$2,0 \pm 1,6 \times 10^{-6}$ **	$173,6 \pm 30,1$ **
P4 előkezelt + BMY7378 ( $10^{-7}$ M)	$9,0 \pm 5,1 \times 10^{-7}$ *	$32,0 \pm 7,9$ ***

40. ábra. A NA uterusz kontrakciót fokozó hatása (a) antagonistá nélkül, (b) WB4101 és (c) BMY7378 jelenlétében, 22. napos vemhes patkány uteruszon, E2 vagy P4 előkezelést követően, *in vitro* (n=8). A kísérleteket propranolol ( $10^{-5}$  M) és yohimbin ( $10^{-6}$  M) jelenlétében végeztük. A P4 előkezelés csökkentette a NA hatását önmagában, illetve WB4101 és BMY7378 jelenlétében, míg az E2 előkezelésnek csak a BMY7378 jelenlétében volt jelentős gátló hatása a NA által kiváltott kontrakciókra (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  a nem előkezelt csoporthoz viszonyítva

A G-protein aktivációs vizsgálatokat is propranolol és yohimbin jelenlétében végeztük. WB4101 jelenlétében a NA fokozta a [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötődést. Az E2 előkezelés után nem történt változás, de P4 előkezelés után a [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötődés mértéke fokozódott. A BMY7378 jelenlétében a NA szintén fokozta a [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötődést az alapértékhez képest.

A P4 előkezelést követően a NA fokozta a G-protein aktiválódást (**41. ábra a, c**). WB4101 jelenlétében, E2 vagy P4 előkezelést követően a NA csökkentette a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötődést. A G-protein által közvetített jelátviteli utak megkülönböztetése érdekében PTX segítségével gátoltuk a G<sub>i</sub>-proteint. A PTX hatására a BMY7378 jelenlétében a NA sem önmagában, sem E2 előkezelést követően nem tudta befolyásolni a G-protein aktivációt. A P4 előkezelést követően azonban a NA csökkentette a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötődés mértékét (**41. ábra b, d**).

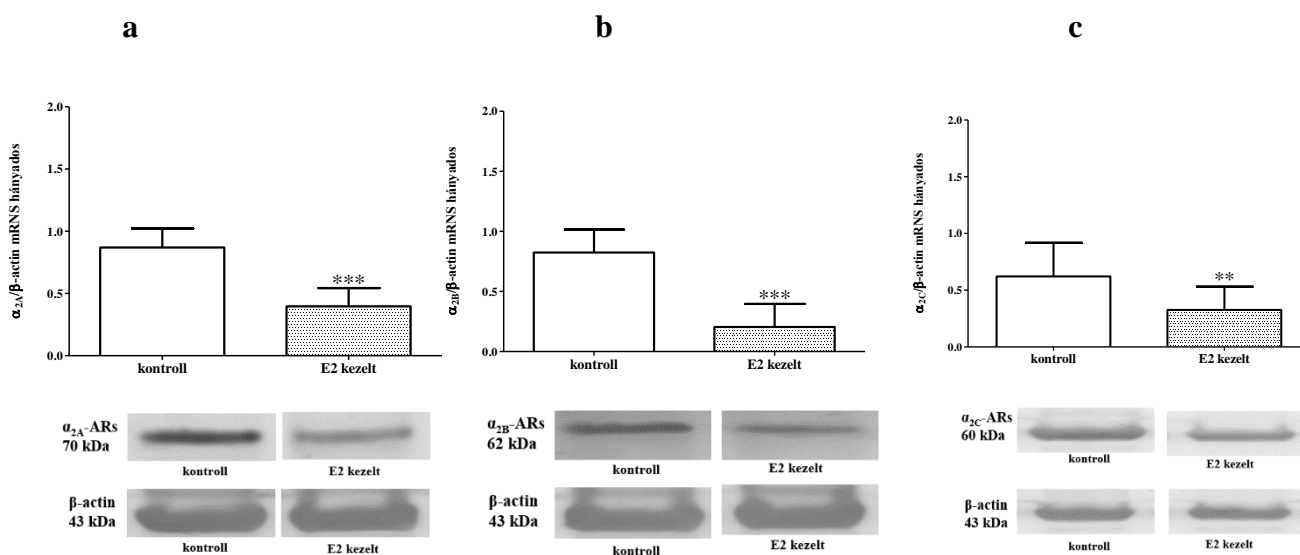


	NA E <sub>max</sub> (%)	NA E <sub>max</sub> PTX (%)
<b>WB4101</b>	114,9 ±1,5	72,8 ±14,1 ##
<b>E2 előkezelt + WB4101</b>	111,5 ±3,3 ns	67,4 ±9,6 ###
<b>P4 előkezelt + WB4101</b>	118,9 ±1,7 *	75,3 ±9,8 ##
<b>BMY7378</b>	113,4 ±2,9	87,6 ±10,4 ##
<b>E2 előkezelt + BMY7378</b>	106,9 ±4,9 ns	93,1 ±10,2 #
<b>P4 előkezelt + BMY7378</b>	117,6 ±1,1 *	75,9 ±9,3 ###

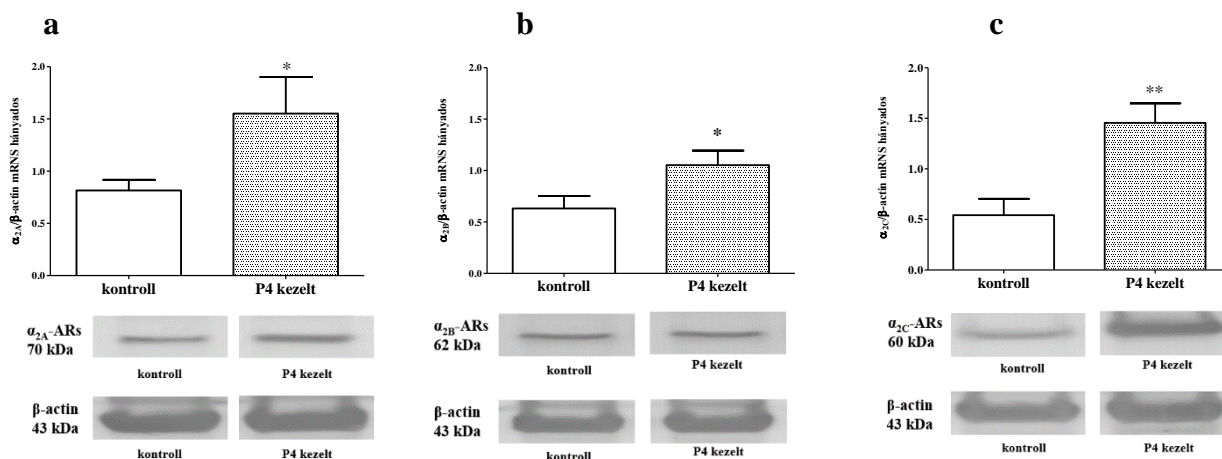
**41. ábra.** A NA G-protein aktiváló hatása (a) WB4101, (b) WB4101+PTX, (c) BMY7378 és (d) BMY7378+PTX jelenlétében 22. napos vemhes uteruszon *in vitro* (n=6). A P4 előkezelés fokozta a NA indukált G-protein aktivációt mindkét antagonistá jelenlétében. A PTX megszüntette a G-protein aktivációt és csökkentette a G-protein aktiválódás mértékét (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*p<0,05; WB4101 vagy BMY7378 értékéhez viszonyítva; #:p<0,05; ##:p<0,01; ###:p<0,001 a PTX nélküli azonos típusú értékhez viszonyítva.

### 5.3.3. Kombinációk $\alpha_2$ -AR antagonistákkal

A  $\alpha_2$ -AR antagonisták vemhes uterusz kontrakciót gátló hatásának változását in vivo E2 és P4 előkezelést követően vizsgáltuk. A kísérletek során mindhárom  $\alpha_2$ -AR altípus ( $\alpha_{2A}$ ,  $\alpha_{2B}$ ,  $\alpha_{2C}$ ) antagonistáinak hatásváltozását mértük a hormonkezeléseket követően. Az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonisták vizsgálata során leirtakkal megegyezően történtek az E2 és P4 kezelések. A 22. vemhességi napon az uteruszokat izoláltuk, és in vitro kontraktilitási méréseket végeztünk izolált szervfürdőben, a receptorok expressziójának változását reverz transzkripciós PCR és WB technika segítségével mértük, detektáltuk a G-protein aktiválódás változását is, valamint ELISA módszerrel megmértük az uterusz mintákban a cAMP szinteket is [105,106]. Míg az E2 előkezelés valamennyi  $\alpha_2$ -AR altípus kifejeződését csökkentette, addig a P4 előkezelés fokozta az altípusok expresszióját (42-43. ábra).

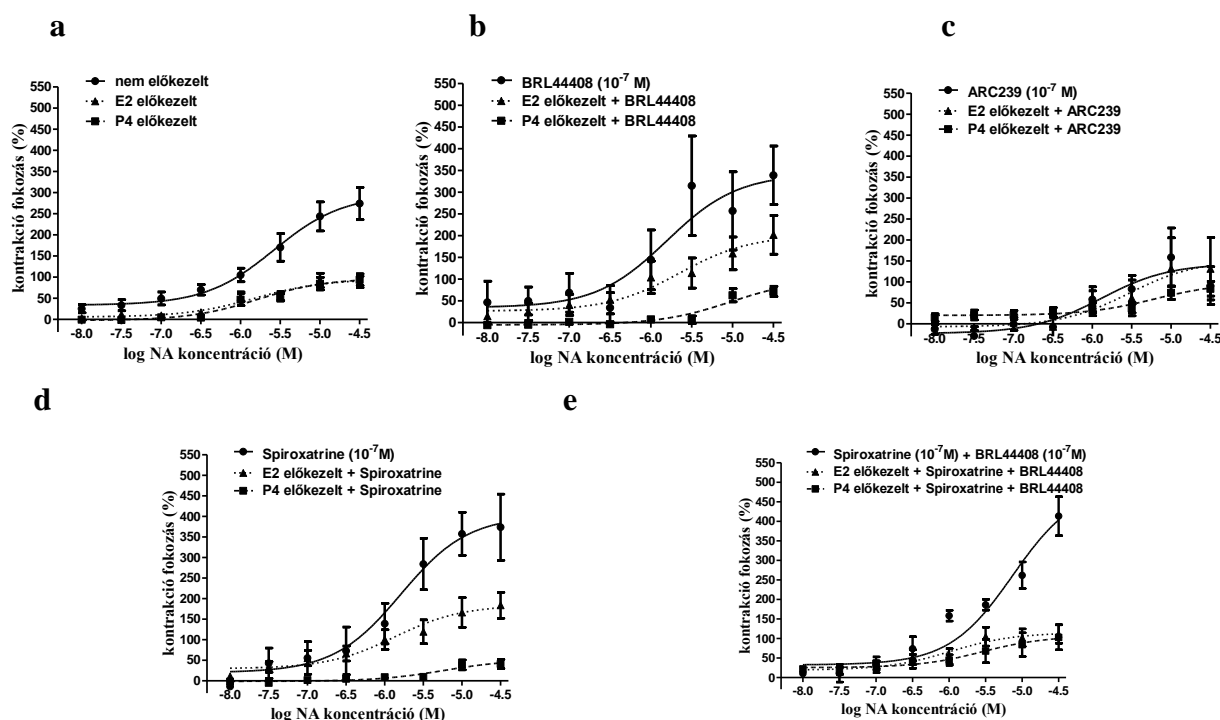


**42. ábra.** 22. napos vemhes patkány uterusz  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ -, és  $\alpha_{2C}$ -AR mRNS és fehérje expressziója E2 kezelést követően (n=6). A reverz transzkripciós PCR során az amplifikálásához használt primerek: TaqMan assay ID: Rn00562488\_s1 ( $\alpha_{2A}$ ), Rn00593312\_s1 ( $\alpha_{2B}$ ), Rn00593341\_s1 ( $\alpha_{2C}$ ), Rn00667869\_m1 ( $\beta$ -actin). A WB mérésekhez poliklonális antitesteket használtunk. A 4 napos E2 kezelés jelentősen csökkentette valamennyi  $\alpha_2$ -AR altípus expresszióját. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 a hormonally nem kezelt (kontroll) mRNS expresszióhoz viszonyítva.



**43. ábra.** 22. napos vemhes patkány uterusz  $\alpha_{2A}$ -,  $\alpha_{2B}$ -, és  $\alpha_{2C}$ -AR mRNS és fehérje expressziója P4 kezelést követően (n=6). A reverz transzkripciós PCR során az amplifikálásához használt primereket ld. 38. ábra. A WB mérésekhez poliklonális antitesteket használtunk. A 7 napos P4 előkezelés mindhárom  $\alpha_2$ -AR altípus expresszióját fokozta. \*p<0,05; \*\*p<0,01 a hormonnal nem kezelt (kontroll) mRNS expresszióhoz viszonyítva.

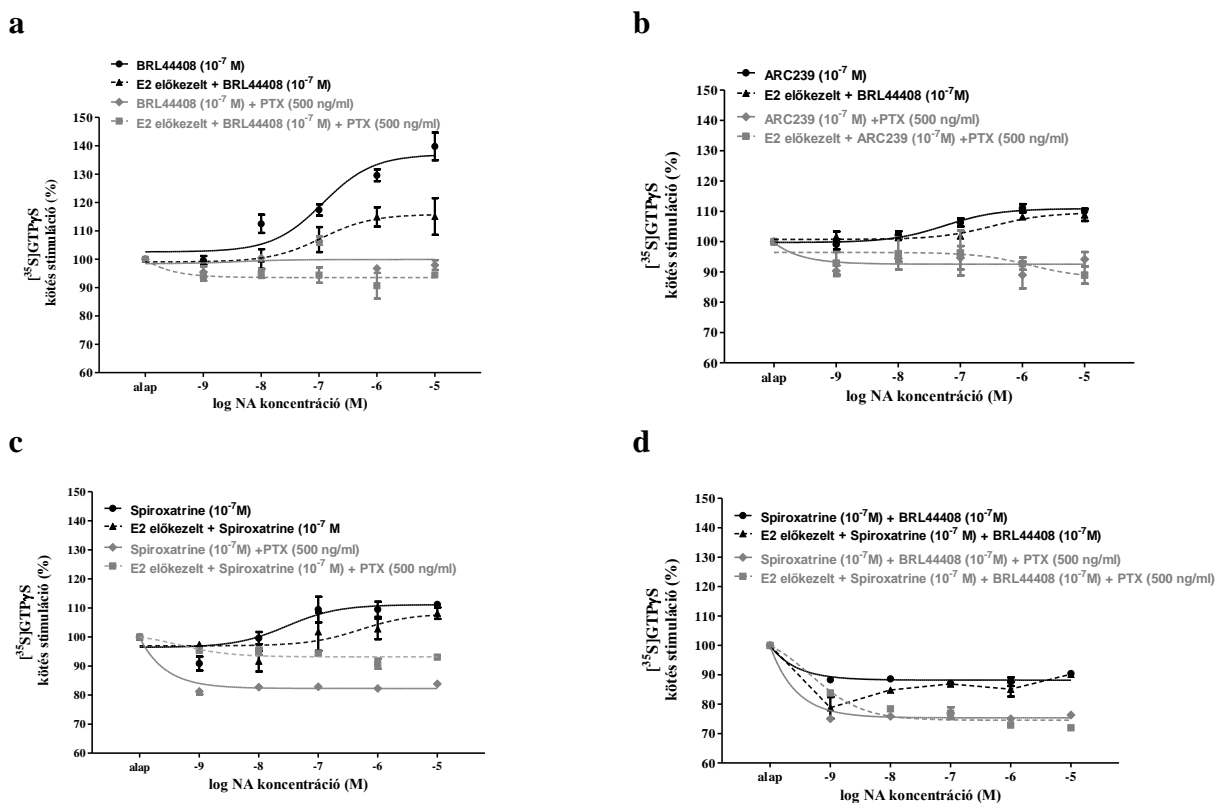
Az izolált szervi kontrakciós vizsgálatokat propranolol és doxazosin jelenlétében végeztük a  $\beta$ - és  $\alpha_1$ -AR-on megvalósuló NA hatás kizárása érdekében. A 22. napos vemhes uteruszokon a NA koncentráció függően ( $10^{-8}$ - $10^{-4,5}$  M) fokozta az összehúzóásokat az  $\alpha_2$ -AR-okon keresztül. Sem a hormonális előkezelések, sem pedig az antagonisták jelenléte nem változtatta meg a NA  $EC_{50}$  értékét. Mind az E2, mind pedig a P4 kezelés jelentősen csökkentette a NA kontrakciót fokozó hatását, a kétféle előkezelés NA hatást csökkentő mértéke között nem volt különbség. Az  $\alpha_{2A}$ -AR antagonistá BRL44408 jelenlétében a NA hatása (az  $\alpha_{2B}$ -és  $\alpha_{2C}$ -AR-okon keresztül) nem változott, bár számértékileg emelkedett, ugyanakkor a P4 előkezelés nagyobb mértékben csökkentette a NA válasz nagyságát, mint az E2 előkezelés. Az  $\alpha_{2B/C}$ -AR antagonistá ARC239 jelenlétében a NA kontrakciót fokozó hatása (az  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztül) a felére csökkent, amit a hormon előkezelések nem módosítottak. Az  $\alpha_{2C}$ -AR antagonistá spiroxatrine jelenlétében a NA hatása (az  $\alpha_{2A}$ -és  $\alpha_{2B}$ -AR-okon keresztül) közel 40%-kal fokozódott, amit az E2 kezelés több mint felére, míg a P4 kezelés majdnem 90%-kal csökkentett. A spiroxatrine és a BRL 44408 együttes jelenlétében pedig a NA hatása (az  $\alpha_{2B}$ -AR-on keresztül) közel 70%-kal növekedett, melyet az E2 vagy a P4 előkezelés mintegy 80%-kal csökkentett. (44. ábra).



	NA EC <sub>50</sub> (M)	NA E <sub>max</sub> (%)
nem előkezelt	2,6±1,2 x 10 <sup>-6</sup>	295,1 ±30,3
E2 előkezelt	1,5±0,8 x 10 <sup>-6</sup> ns	94,9 ±9,7 ***
P4 előkezelt	1,6±0,9 x 10 <sup>-6</sup> ns	97,5 ±10,4 ***
BRL44408 (10 <sup>-7</sup> M)	1,6±1,1 x 10 <sup>-6</sup> ns	342,4 ±58,1 ns
E2 előkezelt + BRL44408 (10 <sup>-7</sup> M)	2,2±1,4 x 10 <sup>-6</sup> ns	201,0 ±34,5 *##
P4 előkezelt + BRL44408 (10 <sup>-7</sup> M)	9,5±3,1 x 10 <sup>-6</sup> ns	100,7 ±21,8 *** ###
ARC239 (10 <sup>-7</sup> M)	1,3±0,5 x 10 <sup>-6</sup> ns	144,1 ±35,7 **
E2 előkezelt + ARC239 (10 <sup>-7</sup> M)	2,9±1,1 x 10 <sup>-6</sup> ns	152,5 ±48,1 ** □
P4 előkezelt + ARC239 (10 <sup>-7</sup> M)	6,1±2,8 x 10 <sup>-6</sup> ns	98,2 ±22,2 *** □
spiroxatine (10 <sup>-7</sup> M)	1,6±0,7 x 10 <sup>-6</sup> ns	401,8 ±47,5 **
E2 előkezelt + Spiroxatine (10 <sup>-7</sup> M)	1,4±0,3 x 10 <sup>-6</sup> ns	184,0 ±22,1 *###
P4 előkezelt + Spiroxatine (10 <sup>-7</sup> M)	5,9±1,2 x 10 <sup>-6</sup> ns	51,9 ±13,9 *** ###
spiroxatine (10 <sup>-7</sup> M) + BRL44408 (10 <sup>-7</sup> M)	7,4±1,9 x 10 <sup>-6</sup> ns	490,5 ±71,0 ***
E2 előkezelt + spiroxatine (10 <sup>-7</sup> M) + BRL44408 (10 <sup>-7</sup> M)	1,1±0,3 x 10 <sup>-6</sup> ns	114,8 ±14,9 *** ###
P4 előkezelt + spiroxatine (10 <sup>-7</sup> M) + BRL44408 (10 <sup>-7</sup> M)	2,8±1,8 x 10 <sup>-6</sup> ns	106,3 ±24,7 *** ###

44. ábra. A NA kontrakciót fokozó hatása (a) antagonistá nélkül, (b) BRL44408, (c) ARC239, (d) spiroxatine és (e) spiroxatine +BRL44408 jelenlétében, 22. napos vemhes patkány uteruszon, E2 vagy P4 előkezelést követően, *in vitro* (n=8). A kísérleteket propranolol (10<sup>-5</sup> M) és doxazosin (10<sup>-7</sup> M) jelenlétében végeztük. Mind az E2, mind pedig a P4 előkezelés csökkentette a NA hatását, a spiroxatine és a spiroxatrin-BRL44408 kombináció jelentősen fokozta, míg az ARC239 jelentősen csökkentette a NA hatását. Az ARC239 kivételével valamennyi esetben az E2 vagy P4 előkezelés csökkentette a NA hatást az antagonisták jelenlétében, a P4 előkezelés gátló hatása jelentősebb volt a BRL44408 és a spiroxatine jelenlétében (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*p<0,001 a nem előkezelt csoporthoz viszonyítva; □: nem szignifikáns ##p<0,01; ###p<0,001 a hormonmal nem előkezelt, adott antagonistá jelenlétében mért hatáshoz képest.

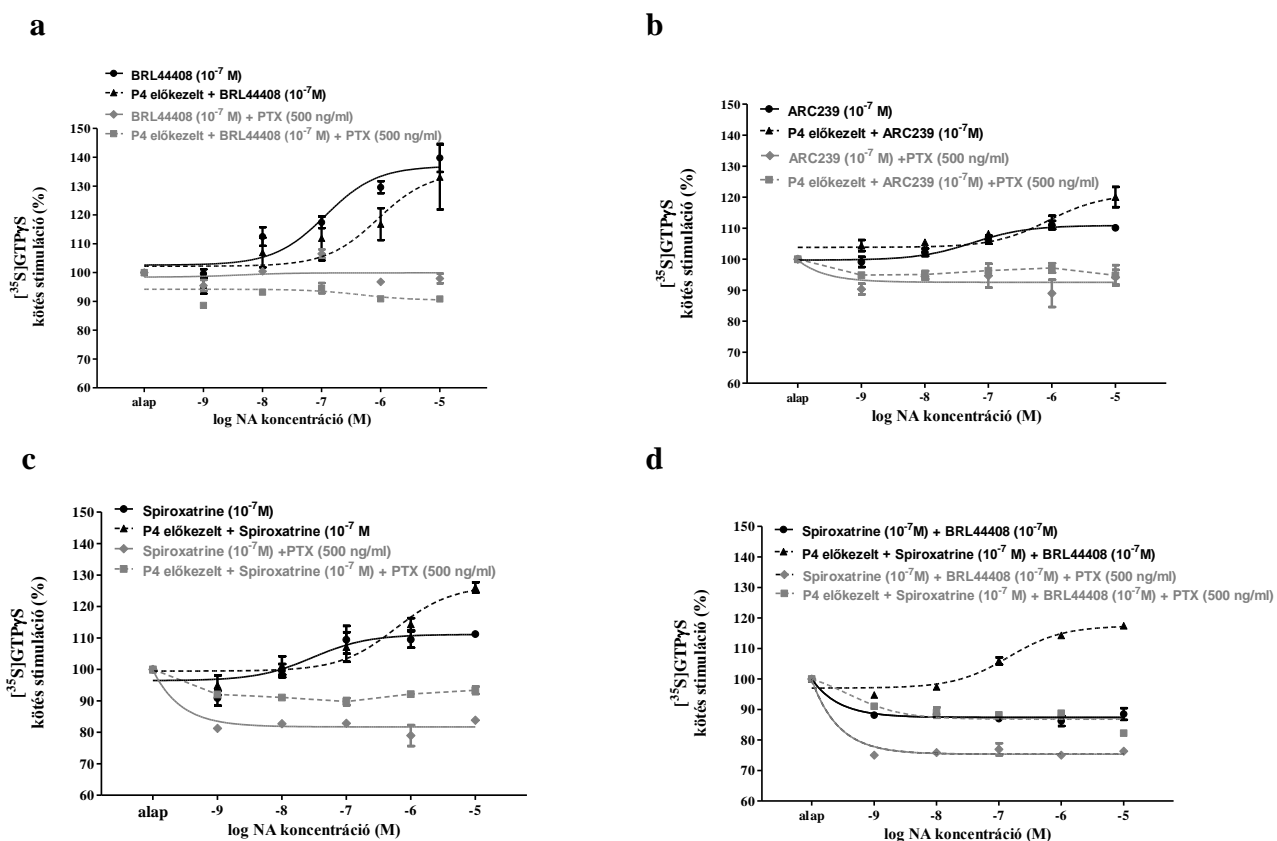
A G-protein aktivációs vizsgálatokat is propranolol és doxazosin jelenlétében végeztük. Az E2 előkezelt uterusz szövetek esetén a BRL44408 jelenlétében a NA [<sup>35</sup>S]GTPγS stimuláló hatása csökkent (az α<sub>2B</sub>-és α<sub>2C</sub>-AR-okon keresztül), míg a többi antagonistá esetében nem történt változás. A G-protein által közvetített jelátviteli utak megkülönböztetése érdekében PTX segítségével gátoltuk a G<sub>i</sub>-proteint. Mind az előkezelés nélküli, mind pedig az E2 előkezelt szövetekben a PTX jelenléte csökkentette a NA kiváltotta [<sup>35</sup>S]GTPγS kötődést. (45. ábra).



	NA E <sub>max</sub> (%)	NA E <sub>max</sub> PTX (%)
<b>BRL44408</b>	137,0 ± 3,1	99,9 ± 1,4 ###
<b>E2 előkezelt + BRL44408</b>	115,8 ± 2,2 **	93,5 ± 1,1 ##
<b>ARC239</b>	110,9 ± 1,0	92,5 ± 1,2 #
<b>E2 előkezelt + ARC239</b>	109,6 ± 1,3 ns	87,9 ± 2,2 #
<b>spiroxitrine</b>	111,1 ± 2,1	82,3 ± 0,7 ###
<b>E2 előkezelt + spiroxitrine</b>	108,1 ± 4,5 ns	93,2 ± 0,6 ##
<b>spiroxitrine + BRL44408</b>	88,2 ± 0,5	75,4 ± 0,7 #
<b>E2 előkezelt + spiroxitrine + BRL44408</b>	90,1 ± 0,4 ns	74,5 ± 0,8 #

**45. ábra.** A NA G-protein aktiváló hatása (a) BRL44408, (b) ARC239, (c) spiroxitrine és (d) spiroxitrine + BRL 44408 jelenlétében 22. napos vemhes uteruszon *in vitro* (n=6). Az E2 előkezelés csökkentette a NA indukált G-protein aktivációt a BRL4408 jelenlétében. A PTX minden esetben gátolta a G-protein aktivációt és szignifikáns csökkentette a G-protein aktiválódás maximum értékeit (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*\*p<0,00 a BRL4408, ARC239, spiroxitrine vagy spiroxitrine+BRL44408 értékéhez viszonyítva; #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 a PTX nélküli azonos típusú értékhez viszonyítva.

A P4 előkezelt uterusz szövetek esetén az ARC239 (szabad  $\alpha_{2A}$ -AR), spiroxatrine (szabad  $\alpha_{2A}$ -és  $\alpha_{2B}$ -AR) vagy spiroxatrine + BRL44408 (szabad  $\alpha_{2B}$ -AR) jelenlétében a NA [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S stimuláló hatása fokozódott, míg a BRL44408 (szabad  $\alpha_{2B}$ -és  $\alpha_{2C}$ -AR) jelenlétében nem történt változás. A PTX jelenlétében mind az előkezelés nélküli, mind pedig a P4 előkezelt szövetekben csökkent a NA kiváltotta [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S aktiválódás. (46. ábra).

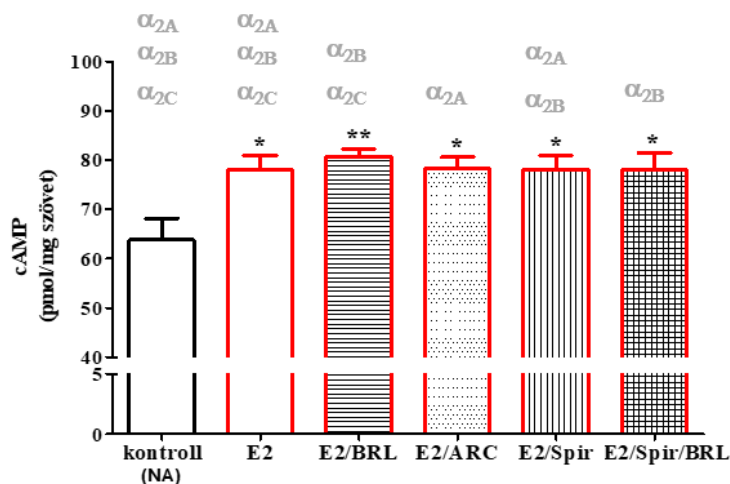


	NA E <sub>max</sub> (%)	NA E <sub>max</sub> PTX (%)
<b>BRL44408</b>	137,0 ± 3,1	99,9 ± 1,4 ###
<b>P4 előkezelt + BRL44408</b>	135,0 ± 8,7 <sup>ns</sup>	90,4 ± 2,3 ###
<b>ARC239</b>	110,9 ± 1,0	92,5 ± 1,2 #
<b>P4 előkezelt + ARC239</b>	121,1 ± 2,8 *	92,2 ± 1,5 #
<b>spiroxatrine</b>	111,1 ± 2,1	81,7 ± 0,7 ###
<b>P4 előkezelt + spiroxatrine</b>	126,7 ± 3,5 **	93,3 ± 1,3 ###
<b>spiroxatrine + BRL44408</b>	87,4 ± 0,5	75,4 ± 0,7 #
<b>P4 előkezelt + spiroxatrine + BRL44408</b>	117,4 ± 1,1 ***	86,8 ± 0,8 ###

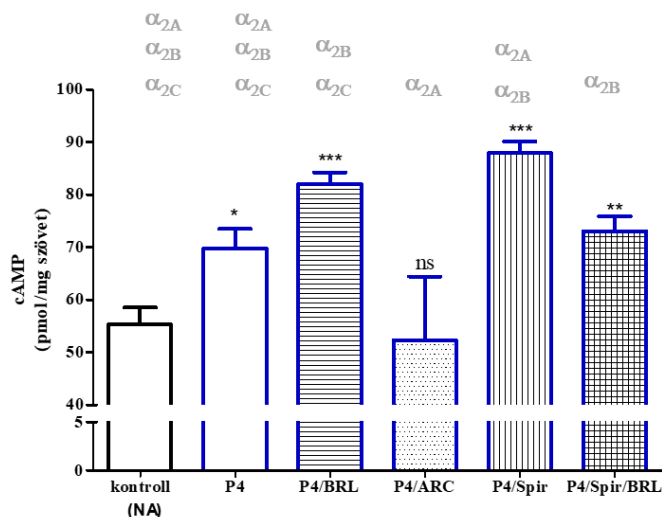
46. ábra. A NA G-protein aktiváló hatása (a) BRL44408, (b) ARC239, (c) spiroxatrine és (d) spiroxatrine + BRL 44408 jelenlétében 22. napos vemhes uteruszon in vitro (n=6). A P4 előkezelés fokozta a NA indukált G-protein aktivációt az ARC239, spiroxatrine és spiroxatrine +BRL44408 jelenlétében. A PTX minden esetben gátolta a G-protein aktivációt és szignifikánsan csökkentette a G-protein aktiválódás maximum értékeit (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*\*p<0,00 a BRL4408, ARC239, spiroxatrine vagy spiroxatrine+BRL44408 értékéhez viszonyítva; #p<0,05; ###:p<0,01; ####:p<0,001 a PTX nélküli azonos típusú értékhez viszonyítva.

A szöveti cAMP meghatározásokat is propranolol és doxazosin jelenlétében végeztük. A NA jelenlétében mért cAMP szintet mind az E2, mind pedig a P4 előkezelés megnövelte. Az altípus szelektív  $\alpha_2$ -AR antagonisták jelenléte nem fokozta a cAMP szint emelkedést az E2 előkezelést követően. A P4 előkezelés szintén fokozta a cAMP szintet, amelyet a BRL44408 és a spiroxatrine tovább fokozott, ugyanakkor együttes jelenlétük cAMP csökkenéssel járt. Az ARC239 jelenléte megszüntette a P4 előkezelés által kiváltott növekedést (47. ábra).

**a**



**b**



**47. ábra.** A NA szöveti cAMP szintet befolyásoló hatása (a) E2, (b) P4 előkezelést követően altípus szelektív  $\alpha_2$ -AR jelenlétében 22. napos vemhes uteruszon in vitro (n=6). Az E2 előkezelés fokozta a NA jelenlétében mért cAMP szintet, az antagonisták jelenléte ezen nem változtatott. A P4 előkezelés szintén fokozta a cAMP szintet, melyet az ARC239 kivételével valamennyi antagonistá tovább növelt. A spiroxatrine +BRL44408 kombináció nem eredményezett nagyobb cAMP szint növekedést. Az oszlopok felett feltüntetett receptorok a NA által az adott esetben stimulált  $\alpha_2$ -AR-ok. BRL: BRL44408; ARC: ARC239; Spir: spiroxatrine, ns: nem szignifikáns; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 kontroll (NA) értékéhez viszonyítva.



## 5.4. Peptidek hatásai az uterusz kontrakciókra

Az endogén peptidek közül csak egy részükről ismert, hogy pontosan milyen módon befolyásolják a méhműködést. A legismertebb közülük az oxitocin, amely kulcsszerepet játszik a vajúadás idején a méhösszehúzóadások kiváltásában [107]. A szülés közeledtével az uterusz oxitocin receptor expressziója jelentősen megnő, mely fokozza a kontrakciókat [108,109]. Az oxitocin szérumszintje általában a terhesség során fokozatosan emelkedik, és koncentrációja a szüléskor éri el a maximumot [110]. Egy másik, az uterusz kontrakciók szempontjából részletesebben tanulmányozott szenzoros neuropeptid a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), mely relaxáló hatással bír számos simaizmon. A CGRP humán és patkány vizsgálatokban egyaránt gátolja a méhösszehúzóadás [111]. A CGRP dózisfüggő relaxációt okoz a spontán és EFS kiváltott összehúzóadásokban. A terhesség végén és a szülés után azonban hatása csökken [112].

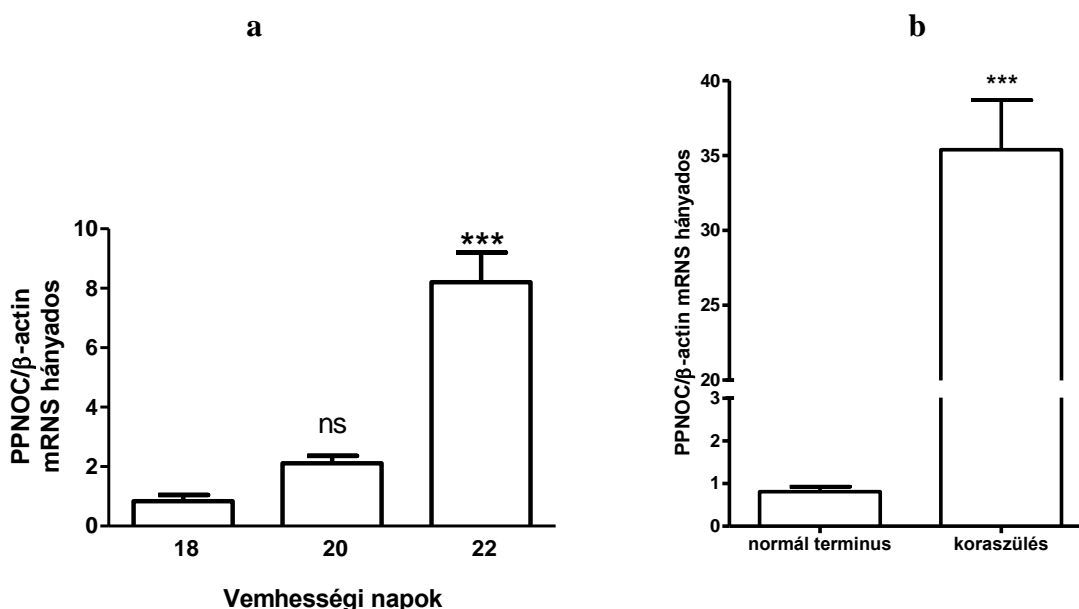
A fent említett példákól kiindulva feltételeztük, hogy más fehérjék (neuropeptidek, citokinek) szintén szerepet játszhatnak az uterusz kontraktilitásban és esetlegesen terápiás célpontként szolgálhatnak a koraszülés megakadályozására. Ennek feltárása érdekében megvizsgáltuk a nociceptin és nocistatin, a kisspeptin, a leptin, az adiponectin és néhány gyulladáscitokin szerepét a méh kontrakciókban.

### 5.4.1. Nociceptin és nocistatin hatása a méhkontrakciókra

A nociceptin az orphan opioid receptor-like 1 (ORL1) endogén ligandja, mely a prepronociceptinből (PPNOC) keletkezik [113,114]. A nociceptin és receptora a központi idegrendszerben és a perifériás szövetekben is expresszálódik. Mind a nociceptin, mind az ORL1 aminosav-szekvenciája nagymértékben homológ az opioid ligandumokéval, ugyanakkor a klasszikus opioid ligandumok kis affinitást mutatnak az ORL1-hez, és az ott kifejtett hatásuk nem gátolható az ópiát antagonistá naloxonnal (NX) [115]. Egy másik neuropeptidet is azonosítottak, amely szintén a PPNOC fehérjéből keletkezik, és egyáltalán nem kötődik az ORL1-hez. Nocistatinnak nevezték el, utalva arra, hogy a központi idegrendszerben nociceptin funkcionális antagonistája [116–118]. Mivel a szülés alatti kontrakciók fájdalommal járnak, a nociceptin és nocistatin pedig részt vesznek a fájdalom percepciójában, ezért logikusnak tűnt megvizsgálni, hogy vajon ezek a nocicepcióban szerepet játszó neuropeptidek befolyásolják-e a terhes méh kontrakciókat. Megmértük a nociceptin és nocistatin lehetséges szerepét a méhösszehúzóadások szabályozásában 22. napos vemhes patkányokban. Vizsgáltuk a PPNOC és az OPRL1 expresszióját vemhes

patkány méhben, illetve a PPNOC esetében humán terhességből származó uterusz mintákon is. Emellett izolált szervi vizsgálatokban mértük a nociceptin és nocistatin kontrakciókra gyakorolt hatását patkány és humán szöveteken, valamint megkíséreltük feltárni a hatásmechanizmusukat [119–122].

Elsőként megmértük, hogy a nociceptin és nocistatin prekuzora, a PPNOC milyen mértékben expresszálódik vemhes patkány és császármetszésből származó terhes humán uteruszokban. Patkányokban azt találtuk, hogy a vemhesség utolsó napján (22. vemhességi nap) a PPNOC mRNS expressziója közel nyolcszorosa volt a 18. vagy 20. vemhességi napokhoz képest. A humán vizsgálatban a koraszülésből származó uterusz mintákban a PPNOC mRNS expressziója 35-szörös volt a normál terminusból származó uteruszokhoz képest.

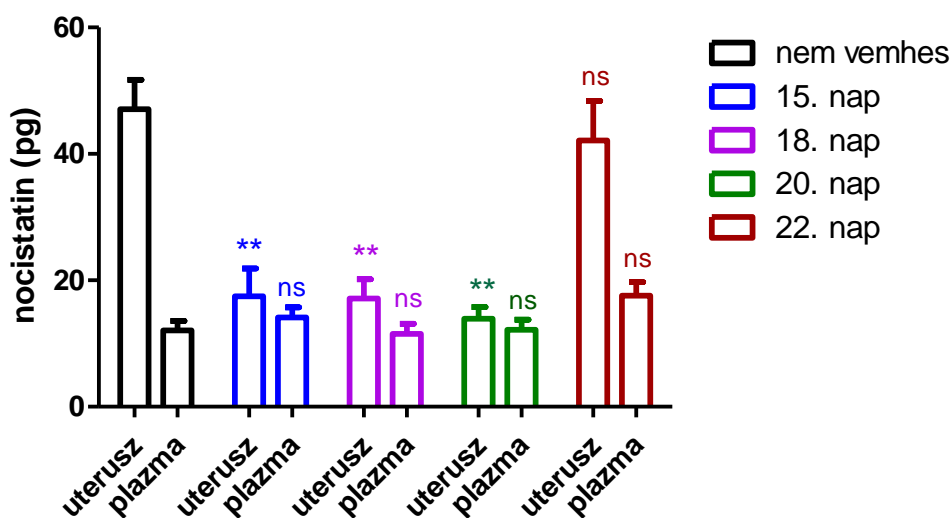


**48. ábra.** PPNOC mRNS expressziója vemhes patkány (a) és humán terhes (b) uteruszban (n=6). Az RT-PCR során az amplifikálásához használt primerek: Rn01637101\_m1 (PPNOC, patkány), Rn 00667869\_m1 (β-actin, patkány), Hs00173823\_m1 (PPNOC, humán), Hs 01060665\_g1 (β-actin, humán). Patkányban a vemhesség utolsó napján megemelkedett a PPNOC mRNS expresszió. A humán mintákban a PPNOC mRNS expressziója jelentősen nagyobb volt a koraszülésből származó uteruszokban. ns: nem szignifikáns, \*\*\*p<0,001 a 18. napos patkányban, illetve a normál terminusban mért mRNS expresszióhoz viszonyítva.

Megvizsgáltuk, hogy a 22 napos vemhes patkány uteruszban kimutatható-e a nociceptin receptora, az ORL1, valamint megmértük az uteruszban a nociceptin szintet is. Az ORL1 jelenlétét radioligand kötési technikával mértük meg (n=4). A nem vemhes nőstényekben az ORL1 maximális kötődési kapacitása, ami jellemzi a jelenlévő receptor mennyiségét is,  $87,3 \pm 5,2$  fmol fehérje/mg membrán, míg a 22. napos vemhes uterusz membránfrakcióiban  $99,6 \pm 2,3$  fmol fehérje/mg membrán volt. A két érték között nem találtunk szignifikáns különbséget. A nociceptin szöveti szintjét RIA módszerével mértük a nem vemhes és a 22.

napos vemhes patkányok uterusában (n=5). A nem vemhes patkányokban a nociceptin  $2,1\pm 0,2$  pg /100 mg szövet koncentrációban volt jelen, míg a 22. napos vemhes patkányok uterusában koncentrációja  $3,6\pm 0,1$  pg/100 mg szövet) volt, ami szignifikánsan magasabb ( $p<0,05$ ), mint a nem vemhes patkányokban.

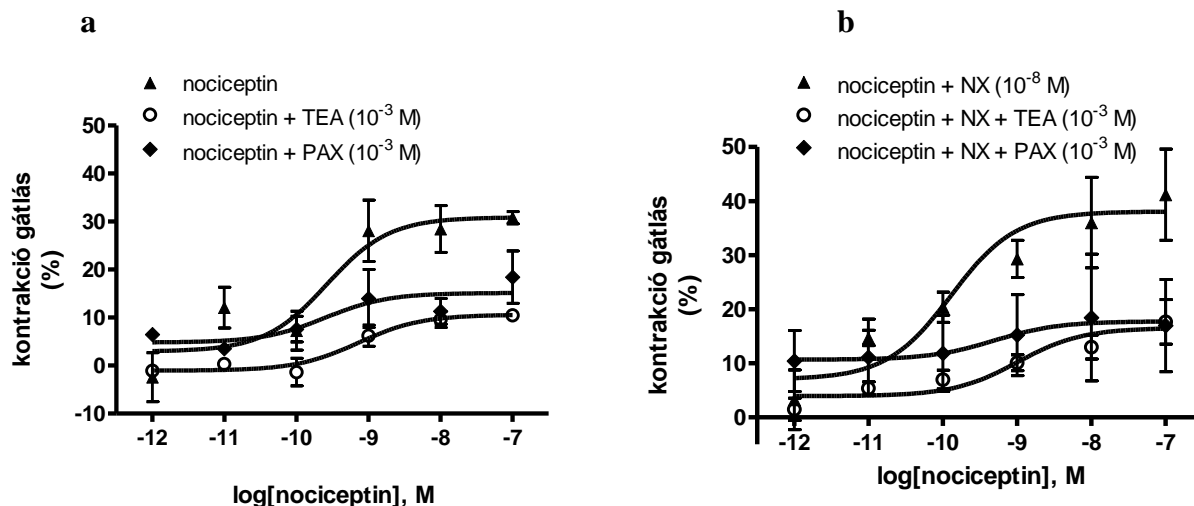
A nocistatin esetében patkány vemhességi modellen megvizsgáltuk mind az uterusz, mind pedig a plazma nocistatin szintjének változását a vemhesség különböző napjain és összehasonlítottuk a kapott értékeket a nem vemhes állatokban mért adatokkal. Érdekes módon a nem vemhes állatokban az uterusz nocistatin szintje magasabb volt, mint a vemhesség 15., 18., és 20. napjain, ugyanakkor a vemhesség utolsó, 22. napjára nocistatin szint újra elérte a nem vemhes értéket. A plazma nocistatin szintekben nem találtunk semmilyen változást a vizsgált napokon a nem vemhes értékhez viszonyítva (49. ábra).



49. ábra. A nocistatin mennyisége nem vemhes és vemhes patkány uteruszban és plazmában (n=6). A meghatározás  $^{125}\text{I}$ -Nocistatin RIA kit segítségével történt. az uterusz esetében a nocistatin mennyisége pg/100 mg szövet, míg a plazma esetében pg/ml egységben értendő. Az uteruszban a nocistatin szint a vemhesség alatt lényegesen alacsonyabb, mint a nem vemhes állapotban, ugyanakkor a vemhesség végére a szintje megközelíti a nem vemhes értéket. A plazmába nem találtunk változást a vizsgált napokon. ns: nem szignifikáns,  $**p<0,01$  a nem vemhes uteruszban, illetve nem vemhes plazmában mért értékekhez viszonyítva.

Izolált szervi kontrakciós kísérletekben megvizsgáltuk, hogy patkány uteruszon a nociceptin hogyan befolyásolja az összehúzódásokat. A nociceptin koncentráció függően gátolta az oxitocin által kiváltott kontrakciókat, mely hatást az ópiát antagonistá NX kis mértékben fokozott. Ugyanakkor a nem szelektív  $\text{K}^+$  csatorna gátló tetraetil-ammónium (TEA) és a magas konduktanciájú  $\text{Ca}^{2+}$ -szenzitív  $\text{K}^+$  csatorna ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) gátló paxilline (PAX) mind

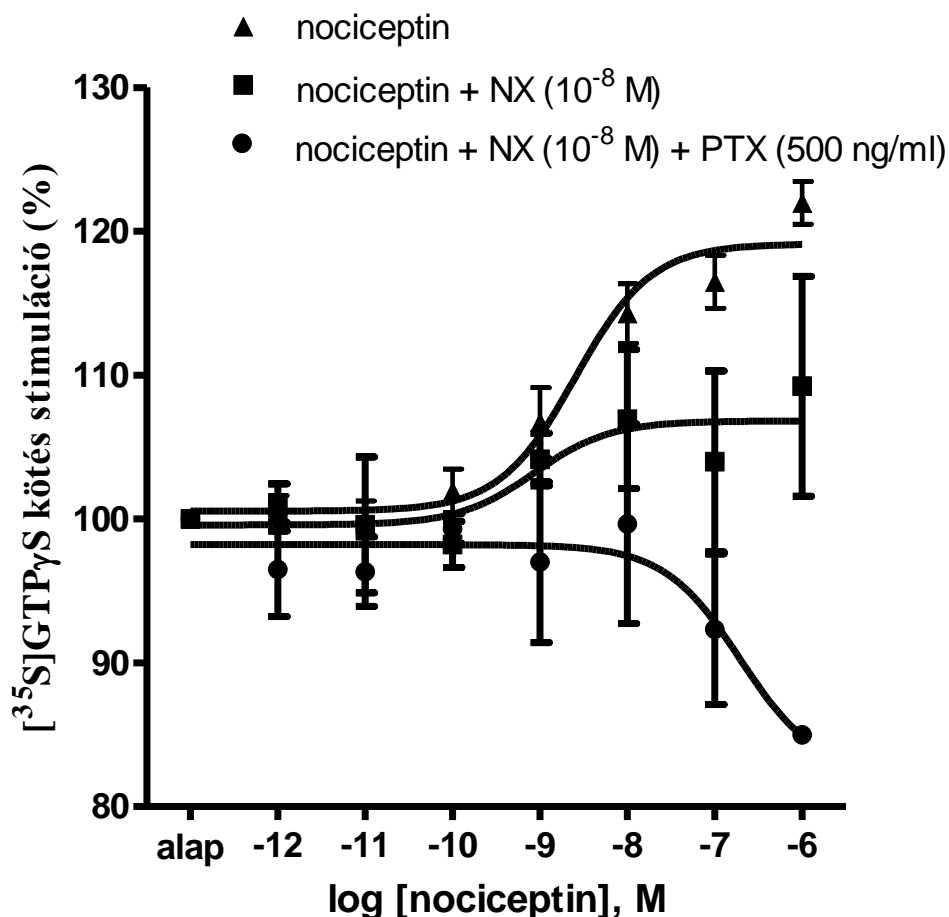
önmagában, mind pedig NX jelenlétében csökkentették a nociceptin relaxáló hatását (50. ábra).



	EC <sub>50</sub> (M)	E <sub>max</sub> (%)
nociceptin	$2,6 \pm 1,1 \times 10^{-10}$	$30,9 \pm 3,6$
nociceptin + TEA ( $10^{-3}$ M)	$7,3 \pm 3,8 \times 10^{-10}$	$10,6 \pm 1,7^{**}$
nociceptin + PAX ( $10^{-3}$ M)	$2,5 \pm 0,9 \times 10^{-10}$	$15,1 \pm 2,7^{**}$
nociceptin + NX ( $10^{-8}$ M)	$1,3 \pm 0,4 \times 10^{-10}$	$38,1 \pm 3,9^*$
nociceptin + NX ( $10^{-8}$ M) + TEA ( $10^{-3}$ M)	$1,0 \pm 0,6 \times 10^{-9}^*$	$16,5 \pm 2,1^{**}$
nociceptin + NX ( $10^{-8}$ M) + PAX ( $10^{-3}$ M)	$5,0 \pm 1,3 \times 10^{-10}$	$17,7 \pm 2,3^{**}$

50. ábra. A nociceptin relaxáló hatása 22. napos vemhes patkány uteruszon *in vitro* (n=6). A kontrakciókat  $10^{-8}$  M oxitocinnal váltottuk ki. A NX önmagában fokozta a nociceptin E<sub>max</sub> értékét, a K<sup>+</sup>-csatorna gátló vegyületek (TEA, PAX) pedig csökkentették a nociceptin relaxáló hatását a NX jelenlététől függetlenül (ld. táblázatos rész). \*p<0,05; \*\*p<0,01 a nociceptin EC<sub>50</sub> vagy E<sub>max</sub> értékeihez viszonyítva

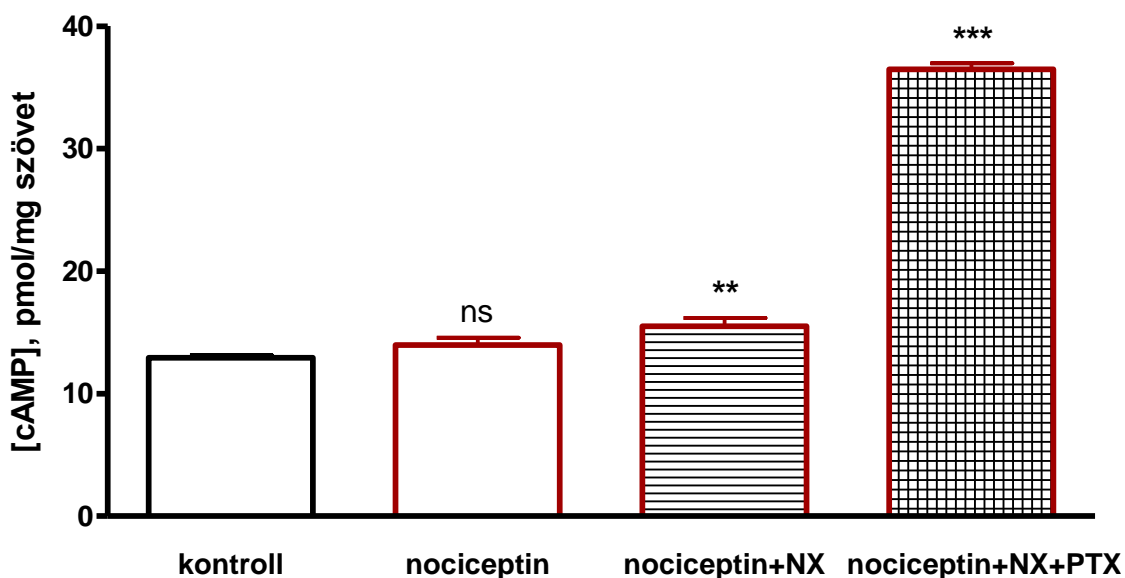
Mivel a NX enyhe nociceptin relaxáló hatást növelő effektusa váratlan eredmény volt, ezért megvizsgáltuk, hogy a G-protein és cAMP aktivációban találunk e magyarázatot a jelenségre. A méréseket a G<sub>i</sub>-protein gátló PTX jelenlétében is elvégeztük. A nociceptin koncentráció függően fokozta a G-protein aktivációt, amelyet a NX mérsékelte, a NX + PTX kombináció pedig kifejezetten gátolt (51. ábra).



	$E_{max}$ (%)
nociceptin	119,1 $\pm$ 1,2
nociceptin + NX ( $10^{-8}$ M)	106,8 $\pm$ 1,3 **
nociceptin + NX ( $10^{-8}$ M) + PTX (550 ng/ml)	82,3 $\pm$ 3,0 ***

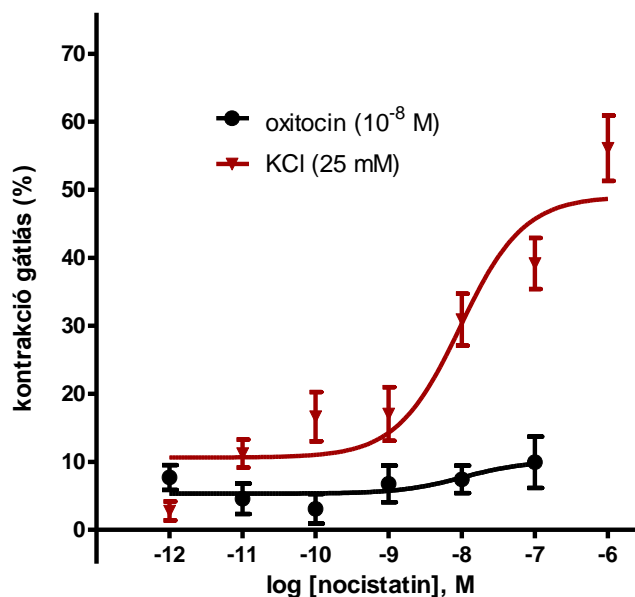
**51. ábra.** A nociceptin G-protein aktiváló hatása NX és PTX jelenlétében 22. napos vemhes uteruszon *in vitro* (n=6). A nociceptin fokozta G-protein aktivációt, amelyet a NX csökkentett, az NX+PTX pedig erőteljesen gátolt (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 a nociceptinhez viszonyítva.

A szöveti cAMP szintet a nociceptin ( $10^{-8}$  M) önmagában nem fokozta, azonban a NX jelenlétében a cAMP mennyisége kismértékben fokozódott. Az NX és PTX együttes jelenlétében azonban a nociceptin szöveti cAMP emelő képessége nagymértékben fokozódott a 22. napos vemhes patkány uteruszban (**52. ábra**).



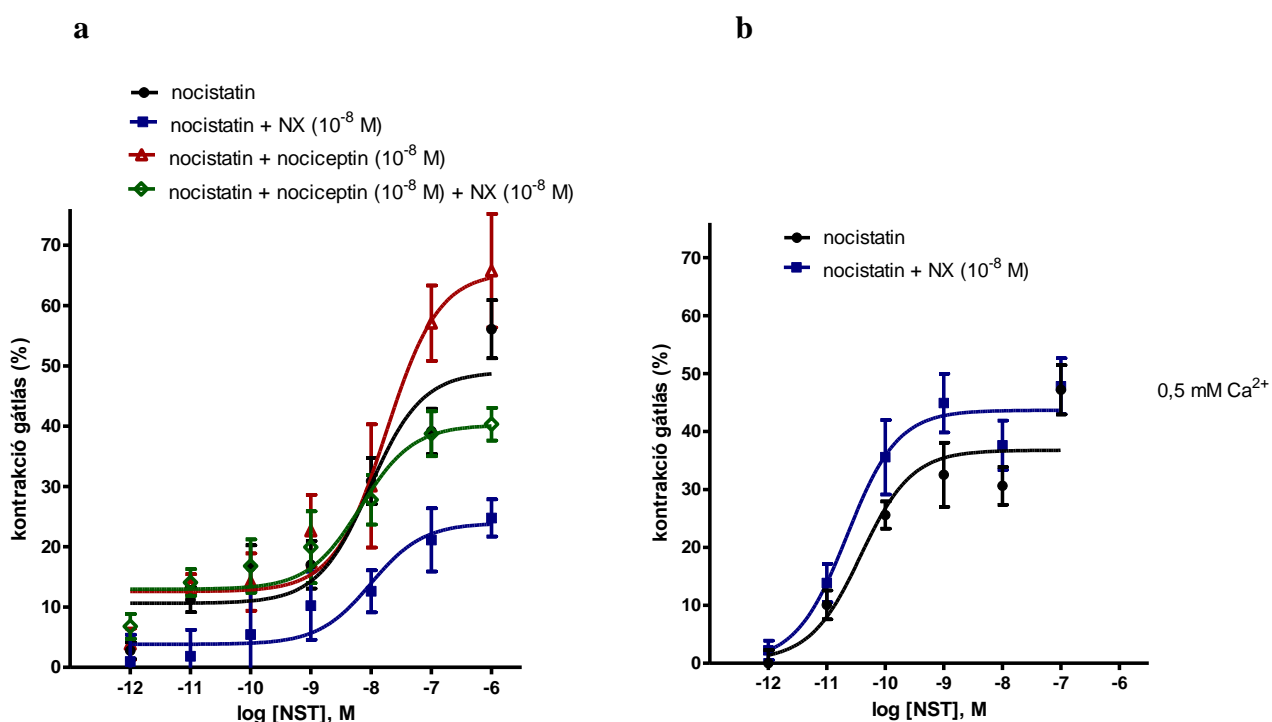
52. ábra. A nociceptin szöveti cAMP szintet növelő hatása NX és PTX jelenlétében 22. napos vemhes uteruszon in vitro (n=8). A nociceptin ( $10^{-8}$  M) nem fokozta a szöveti cAMP szintet, azonban a NX ( $10^{-8}$  M) jelenlétében a fokozó hatás már mérhető volt, míg az NX + PTX (500 ng/ml) együttes jelenléte jelentős cAMP növekedést eredményezett. ns: nem szignifikáns; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  kontroll értékéhez viszonyítva.

A nocistatin nem tudta csökkenteni az oxitocinnal kiváltott izolált szervi vemhes uterusz kontrakciókat, ugyanakkor a KCl-dal kiváltott kontrakciókat közel 60%-ban gátolta (53. ábra). Ezért a további kísérletekben KCl segítségével váltottuk ki az uterusz kontrakciókat.



53. ábra. A nocistatin relaxáló hatása 22. napos vemhes patkány uteruszon in vitro (n=8). Az oxitocinnal ( $10^{-8}$  M) kiváltott kontrakciókat a nocistatin nem gátolta, a KCl (25 mM) által kiváltott kontrakciókat azonban jelentős mértékben csökkentette.

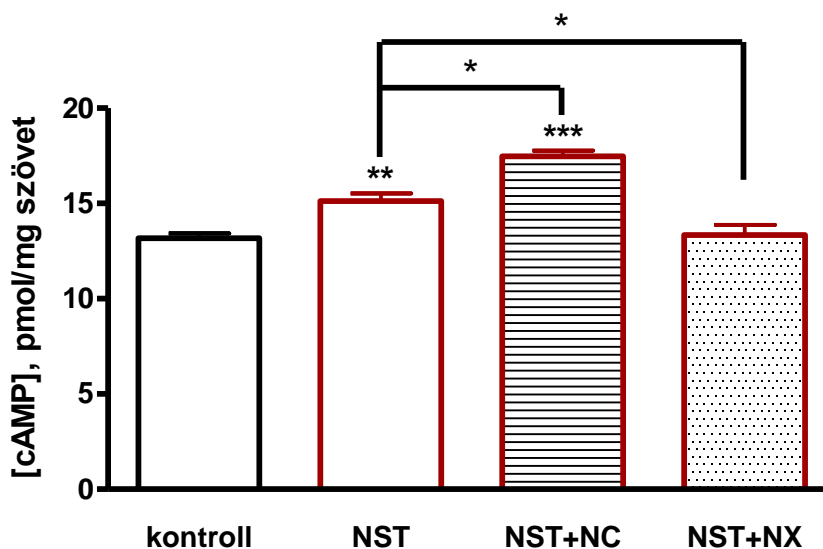
A nocistatin uterus relaxáló hatását megvizsgáltuk nociceptin és nociceptin + NX jelenlétében is in vitro. A nociceptin fokozta a nocistatin gátló hatását, ami azt sugallja, hogy a két peptid nem antagonistá, hanem szinergista interakciót ad a vemhes patkány uteruszon. Ugyanakkor, ha NX is jelen volt a rendszerben, a relaxáló hatás a nocistatin önálló hatásánál is kisebbnek bizonyult, de az EC<sub>50</sub> értékekben nem tapasztaltunk szignifikáns változást. Ha a kísérletek során a pufferoldat Ca<sup>2+</sup> tartalmát a felére csökkentettük (0,5 mM), a nocistatin koncentráció hatás görbéje jelentősen balra tolódott, a gátló hatása pedig kis mértékben csökkent. Csökkentett Ca<sup>2+</sup> tartalmú környezetben a NX jelenléte nem változtatott a nocistatin hatásán, azonban értéke nagyobb volt, mint normál Ca<sup>2+</sup> tartalom esetén (54. ábra).



	EC <sub>50</sub> (M)	E <sub>max</sub> (%)	EC <sub>50</sub> (M) Ca <sup>2+</sup> ↓	E <sub>max</sub> (%) Ca <sup>2+</sup> ↓
<b>nocistatin</b>	9,5 ±2,3 x 10 <sup>-9</sup>	49,0 ±3,2	3,8 ±1,2 x 10 <sup>-11</sup> ###	36,8 ±2,2 #
<b>nocistatin + NX (10<sup>-8</sup> M)</b>	9,9 ±1,9 x 10 <sup>-9</sup>	23,9 ±3,9 ***	2,2 ±1,0 x 10 <sup>-11</sup> ###	43,7 ±2,7 ###
<b>nocistatin + nociceptin (10<sup>-8</sup> M)</b>	1,8 ±2,1 x 10 <sup>-8</sup>	65,6 ±7,4 **		
<b>nocistatin + nociceptin (10<sup>-8</sup> M) + NX (10<sup>-8</sup> M)</b>	6,7 ±1,6 x 10 <sup>-9</sup>	40,2 ±2,9 *		

54. ábra. A nocistatin relaxáló hatása 22. napos vemhes patkány uteruszon nociceptin és NX jelenlétében in vitro (n=6). A kontrakciókat KCl-dal (25 mM) váltottuk ki. (a) A nocistatin (NST) uterus relaxáló hatását a nociceptin fokozta, a nociceptin és NX együttes jelenléte azonban mérsékelte (ld. táblázatos rész). (b) Csökkentett kalcium tartalmú (0,5 mM) környezetben a nocistatin gátló hatása csökkent, de a NX ezt nem tudta befolyásolni (ld. táblázatos rész színes oszlopai). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 a nocistatin E<sub>max</sub> értékéhez viszonyítva; ###p<0,01; ###p<0,001 a normál Ca<sup>2+</sup> tartalmú pufferben mért vonatkozó értékhez viszonyítva

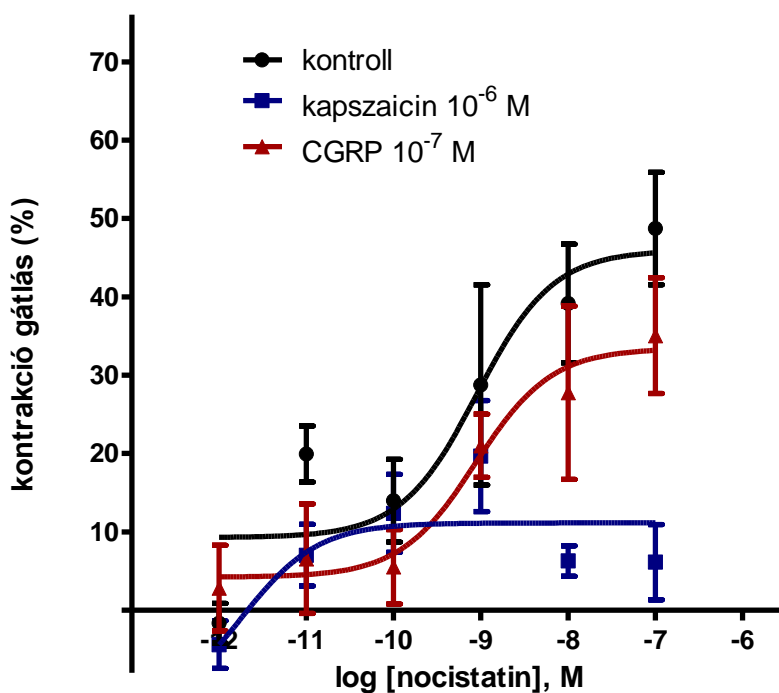
ELISA módszerrel megmértük a nocistatin, valamint a nocistatin + NX és a nocistatin + nociceptin kombináció cAMP szint növelő hatását 22. napos vemhes patkány uteruszon, keresve a simaizom relaxáció okát. A nocistatin kismértékben fokozta a szöveti cAMP szintet a kontrollhoz (nem kezelt) képest, mely tovább nőtt a nociceptinnel való kombináció során. Ezzel szemben a NX jelenléte megszüntette a nocistatin cAMP szint emelő hatását (55. ábra).



55. ábra. A nocistatin szöveti cAMP szintet növelő hatása nociceptin és NX jelenlétében 22. napos vemhes uteruszon *in vitro* (n=8). A nocistatin ( $10^{-8}$  M) megemelte a szöveti cAMP szintet, melyet a nociceptin ( $10^{-8}$  M) még tovább fokozott. A NX ( $10^{-8}$  M) jelenléte megszüntette a nocistatin cAMP emelő hatását. NST: nocistatin; NC: nociceptin; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 kontroll értékkel, illetve a szakaszokkal jelölt oszlopok között összehasonlítva.

A nocistatin hatásmechanizmusának további tisztázása érdekében azt is megvizsgáltuk, hogy a neuropeptidok felszabadítása szerepet játszik-e a hatásában. Izolált szervfürdő kísérletben az uterusban található kapszaicin-érzékeny primer afferensek neuropeptid tartalmát kapszaicinnel ( $10^{-6}$  M, 10 perc) depletáltuk, melynek következtében a nocistatin maximális relaxáló hatása szignifikánsan csökkent. A neuropeptid depléciót követően a szervfürdőbe CGRP-t ( $10^{-7}$  M, 20 perc) adtunk, melyet követően a nocistatin relaxáló hatása visszatért, megközelítve a kapszaicin kezelés előtti értéket. Ezáltal igazoltuk, hogy a nocistatin uterusz relaxáló hatásában neuropeptidok közül a CGRP felszabadítás biztosan fontos szerepet játszik (56. ábra).

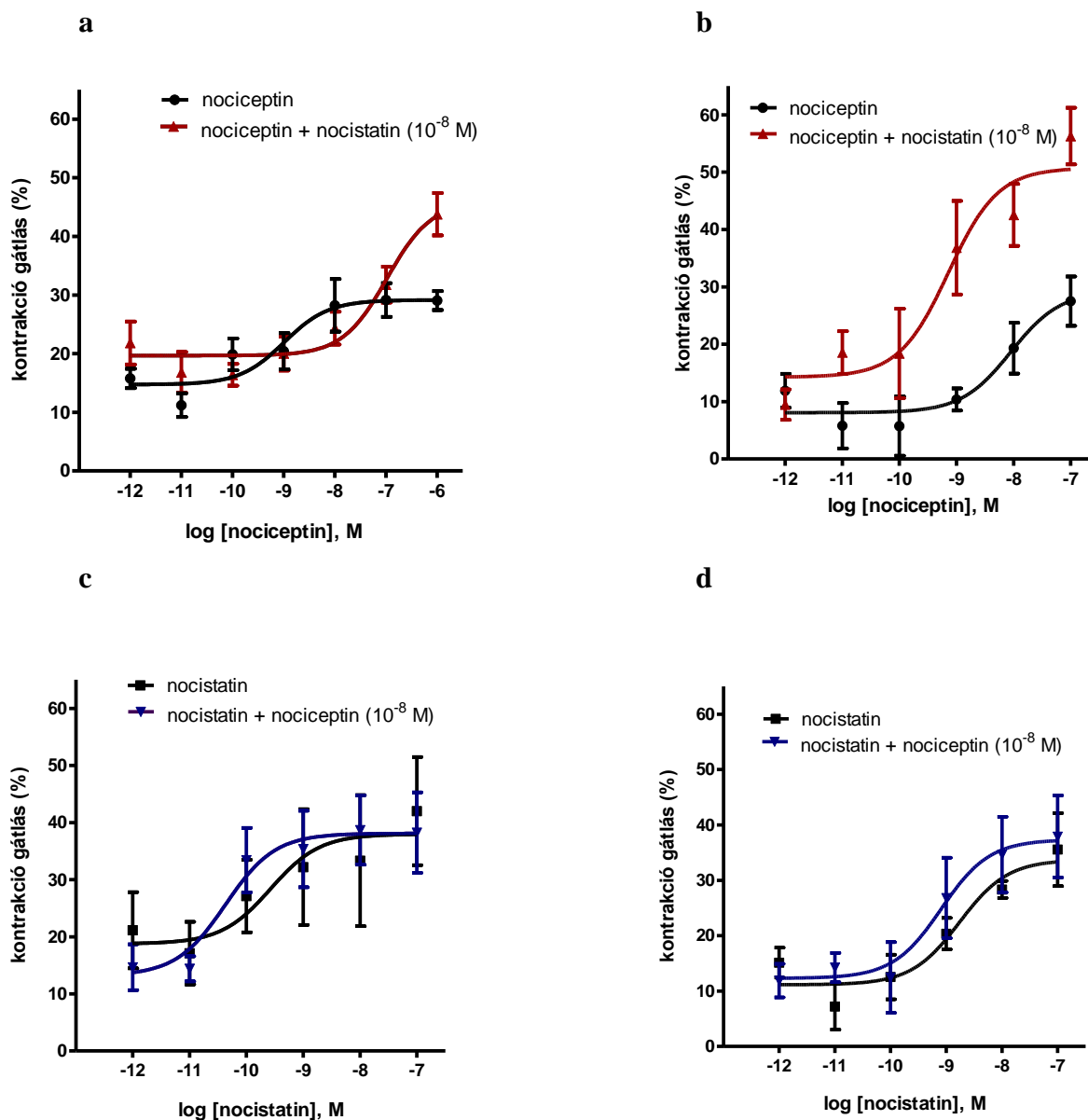




	$E_{max}$ (%)
<b>nocistatin</b>	45,9 ±6,2
<b>nocistatin + kapszaicin (10<sup>-6</sup> M)</b>	11,1 ±2,5 ***
<b>nocistatin + CGRP (10<sup>-7</sup> M)</b>	33,4 ±5,5 *

**56. ábra.** A nocistatin relaxáló hatása 22. napos vemhes patkány uteruszon nociceptin és NX jelenlétben kapszaicin előkezelést majd CGRP inkubációt követően *in vitro* (n=6). A kapszaicint (10<sup>-6</sup> M) 6% Tween 80-t és 8% etanolt tartalmazó fiziológiás sóoldatban oldottuk, és 10 percig inkubáltuk vele a szöveteket. A kontroll mérés során a nocistatin mellé a kapszaicin oldószerét is adagoltuk. Alapos kimosás után a szöveteket CGRP-vel (10<sup>-7</sup> M; 20 perc) inkubáltuk, majd ismét kimostuk és újra felvettük a nocistatin koncentráció-hatás görbéjét. A kísérletek során a szervfürdőhöz a következő proteáz inhibitorokat adtuk: fenilmetánszulfonil-fluorid (10<sup>-6</sup> M), kaptopril (10<sup>-4</sup> M), ditiotreitolt (5x10<sup>-4</sup> M mM), szója tripszin inhibitor (10<sup>-3</sup> M) és aprotinin (36 000 kIU/L). A kapszaicin kezelés megszüntette a nocistatin relaxáló hatását, amit a CGRP kezelés csökkentett mértékben, de helyreállított (ld. táblázatos rész). \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 a kontroll (nocistatin) értékhez viszonyítva

A nociceptin és nocistatin uterusz relaxáló hatását megvizsgáltuk humán mintákon is *in vitro*. A terhes humán uterusz minták császármetszésből származtak normál terminusból és koraszülésből. A nociceptin azonos mértékben gátolta a koraszülésből és a normál terminusból származó uteruszok oxitocinnal (10<sup>-8</sup> M) kiváltott kontrakcióit, melyet a nocistatin (10<sup>-8</sup>M) jelenléte mindkét esetben tovább erősített, a gátlás mértéke nagyobb volt a koraszüléssel minták esetén. A nocistatin szintén hasonló mértékben gátolta a normál terminusból és a koraszülésből származó uterusz kontrakciókat, melyet azonban a nociceptin jelenléte (10<sup>-8</sup> M) nem módosított. (57. ábra).



	EC <sub>50</sub> (M) normál terminus	E <sub>max</sub> (%) normál terminus	EC <sub>50</sub> (M) koraszülés	E <sub>max</sub> (%) koraszülés
<b>nociceptin</b>	$1,2 \pm 0,6 \times 10^{-9}$	$29,1 \pm 1,8$	$9,0 \pm 3,1 \times 10^{-9}$	$29,3 \pm 5,4$
<b>nociceptin + nocistatin (<math>10^{-8}</math> M)</b>	$1,4 \pm 0,4 \times 10^{-7}$ ***	$45,9 \pm 4,8$ **	$7,2 \pm 2,5 \times 10^{-10}$ **	$50,7 \pm 4,6$ *
<b>nocistatin</b>	$2,6 \pm 1,7 \times 10^{-10}$	$38,0 \pm 5,8$	$1,7 \pm 0,8 \times 10^{-9}$	$33,7 \pm 4,0$
<b>nocistatin + nociceptin (<math>10^{-8}</math> M)</b>	$4,3 \pm 1,1 \times 10^{-11}$ *	$38,1 \pm 3,3$	$8,1 \pm 2,9 \times 10^{-10}$ *	$34,7 \pm 4,6$

**57. ábra.** A nociceptin és nocistatin relaxáló hatása normál terminusból és koraszülésből származó humán uterusz szöveteken in vitro. Az összehúzóásokat  $10^{-8}$  M oxitocinnal váltottuk. (a) A nociceptin relaxáló hatása normál terminusból származó szöveten megnőtt nocistatin ( $10^{-8}$  M) jelenlétében (n=6). (b) A nociceptin relaxáló hatását a nocistatin nagy mértékben növelte koraszüléssel szöveten (n=4). (c) A nocistatin relaxáló hatásmaximumát a nociceptin ( $10^{-8}$  M) nem változtatta meg sem normál terminusból (n=4), (d) sem pedig koraszülésből (n=5) származó szöveteken (ld. táblázatos rész). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 a nociceptin vagy nocistatin értékeihez viszonyítva

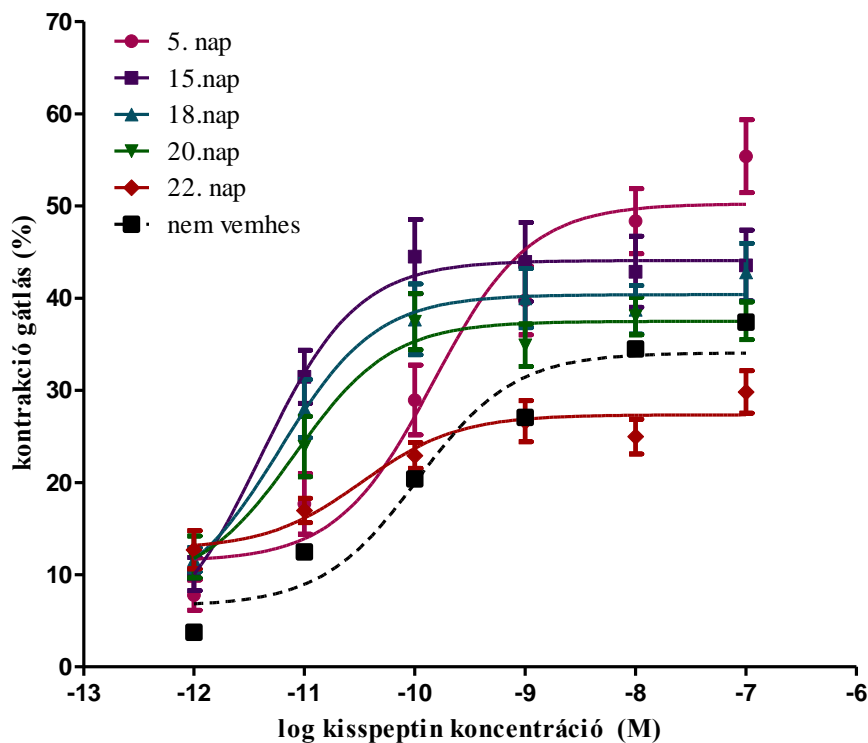
#### 5.4.2. Kisspeptin hatása a méhkontrakciókra

A KISS1/Kiss1 gén termékei közül, amelyeket kisspeptinként említenek, a legjelentősebb 54 aminosavból áll, és elsőként a humán malignus melanóma sejtvonalakon kifejtett metasztázis gátló hatását írták le [123]. További 10, 13 és 14 aminosavból álló származékok is keletkeznek, melyek hatékonyan aktiválják mind a patkány, mind a humán kisspeptin receptort (Kiss1R), amely  $G_{q/11}$ -proteinhez kapcsolódik, az IP3 mobilizálja az intracelluláris kalciumot a raktárából, míg a DAG képződés a protein kináz C aktiválódását eredményezi, ami különböző mitogén-aktivált protein kinázok, mint az ERK1/2 és a p38 foszforilációját váltja ki [124]. A kisspeptin/Kiss1R rendszer elemeit azonosították humán és a rágcsáló petefészekben, ováriumban és az uterusban is [125,126]. A kisspeptin fokozza a gonadotropin releasing hormon (GnRH) felszabadulást, amely által fokozza a luteinizáló hormon (LH) és a folliculus stimuláló hormon (FSH) szekrécióját [127]. Késői terhességben a kisspeptin fokozza az oxitocin neuronok aktivitását, azonban ennek a hatásnak a pontos mechanizmusa és funkciója még nem tisztázott [128].

Mivel a kisspeptin uterusz kontraktilitásban kifejtett közvetlen szerepéről nem álltak rendelkezésre adatok, ezért megvizsgáltuk hatását nem vemhes és vemhes patkány uteruszon, illetve megmértük a Kiss1R expresszióját és lokalizációját is a méhszövetben [129]. A vizsgálatok során a kisspeptin KISS1 94-121 fragmensét használtuk.

Elsőként izolált szervfürdőben megmértük, hogy a kisspeptin hogyan befolyásolja a KCl kiváltotta kontrakciókat nem vemhes és vemhes patkány uteruszon, valamint endometrium eltávolítás után a miometriumon.

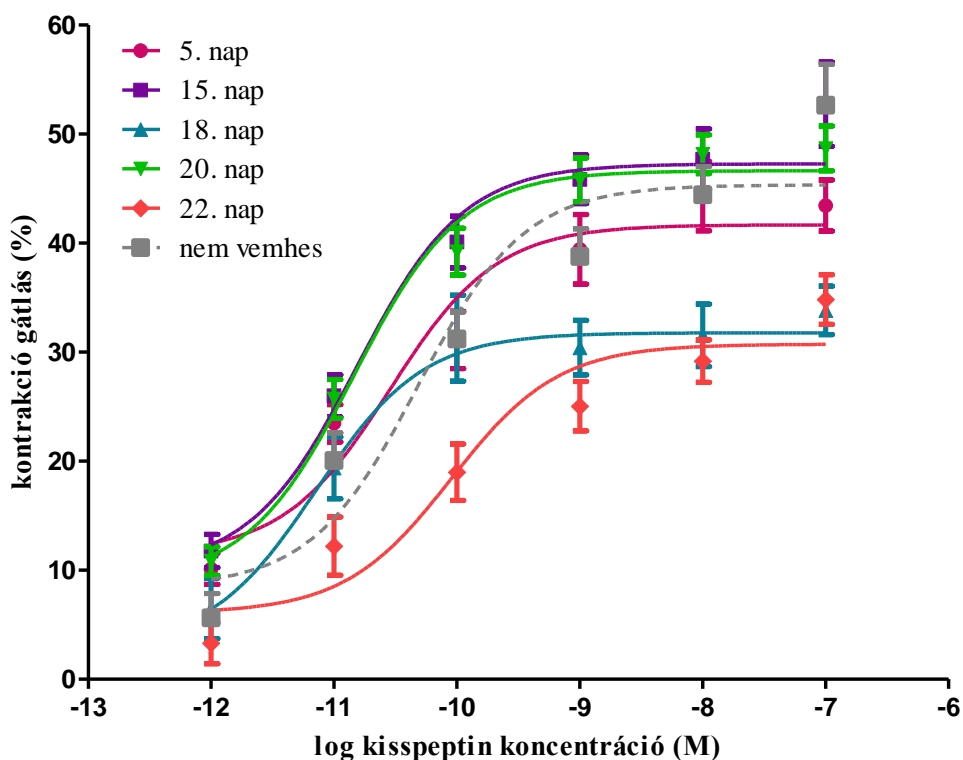
A kontraktilitási vizsgálatokat ösztrusz fázisban lévő nem vemhes, valamint 5., 15., 18., 20. és 22. napos vemhes uterusz szöveteken végeztük. A kisspeptin koncentráció függően gátolta a kontrakciókat, a maximális gátló hatás a vemhesség vége felé haladva fokozatosan csökkent. A legerősebb uterorelaxáns hatást az 5. vemhességi napon mértük. Az  $EC_{50}$ -értékekben nem tapasztaltunk változásokat (**58. ábra**).



	EC <sub>50</sub> (M)	E <sub>max</sub> (%)
nem vemhes	1,1 ±4,5 × 10 <sup>-10</sup>	34,1 ±2,0
5. nap	1,5 ±1,4 × 10 <sup>-10</sup> ns	50,3 ±2,3 **
15. nap	4,0 ±12,1 × 10 <sup>-11</sup> ns	44,1 ±1,8 ns
18. nap	6,0 ±5,4 × 10 <sup>-12</sup> ns	40,4 ±1,6 ns
20. nap	8,2 ±4,2 × 10 <sup>-12</sup> ns	37,5 ±1,4 ns
22. nap	3,3 ±84,3 × 10 <sup>-11</sup> ns	27,4 ±1,2 *

**58. ábra.** A kisszeptin hatása a nem vemhes és vemhes patkány uterusz kontrakciókra *in vitro* (n=8/vemhességi nap). A kontrakciókat 25 mM KCl-dal váltottuk ki. A kisszeptin kumulatív adagolása minden esetben simaizomrelaxációt okozott, a vemhességi napokat figyelembe véve a maximális hatása folyamatosan csökkent (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns, \*p<0,05; \*\*p<0,01 az előző napi értékhez viszonyítva

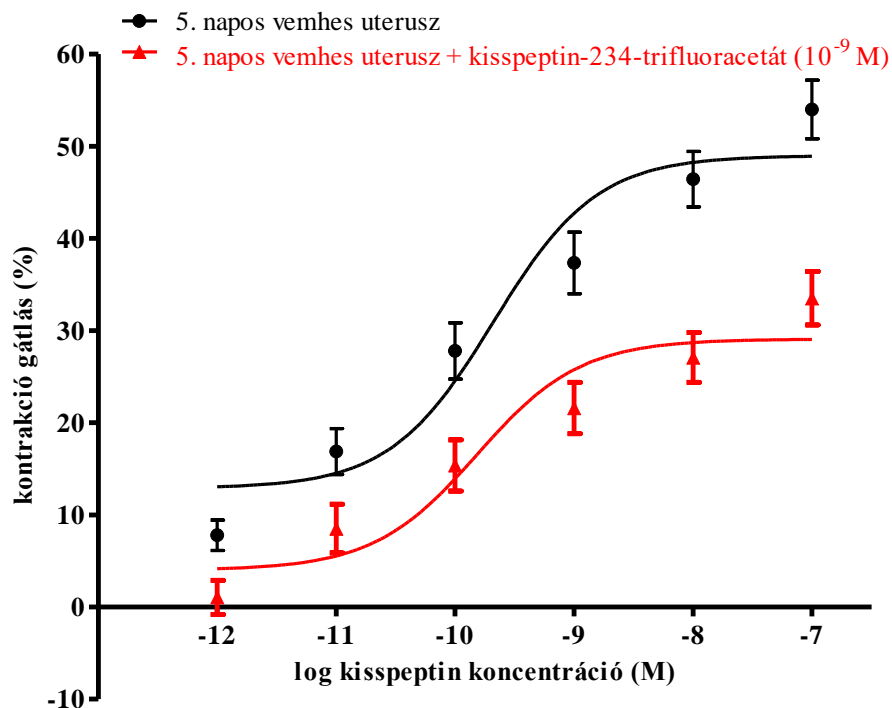
Az endometrium eltávolítása után a miometrium gyűrűkön kiváltott kontrakciók esetén a kisszeptin relaxáló hatásában megszűnt a fokozatosan csökkenő tendencia. A maximális relaxáló hatás vemhesség 18. és 22. napján csökkent, míg a 20. napon átmeneti növekedést tapasztaltunk. Az uterusz és az endometrium nélküli miometrium összehasonlításában a kisszeptin hatékonyabb volt a vemhesség végén a miometriumon, bár az E<sub>max</sub> értékek közötti különbség csak a vemhesség 20. napján volt szignifikáns. A kisszeptin 10<sup>-8</sup> M koncentrációja felett a gátló hatás nem növelhető tovább (**59. ábra**).



	EC <sub>50</sub> (M)	p vs. EC <sub>50</sub> uterusz (ld. 58. ábra)	E <sub>max</sub> (%)	p vs. E <sub>max</sub> uterusz (ld. 58. ábra)
nem vemhes	4,8 ± 3,2 × 10 <sup>-11</sup>	*	45,3 ± 1,8	*
5. nap	2,8 ± 1,0 × 10 <sup>-11</sup> ns	**	41,7 ± 1,7 ns	ns
15. nap	1,5 ± 1,1 × 10 <sup>-11</sup> ns	ns	47,3 ± 1,4 ns	ns
18. nap	7,1 ± 89,3 × 10 <sup>-12</sup> ns	ns	31,8 ± 1,8 ***	ns
20. nap	1,4 ± 0,6 × 10 <sup>-11</sup> ns	ns	46,6 ± 1,1 ***	***
22. nap	9,0 ± 21,9 × 10 <sup>-11</sup> ns	ns	30,7 ± 1,5 ***	ns

**59. ábra.** A kisspeptin hatása a nem vemhes és vemhes, endometrium eltávolított patkány miometrium kontrakciókra *in vitro* (n=8/vemhességi nap). A kontrakciókat 25 mM KCl-dal váltottuk ki. A kisspeptin kumulatív adagolása minden esetben simaizomrelaxációt okozott, azonban az uterusznál tapasztalt, vemhesség előrehaladtával csökkentő tendencia megszűnt. Az endometrium eltávolítása fokozta a kisspeptin gátló hatását a nem vemhes és a 20. napos vemhes minták esetén (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 az előző napi értékhez (fehér oszlopok), illetve az uteruszban mért megfelelő értékekhez (színes oszlopok) viszonyítva.

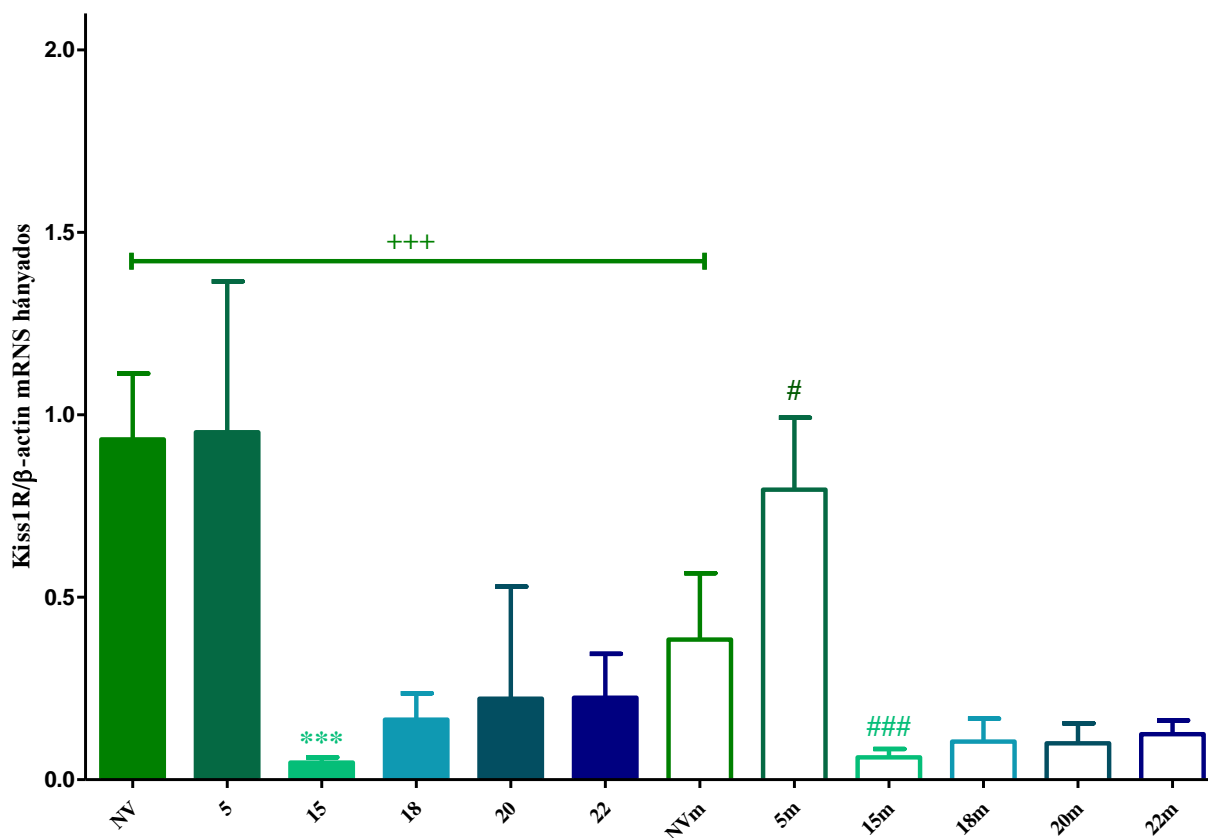
Ezután megvizsgáltuk, hogy a kisspeptin relaxáló hatása valóban köthető-e a kisspeptin receptorokhoz. Mivel az 5 napos vemhes uteruszon volt a legnagyobb a kisspeptin gátló hatása, ezért ezen a vemhességi napon mértük meg a kisspeptin hatását a Kiss1R antagonistá kisspeptin-234-trifluoracetát jelenlétében. Azt tapasztaltuk, hogy az antagonistá jelentősen csökkentette a kisspeptin uterusz relaxáló hatását, igazolva, hogy a kisspeptin gátló hatása valóban az uterusz Kiss1R receptorain keresztül valósul meg (**60. ábra**).



	EC <sub>50</sub> (M)	E <sub>max</sub> (%)
kisspeptin	2,1 ± 3,3 × 10 <sup>-10</sup>	49,0 ± 3,1
kisspeptin + kisspeptin-234-trifluoracetát (10 <sup>-9</sup> M)	1,5 ± 1,0 × 10 <sup>-10</sup> ns	29,1 ± 3,1***

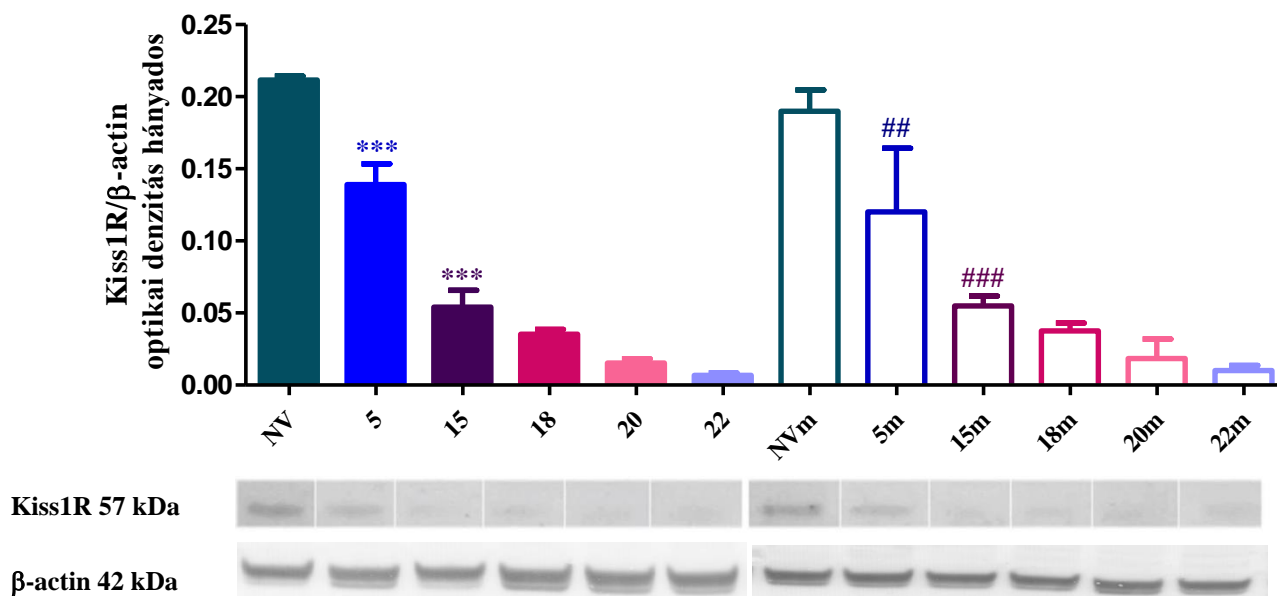
**60. ábra.** A kisspeptin-234-trifluoracetát (Kiss1R antagonist) hatása a kisspeptin uterusz kontrakciót gátló hatására 5. napos vemhes uteruszon *in vitro* (n=6). A kontrakciókat 25 mM KCl-dal váltottuk ki. A Kiss1R antagonist jelenléte csökkentette a kisspeptin E<sub>max</sub> értékét, az EC<sub>50</sub> értéket nem változtatta meg (ld. táblázatos rész). ns: nem szignifikáns, \*\*\*p<0,001 a kisspeptin megfelelő értékéhez viszonyítva.

Ezt követően megmértük a Kiss1R mRNA és fehérje expresszióját mind az uteruszban, mind pedig a miometriumban. A Kiss1R mRNA mind a nem vemhes, mind pedig a vemhes uteruszokban jelen volt, legmagasabb szintjét a nem vemhes és az 5. napos vemhes szövetekben találtuk. A vemhesség végére a Kiss1R mRNA szintje drámaian csökkent, a legalacsonyabb értéket a 15. napon érte el. Bár a 18. napon enyhe emelkedést találtunk, további változásokat nem észleltünk, a Kiss1R mRNA-szint az ellés napjáig (22. nap) alacsony maradt. Az endometrium eltávolítása a receptor mRNA mennyiségének arányos csökkenését okozta valamennyi vizsgált gesztációs napon, valamint a nem vemhes mintákban is, bár a különbség csak a nem vemhes esetben volt szignifikáns az uterusz és a miometrium között (**61. ábra**)



**61. ábra.** A Kiss1R mRNS-expressziójának változása patkány uterusban (tömör oszlopok) és a miometriumban (üres oszlopok) a vemhesség alatt és a nem vemhes mintákban (n=4-7). A RT-PCR vizsgálat során következő primereket használtuk: Rn00576940\_m1 (Kiss1R), Rn00667869\_m1 (β-actin). Minden mintát három párhuzamosban futtattunk. A próbák fluoreszcencia-intenzitását a PCR-ciklusszám függvényében ábrázoltuk. A fluoreszcenciajel első jelentős növekedését mutató amplifikációs ciklust tekintettük küszöbciklusnak. Az mRNS expresszió alacsonyabb volt a késői vemhes patkány uterusokban. A Kiss1R uterus expresszióját összehasonlítottuk a miometriális expresszióval az egyes gesztációs napokon, valamint a nem vemhes mintákban (+). Az 5. vemhességi napot is összehasonlítottuk a nem vemhes értékekkel, és a vemhesség minden egyes vizsgált napját az előző vemhességi naphoz hasonlítottuk (\* és #). NV: nem vemhes, m: miometrium \*\*\*p<0,001 az előző napi uterus értékhez viszonyítva; #p<0,05; ###p<0,001 az előző napi miometrium értékhez viszonyítva; +++p <0,001, a nem vemhes uteruszhoz viszonyítva

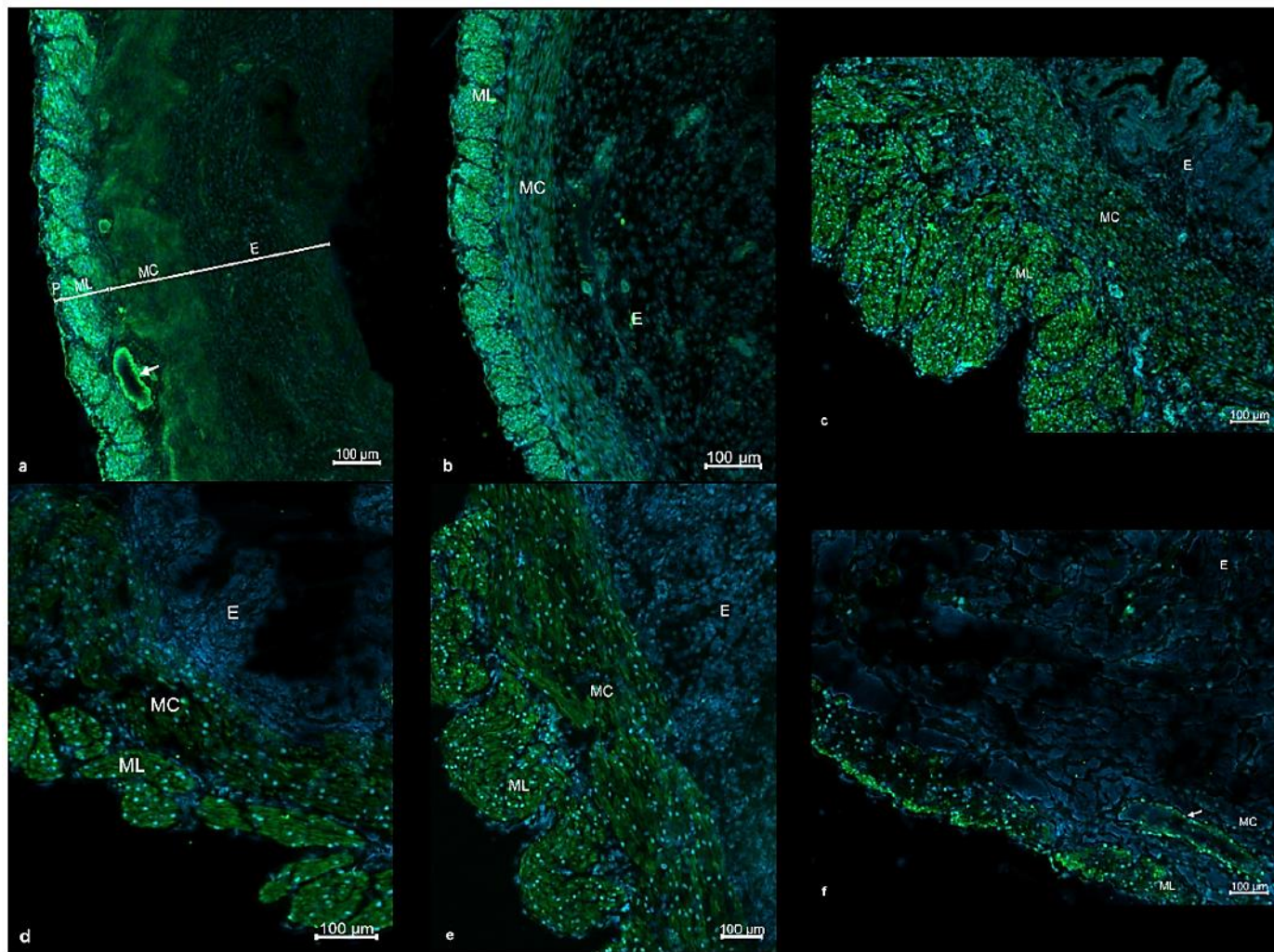
WB technikával a legmagasabb Kiss1R fehérjeszintet a nem vemhes szövetekben mértünk. A vemhesség 5. napján szintén magas denzitást figyeltünk meg mind az uterusban, mind pedig a miometriumban. A Kiss1R fehérje szintje a vemhességi időszak végére csökkent, bár a csökkenés nem volt szignifikáns a 15. vemhességi nap után. Az endometrium eltávolítása a Kiss1R denzitás arányos csökkenését okozta a miometriumokban, de ezek a változások sem voltak szignifikánsak (62. ábra).



**62. ábra.** A Kiss1r fehérje expressziója a patkány uterusban (tömör oszlopok) és miometriumban (üres oszlopok) a vemhesség különböző napjain és nem vemhes mintákban (n=4-7). A blotokat rázás közben inkubáltuk Kiss1R (1:200, Bioss Antibody, Cat# bs-2501R, RRID:AB\_10855480) és β-actin (1:200, Bioss Antibody, Cat# bs-0061R, RRID: AB\_2854584) poliklonális antitestekkel blokkoló pufferben. A Kiss1R expresszió a vemhesség során csökkenő tendenciát mutat. Az uterusban mért eredményeket összehasonlítottuk a miometriális expressziókkal is az egyes vemhességi napokon, valamint a nem vemhes mintákban, de szignifikáns különbséget nem találtunk. NV: nem vemhes, m: miometrium, \*\*\*p<0,001 az előző napi uteruszhoz értékhez viszonyítva; ##p<0,01; ###p<0,001 az előző napi miometrium értékhez viszonyítva.

Immunhisztokémiai módszerrel megmértük a Kiss1R eloszlását az uterusz szövetekben. A receptor erős immunreaktivitást mutatott mind a vemhes, mind pedig nem vemhes mintákban. A legintenzívebb Kiss1R immunfestődés a miometrium hosszanti, míg kevésbé intenzív a körkörös rétegében, a leggyengébb festődés pedig az endometrium rétegében volt látható. Emellett a Kiss1R az érrendszeri simaizomsejtekben is erősen expresszáldott. A legnagyobb expressziót a nem vemhes és az 5. napos vemhes uteruszokban találtuk. A vemhesség végére egyre csökkenő Kiss1R immunreaktivitást mértünk mind a miometriális, mind az endometriális rétegben, de a csökkenés különösen látványos volt az endometriális területen. A 18. naptól kezdve az immunfestődés elsősorban az uterusz simaizom rétegeiben lokalizálódott, míg az endometriális expresszió elhanyagolhatóvá vált. A 22. napos vemhes méh festődési intenzitása marginális volt a nem vemhes vagy az 5. napos vemhes mintákhoz képest (63. ábra).





**63. ábra** Reprezentatív fluoreszcens mikroszkóp felvételek a Kiss1R expressziójáról patkány uterusból vett kriosekciókban. A mintákat Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific Cat# A32731, RRID:AB\_2633280; 1:200) másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, a Kiss1R expresszió zöld színnel jelenik meg a nem vemhes (a), valamint az 5. (b), 15. (c), 18. (d), 20. (e) és 22. (f) vemhességi napokon. A sejtmagok jelölésére DAPI-t használtunk (kék színnel). P: perimetrium, ML: miometrium hosszanti réteg, MC: miometrium körkörös réteg, E: endometrium, nyíl: nagy ér a vaszkuláris rétegben.

### 5.4.3. Leptin és adiponectin hatása a méhkontrakciókra

Az adipokineket a zsírszövet termeli és számos szervben, szervrendszerben igazolódott már szabályozó szerepük. Két ilyen adipokin uterusz kontraktilitásban betöltött szerepét vizsgáltuk patkány vemhességi modellen.

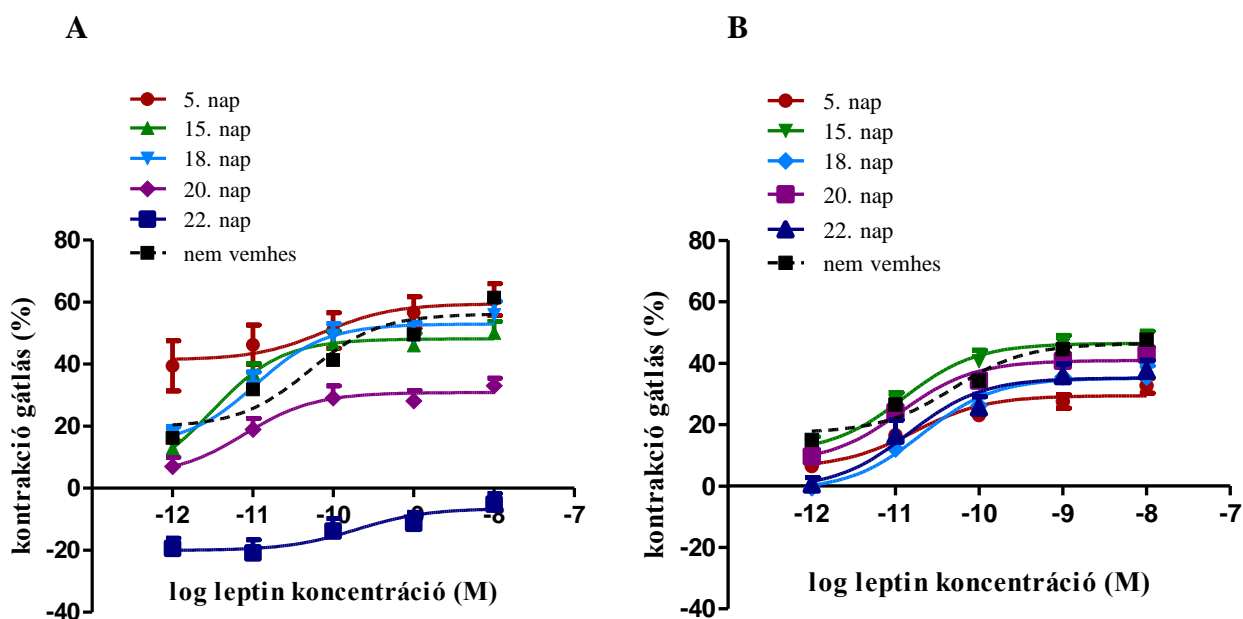
Az egyik a leptin, melyet a fehér zsírszövet termel, de számos más szövetben, szervben is megtalálható, pl. a gyomor-bélrendszerben vagy a placentában [130,131]. A leptinnek alapvető szerepe van az étvágy, az anyagcsere és a neuroendokrin funkciók szabályozásában, plazma koncentrációja tükrözi a testzsír százalékos arányát [132]. A leptin receptor (LEPR)

stimulációja elsősorban a JAK2/STAT kaszkádot aktiválja, de más jelátviteli útvonalak is működhetnek [133]. Mivel a LEPR nem expresszálódik a GnRH-neuronokban, így a leptin csak közvetve, a kisspeptin neuronokra hatva serkenti a GnRH-szekréciót [134]. Az anyai leptin koncentrációt növeli a testzsír és a gesztációs idő, mivel terhességben a leptin fő forrása a zsírszövet és a placenta [135]. Vizsgálataink előtt csupán néhány adat állt rendelkezésre a leptin patkányok és humán uterusz kontrakciókra gyakorolt hatásáról [136]. A másik adipokin az adiponectin, melynek plazma koncentrációja a leptinnel ellentétben fordítottan arányos a testtömeg indexszel [137]. Hatását receptorain keresztül (AdipoR1 és AdipoR2) fejt ki kötődve a T-kadherinhez, melyen keresztül szabályozza a méhre gyakorolt hatását, részben a vaszkularizáció befolyásolásával [138]. Az adiponectin rendszert azonosították a rágcsáló uteruszban [139], de a kontrakciókban betöltött szerepe nem volt ismert. Csupán annyi adat állt rendelkezésre, hogy az adiponectin csökkenti a méh kontraktilitását vemhes egér uteruszon [140].

Mivel a leptin és adiponectin uterusz kontraktilitásban kifejtett közvetlen szerepéről nem álltak rendelkezésre adatok, ezért megvizsgáltuk mindkét adipokin hatását nem vemhes és vemhes patkány uteruszon, illetve meghatároztuk a LEPR, AdipoR1 és AdipoR2 expresszióját és lokalizációját a méhszövetben [141].

#### **5.4.3.1. Leptin hatások**

A kontraktilitási vizsgálatokat a kisspeptin mérésekhez hasonlóan nem vemhes és 5., 15., 18., 20. és 22. napos vemhes patkányokból nyert uterusz szöveteken végeztük, illetve megmértük az endometrium nélküli szövetek válaszát is. A leptin koncentrációfüggő módon csökkentette a KCl-dal kiváltott nem vemhes méhösszehúzóásokat. Ez a relaxáló hatás jelentősen csökkent az endometrium eltávolítása után. Vemhes uteruszban a leptin szintén gátolta a kontrakciókat. A leptin a vemhesség korai szakaszában erős relaxáló hatást fejtett ki, mely a gesztációs idő végére jelentősen csökkent, a vemhesség utolsó (22.) napján pedig teljesen megszűnt. A leptin endometrium nélküli miometriális kontrakciókra gyakorolt gátló hatása nőtt vemhesség 15. napján, de onnantól nem változott számottevően a vemhesség végéig. Az  $E_{max}$  értékek az endometrium nélküli szöveteken az 5. és 18. napon csökkentek, míg a 20-22. napokon növekedtek az uteruszhoz képest (**64. ábra**).

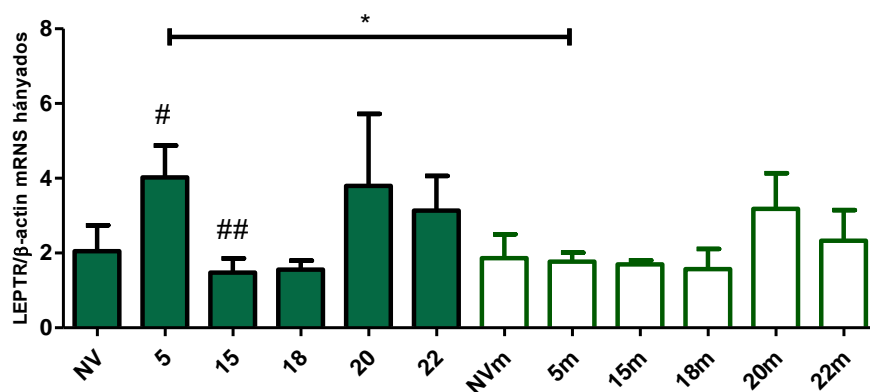


	EC <sub>50</sub> (M) uterusz	E <sub>max</sub> (%) uterusz	EC <sub>50</sub> (M) miometrium	E <sub>max</sub> (%) miometrium	p EC <sub>50</sub> u vs. m	p E <sub>max</sub> u vs. m
nem vemhes	4,9 ± 1,7x10 <sup>-10</sup>	61,2 ± 2,9	1,1 ± 0,2x10 <sup>-10</sup>	51,4 ± 1,9	#	#
5. nap	7,7 ± 0,5x10 <sup>-10</sup>	63,0 ± 5,1	3,3 ± 0,7x10 <sup>-11</sup>	30,9 ± 2,0	ns	###
15. nap	2,9 ± 0,2x10 <sup>-11</sup>	57,1 ± 3,3	2,5 ± 0,6x10 <sup>-11</sup>	46,0 ± 2,9***	ns	ns
18. nap	6,0 ± 0,2x10 <sup>-11</sup>	56,9 ± 4,5	2,4 ± 0,5x10 <sup>-11</sup>	39,7 ± 2,6	ns	###
20. nap	3,0 ± 0,2x10 <sup>-10</sup>	32,2 ± 2,2***	2,1 ± 0,4x10 <sup>-11</sup>	40,3 ± 2,3	ns	#
22. nap	1,1 ± 0,6x10 <sup>-9</sup>	-4,5 ± 3,4***	1,0 ± 0,5x10 <sup>-10</sup>	37,7 ± 3,5	ns	###

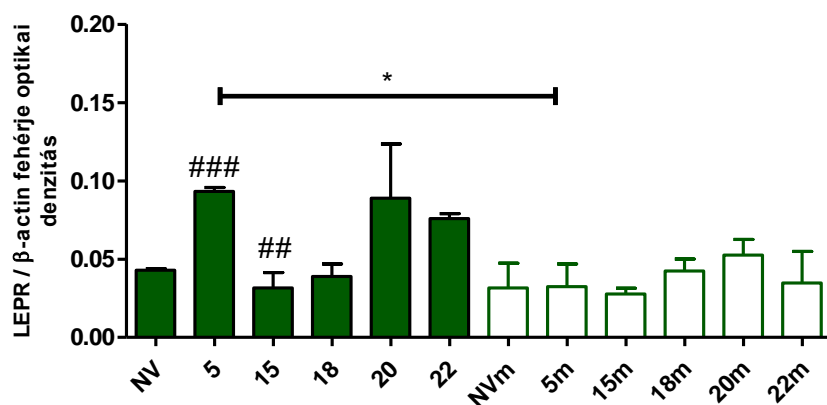
**64. ábra.** A leptin hatása a nem vemhes és vemhes patkány uterusz (A) és endometrium eltávolított miometrium (B) kontrakciókra *in vitro* (n=6/vemhességi nap). A kontrakciókat 25 mM KCl-dal váltottuk ki. A leptin kumulatív adagolása csökkentette a nem vemhes méh összehúzódásait, míg az endometrium eltávolítása gyengítette hatását. A leptin a vemhes uterusz kontrakcióit is csökkentette a vemhesség korai szakaszában, azonban a vemhesség végére hatása megszűnt. Ezzel szemben a miometriumon a teljes vemhességi időszak alatt képes volt fenntartani relaxáló hatását. Az endometrium hiánya gyengítette (5. és 18. nap), vagy éppen fokozta (20. és 22. nap) a hatékonyságát (ld. táblázatos rész),. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 az előző naphoz viszonyítva; ns: nem szignifikáns, #p<0,05; ###p<0,001 az uterusz (u) és a miometrium (m) azonos napi értékeit összehasonlítva

A LEPR-t mind a nem vemhes, mind a vemhes patkányok uteruszban kimutattuk, a legnagyobb expressziót a vemhesség 5. napján tapasztaltuk. A 15. és 18. napon az expresszió csökkent, de a vemhesség késői szakaszában (20. és 22. nap) ismét magasabb értékeket mértünk, bár a növekedés nem volt szignifikáns. Az endometrium eltávolítása jelentősen csökkentette a receptor mRNS és fehérje mennyiségét az 5. napon. A miometrium azonban nem tartalmazott szignifikánsan kevesebb LEPR-t sem a többi vemhességi napon, sem pedig a nem vemhes mintákban (**65. ábra**)

A



B



LEPR 156 kDa

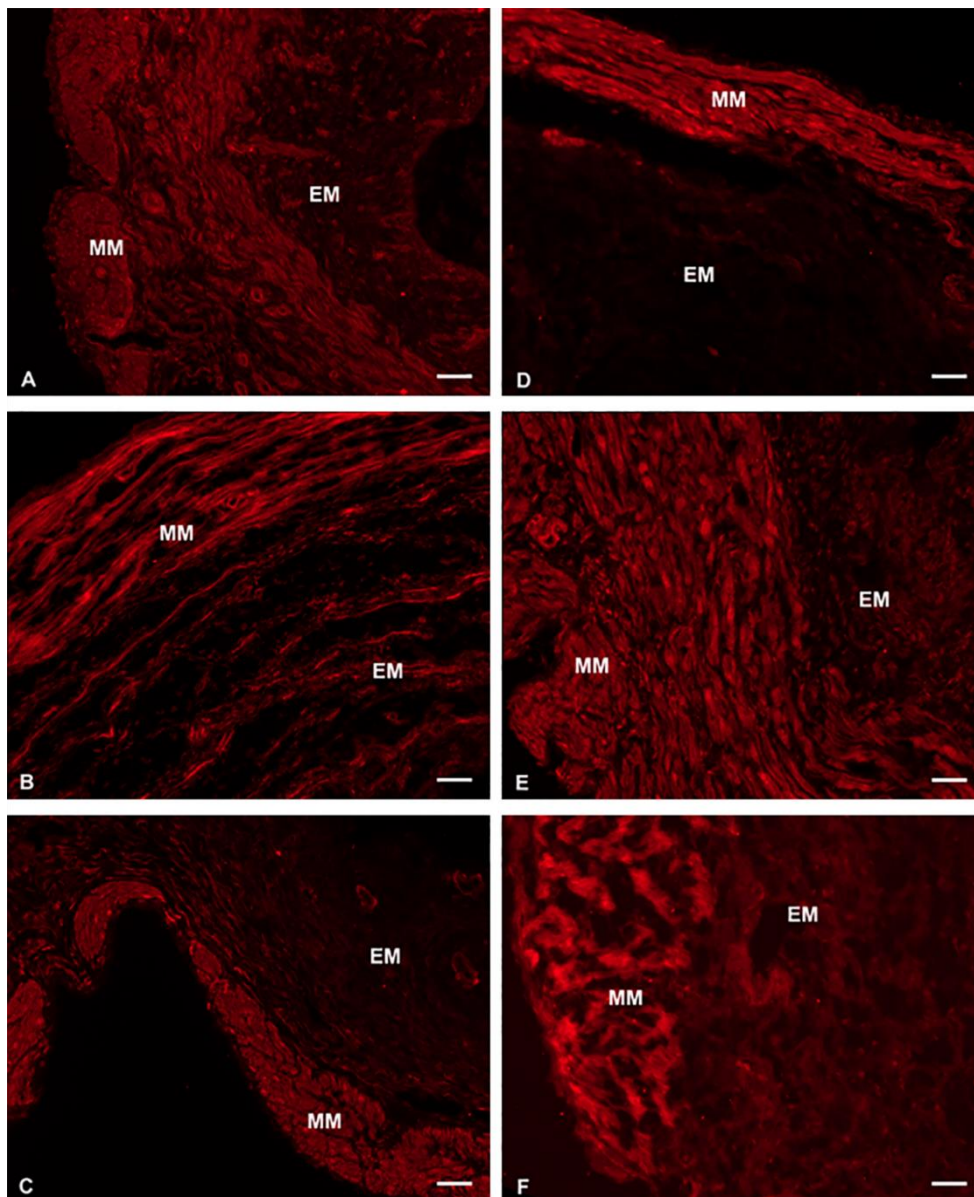


β-actin 42 kDa



65. ábra. A LEPTR mRNS (A) és fehérje (B) expressziójának változása patkány uterusban (tömör oszlopok) és a miometriumban (üres oszlopok) a vemhesség alatt és a nem vemhes mintákban. A RT-PCR vizsgálat során (A) következő primereket használtuk: Rn01433205\_m1 (LEPR), Rn00667869\_m1 (β-actin). Minden mintát három párhuzamosban futtattunk. A próbák fluoreszcencia-intenzitását a PCR-ciklusszám függvényében ábrázoltuk. A fluoreszcenciajel első jelentős növekedését mutató amplifikációs ciklust tekintettük küszöbciklusnak. Az mRNS expresszió megnőtt az 5. napon, visszaesést mutatott a 15. napon, mely után nem volt szignifikáns változás az uterusban (A, tömör oszlopok). Az endometrium eltávolítása megszüntette a szignifikáns változást a LEPR mRNS expresszióban (A, üres oszlopok). Az endometrium eltávolítása az 5. napon a jelentősen csökkentette a LEPR mRNS expressziót. A WB mérések során (B) a blotokat rázás közben inkubáltuk LEPR (1:300, Bioss Antibodies, Cat# bs-0109R, RRID:AB\_10852741) és β-actin (1:300, Bioss Antibody, Cat# bs-0061R, RRID:AB\_10855480) poliklonális antitestekkel blokkoló pufferben. A LEPR expresszió a β-actin összehasonlításában a vemhesség során az mRNS változással megegyező változást mutatott mind az uterusban (B, tömör oszlopok), mind pedig az endometrium eltávolítása után (B, üres oszlopok). NV: nem vemhes, m: miometrium, # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  az előző napi értékhez viszonyítva; \* $p < 0,05$ ; az azonos napi uterus értékhez viszonyítva

Immunhisztokémiai módszerrel megmértük a LEPR eloszlását is az uterusz szövetekben. A LEPR festődés intenzitása mind a nem vemhes, mind pedig a vemhes mintákban erős volt. A nem vemhes méhben a LEPR főként a miometrium cirkuláris és longitudinális rétegeiben festődött. A vemhes mintákban a LEPR jelenléte többnyire a miometriumra korlátozódott, kivéve az 5. napon, amikor az endometrium rétegében nagyobb intenzitást észleltünk. (66. ábra).

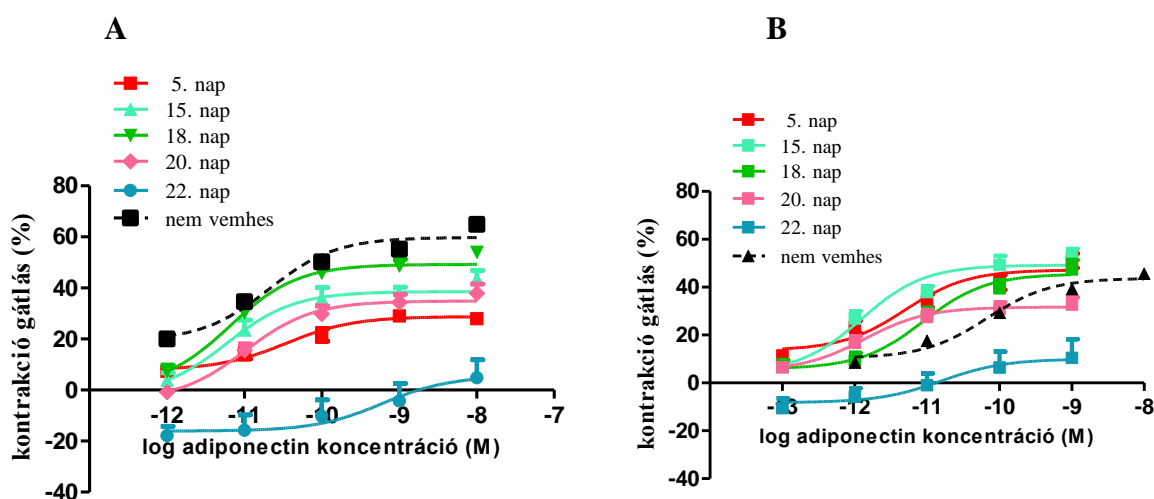


**66. ábra** Reprezentatív fluoreszcens mikroszkóp felvételek a LEPR expressziójáról patkány uterusból vett krioszekciókban. A mintákat Alexa Fluor 647 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Cat# 103-605-155, RRID:AB\_2337392; 1:200) másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, a LEPR expresszió vörös színnel jelenik meg a nem vemhes (A), valamint az 5. (B), 15. (C), 18. (D), 20. (E) és 22. (F) vemhességi napokon. MM: miometrium, EM: endometrium, lépték jel: 50  $\mu$ m

### 5.4.3.2. Adiponectin hatások

A kontraktilitási vizsgálatokat a leptin és kisspeptin mérésekhez hasonlóan nem vemhes és 5., 15., 18., 20. és 22. napos vemhes patkányokból nyert uterusz szöveteken végeztük, illetve megmértük az endometrium nélküli szövetek válaszát is. A nem vemhes patkány uteruszon az adiponectin dózisfüggő relaxációt okozott. Az endometrium eltávolítása után a relaxáló hatás jelentősen csökkent. Az adiponectin csökkentette a vemhes uterusz kontrakciókat is, relaxáló hatása az 5. vemhességi naptól a 18. napig erősödött. Azonban 20. napon a gátló hatása csökkent, a vemhesség utolsó napjára pedig gyakorlatilag megszűnt.

Az endometrium nélküli miometriumon a vemhesség korai és középső szakaszában (5., 15. és 18. nap) erős relaxáló hatást tapasztaltunk, ami a 20. napra jelentős csökkent. A vemhesség 22. napján az adiponectin miometrium kontrakciót gátló hatása minimálisra csökkent. A miometriumon kifejtett gátló hatása nagyobb volt az 5. és 15. napon, mint az uteruszon mért hatások (67. ábra).

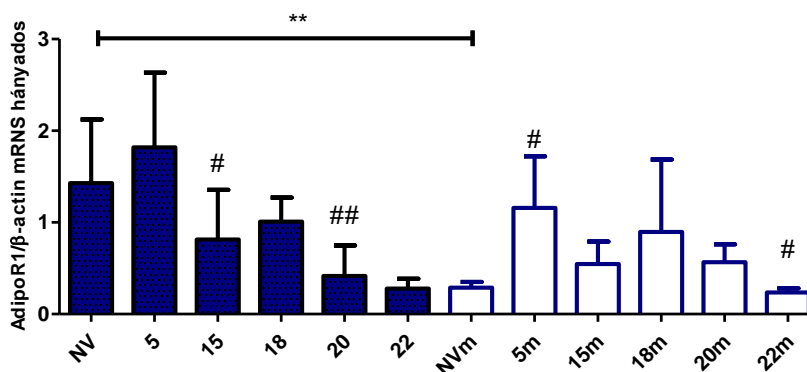


	EC <sub>50</sub> (M) uterusz	E <sub>max</sub> (%) uterusz	EC <sub>50</sub> (M) miometrium	E <sub>max</sub> (%) miometrium	p EC <sub>50</sub> u vs. m	p E <sub>max</sub> u vs. m
nem vemhes	4,0 ± 0,9 × 10 <sup>-11</sup>	62,7 ± 2,6	2,3 ± 1,0 × 10 <sup>-10</sup>	46,4 ± 2,8	ns	###
5. nap	5,2 ± 0,2 × 10 <sup>-11</sup>	30,2 ± 2,5	4,7 ± 0,8 × 10 <sup>-12</sup>	48,8 ± 2,8	##	###
15. nap	2,1 ± 0,1 × 10 <sup>-10</sup>	37,6 ± 3,0	2,3 ± 0,6 × 10 <sup>-12</sup>	49,7 ± 2,9	#	##
18. nap	2,3 ± 0,8 × 10 <sup>-11</sup>	50,8 ± 2,7***	1,6 ± 0,6 × 10 <sup>-11</sup>	45,9 ± 3,7	ns	ns
20. nap	1,1 ± 0,1 × 10 <sup>-11</sup>	36,2 ± 2,8**	2,6 ± 0,6 × 10 <sup>-12</sup>	32,9 ± 2,5**	###	ns
22. nap	8,4 ± 0,7 × 10 <sup>-10</sup>	6,5 ± 6,8***	2,8 ± 0,7 × 10 <sup>-11</sup>	17,0 ± 6,4**	ns	#

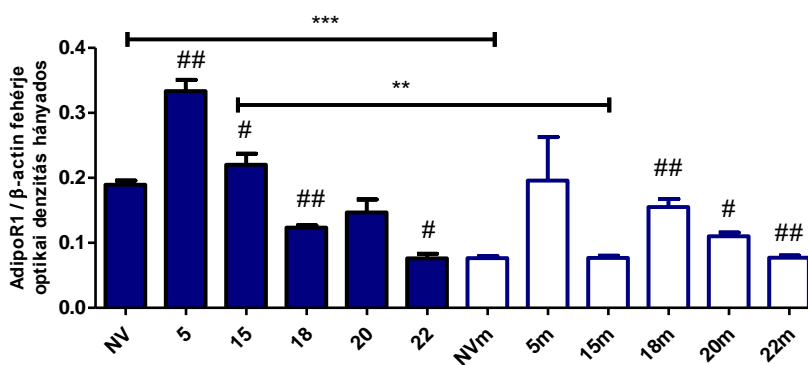
67. ábra. Az adiponectin hatása a nem vemhes és vemhes patkány uterusz (A) és endometrium eltávolított miometrium (B) kontrakciókra *in vitro* (n=6/vemhességi nap). A kontrakciókat 25 mM KCl-dal váltottuk ki. Az adiponectin kumulatív adagolása csökkentette a nem vemhes méh összehúzódásait, az endometrium eltávolítása a nem vemhes és korai vemhes esetben mérsékelten növelte a hatását. Ugyanakkor a vemhesség végére az adiponectin hatása lényegében megszűnt (ld. táblázatos rész)., \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 az előző naphoz viszonyítva; ns: nem szignifikáns, #p<0,05; ##p<0,01; ###p<0,001 az uterusz (u) és a miometrium (m) azonos napi értékeit összehasonlítva

Az adiponectin mindkét receptorát kimutattuk az uterusban és a miometriumban is. Az AdipoR1 expressziója a nem vemhes és az 5. napos vemhes uterusban volt a legmagasabb, mindkét esetben az endometrium eltávolítása csökkentette az mRNS és a fehérje expressziót, bár a fehérje expresszió csökkenése nem volt szignifikáns. A 15. vemhességi naptól kezdve a receptorok expressziója mérséklődött, az endometrium eltávolítása a 18. naptól kezdve nem módosította szignifikánsan az AdipoR1 mRNS- és fehérjeszintet (**68. ábra**)

A

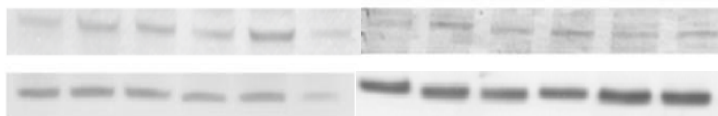


B



AdipoR1 ~52 kDa

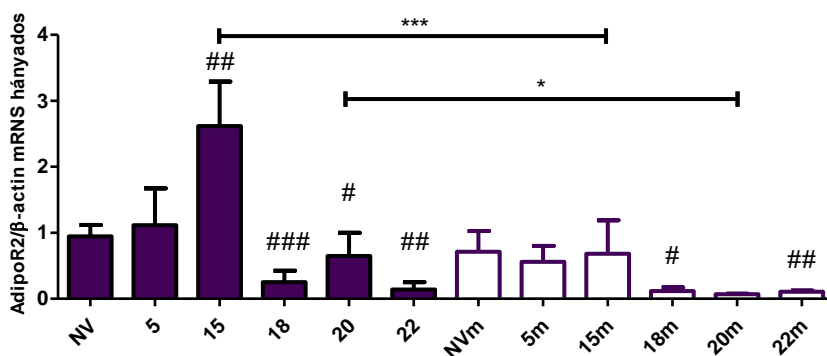
β-actin 42 kDa



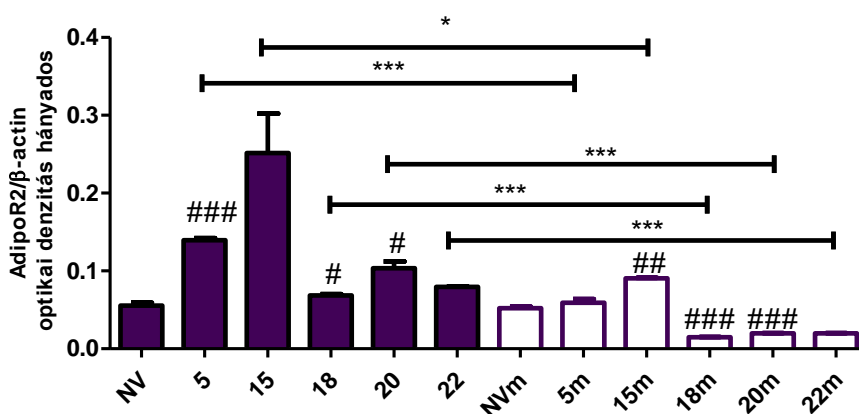
**68. ábra.** Az AdipoR1 mRNS (A) és fehérje (B) expressziójának változása patkány uterusban (tömör oszlopok) és a miometriumban (üres oszlopok) a vemhesség alatt és a nem vemhes mintákban. A RT-PCR vizsgálat során (A) következő primereket használtuk: ID Rn01483784\_m1 (AdipoR1), Rn00667869\_m1 (β-actin). Az mRNS expresszió megnőtt az 5. napon, majd a 15. naptól csökkent (A, tömör oszlopok). Az endometrium eltávolítása csökkentette az mRNS expressziót, de a változás tendenciái megmaradtak (A, üres oszlopok). A WB mérések során (B) a blotokat rázás közben inkubáltuk AdipoR1 (1:300, Bioss Antibodies, Cat# bs-0610R, RRID:AB\_10857625) és β-actin (1:300, Bioss Antibody, Cat# bs-0061R, RRID:AB\_10855480) poliklonális antitestekkel blokkoló pufferben. Az AdipoR1 expresszió a β-actin összehasonlításában a vemhesség során az mRNS változással hasonló módosulásokat mutatott mind az uterusban (B, tömör oszlopok), mind pedig az endometrium eltávolítása után (B, üres oszlopok). NV: nem vemhes, m: miometrium, # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$  az előző napi értékhez viszonyítva; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  az azonos napi uterus értékhez viszonyítva

Az AdipoR2 szintén kimutatható volt mind a nem vemhes, mind pedig a vemhes uterusban. A receptor mRNS és fehérje expressziója a 15. napon érte el a maximumát, ezt követően a vemhesség végéig jelentős csökkenést észleltünk. Az endometrium eltávolítása jelentősen csökkentette a receptor mRNS- és fehérjeexpressziót a 15. és 20. vemhességi napon. Az AdipoR2 expressziója a késői vemhes uterusban (18-22. nap) nagyon alacsony volt, amit az endometrium eltávolítás nem csökkentett (69. ábra).

A

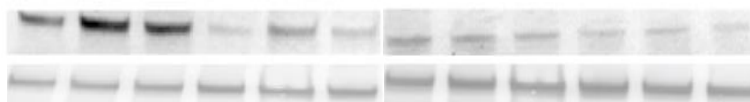


B



AdipoR2 ~52 kDa

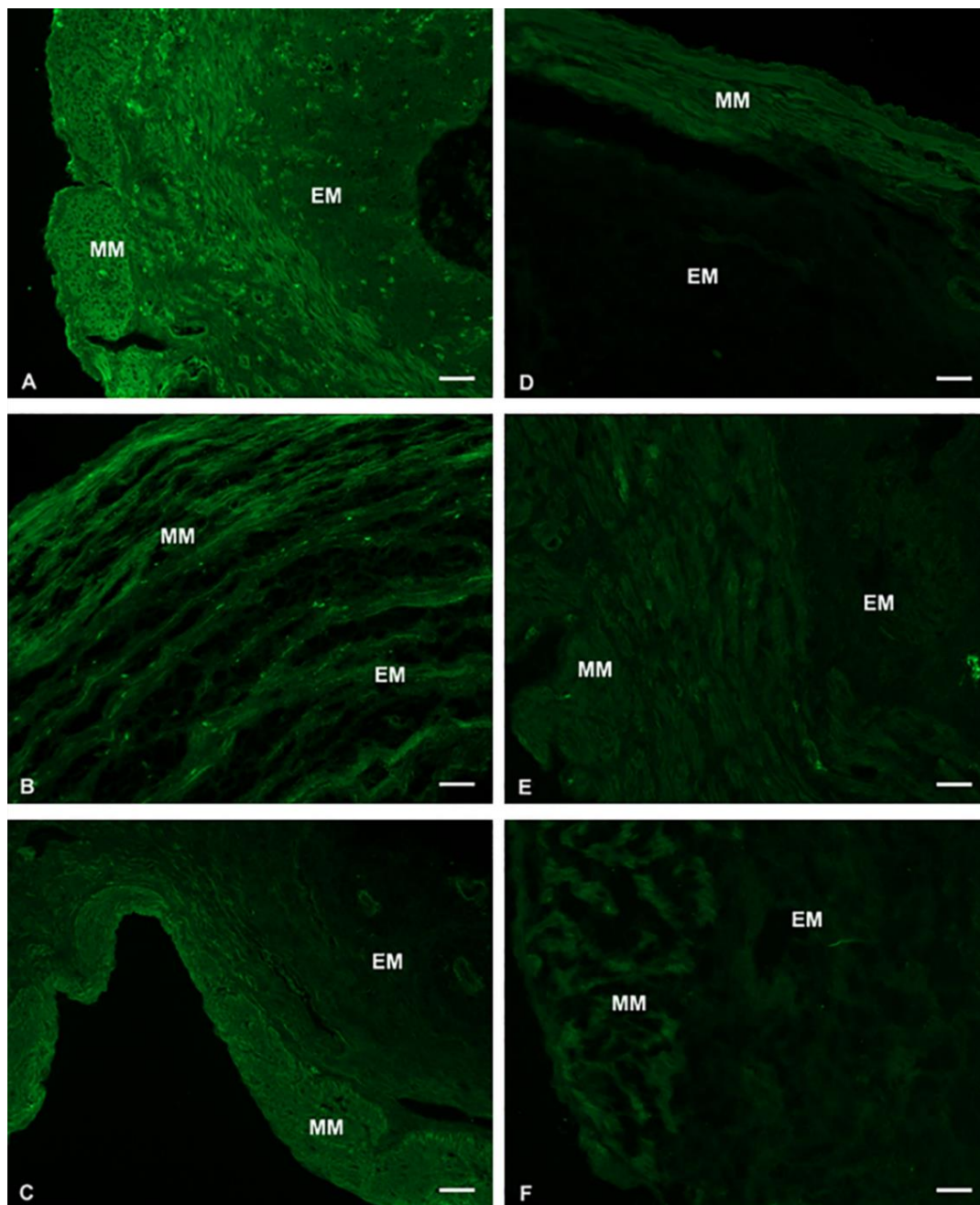
β-actin 42 kDa



69. ábra. Az AdipoR2 mRNS (A) és fehérje (B) expressziójának változása patkány uterusban (tömör oszlopok) és a miometriumban (üres oszlopok) a vemhesség alatt és nem vemhes mintákban. A RT-PCR vizsgálat során (A) következő primereket használtuk: ID Rn01463173\_m1 (AdipoR1), Rn00667869\_m1 (β-actin). Az mRNS expresszió megnőtt a 15. napon, majd utána jelentősen csökkent (A, tömör oszlopok). Az endometrium eltávolítása nagymértékben csökkentette az mRNS expressziót a 15. és 20. napon (A, üres oszlopok). A WB mérések során (B) a blotokat rázás közben inkubáltuk AdipoR2 (1:300, Bioss Antibodies, Cat# bs-0611R, RRID:AB\_10857621) és β-actin (1:300, Bioss Antibody, Cat# bs-0061R, RRID:AB\_10855480) poliklonális antitestekkel blokkoló pufferben. Az AdipoR2 expresszió a β-actin összehasonlításában a vemhesség során az mRNS változással hasonló mintázatot mutatott mind az uterusban (B, tömör oszlopok), mind pedig az endometrium eltávolítása után (B, üres oszlopok). NV: nem vemhes, m: miometrium, # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$  az előző napi értékhez viszonyítva; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  az azonos napi uterusz értékhez viszonyítva

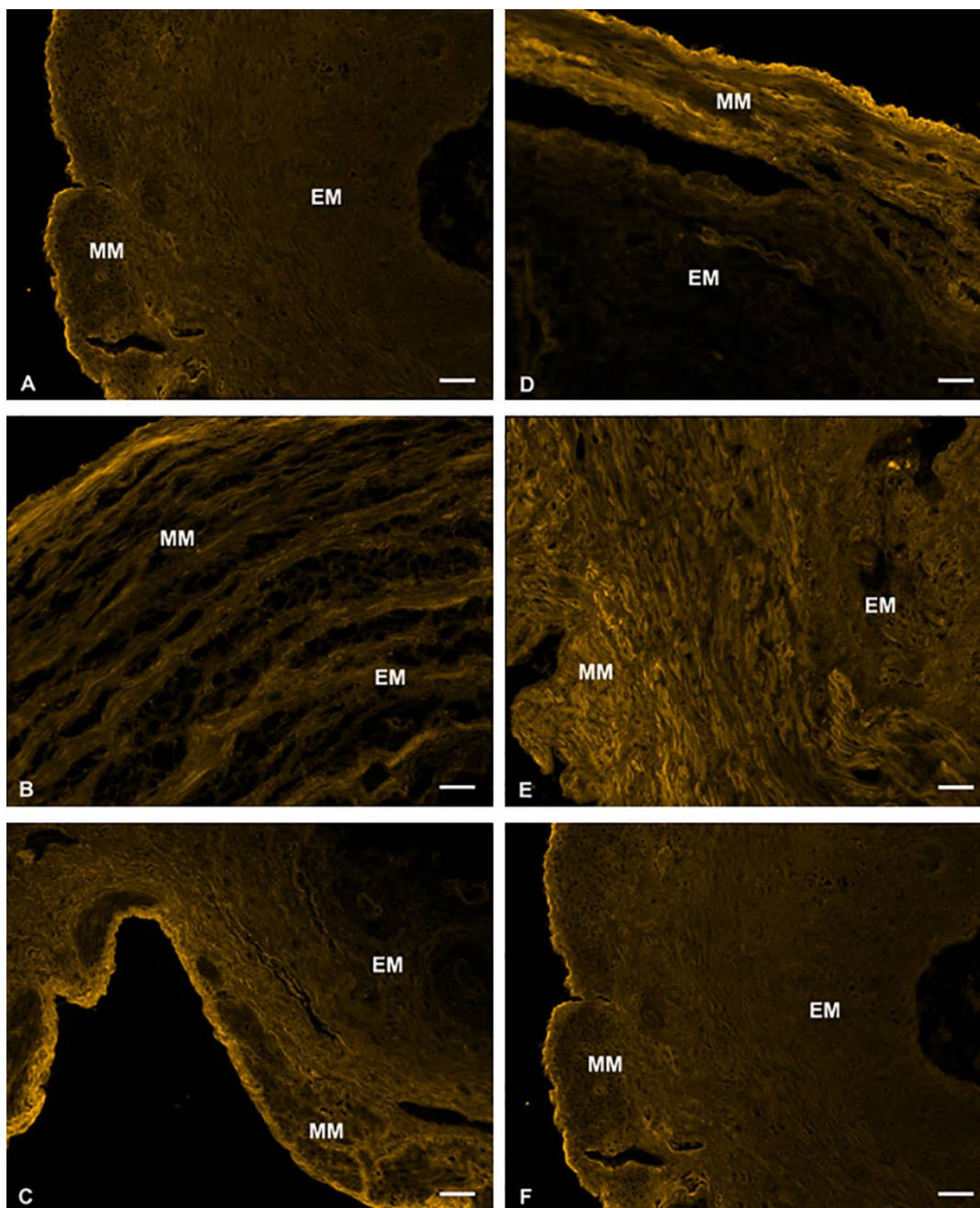


Az RT-PCR és a WB eredményekkel összhangban a nem vemhes és a korai vemhes uterusz minták simaizomzata és endometrium rétegei erős immunfestődést mutattak az AdipoR1-re. A vemhesség vége felé alacsonyabb immunreaktivitást tapasztaltunk, a receptor főként az izomrétegben expresszáldott (**70. ábra**).



**70. ábra** Reprezentatív fluoreszcens mikroszkóp felvételek az AdipoR1 expressziójáról patkány uterusból vett krioszekciókban. A mintákat Alexa Fluor 488 (Life Technologies Corporation, Molecular Probes; 1:200) másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, az AdipoR1 expresszió zöld színel jelenik meg a nem vemhes (A), valamint az 5. (B), 15. (C), 18. (D), 20. (E) és 22. (F) vemhességi napokon. MM: miometrium, EM: endometrium, lépték jel: 50  $\mu$ m

Az AdipoR2 festődés legalacsonyabb intenzitása a nem vemhes, az 5. és a 18. napos vemhes mintákban volt megfigyelhető. A méh simaizomsejtjei a 15. vemhességi napon mutatták a legmagasabb immunreaktivitást. Az AdipoR2 endometriális jelenléte is erősebb volt a terhesség középső és késői szakaszában (15. és 20. nap) (71. ábra).



**71. ábra** Reprezentatív fluoreszcens mikroszkóp felvételek az AdipoR2 expressziójáról patkány uterusból vett krioszekciókban. A mintákat CyTM3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 1:200) másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk, az AdipoR2 expresszió sárga színnel jelenik meg a nem vemhes (A), valamint az 5. (B), 15. (C), 18. (D), 20. (E) és 22. (F) vemhességi napokon. MM: miometrium, EM: endometrium, lépték jel: 50  $\mu$ m

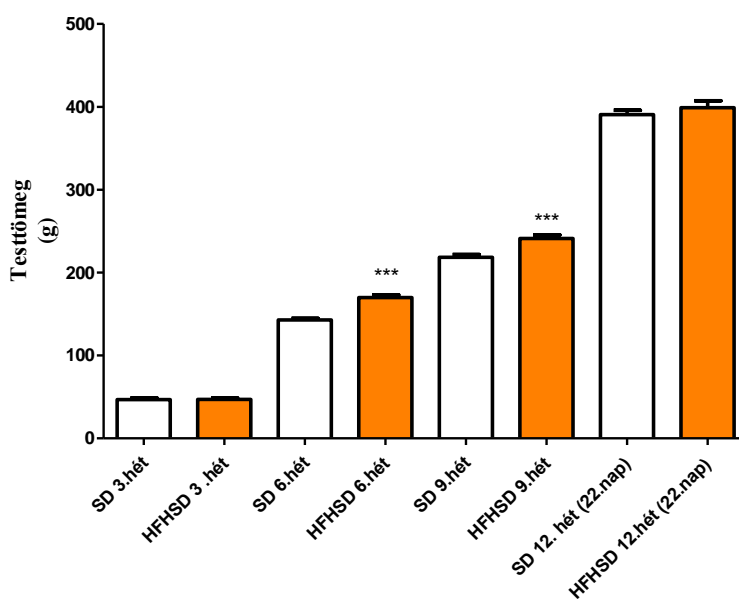
#### **5.4.4. Obezitás és gyulladás hatása a méhkontrakciókra (adipokinek és citokinek)**

A terhességi elhízás jelentős terhet ró az egészségügyi rendszerre, és negatív epigenetikai hatással lehet az utódokra is [142], növeli a császármetszés, a szülés utáni vérzés, a gesztációs diabetes, a késői cervix felpuhulás előfordulását, valamint az utódoknál veleszületett rendellenességekhez és betegségekhez vezethet [143]. Az elhízás egyes adatok szerint csökkentheti terhes uterusz kontraktilitását [144], de akár növelheti is a koraszülés kockázatát [145]. Elhízás esetén a zsírszövet endokrin szervvé válik, amely adipokineket (pl. leptin, adiponectin, kisspeptin) termel [146]. Ezek az adipokinek közvetlenül befolyásolhatják a terhesség alatti elhízás során a méhkontrakciókat, ugyanakkor adatok ezzel kapcsolatosan nem álltak rendelkezésre, ugyanis elhízásos modellből származó uterusz kontraktilitási vizsgálatokat adipokinekkal nem végeztek, még rágcsló modellen sem. Emellett az is ismert, hogy a terhességi elhízás módosítja az anyai nemi hormonok és citokinek szintjét, amelyek szintén jelentős hatással lehetnek a méhkontraktilitásra [147,148] és hozzájárulhatnak a cervikális elégtelenséghez [149]. Az elhízás okozta zsírszövet-felhalmozódást tartják kis intenzitású („low grade”) gyulladás egyik fő okának, amely felelős számos patofiziológiai folyamatért [150]. Emellett az intrauterin fertőzés is gyulladással jár és fokozza a koraszülés kockázatát [151]. Korábbi klinikai vizsgálatok alapján a koraszüléssel végződő terhességek mintegy ötödében kimutatható volt a bakteriális fertőzés a magzatvízben annak ellenére, hogy nem volt klinikai jele az intrauterin infekciónak [152]. A gyulladásos folyamatok során megemelkedik a proinflammatorikus citokinek (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8) és PG-ok szintje is az uteruszban, mely fokozza a kontrakciókat [153].

A fentiek alapján az elhízás és a gyulladás tekintetében több célt is kitűztünk. Egyrészt patkány modellen tanulmányoztuk az elhízás hatását a vemhes uterusz kontrakciókra. Az elhízást magas zsír- és szacharóztartalmú étrend fogyasztásával idéztük elő, mértük a női nemi hormonok, citokinek és adipokinek (kisspeptin, leptin, adiponectin) változását. A méhösszehúzóerőket és a cervix rezisztencia változását, valamint a kisspeptin, leptin és adiponectin hatásait is vizsgáltuk, a receptorok expresszió változásával együtt [154]. Másrészt gyulladásos vizsgálatokban vemhes patkányban bakteriális LPS intrauterin adásával váltottunk ki koraszüléshez hasonló állapotot. A szisztémás gyulladást a szérum TNF $\alpha$  szintjének mérésével követtük, a TNF $\alpha$  okozta kontrakció változásokat pedig a  $\beta$ -AR agonista terbutalin hatásának változásán keresztül mértük a TNF $\alpha$  antagonistá thalidomide jelenlétében [155].

#### 5.4.4.1. Obezitás hatása a méhkontrakciókra

Az elhízást HFHSD segítségével indukáltuk, az állatok 4 hetes koruktól 12 hetes korukig tartottuk ezen a diétán, vemhesítésüket 10 hetes korukban végeztük SD étrenden tartott (részleteket ld. 4.13.4.1. fejezet) hím állatokkal. A kontroll nőstény csoport is SD étrendet kapott. A HFHSD 3 hét után (6 hetes korban) jelentősen megnövelte a nőstény patkányok testtömegét az SD csoporthoz képest. A HFHSD csoportban a magasabb testtömeg 6 hetes diéta után (9 hetes korban) is megmaradt. A vemhesség végére (vemhesség 22. napja, 12 hetes kor) a testsúlykülönbség eltűnt az SD és a HFHSD csoportok között (72. ábra).



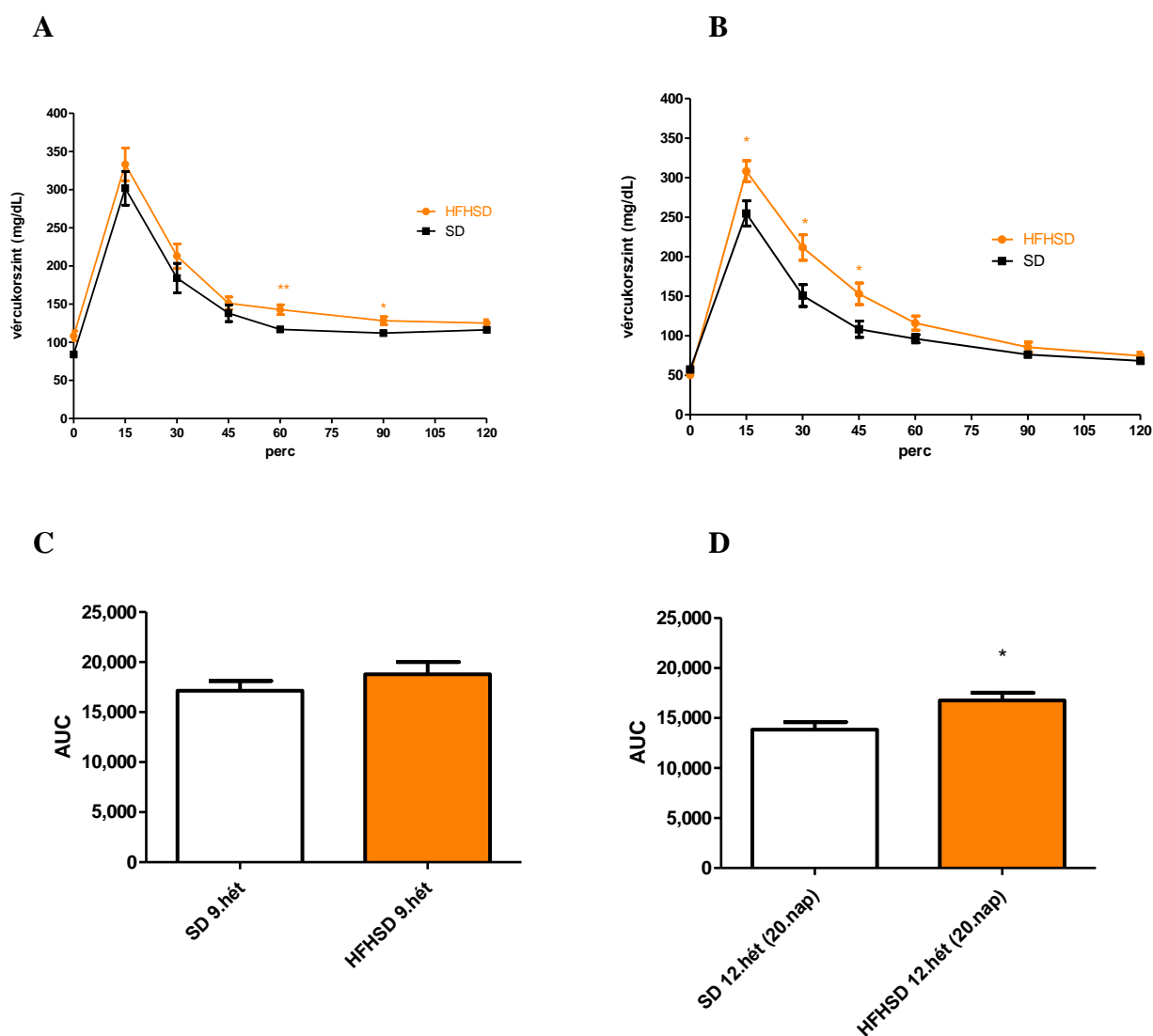
72. ábra Az SD és HFHSD táplált patkányok 3 heti testtömeg átlagai, beleértve a vemhesség utolsó napját (22. nap) (n=12/csoport). A HFHSD diétát 4 hetes korban kezdődött. A patkányok 10 hetes korukban vemhesültek. A 12. héten ért véget a vemhességük (vemhesség 22. napja) \*\*\*:  $p < 0.001$  az SD csoport azonos időpontban mért értékéhez viszonyítva

A vemhesség végén tapasztalt testtömeg kiegyenlítődés annak köszönhető, hogy a HFHSD csoportban a magzatok és placenta tömege kisebb volt, mint az SD csoportban, így az állatok össztömege az összehasonlításban az SD csoport javára gyarapodott (1. táblázat).

Szerv	SD	HFHSD	p
uterusz (g±SEM)	4,22±0,13	3,65±0,15	*
placenta (g±SEM)	0,54±0,01	0,41±0,02	***
magzat (g±SEM)	5,83±0,10	5,17±0,13	***
magzat/placenta (±SEM)	10,93±0,28	12,21±0,27	**
magzatok száma (n ±SEM)	12,69±0,58	12,84±0,93	ns

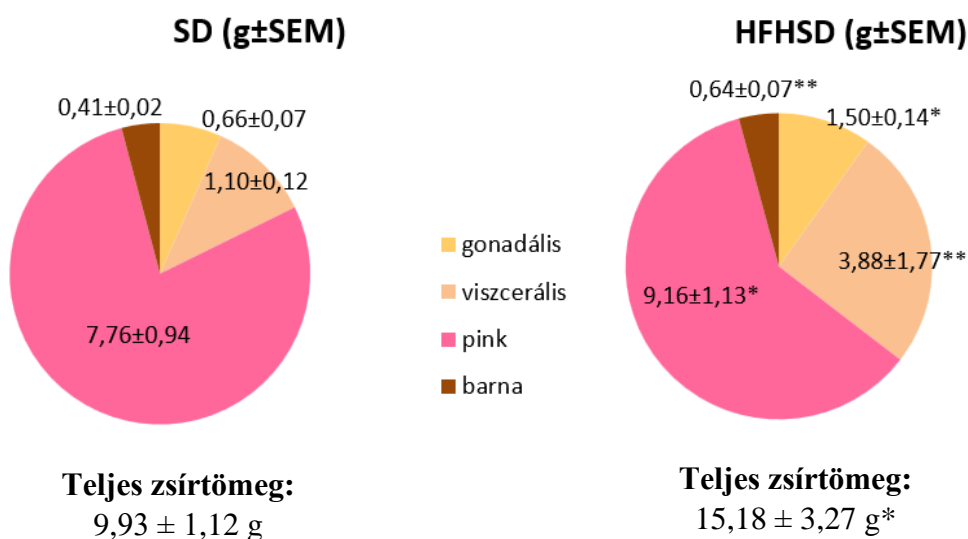
1. táblázat. A szervtömegek és a magzatok számának változása 22. napos vemhes patkányban SD és HFHSD táplálás esetén (n=12/csoport). A HFHSD csoportban mind az uterusz tömeg, mind pedig magzati és placenta tömeg is csökkent. ns: nem szignifikáns \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  az SD csoport azonos értékéhez viszonyítva

A 9. hét után a HFHSD növelte a patkányok éhomi vércukorszintjét, a GTT során pedig 60 és 90 perc után is növelte a vércukorszintet. A vércukor plazmaszintjének AUC elemzése azonban nem mutatott szignifikáns emelkedést. A terhesség végén (12. hét, 20. terhességi nap) az ismételt GTT azt mutatta, hogy a HFHSD nem befolyásolta az éhomi glükózszintet, de rontotta a glükóz-toleranciát a glükóz beadását követő első 45 percben. Az AUC elemzés a GTT alatt megnövekedett plazma glükózszintet mutatott a HFHSD csoportban az SD-csoportéhoz képest (**73. ábra**). Mindez igazolta, hogy az elhízás modell működött és az obesitas következtében megjelent a csökkent glükóz tolerancia.



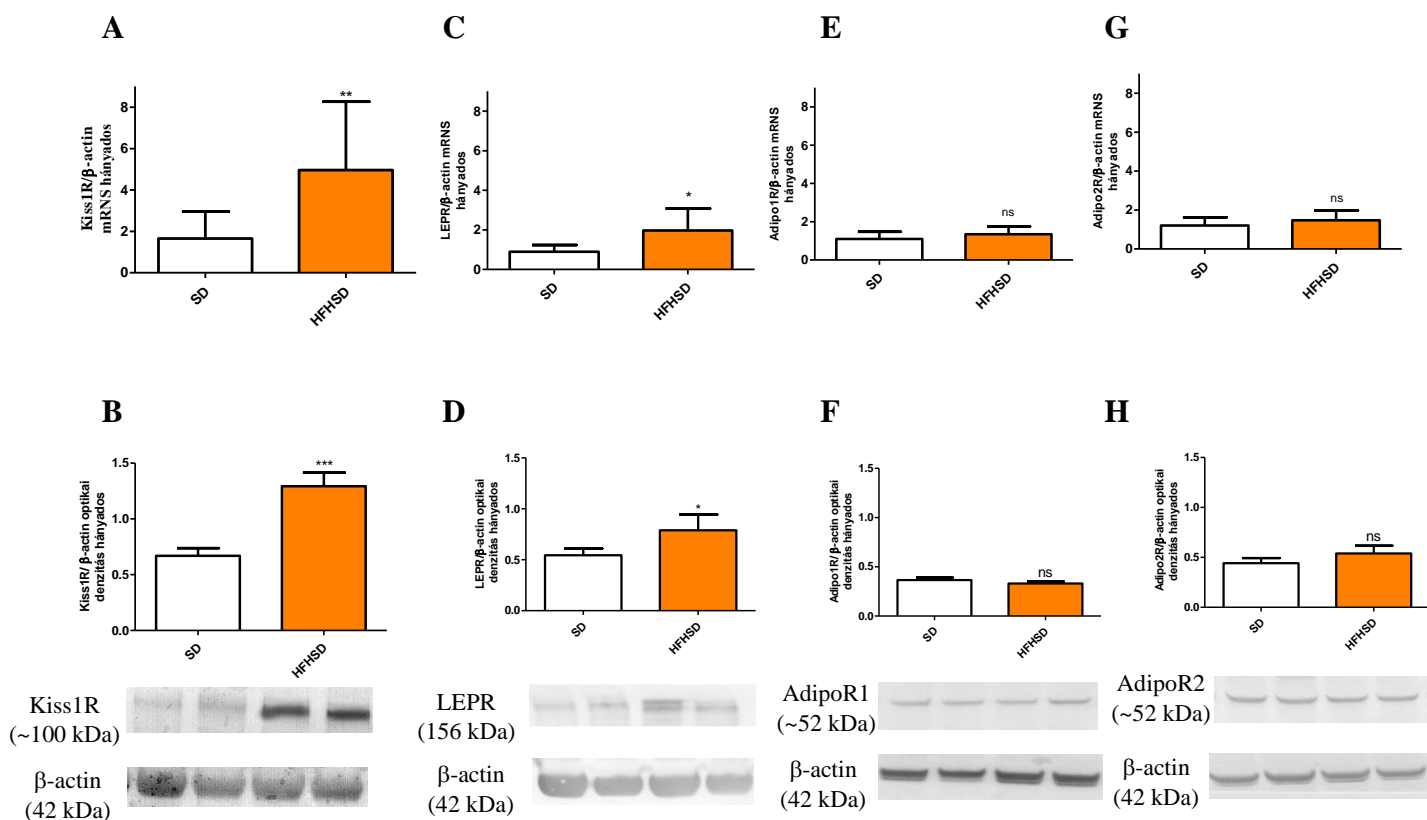
**73. ábra** A plazma glükózszintjének változása GTT során SD és HFHSD táplált patkányoknál 9 (A, C) és 12 hetes (B, D) korban (n=12/csoport). A patkányok 10 hetes korukban vemhesültek, a 12. héten a GTT-t a 20. gesztációs napon végeztük. A plazma görbékét az AUC kiszámításával hasonlítottuk össze. A HFHSD a 9 hét után csökkentette a glükóztoleranciát. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$  az SD csoport értékéhez viszonyítva

A 9 hétig tartó HFHSD megváltoztatta a vemhes patkányok zsírszöveti eloszlását is. A rózsaszín (pink) zsír tömege mind az SD, mind a HFHSD-vel táplált patkányoknál domináns volt a vemhesség utolsó napján. A HFHSD jelentősen megnövelte a gonadális, vizszerális, pink és barna zsírok tömegét a teljes zsírtömeggel együtt. A vizszerális zsír mutatta a HFHSD hatására a legnagyobb súlygyarapodást. A HFHSD csökkentette az eredetileg a laktáció miatt megnövekedett pink zsírszövet tömeget, és növelte a vizszerális és gonadális zsírok mennyiségét (74. ábra).



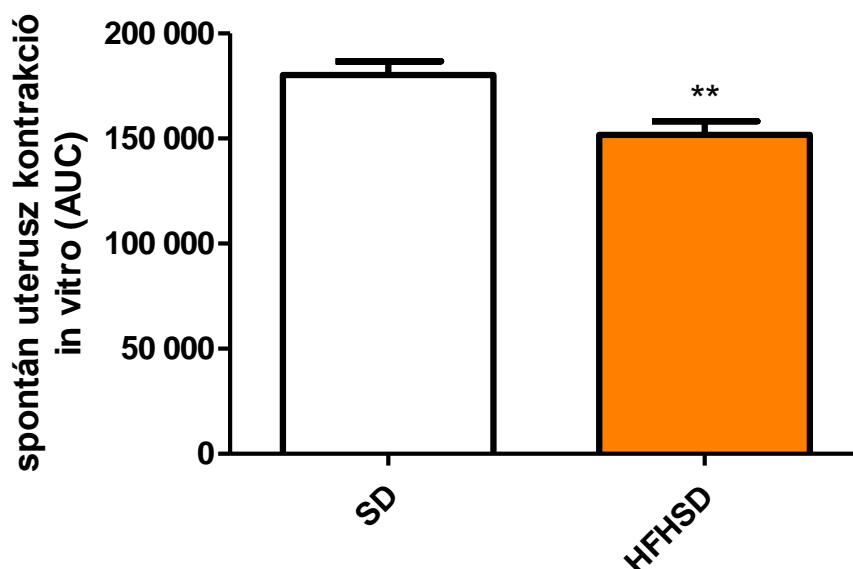
**74. ábra.** A zsíreloszlás változása a 9 hétig tartó SD és HFHSD után a vemhesség utolsó napján (12 hetes korban) patkányban (n=12/csoport). A patkányok 10 hetes korukban vemhesültek. Az összes zsírszövettípus és a teljes zsírtömeg tömege megnőtt, a legnagyobb növekedést a vizszerális zsír esetén mértük. \*: p<0,05; \*\*: p<0,01 a SD csoport megfelelő értékeihez viszonyítva

A HFHSD indukálta testtömeg gyarapodás fokozta a Kiss1R és LEPR expressziót a 22 napos vemhes uterusban az SD csoporthoz képest. Mind az mRNS- és fehérje expressziója szignifikánsan megnőtt mindkét receptor esetén. A HFHSD ugyanakkor nem módosította sem az AdipoR1, sem pedig az AdipoR2 expresszióját a vemhes uterusban (75. ábra).



**75. ábra.** A Kiss1R (A, B) a LEPR (C, D), az AdipoR1 (E, F) és AdipoR2 (G, H) mRNS és fehérje expressziójának változása SD és HFHSD táplált vemhes patkányok uteruszban (n=6/csoport). A RT-PCR vizsgálat során (A, C, E, G) következő primereket használtuk: Rn00576940\_m1 (Kiss1R), Rn01433205\_m1 (LEPR), Rn01463173\_m1 (AdipoR1), Rn00667869\_m1 ( $\beta$ -actin). A Kiss1R és LEPR mRNS megnövekedett a 9 hétig tartó HFHSD hatására a vemhesség utolsó napjára. A WB mérések során (B, D, F, H) a blotokat rázás közben inkubáltuk Kiss1R (1:200, Bioss Antibodies, Cat# bs-2501R, RRID:AB\_10855480), LEPR (1:300, Bioss Antibodies, Cat# bs-0109R, RRID:AB\_10852741), AdipoR1 (1:300, Bioss Antibodies, Cat# bs-0610R, RRID:AB\_10857625), AdipoR2 (1:300, Bioss Antibodies, Cat# bs-0611R, RRID:AB\_10857621) és  $\beta$ -actin (1:300, Bioss Antibodies, Cat# bs-0061R, RRID:AB\_10855480) poliklonális antitestekkel blokkoló pufferben. A fehérje expressziók változása összhangban volt az mRNS változásokkal. ns: nem szignifikáns, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  az SD csoporthoz hasonlítva

A HFHSD hatására a spontán kontraktilitás jelentősen csökkent az SD csoporthoz képest. A 30 perc alatti spontán összehúzódások AUC értéke 16%-ot csökkent a HFHSD csoportban, ami az obezitás indukálta kontraktilitás csökkenésére utal (76. ábra).

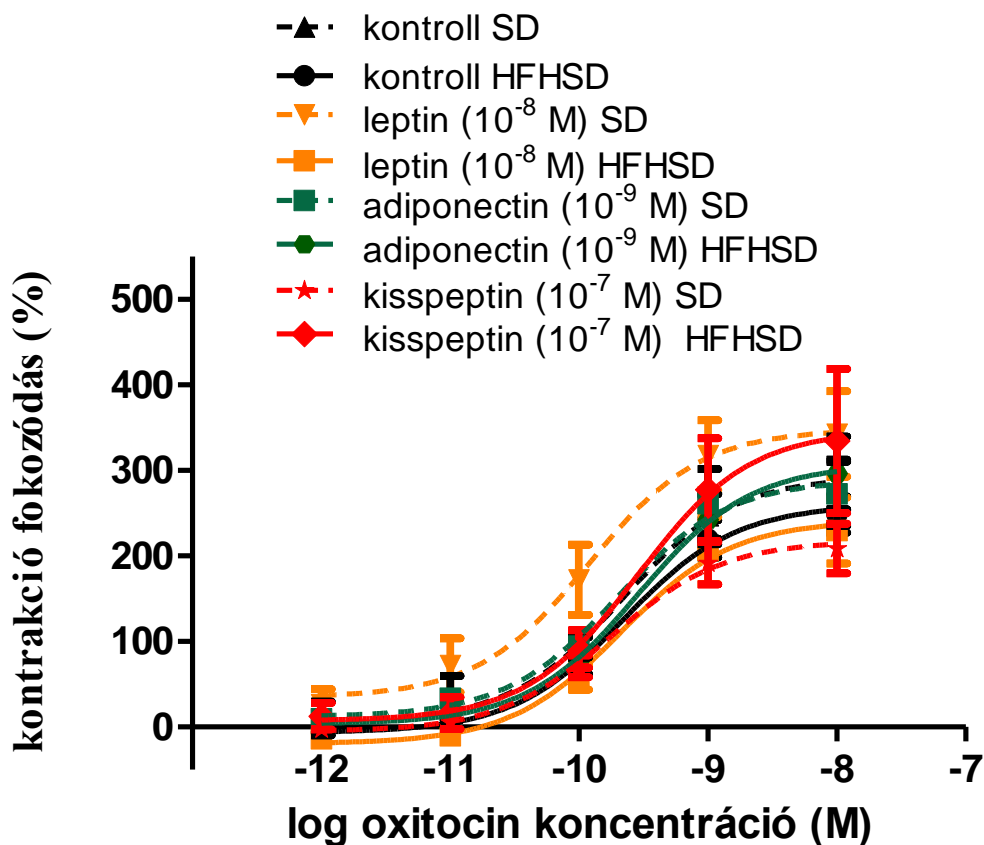


76. ábra. A spontán kontrakciók AUC értékei izolált szervfürdő rendszerben 9 hétig tartó SD és HFHSD után 22. napos vemhes patkány uteruszban (n=12/csoport). A HFHSD csoportban a kontrakciók gyengébbek voltak az SD csoporthoz képest 30 perc mérést követően \*\*: p<0,01

A HFHSD nem befolyásolta az oxitocin által kiváltott összehúzódásokat, de módosította a kisspeptin és a leptin jelenlétében adott választ. Az SD csoportban a kisspeptin jelenléte csökkentette az oxitocin indukálta összehúzódásokat, míg a HFHSD csoportban fokozta a kontrakciók nagyságát. Ezzel szemben a leptin jelenléte fokozta az oxitocin által kiváltott összehúzódásokat, de ezt a hatást jelentősen mérsékelte a HFHSD. Az adiponectin egyáltalán nem módosította az oxitocin által kiváltott összehúzódásokat sem az SD, sem a HFHSD csoportban (77. ábra).

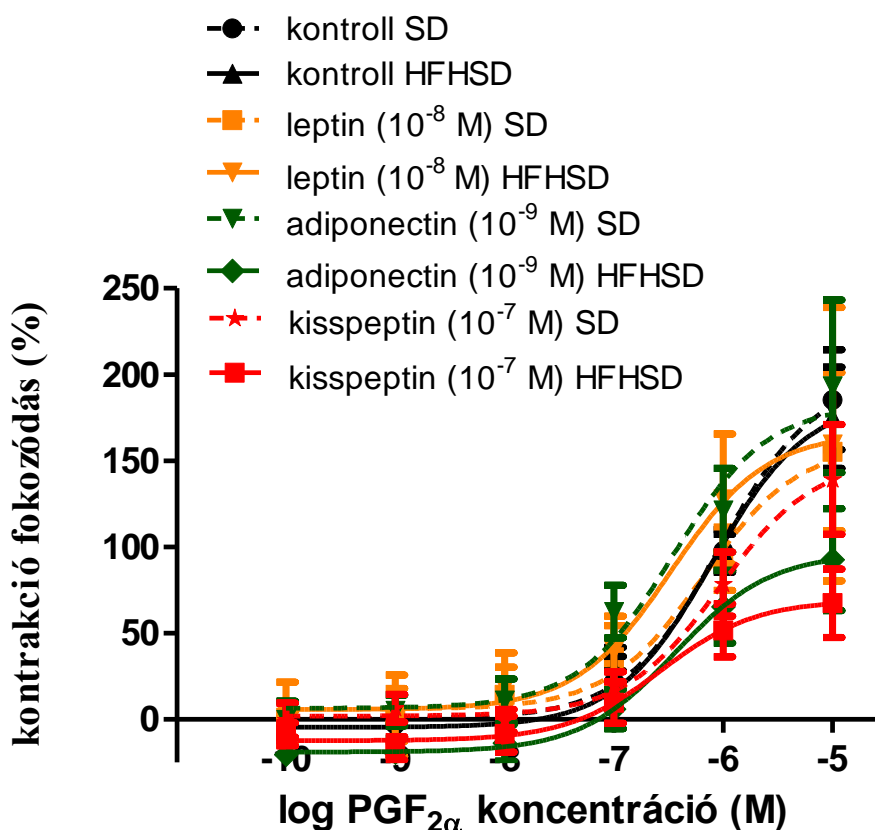
Az oxitocinhoz hasonlóan, a diéta nem befolyásolta a  $PGF_{2\alpha}$ -indukált összehúzódásokat, de módosította a kisspeptin és az adiponectin jelenlétében kifejtett hatásokat. Az SD csoportban a kisspeptin jelenléte csökkentette a  $PGF_{2\alpha}$  indukálta összehúzódásokat, míg a HFHSD kontrakciós válasz további csökkenését eredményezte. Az adiponectin jelenléte nem módosította a  $PGF_{2\alpha}$  által kiváltott összehúzódásokat, de csökkentette a HFHSD csoportban kifejtett kontrakciókat. Ugyanakkor a leptin jelenléte nem módosította a  $PGF_{2\alpha}$  által indukált kontrakciókat sem az SD, sem pedig a HFHSD csoportban (78. ábra).





	EC <sub>50</sub> (M) SD	E <sub>max</sub> (%) SD	EC <sub>50</sub> (M) HFHSD	E <sub>max</sub> (%) HFHSD	p EC <sub>50</sub> SD vs. HFHSD	p E <sub>max</sub> SD vs. HFHSD
kontroll	$2,2 \pm 1,3 \times 10^{-10}$	$293,1 \pm 17,9$	$2,3 \pm 1,1 \times 10^{-10}$	$260,0 \pm 14,3$	ns	ns
kisspeptin	$1,8 \pm 0,9 \times 10^{-10}$	$217,8 \pm 16,8$ **	$2,8 \pm 1,5 \times 10^{-10}$	$347,4 \pm 48,9$ **	ns	###
leptin	$1,2 \pm 0,6 \times 10^{-10}$	$348,2 \pm 32,3$ *	$2,1 \pm 1,4 \times 10^{-10}$	$241,7 \pm 24,6$	ns	###
adiponectin	$1,9 \pm 1,0 \times 10^{-10}$	$289,2 \pm 27,3$	$2,9 \pm 1,7 \times 10^{-10}$	$307,5 \pm 25,5$	ns	ns

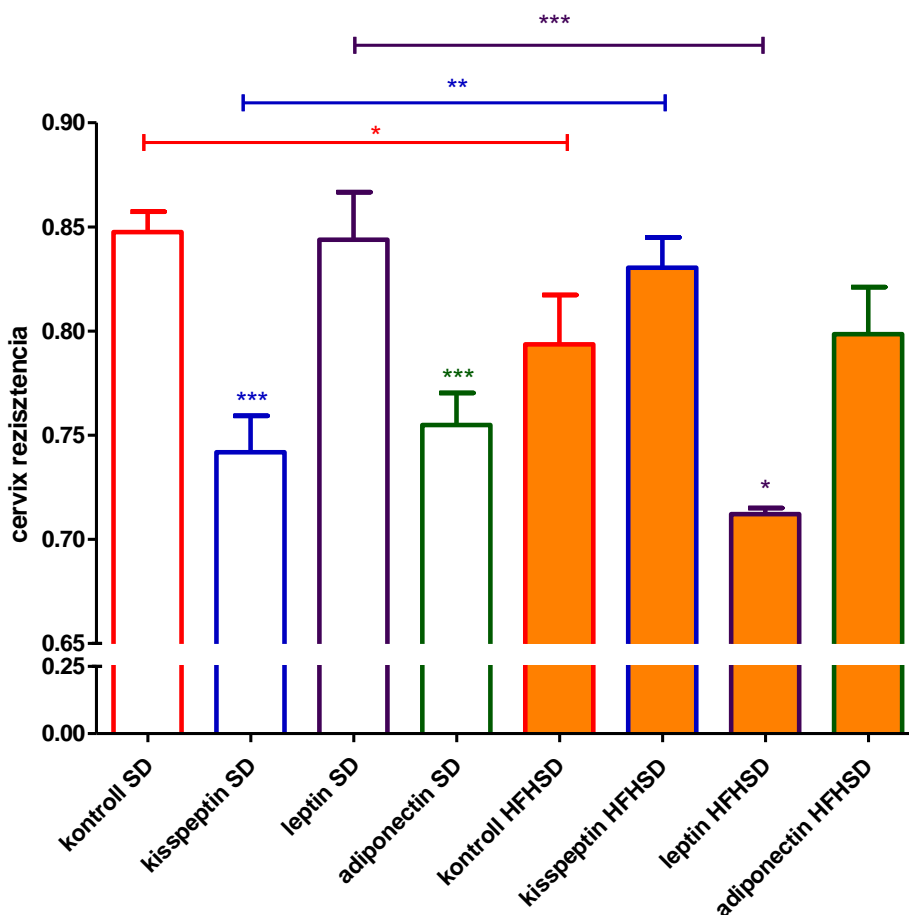
77. ábra. A 9 hétig tartó HFHSD hatása az oxitocin indukált kontrakciókra adipokinek jelenlétében 22 napos vemhes patkány uteruszon in vitro (n=12). A HFHSD nem befolyásolta az oxitocin hatását, valamint az adipokinek jelenlétében az oxitocin EC<sub>50</sub> értékét. A kisspeptin gátló hatása fokozó hatássá, míg a leptin fokozó hatása gátló hatássá alakult át a HFHSD következtében (ld. táblázatos rész)., \*p<0,05; \*\*p<0,01 az azonos diétához tartozó kontroll értékhez viszonyítva; ns: nem szignifikáns, ###p<0,001 a két diétás csoport összehasonlításában



	$EC_{50}$ (M) SD	$E_{max}$ (%) SD	$EC_{50}$ (M) HFHSD	$E_{max}$ (%) HFHSD	p $EC_{50}$ SD vs. HFHSD	p $E_{max}$ SD vs. HFHSD
kontroll	$9,2 \pm 3,4 \times 10^{-7}$	$198,4 \pm 17,4$	$7,8 \pm 2,2 \times 10^{-7}$	$186,1 \pm 16,1$	ns	ns
kisspeptin	$9,3 \pm 3,8 \times 10^{-7}$	$151,3 \pm 24,2$ *	$2,7 \pm 1,3 \times 10^{-7}$	$69,3 \pm 13,0$ ***	ns	###
leptin	$6,5 \pm 1,8 \times 10^{-7}$	$159,4 \pm 31,6$	$3,3 \pm 1,5 \times 10^{-7}$	$166,2 \pm 38,9$	ns	ns
adiponectin	$3,5 \pm 1,3 \times 10^{-7}$	$182,9 \pm 25,3$	$3,6 \pm 1,1 \times 10^{-7}$	$96,4 \pm 17,7$ ***	ns	###

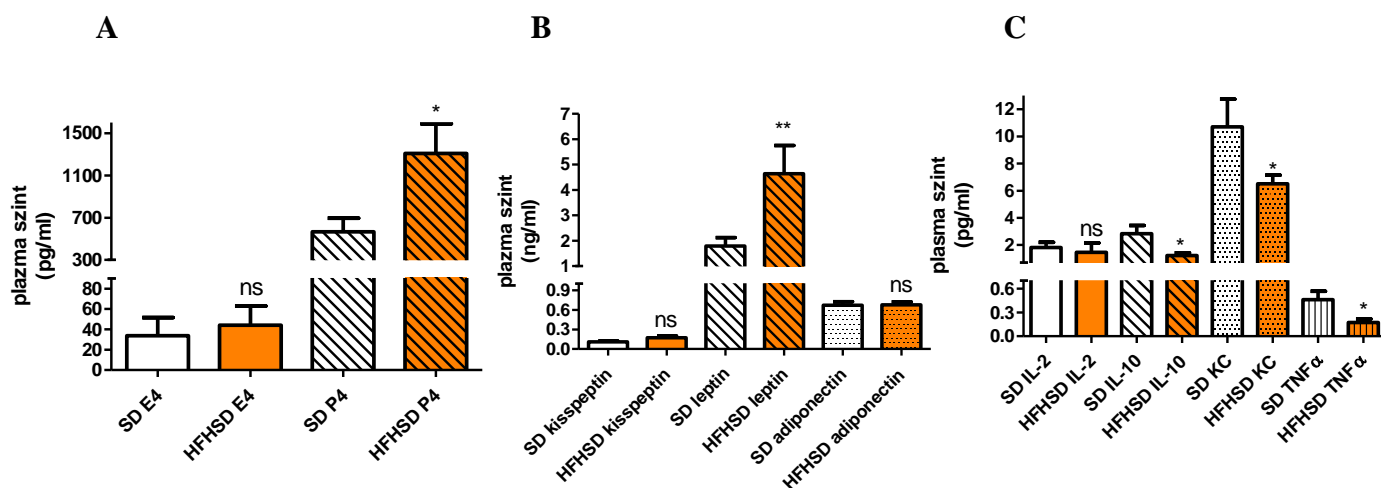
78. ábra. A 9 hétig tartó HFHSD hatása a  $PGF_{2\alpha}$  indukált kontrakciókra adipokinek jelenlétében 22. napos vemhes patkány uteruszon *in vitro* (n=12). A HFHSD nem befolyásolta a  $PGF_{2\alpha}$  hatását, valamint az adipokinek jelenlétében a  $PGF_{2\alpha}$   $EC_{50}$  értékét. A kisspeptin gátló hatása HFHSD következtében tovább erősödött, míg az adiponectin csak a HFHSD esetén gátolta a kontrakciókat (ld. táblázatos rész)., \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  az azonos diétához tartozó kontroll értékhez viszonyítva; ns: nem szignifikáns, ### $p < 0,001$  a két diétás csoport összehasonlításában

A HFHSD csökkentette a 22. napos vemhes patkányok cervix rezisztenciáját az SD csoporthoz képest. A kisspeptin vagy az adiponectin jelenléte további csökkenést idézett elő, míg a leptin önmagában nem módosította az SD csoportban a cervix rezisztenciát. A HFHSD következtében a kisspeptin és az adiponectin rezisztencia csökkentő hatása megszűnt, ugyanakkor a leptin jelenlétében az érték jelentősen csökkent (79. ábra).



**79. ábra.** Az étrend és az adipokinek hatása a cervix rezisztenciára 22. napos vemhes patkányokban (n=12). A cervix rezisztenciát izolált szervfürdőben, nyújtási tesztet alkalmazva mértük. HFHSD önmagában csökkentette a rezisztenciát. A kisspeptin ( $10^{-7}$ M) és az adiponectin ( $10^{-9}$ M) csökkentette a rezisztenciát az SD mintákban. A HFHSD megszüntette a kisspeptin és az adiponectin rezisztencia csökkentő hatását, a leptin esetében viszont rezisztencia csökkentő hatást eredményezett. \* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,001$  a saját diétás kontrollhoz képest, vagy a szakaszokkal jelölt értékek összehasonlításában

A plazmában a HFHSD növelte a P4 szintjét, míg az E2 szintje változatlan maradt. Az adipokinek közül csak a leptin szintje növekedett a HFHSD következtében, a többi adipokin szintje változatlan maradt. A citokinek közül az IL-10, a KC és a TNF $\alpha$  plazmaszintjét a HFHSD csökkentette, míg az IL-2 szintje változatlan maradt. A további vizsgált citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$ ) nem voltak kimutathatók sem a SD sem pedig HFHSD csoportba tartozó patkányok plazmájában (**80. ábra**).

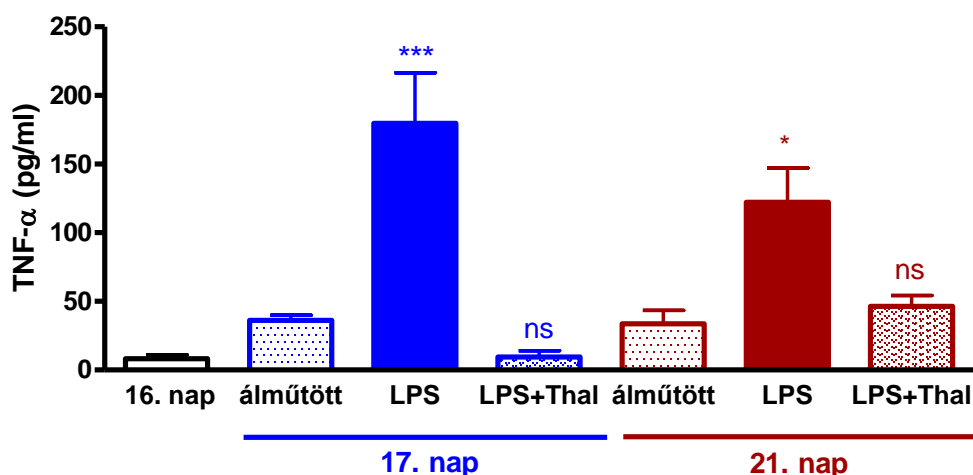


**80. ábra.** A nemi hormonok (A), az adipokinek (B) és a citokinek (C) plazmaszintjének változása 22. napos vemhes patkányoknál 9 hétig tartó HFHSD (narancssárga oszlopok) következtében. (A) Az E2 (üres oszlopok) szintje nem változott, a P4 (harántcsíkos oszlopok) szintje emelkedett az SD (fehér oszlopok) csoporthoz képest. (B) A leptin (harántcsíkos oszlopok) plazmaszintje szintén emelkedett, míg a kisszeptin (üres oszlopok) és az adiponectin (pontosított oszlopok) szintje változatlan maradt. (C) Az IL-10 (harántcsíkos oszlopok), KC (pontosított oszlopok) és TNF $\alpha$  (függőleges csíkos oszlopok) szintje csökkent, míg az IL-2 (üres oszlopok) szintje nem változott. ns: nem szignifikáns; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; az SD csoport azonos értékéhez viszonyítva.

#### 5.4.4.2. Gyulladás hatása a méhkontrakciókra

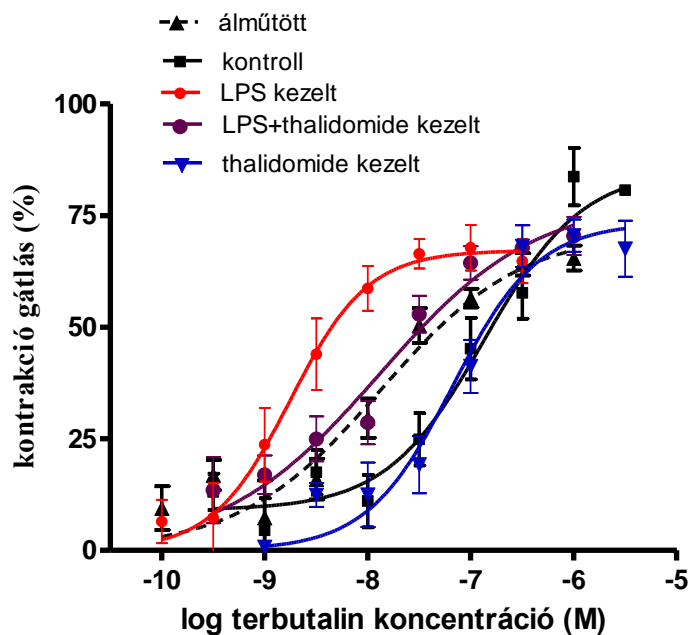
A gyulladásos vizsgálatainkban az intrauterin gyulladást LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{uterusz szarv}$ ) segítségével váltottuk ki a vemhesség 16. napján, a vizsgálatokat pedig a vemhesség 21. napján végeztük, mely magába foglalta az uterusz  $\beta_2$ -AR denzitás mérését radioligand kötési technikával, cAMP szintjének és az állatok plazma TNF $\alpha$  szintjének mérését ELISA technikával, valamint az izolált szervi kontrakciós vizsgálatokat EFS alkalmazásával. Az uterusz relaxációs választ terbutalin és a TNF $\alpha$  gátló thalidomide jelenlétében vizsgáltuk. Az LPS indukált gyulladás nem változtatta meg a  $\beta_2$ -AR denzitását az LPS kezelt szövetekben ( $\beta_2$ -ARs értékek fmol/mg fehérjében:  $216,6 \pm 49,1$  a kontroll és  $263,4 \pm 15,3$  az LPS kezelt csoportban).

A gyulladásos folyamatot a szérum TNF $\alpha$  szintjének mérésével követtük. A szérum TNF $\alpha$  szintjét az LPS kezelés jelentősen megemelte már a 17. vemhességi napon mind a kontroll, mind pedig az álműtött (steril fiziológiás sóoldattal kezelt) állatokhoz képest. Az intrauterin LPS kiváltása előtt 30 perccel adott thalidomide (45 mg/kg, i.p.) megakadályozta a TNF $\alpha$  szint emelkedést. A 21. napon is magasabb volt az LPS-kezelt patkányok plazma TNF $\alpha$  koncentrációja, a thalidomide védőhatása ebben az esetben is érvényesült (**81. ábra**).



**81. ábra.** AZ LPS indukált TNF $\alpha$  plazmaszint változás patkányban a vemhesség 17. és 21. napján (n=6/csoport). Az álműtét nem befolyásolta, míg az LPS kezelés jelentősen megnövelte mindkét vemhességi napon a TNF $\alpha$  szintet, melyet a thalidomide előkezelés kivédett. Thal: thalidomide; ns: nem szignifikáns, \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 az adott napi álműtött értékhez viszonyítva

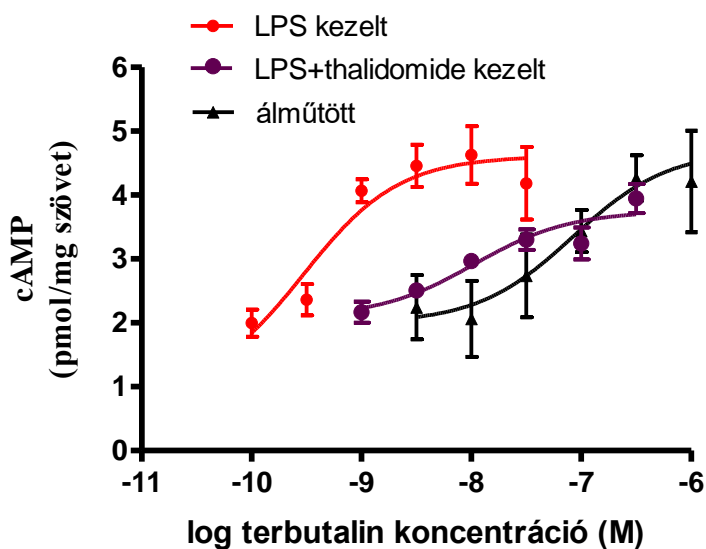
Ezek után megvizsgáltuk, hogy az LPS kezelés, illetve a thalidomide előkezelés hogyan befolyásolja a terbutalin gátló hatását az EFS kiváltott 21. napos vemhes patkány uterusz kontrakciókra in vitro. Mind a kontroll, mind az álműtött patkányoknál a terbutalin koncentráció függően gátolta az uterusz kontrakciókat, a két csoport között nem volt különbség a hatásmaximum tekintetében. Az LPS kezelt patkányokban azonban a terbutalin koncentráció hatás görbéje jelentősen balra tolódott az  $E_{max}$  változása nélkül. Az in vivo thalidomide előkezelés önmagában nem volt hatással a terbutalin koncentráció-válaszgörbéjére. A thalidomide előkezelt, majd LPS kezelt patkányokból származó uterusz mintákon azonban terbutalin  $EC_{50}$  értéke hasonló volt álműtött kontrollhoz képest, így a thalidomide jelenlétében a terbutalinra adott fokozott relaxációs megszűnt (**82. ábra**).



	terbutalin EC <sub>50</sub> (M)	terbutalin E <sub>max</sub> (%)
kontroll	1,8 ± 1,9x10 <sup>-7</sup>	80,1 ± 12,1
álműtött	3,8 ± 3,3x10 <sup>-8</sup>	75,0 ± 11,2
thalidomide kezelt	6,7 ± 2,9x10 <sup>-8</sup>	73,4 ± 5,5
LPS kezelt	2,2 ± 1,4x10 <sup>-9</sup> **	73,0 ± 7,6
LPS+thalidomide kezelt	1,3 ± 1,0x10 <sup>-8</sup>	78,9 ± 7,8

**82. ábra.** Az LPS indukált intrauterin gyulladás hatása a terbutalin uterusz relaxáló hatására 21. napos vemhes patkány uteruszban *in vitro* (n=6/csoport). A kontrakciókat EFS segítségével váltottuk ki. Az LPS okozta gyulladás miatt a terbutalin koncentráció-hatás görbéje balra tolódott (piros görbe), melyet a thalidomide előkezelés visszaállított (lila görbe) (ld. táblázatos rész). \*\*p<0,001 az álműtött értékhez viszonyítva

A terbutalin koncentráció függően fokozta az uterusz cAMP szintjét az álműtött és az LPS-kezelt patkányok esetén is, azonban a terbutalin koncentráció-hatás görbéje az LPS-kezelt patkányoknál balra tolódott, hasonlóan a kontraktilitási vizsgálatoknál tapasztaltakhoz. A thalidomide előkezelés esetén az E<sub>max</sub> értékekben nem volt különbség, de a terbutalin EC<sub>50</sub> értéke jelentősen jobbra tolódott (**83. ábra**).



	terbutalin EC <sub>50</sub> (M)	terbutalin E <sub>max</sub> (pmol/mg szövet)
álműtött	8,4 ± 4,1x10 <sup>-8</sup>	4,7 ± 0,7
LPS kezelt	3,0 ± 0,9x10 <sup>-10</sup> ***	4,6 ± 0,2
LPS+thalidomide kezelt	1,1 ± 0,8x10 <sup>-8</sup>	3,7 ± 0,2

83. ábra. Az LPS indukált intrauterin gyulladás hatás a terbutalin cAMP szint emelő képességére 21. napos vemhes patkány uteruszban (n=6/csoport). Az intrauterin gyulladás nem fokozta a terbutalin maximális hatását, de jelentősen balra tolta a görbét. A thalidomide előkezelés visszaállította a terbutalin hatásgörbét az álműtött szintre (ld. táblázatos rész). \*\*\*p<0,001 az álműtött értékhez viszonyítva

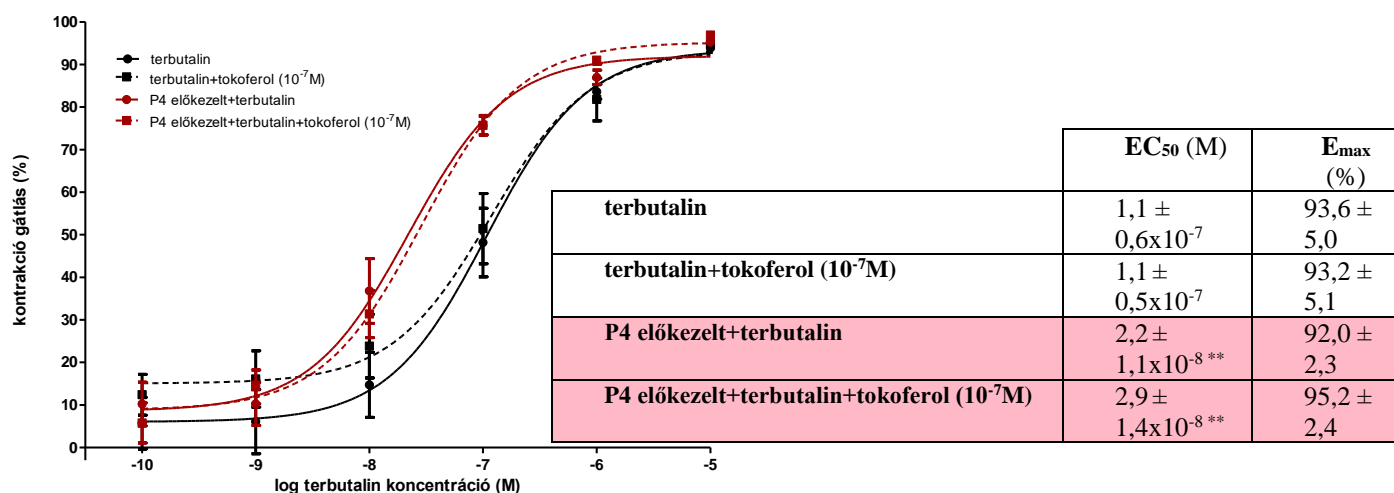
## 5.5. Antioxidáns hatás az uterusz kontrakcióra és a cervix rezisztenciára

A ROS nélkülözhetetlen számos jelátviteli folyamatban, mint pl. a sejtproliferáció, a homeosztázis, az antioxidáns génszabályozás, a mitokondriális oxidatív stressz, az apoptózis, az öregedés, vagy a DNS károsodási válaszreakció [156]. A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok esetében az adott receptorok stimulációját szintén ROS-képződéssel hozták összefüggésbe [157]. A  $\beta$ -adrenerg agonista izoproterenolról ismert, hogy növeli a mitokondriális ROS-termelést a kardiomiocitákban [158]. A ROS gátlása mérsékli a  $\beta_2$ -AR jelátvitelt [159], ami arra utal, hogy az intracelluláris ROS alacsony szintje befolyásolhatja a  $\beta_2$ -AR jelátvitel egészét. Ismert, hogy az E-vitamin származékok ( tokoferolok) nagy peroxil gyökfogó képességgel rendelkeznek, emellett számos intracelluláris receptorhoz és enzimhez képesek kötődni. Ezen hatásoknak köszönhetően nemcsak a receptorok és enzimek, hanem egyes gyógyszerek hatását is módosíthatják [160]. A tokoferolok analógjai

hatást gyakorolnak a COX-ra is. Mind a COX-1, mind a COX-2 expresszálódik az uterusban és a cervixben is, szintjük a terhesség során megnő. Úgy tűnik, hogy szüléskor nagyobb jelentőséggel bír a COX-2 általi PG felszabadulás a cervix érésében és a spontán méhkontrakciók fokozódásában [161]. Mindezekből kiindulva megvizsgáltuk, hogy a tokoferol ( $\alpha$ -tokoferolsav-szukcinát) jelenléte hogyan változtatja meg a terbutalin, és a COX gátlók uterusz kontrakciókra és cervix rezisztenciára kifejtett hatásait. A mérések során izolált szervfürdő, valamint cAMP, COX és OSI vizsgálatokat végeztünk nem vemhes és vemhes patkányokon, valamint a COX gátlók esetén az ellési időt mérő kísérlet is végrehajtottunk [162–164]. A kísérletek során a tokoferolt 96%-os etanol és Macrogol 400 1:14 arányú keverékben oldottuk, majd tovább hígítottuk Macrogol 400-ban. A kontrollszöveteket és kontroll állatokat a tokoferol nélküli oldószerrel kezeltük, és a tokoferollal kapott eredményeket ezekkel az értékekkel korigáltuk.

### 5.5.1. Tokoferol és terbutalin hatása a méhkontrakcióra és a cervix rezisztenciára

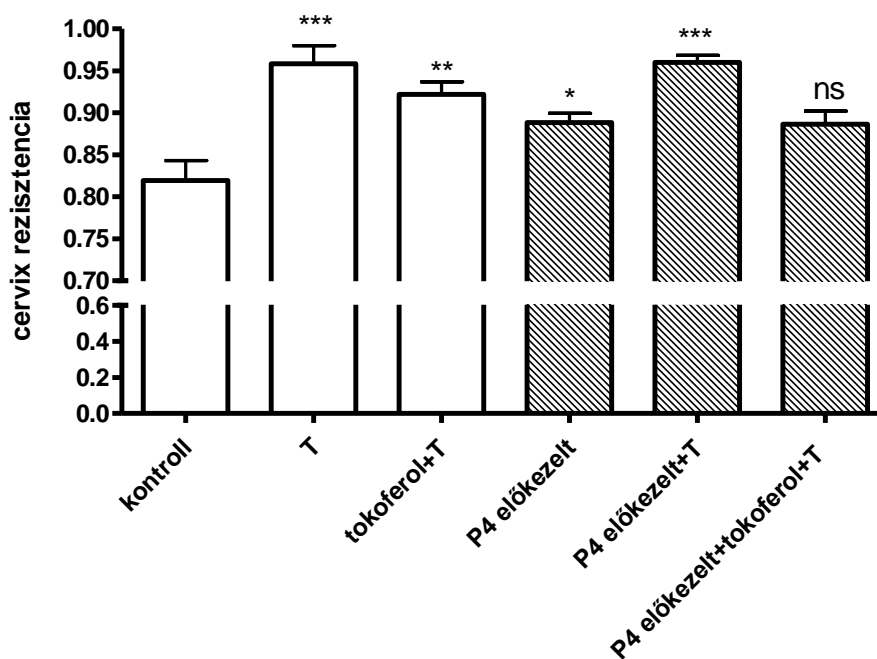
A terbutalin koncentrációfüggő gátló hatást váltott ki a 22. napos vemhes uterusz gyűrűk spontán összehúzódásaira. A terbutalin koncentráció-válasz görbéje balra tolódott a P4-előkezelte állatokból származó minták esetében (korábban igazoltuk már, hogy a P4 előkezelés fokozza a terbutalin hatást). A tokoferol ( $10^{-7}$  M) jelenléte nem változtatta meg a terbutalin hatását sem a nem kezelt, sem a P4 előkezelte patkányokból származó szövetekben (84. ábra).



84. ábra. A terbutalin kontrakció gátló hatása tokoferol ( $10^{-7}$  M) jelenlétében kezeletlen és P4-előkezelte 22. napos vemhes patkány uteruszon in vitro (n=7). A gátló hatásokat spontán kontrakciókra vizsgáltuk. A P4 kezelés esetén az előkezelését a vemhesség 15. napján kezdtük, és a vemhesség 21. napjáig 7 napon keresztül szubkután adagoltuk 0,5 mg/állat/nap dózisban. A terbutalin koncentráció-válasz görbéje a P4 előkezelés hatására balra tolódott melyet a tokoferol jelenléte nem változtatott meg (ld. táblázatos rész). \*\*p<0,01 a P4 előkezelés nélküli azonos értékhez viszonyítva

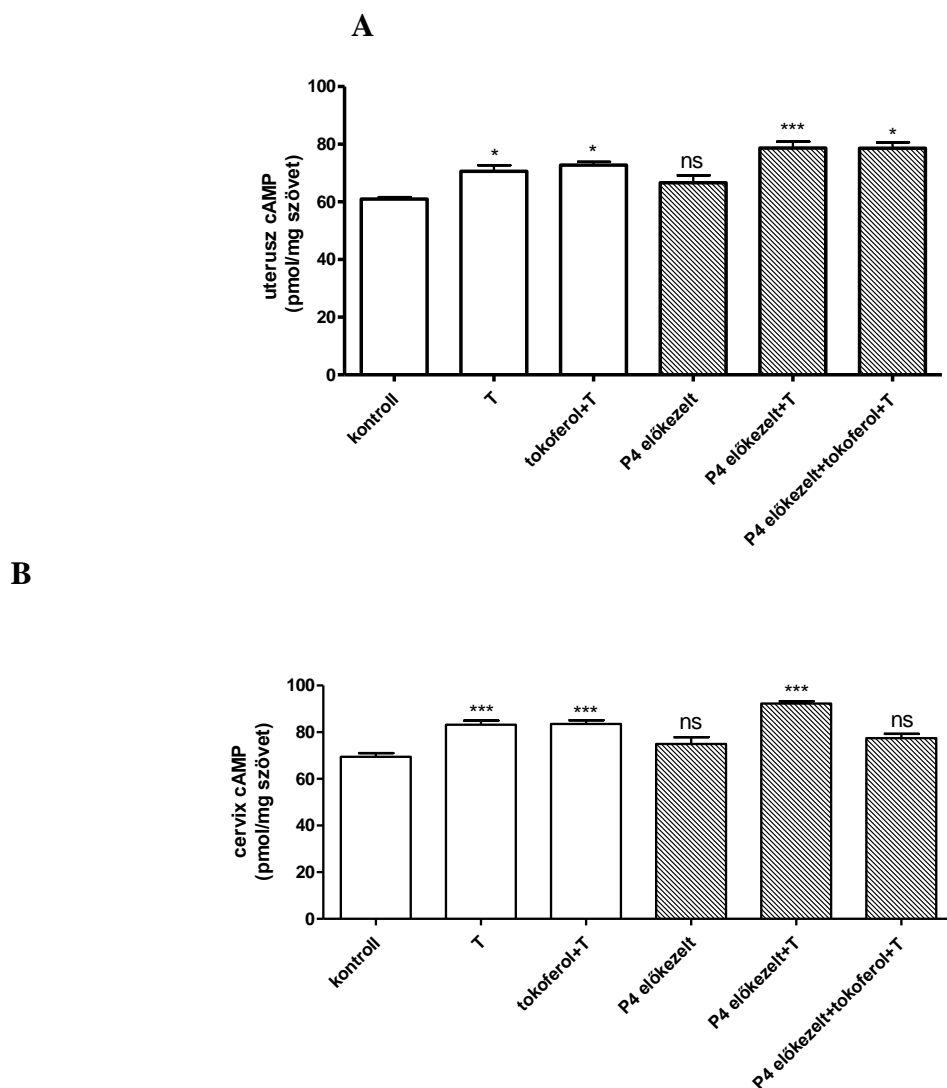


A terbutalin ( $10^{-6}$  M) fokozta 22. napos vemhes cervix rezisztenciáját, melyet a tokoferol ( $10^{-7}$  M) nem változtatott meg. A P4 előkezelés önmagában növelte a cervix rezisztenciát, de nem befolyásolta a terbutalin hatását, ugyanakkor tokoferol jelenlétében megszűnt a P4 előkezelés után mért terbutalin hatás (**85. ábra**).



**85. ábra.** A terbutalin rezisztencia fokozó hatása tokoferol ( $10^{-7}$  M) jelenlétében kezeletlen és P4-előkezelt 22. napos vemhes patkány cervixen *in vitro* ( $n=7$ /csoport). A P4 kezelés esetén az előkezelését a vemhesség 15. napján kezdtük, és a vemhesség 21. napjáig 7 napon keresztül szubkután adagoltuk 0,5 mg/állat/nap dózisban. A terbutalin ( $10^{-6}$  M) növelte a cervix rezisztenciát, ezt a hatását a tokoferol ( $10^{-7}$  M) nem változtatta meg (üres oszlopok) A P4 előkezelés önmagában fokozta a cervix rezisztenciát, de nem növelte tovább a terbutalin hatását, ugyanakkor a tokoferol megszüntette a terbutalin P4 előkezelést követően mért hatását (csíkozott oszlopok). T: terbutalin; ns: nem szignifikáns; \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  a kontroll értékhez képest.

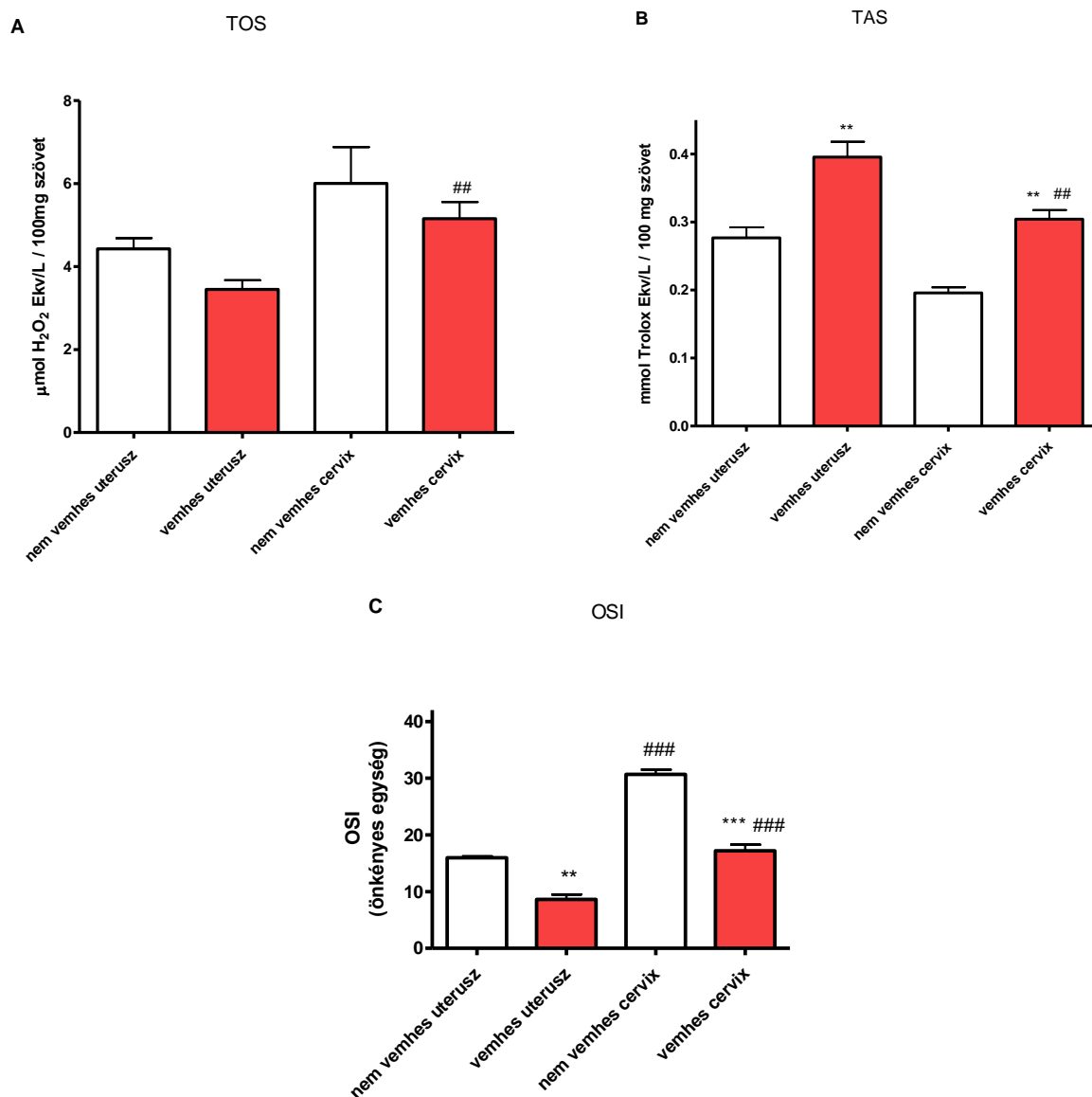
A terbutalin ( $10^{-6}$  M) növelte az uterusban cAMP szintet. A tokoferol ( $10^{-7}$  M) jelenléte nem változtatta meg a terbutalin hatását. A P4 előkezelt kezelt mintákban a terbutalin által indukált cAMP-szint növekedés nagyobb volt, de a tokoferol ezt sem befolyásolta (**86. ábra A**). A terbutalin megemelte a cAMP szintet vemhes cervixben is. A tokoferol jelenlétében a cAMP szint nem változott tovább. A P4 előkezelés után a terbutalin tovább fokozta cAMP-mennyiségét, melyet a tokoferol megszüntetett. (**86. ábra B**).



**86. ábra.** A terbutalin cAMP fokozó hatása tokoferol ( $10^{-7}$  M) jelenlétében kezeletlen és P4-előkezelt 22. napos vemhes patkány uteruszon (A) és cervixen (B) *in vitro* ( $n=7$ /csoport). A P4 kezelés esetén az előkezelését a vemhesség 15. napján kezdtük, és a vemhesség 21. napjáig 7 napon keresztül szubkután adagoltuk 0,5 mg/állat/nap dózisban. A terbutalin ( $10^{-6}$  M) növelte a cAMP-szintet az uterusban és a cervixben, melyet a tokoferol ( $10^{-7}$  M) nem befolyásolt (üres oszlopok). A P4 előkezelt szövetek esetén az uterusban és a cervixben is a terbutalin tovább növelte a cAMP szintet, a tokoferol nem befolyásolta az uterus hatását. A cervixben a terbutalin cAMP szint emelő hatása P4 előkezelést követően megszűnt (csíkozott oszlopok). T: terbutalin; ns: nem szignifikáns; \* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$  a kontroll értékhez képest.

A TOS értéke a vemhes uterusban alacsonyabb volt, mint a cervixben. A nem vemhes uterus és a cervix TOS értékei hasonlóak voltak a vemhes értékekhez (87. ábra A). A TAS értéke viszont uterusban volt magasabb. A nem vemhes uterus és cervix TAS értékei alacsonyabbak voltak, mint a vemhes mintákban (87. ábra B). Az OSI (TOS/TAS)

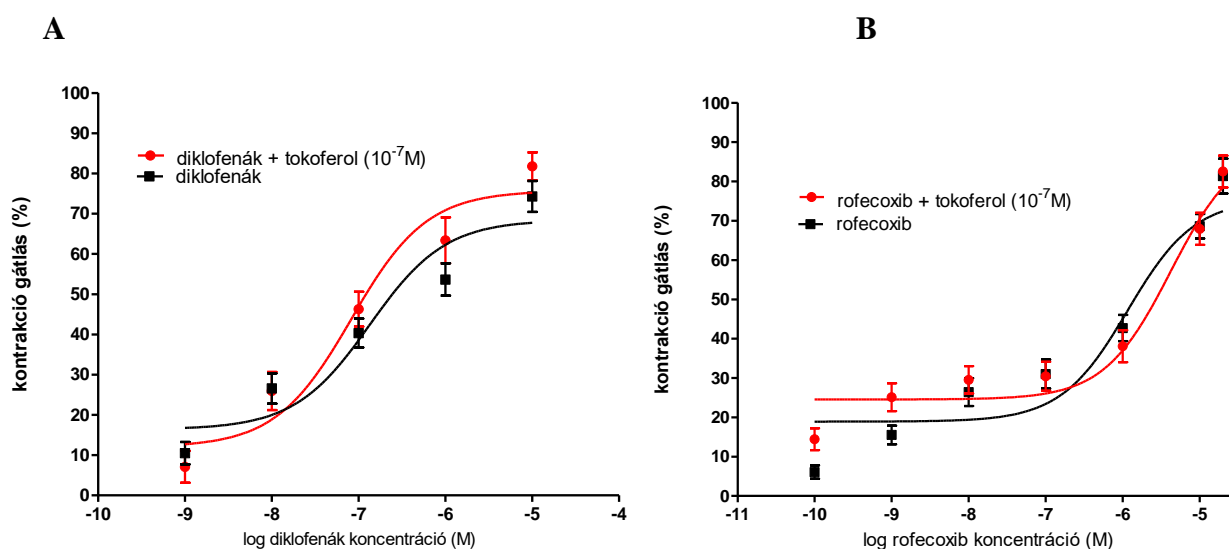
alacsonyabb volt a vemhes uterusban. A vemhes cervix OSI értéke alacsonyabb volt, mint a nem vemhes mintákban (87. ábra C).



**87. ábra.** Az uterusz és a cervix oxidatív/antioxidáns státusza nem vemhes és vemhes patkányokban (n=7/csoport). A nem vemhes mintákat ösztrozusban lévő nőstény patkányoktól gyűjtöttük, a vemhes minták 22. napos vemhes patkányokból származnak. (A) A vemhes cervix teljes oxidatív státusz (TOS) értéke magasabb volt a vemhes uteruszhoz képest. A vemhes és nem vemhes szövetek közötti különbségek nem voltak szignifikánsak. (B) A teljes antioxidáns státusz (TAS) értéke a vemhes uteruszban magasabb volt, mint a vemhes cervixben. A vemhes és nem vemhes azonos szövetek közötti különbségek szignifikánsak voltak. (C) Az oxidatív stressz index (OSI) a TOS és a TAS hányadosa. Az OSI értéke a vemhes cervixben magasabb volt, mint a vemhes uteruszban. A különbség a vemhes és a nem vemhes cervixek között szignifikáns volt. <sup>\*\*</sup>p<0,01; <sup>\*\*\*</sup>p<0,001 a nem vemhes azonos típusú szövet (uterusz vagy cervix) értékeivel összehasonlítva; <sup>##</sup>p<0,01; <sup>###</sup>p<0,001 az azonos állapotú (nem vemhes vagy vemhes) uteruszhoz hasonlítva.

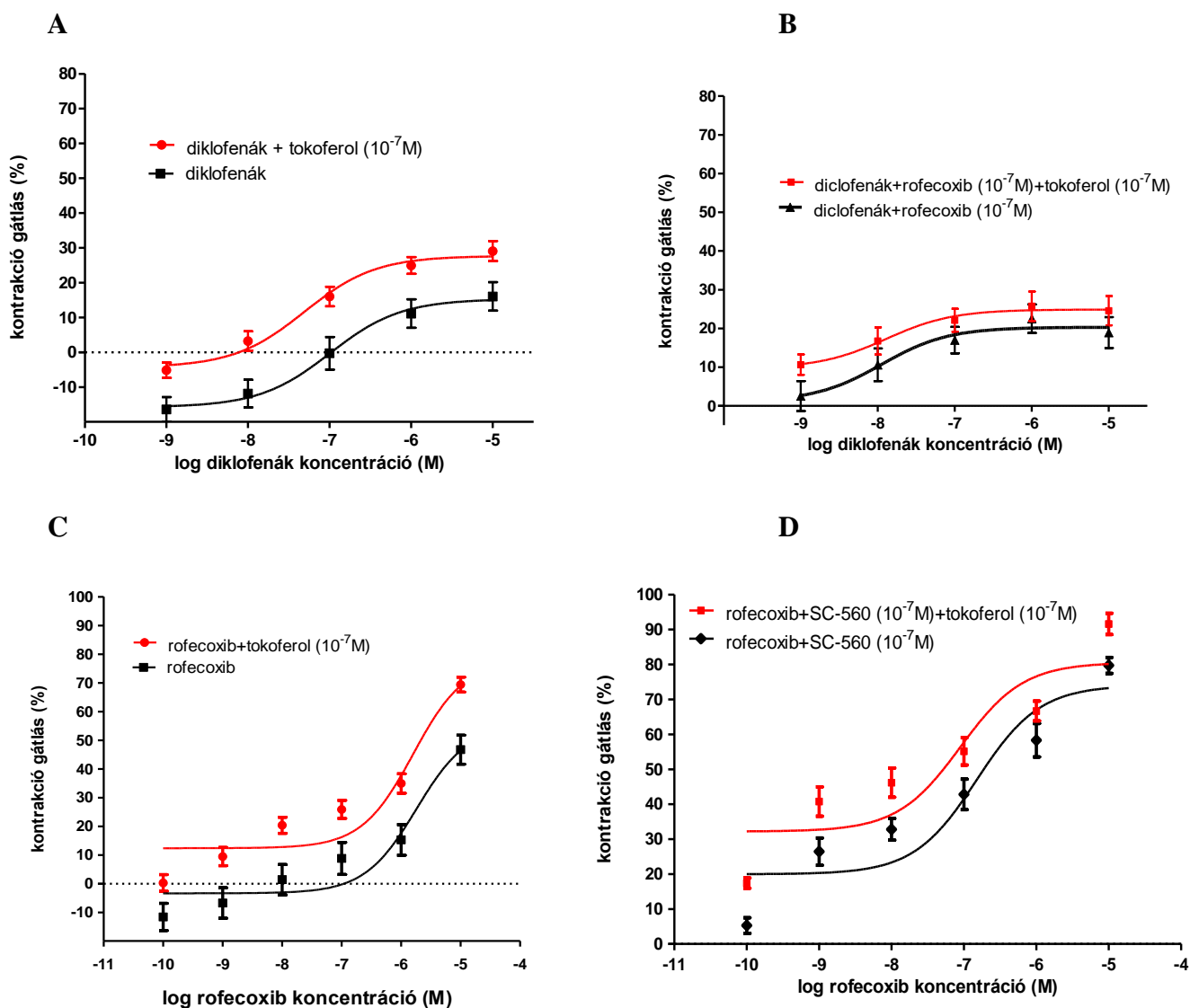
### 5.5.2. Tokoferol és COX-gátlók hatása a méhkontrakcióra és a cervix rezisztenciára

Nem vemhes patkány uteruszon mind a nem szelektív COX gátló diklofenák, mind pedig a COX2-szelektív gátló rofecoxib koncentráció függően gátolta a KCl kiváltotta kontrakciókat izolált szervfürdőben. A tokoferol jelenléte ( $10^{-7}$  M) nem befolyásolta egyik COX gátló relaxáló hatását sem (**88. ábra**).



**88. ábra.** A diklofenák (A) és a rofecoxib (B) uterusz kontrakciót gátló hatása tokoferol ( $10^{-7}$  M) jelenlétében nem vemhes uteruszon (n=6/csoport). A nem vemhes mintákat ösztruszban lévő nőtényi patkányoktól gyűjtöttük, a kontrakciókat 25 mM KCl-dal váltottuk ki. Mind a diklofenák, mind a rofecoxib jelentős mértékben (80%) gátolta az összehúzódásokat. A tokoferol jelenlétében egyik hatóanyag gátló hatása sem változott meg.

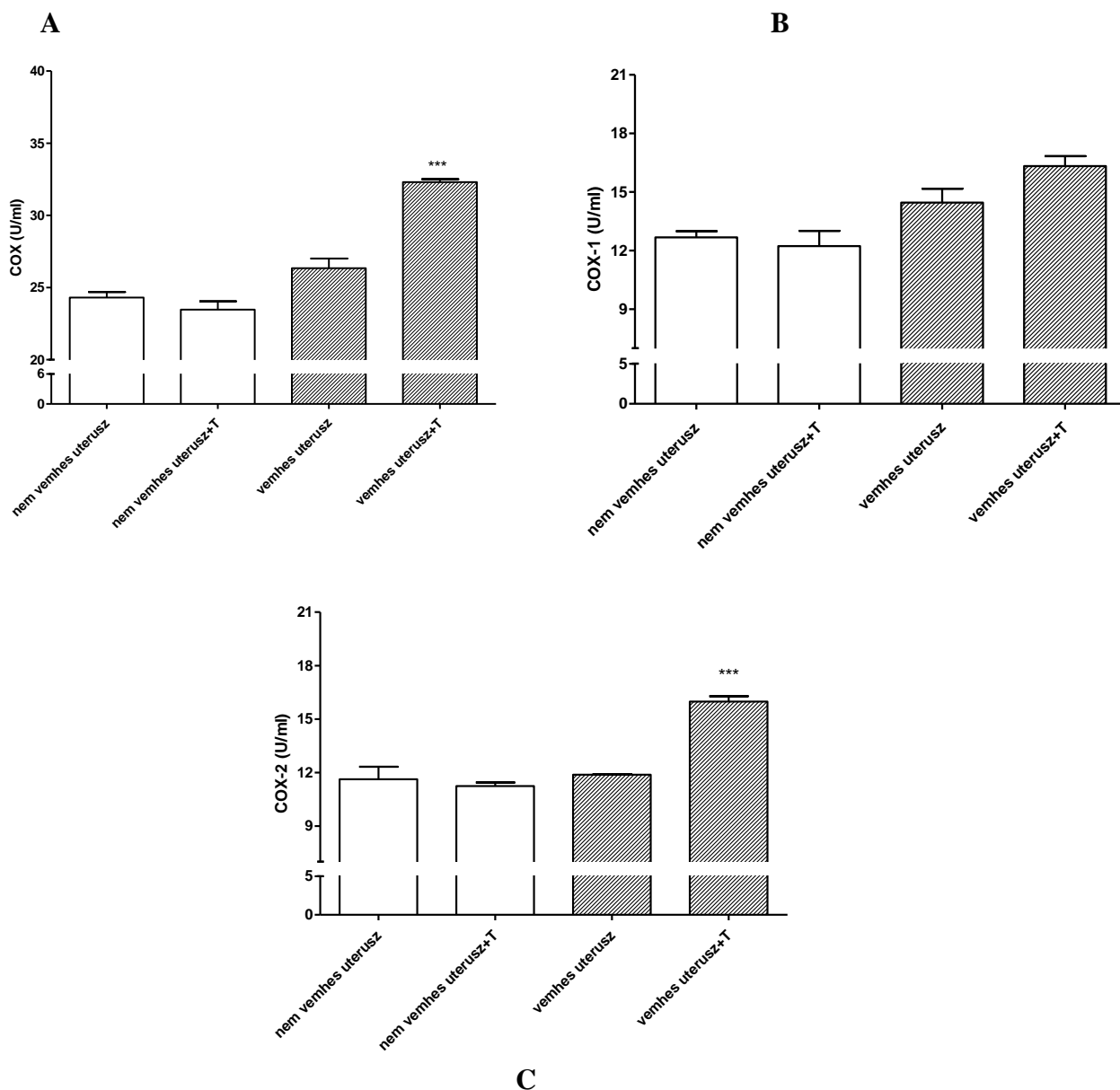
A 22. napos vemhes uteruszon a szelektív COX-2-gátló rofecoxib relaxáló hatása nagyobb volt, mint a diklofenáké. A tokoferollal történő előkezelést követően a relaxáló hatás mindkét vegyület esetében fokozódott (**89. ábra A, C**). A rofecoxibbal ( $10^{-7}$  M) előkezelt vemhes uteruszon a diklofenák kontrakciót gátló hatása nem változott, és a tokoferol jelenlétében sem mutatott szignifikáns emelkedést. (**89. ábra B**). A szelektív COX-1 gátló SC-560 ( $10^{-7}$  M) előkezelést követően a rofecoxib relaxáló hatása tovább fokozódott, amit a tokoferol jelenléte még tovább erősített. (**89. ábra D**)



	EC <sub>50</sub> (M)	E <sub>max</sub> (%)
diklofenák	$1,0 \pm 0,3 \times 10^{-7}$	$15,3 \pm 3,4$
diklofenák+tokoferol ( $10^{-7}$ M)	$4,9 \pm 1,2 \times 10^{-8}$ *	$27,7 \pm 2,0$ *
diklofenák+rofecoxib ( $10^{-7}$ M)	$1,2 \pm 0,5 \times 10^{-8}$	$20,3 \pm 2,5$
diklofenák+rofecoxib ( $10^{-7}$ M)+tokoferol ( $10^{-7}$ M)	$1,3 \pm 0,4 \times 10^{-8}$	$24,9 \pm 2,2$
rofecoxib	$1,8 \pm 0,7 \times 10^{-6}$	$55,3 \pm 9,7$
rofecoxib+tokoferol ( $10^{-7}$ M)	$1,6 \pm 0,5 \times 10^{-6}$	$77,9 \pm 5,7$ **
rofecoxib+SC-560 ( $10^{-7}$ M)	$1,5 \pm 0,6 \times 10^{-7}$	$74,0 \pm 3,6$ ##
rofecoxib+SC-560 ( $10^{-7}$ M)+tokoferol ( $10^{-7}$ M)	$8,9 \pm 3,2 \times 10^{-8}$	$80,5 \pm 4,3$ *

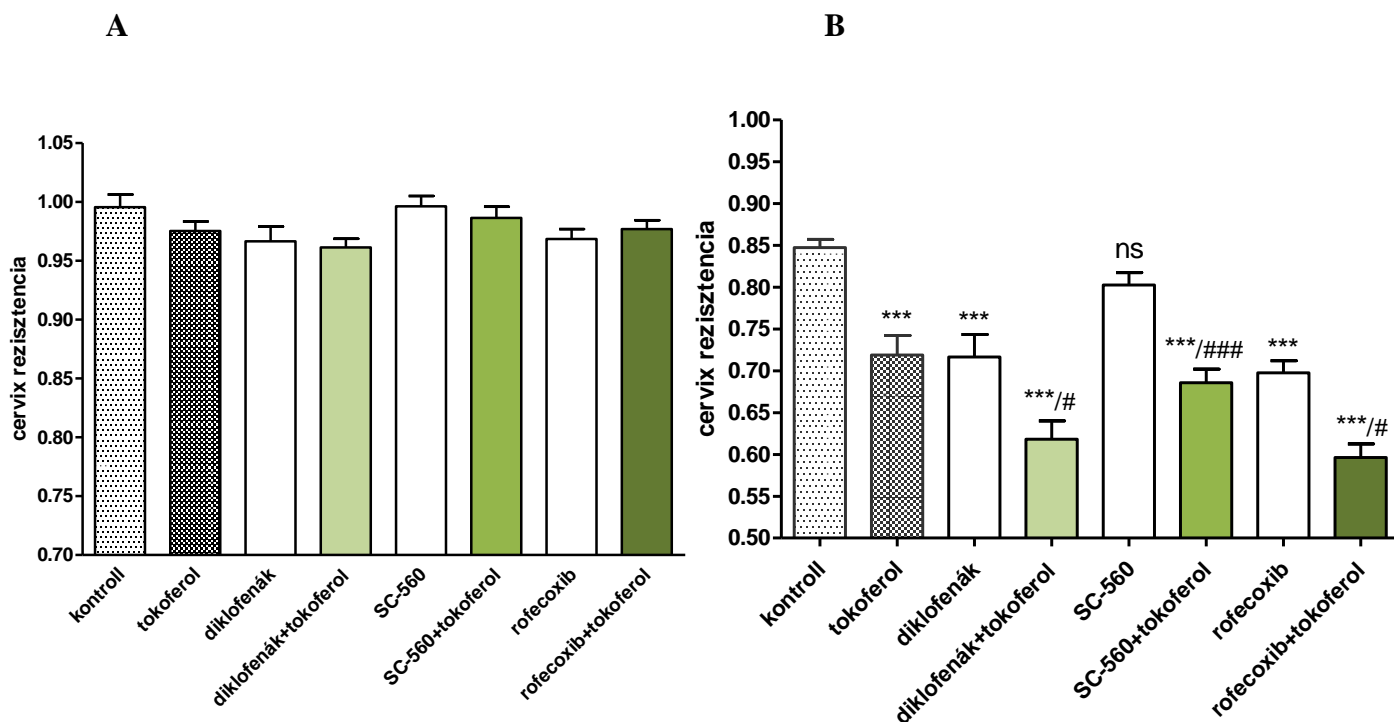
**89. ábra.** A diklofenák és a rofecoxib hatása a 22. napos terhes patkány uterusz kontrakciókra szelektív COX gátlók és tokoferol ( $10^{-7}$  M jelenlétében) (n=6/csoport). A kontrakciókat 25 mM KCl-dal váltottuk ki izolált szervfürdőben. A tokoferollal történő előkezelés után a diklofenák és a rofecoxib hatása is fokozódott (A, C). A COX-2 szelektív gátló rofecoxib nem befolyásolta a diklofenák hatását, de kivédte a tokoferol fokozó hatását (B). A COX-1 szelektív SC-560 tovább növelte a rofecoxib gátló hatását és tovább fokozta a tokoferol növelő hatását is (ld. táblázatos rész). \*p<0,05; \*\*p<0,01 a tokoferol nélküli azonos értékhez viszonyítva; ##p<0,01 a rofecoxib hatásához viszonyítva.

A teljes COX-aktivitás tekintetében nem volt különbség a nem vemhes és a 22. napos vemhes uterusok között, sőt még a tokoferol előkezelés ( $10^{-7}$  M) sem módosította a nem vemhes értékeket. Ugyanakkor a vemhes uterusban a teljes COX aktivitást a tokoferol előkezelés szignifikánsan növelte (90. ábra A). A COX-1 enzim aktivitása nem változott a szövetekben tokoferol jelenlétében (90. ábra B), a COX-2 enzim aktivitása azonban jelentősen fokozódott (90. ábra C).



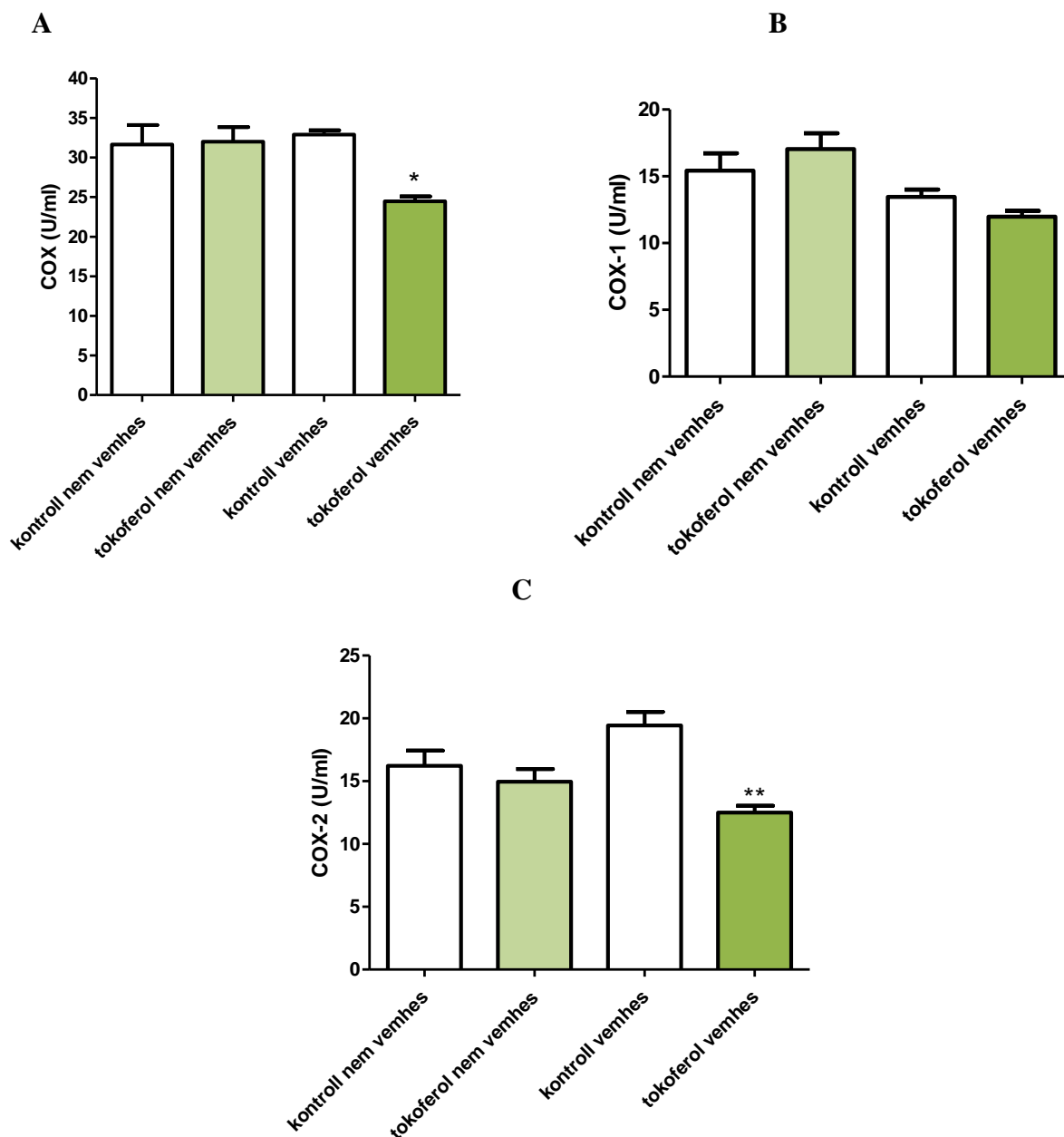
**90. ábra.** Tokoferol hatása a COX aktivitására a nem vemhes és 22. napos vemhes patkány uterusban (n=6/csoport) (A) A tokoferollal ( $10^{-7}$ M) történő előkezelés csak a vemhes méhben növelte a teljes COX-enzim aktivitást. (B) A COX-1 aktivitás nem változott tokoferol jelenlétében sem. (C) A COX-2 aktivitását a tokoferol jelenléte fokozta a vemhes szövetekben. T: tokoferol; \*\*\* $p < 0,001$  a nem vemhes uteruszhoz képest

A COX-gátlók és a tokoferol hatását nem vemhes és 22 napos vemhes cervixeken is megvizsgáltuk. Nem vemhes szöveteken sem a COX-gátlók, sem pedig a tokoferol nem fejtett ki hatást (**91. ábra A**). A 22. napos vemhes mintákban -már korábban igazolt módon-, a cervix rezisztencia alacsonyabb volt, mint a nem vemhes mintákban. A tokoferol és a diklofenák igen nagymértékben csökkentette a rezisztenciát, mely hatás tovább erősödött a két vegyület kombinációjával. A szelektív COX-1-gátló SC-560 önmagában nem befolyásolta a cervix rezisztenciát, de tokoferollal együtt a tokoferol önálló hatásánál nagyobb gátlást fejtettek ki. A szelektív COX-2 gátló rofecoxib önállóan a tokoferolhoz és a diklofenákhoz hasonló mértékű rezisztencia csökkenést eredményezett, a tokoferollal való kombinációja a legnagyobb mértékű cervix rezisztencia csökkenést eredményezte (**91. ábra B**).



**91. ábra.** A tokoferol ( $10^{-7}$  M), a COX-gátlók ( $10^{-6}$  M) és a tokoferollal kombinált COX-gátlók hatása a patkány cervix rezisztenciára nem vemhes (A) és 22. napos vemhes (B) mintákon ( $n=6$ /csoport). A cervix rezisztenciát izolált szervfürdőben nyújtási teszttel mértük. (A) Sem a tokoferol, sem a COX-gátlók nem befolyásolták a cervix rezisztenciát a nem vemhes szöveteken. (B) A tokoferol, a diklofenák és a rofecoxib csökkentette a cervix rezisztenciát a vemhes szöveteken. A tokoferollal való kombináció fokozta a COX-gátlók hatását. (ns: nem szignifikáns; \* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$  a kontroll oszlophoz képest; # $p<0,05$ ; ### $p<0,001$  az előző oszlophoz képest).

A teljes COX aktivitás a nem vemhes és vemhes cervixek esetében egyforma volt. A tokoferollal előkezelt nem vemhes és vemhes szövetekben a COX-1 aktivitása nem változott, míg a vemhes mintákban a COX-2 aktivitás jelentősen csökkent (**92. ábra**).

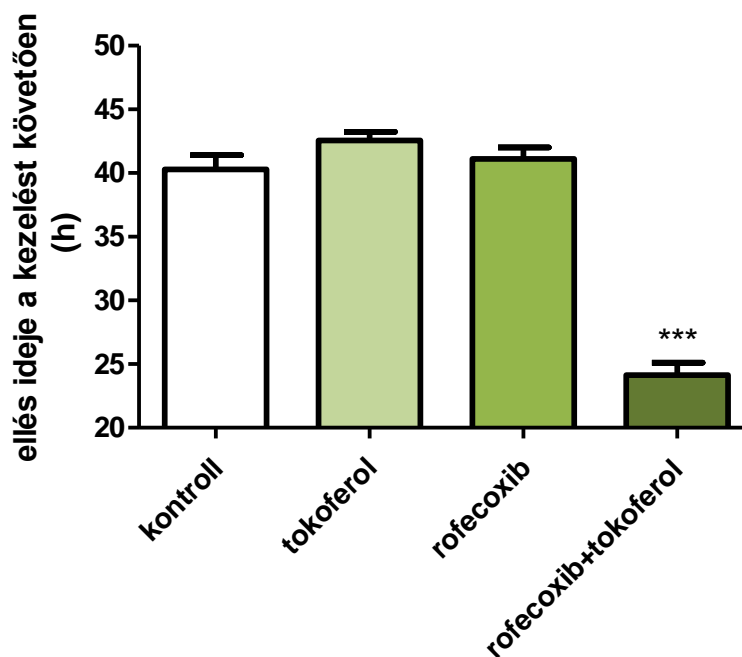


**92. ábra.** A cervikális COX aktivitás változása nem vemhes és 22. napos vemhes patkányokban tokoferol ( $10^{-7}$  M) jelenlétében (n= 6). (A) Nem volt különbség a nem vemhes és a vemhes COX aktivitás között. A tokoferol kizárólag a vemhes cervixben csökkentette a teljes COX enzim aktivitást. (B) Nem volt különbség a nem vemhes és a vemhes COX-1 aktivitás között, melyen a tokoferol jelenléte sem változtatott. (C) Nem volt különbség a nem vemhes és a vemhes COX-2 aktivitás között sem, azonban a vemhes COX-2 aktivitás tokoferol jelenlétben csökkent. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  a vemhes kontrollhoz viszonyítva

Mivel a tokoferol hatása fokozta a COX-2 gátló rofecoxib uterus relaxáló hatását, viszont kifejezetten gyengítette a cervix rezisztenciát, ezért megvizsgáltuk, hogy per os kezelést követően hogyan módosul az ellés ideje in vivo. A kontroll patkányoknál az ellés a vivőanyag kezelés után 40 órával következett be. Sem a tokoferol, sem pedig a rofecoxib kezelés önmagában nem volt képes változtatni az ellés kezdetének időpontján. A tokoferol



és a rofecoxib együttes alkalmazása esetén azonban az ellés 16 órával korábban indult be a kontrollcsoporthoz képest (93. ábra).



**93. ábra.** Az ellés kezdő időpontjának változása tokoferol, rofecoxib és tokoferol+rofecoxib hatására (n=8/csoport). A patkányokat a vemhesség 21. napján kezeltük per os tokoferollal (250 mg/kg), rofecoxibbal (5 mg/kg), illetve a kettő kombinációjával. A kontroll csoport 1 ml vizet kapott. Az ellés kezdete a rofecoxibbal kombinált tokoferol kezelés hatására korábban következett be. \*\*\* $p < 0,001$  a kontroll csoporthoz viszonyítva.

## 6. Megbeszélés

### 6.1. Az adrenerg hatások jelentősége az uterusz és a cervix kontraktilitásában

#### 6.1.1. Adrenerg hatások az uteruszban

Vizsgálatainkat megelőzően az  $\alpha_1$ - és  $\alpha_2$ -AR altípusok tekintetében nem álltak rendelkezésre adatok a vemhességi méhkontrakciókban betöltött szerepüket illetően. Vemhes patkányban kimutattuk, hogy az  $\alpha_1$ -AR altípusok közül csak az  $\alpha_{1A}$ - és  $\alpha_{1D}$ -AR játszik szerepet az összehúzódásokban, míg az  $\alpha_{1B}$ -AR nem expresszálódik. A két azonosított altípus gátlásával csökkennek a kontrakciók, mely hatás az  $\alpha_{1A}$ -AR esetén a vemhesség előrehaladtával egyre érzékenyebb lett a specifikus antagonistára (5-MU). Az  $\alpha_{1D}$ -AR esetén a vemhesség utolsó, 22. napján kifejezett érzékenységek csökkenés volt megfigyelhető. Ezek alapján arra következtetésre jutottunk, hogy az  $\alpha_{1A}$ -AR lehet az egyik olyan célpont, amivel késői vemhes méhkontrakció eredményesen gátolható, ami előnyös lehet a  $\beta_2$ -AR agonista szerek ismert terápiás deszenzitizációjával, illetve hipertóniát indukáló mellékhatásukkal szemben [165], hiszen az  $\alpha_{1A}$ -AR gátlása nem jár a hatás csökkenéssel a vemhesség előrehaladtával, illetve vérnyomáscsökkentést is eredményezhet [166].

Az  $\alpha$ -adrenerg és a szerotonerg rendszer közötti kooperáció ismert [68], ugyanakkor az uterusz kapcsán nem álltak rendelkezésre adatok arra nézve, hogy a két rendszer különböző receptor altípusai között van-e kapcsolat a méhkontrakció szabályozásában. Kimutattuk, hogy az inverz agonista 5-MU képes gátolni az 5-HT kiváltotta vemhes uterusz kontrakciókat, illetve, hogy a kontrakció gátló hatása tovább fokozható 5-HT<sub>1A</sub>-R gátló vegyület (WAY100135) jelenlétében. Mindez azt sugallja, hogy az 5-MU gyenge 5-HT agonista hatással is bír, amely gyengítheti az uterorelaxáns hatását. Ezek alapján feltételezzük, hogy a tokolitikus terápia céljából fejlesztendő altípus-szelektív  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistáknak minél kisebb 5-HT<sub>1A</sub>-R agonista aktivitással kell rendelkezni annak érdekében, hogy minél nagyobb relaxáló hatást tudjanak kifejteni.

Az  $\alpha_2$ -AR altípusok uterusz kontraktilitásában betöltött szerepe vizsgálatainkat megelőzően nem volt ismert. Csupán a receptorok lokalizációját azonosították a késői vemhes patkányok miometriumban [167]. Mindhárom  $\alpha_2$ -AR altípust azonosítottuk a 22. napos vemhes patkány uteruszban, melyek közül az  $\alpha_{2C}$ -AR altípust elsőként identifikáltuk ebben a

szövet típusban, mivel a korábbi vizsgálatok érzékenysége erre nem volt alkalmas [168]. A kontraktilitási vizsgálatok során NA-nal váltottunk ki kontrakciókat melyek az  $\alpha_1$ - és  $\beta$ -AR blokkolók (doxazosin, propranolol) jelenléte miatt csak az  $\alpha_2$ -AR-okon keresztül alakulhattak ki. Három olyan vegyületet használtunk a vizsgálatok során, amelyek antagonistaként elfogadható szelektivitással rendelkeztek egy vagy két altípusra. A BRL44408 az  $\alpha_{2A}$ -AR, az ARC239 az  $\alpha_{2B/C}$ -AR, a spiroxatrine pedig az  $\alpha_{2C}$ -AR szelektív antagonistájának tekinthető [169–171]. A három altípus-szelektív vegyület segítségével megvizsgáltuk, hogy a simaizomzat összehúzódásának és relaxációjának szabályozásában szerepet játszó egyes  $\alpha_2$ -AR altípusok stimulációja hogyan változtatja meg a kontrakciókat, illetve a szöveti cAMP-szintet. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a késői vemhes uterusban az  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztül csak gyenge összehúzódások jönnek létre, míg az  $\alpha_{2B}$ -AR stimulációja erős kontrakciókat eredményez. Úgy tűnik, hogy az  $\alpha_{2C}$ -AR is csökkenti a kontrakciókat, mivel az  $\alpha_{2B}$ -AR által közvetített kontrakciós válasz jelentősen megnő, amikor az  $\alpha_{2C}$ -AR-t blokkoljuk. A relaxációs válaszokhoz kapcsolódóan emelkedik szöveti cAMP szint is, ami választ ad a szignálmechanizmusra. Ugyan az intracelluláris cAMP-szint emelkedés szokatlan az  $\alpha_2$ -AR stimulációt követően, úgy tűnik, hogy a vemhesség a G-protein aktivációt megváltoztatja, ahogyan azt a  $\beta$ -adrenerg rendszerben 22. napos vemhes patkányoknál már igazoltuk [81]. Emellett az is ismert, hogy a patkányban a vemhesség során megváltozhat az  $\alpha_2$ -AR  $G_i/G_s$ -aktiváció, ami a miometriális adenil-cikláz aktivitás eltérő szabályozását eredményezi a vemhesség végén a gesztációs középidőszakhoz képest [172].

Mivel az ARC239 kifejezett relaxáló hatást fejtett ki az NA által stimulált kontrakciókra; ezért hatékonyságát kipróbáltuk hormonális koraszülés modellből származó uteruszöveten is in vitro, amelyben gátló hatása jelentős volt, kb. felére csökkentette a kontrakciókat. A NA kontrakciót fokozó hatása elmaradt ugyan a normál vemhességből származó szövetekhez képest, de ez várható volt, hiszen a koraszülés modellben az alapkontraktilitás már eleve jelentősen megemelkedett, így annak fokozása valószínűleg már csak kisebb mértékben lehetséges a NA által.

Ezek alapján megállapítható, hogy 22 napos vemhes patkányok uteruszában az  $\alpha_{2B}$  -AR-ok dominálnak és közvetítik a kontrakciót, míg az  $\alpha_{2A}$  - és  $\alpha_{2C}$  -AR-okon keresztül a NA összehúzó hatása csökken. Amennyiben ezek a szabályszerűségek a humán uterusban is fennállnak, akkor  $\alpha_{2A}$  - és  $\alpha_{2C}$  -AR-ok stimulálása vagy az  $\alpha_{2B}$  -AR gátlása új támadáspontot kínál a tokolitikus terápia számára.

### 6.1.2. Adrenerg hatások a cervixben

A terhesség végén a cervix érése és tágulása az egyik kulcs lépése a szülési folyamatnak, ugyanakkor a korai cervix érés jelentős kockázatot jelent a koraszülés tekintetében [173]. A tokolitikus terápia szempontjából a hatóanyagok cervikális hatásai épp olyan fontosak lehetnek a sikeres kezelés szempontjából, azonban erre vonatkozó adatok és vizsgálatok csak nagyon limitáltan elérhetők. Ezért 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  $\beta_2$ -AR agonista hatás cervikális következményeit vizsgáltuk a vemhesség 18., 20., 21 és 22. napjain in vitro cervix rezisztencia modellen. 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  $\beta_2$ -AR agonista hatás jól ellensúlyoz. A hatás hátterében igazoltuk a  $\beta_2$ -AR receptorok jelenlétét, melyek expressziója megemelkedett a nem vemhes cervixhez képest, ugyanakkor nem változott a 18-22. nap között, így a receptor expresszió nem magyarázza a vemhesség legvégén mérhető jelentősebb rezisztencia fokozó hatást. Ugyanakkor igazoltuk, hogy a cervix szövetekben a terbutalin indukált G-protein aktiváció egyre csökken a gesztációs idő előrehaladtával. Ezek alapján a terbutalin simaizom rezisztencia növelő hatást fejt ki a vemhes patkány cervixen, ami az aktivált G-protein csökkent szintjével magyarázható. Vizsgálatainkban elsőként mutattuk ki a terbutalin G-protein-gátló hatását. Korábban erre a propranolol esetében volt csak példa [174]. A terbutalin felfedezett cervix rezisztencia növelő hatása hozzájárulhat a  $\beta_2$ -AR agonisták klinikai alkalmazásának további mérlegeléshez a szülészetben.

A  $\beta_2$ -AR agonista hatások mellett az  $\alpha$ -AR antagonisták hatásai sem voltak ismertek a cervixben. Az  $\alpha_1$ -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. Ráadásul az inverz agonista altípus szelektív szerek közül csak az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonisták képesek fokozni a cervix rezisztenciát, a többi altípuson keresztül hatást nem tudunk kiváltani. Az  $\alpha_{1A}$ -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, PTX szenzitív G-protein aktiválódás is igazolt. Mivel a PTX a  $G_i$ -fehérjék aktivációját gátolja [175], így az  $\alpha_{1A}$ -AR

gátlással létrejövő cervix rezisztencia fokozódás is feltehetően  $G_i$ -fehérjékhez kapcsolódik. Az  $\alpha_{1A}$ -AR gátlása fokozza a cervix rezisztenciát és ez hozzáadódik az uterusz kontrakciót gátló hatáshoz, mely együttesen szintén ígéretes lehet potenciális tokolitikus szerek új hatásmechanizmusaként.

Az  $\alpha_1$ -AR altípusokhoz hasonlóan az  $\alpha_2$ -AR altípusok szerepéről sem állt rendelkezésre semmilyen információ a cervix rezisztencia tekintetében. Mindhárom  $\alpha_2$ -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  $\alpha_2$ -AR altípusok NA általi stimulációjának cervix rezisztenciára kifejtett hatásait a szöveti cAMP szint változással párhuzamosan mértük az uterusz esetén már alkalmazott altípus szelektív gátló vegyületek jelenlétében. A NA által kiváltott cervix rezisztencia változások teljes összhangban voltak az intracelluláris cAMP szint változásával. A 18. napon az ARC239 jelenlétében csak az  $\alpha_{2A}$ -AR-ok maradtak szabadon; ennek az altípusnak a stimulálása a cAMP-szint csökkenésével együtt növelte cervix rezisztenciát, míg ugyanez a 20. napon ellentétes hatást eredményezett. A  $\alpha_{2A}$ -AR szerepét alátámasztotta, hogy a BRL44408 ( $\alpha_{2A}$ -AR -antagonista) képes volt blokkolni a NA hatását. Másrészt a spiroxatrine ( $\alpha_{2C}$ -AR-antagonista) jelenlétében a NA hatása megszűnt. Mivel a rendelkezésre álló antagonistákkal nem tudunk tiszta  $\alpha_{2A}$ -AR stimulációt biztosítani, így csak feltételezhetjük, hogy a NA által kiváltott cervix rezisztencia változásokban az  $\alpha_{2A}$ -AR is részt vesz. Ezt támasztja alá, hogy a  $\alpha_{2A/C}$ -AR-ok együttes blokkolása (BRL44408 + spiroxatrine) szintén gátolta a NA hatását.

Az  $\alpha_2$ -AR klasszikusan a PTX-érzékeny  $G_i$ -fehérjéhez kapcsolódik [176], de bizonyos körülmények között a  $G_s$ -fehérjékhez is kapcsolódhatnak, ami az adenil-cikláz aktiválásához vezet [177]. A 18. vemhességi napon a PTX jelenlétében a bazális szöveti cAMP szint fokozódott és a cervix rezisztencia csökkent. A NA önmagában és ARC239 jelenlétében ( $\alpha_{2A}$ -AR stimuláció) kifejtett hatását a PTX megszüntette, ami az  $\alpha_{2A}$ -AR (és esetleg az  $\alpha_{2C}$ -AR)  $G_i$ -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 ARC239 jelenlétében kifejtett hatását, ami arra utal, hogy a 20. napon az  $\alpha_{2A}$ -AR (és  $\alpha_{2C}$ -AR)  $G_s$ -fehérje kapcsolatos lehet. Az  $\alpha_2$ -AR-ok hajlamosak a homo- és heterodimerizációra, illetve, ha az  $\alpha_{2A}$ -és  $\alpha_{2C}$ -AR-ok egyidőben expresszálódnak, akkor nagyobb a valószínűsége annak, hogy a két AR inkább heterodimereket képez [178,179]. Eredményeink azt mutatják, 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 spiroxatine jelenlétében is megmaradt. Ebből arra lehet következtetni, hogy ezen a vemhességi napon a hatás közvetítésében valószínűleg az  $\alpha_{2A}$ - és  $\alpha_{2B}$ -AR-ok játszanak szerepet, míg az  $\alpha_{2C}$ -AR nem vesz részt a hatásban. PTX-kezelést követően a NA önálló, illetve spiroxatine jelenlétében kifejtette hatása megszűnt, azaz a 21. vemhességi napon az agonista hatás túlnyomórészt  $G_i$ -fehérje kapcsolatan valósul meg.

A 22. napon azonban a NA nem tudta befolyásolni az egyébként jelentősen csökkent cervix rezisztenciát, valamint nem volt hatással a cAMP termelődésre sem. Mivel valamennyi altípus kimutatható a cervixben a 22. vemhességi napon is, ezért feltételezzük, hogy  $\alpha_2$ -AR-ok  $G$ -fehérje kapcsoltsága a vemhesség utolsó napján lényegében megszűnik és nem lehet hatást kifejteni a receptorokon keresztül.

A vemhesség 18-22. napjain a cervikális  $\alpha_2$ -AR-ok cervix rezisztenciára kifejtett hatását és  $G$ -protein kapcsoltságát a **2. táblázat** foglalja össze.

Patkány cervix	$\alpha_{2A}$ -AR		$\alpha_{2B}$ -AR		$\alpha_{2C}$ -AR	
	<i>G-fehérje</i>	<i>Rezisztencia</i>	<i>G-fehérje</i>	<i>Rezisztencia</i>	<i>G-fehérje</i>	<i>Rezisztencia</i>
Vemhességi napok						
18.	$G_i$	nő	-	-	$G_i$	nő
20.	$G_s$	csökken	-	-	$G_s$	csökken
21.	$G_i$	nő	$G_i$	nő	-	-
22.	-	-	-	-	-	-

**2. táblázat.** Az  $\alpha_2$ -AR-ok  $G$ -protein kapcsoltsága és cervix rezisztenciára kifejtett hatásai a vemhesség különböző napjain patkányban.

Mindezek alapján patkányban a vemhesség végén a vemhességi napoktól függően változhat az altípus szelektív  $\alpha_2$ -AR antagonisták hatása, az  $\alpha_{2B/C}$ -AR gátlók a cervix rezisztencián keresztül összességében kedvező hatást fejthetnek ki a koraszülés megakadályozására.

## 6.2. Az adrenerg kombinációk jelentősége a vemhes uterusz kontrakciók gátlásában

A koraszülés okai összetettek és részben tisztázatlanok, így nem várható, hogy monoterápiában bármely hatóanyag is képes legyen a tokolízis során megfelelni a terápiás elvárásoknak [180]. Ezért olyan hatóanyag kombinációkkal végeztünk preklinikai vizsgálatokat, melyek alkalmasak lehetnek e terápiás kihívás megoldására.

### 6.2.1. $\beta_2$ -AR agonista kombinációk jelentősége

A legtöbb kombinációs variációt a  $\beta_2$ -AR agonista hatóanyagokkal teszteltük tekintettel arra, hogy a  $\beta_2$ -AR agonistákkal áll rendelkezésre a legtöbb klinikai tapasztalat a tokolízis kapcsán, bár mellékhatásaik és korlátozott hatékonyságuk miatt önállóan nem nyújtanak kielégítő terápiát és egyes irányelvek szerint –főleg a mellékhatások miatt– nem alkalmazhatók tokolízisre [181]. Ugyanakkor kombinációban az alkalmazandó dózis és ezáltal a mellékhatások is csökkenthetők.

Legelőször azt vizsgáltuk, hogy a **P4** előkezelés képes-e fokozni a terbutalin vemhesség végére csökkenő relaxáló hatását. Mindezt arra a korábbi eredményre alapoztuk, mely szerint a P4 jelenléte vagy hiánya megváltoztathatja a  $\beta_2$ -AR agonisták vemhes uterusra gyakorolt hatását [182]. Egy vizsgálatban izolált humán miometriumon már igazolták a P4 potenciáló effektusát a  $\beta_2$ -AR agonista ritodrin relaxáló hatására, de a mechanizmust nem tisztázták [183]. Az általunk 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 vemhesség 22. napján a terbutalin relaxáló hatását, így bizonyítottuk, hogy a P4 meghatározó tényező a terbutalin uterorelaxáns hatása szempontjából. A fokozódás hátterében részben a P4 -mások által is leírt és általunk is igazolt-  $\beta_2$ -AR expressziót fokozó hatása áll az uterusban [184]. Korábbi eredmények alapján azt is feltételezhető volt, hogy az uterusban a nemi hormonok szerepet játszanak a G-fehérjék szabályozásában is [185]. Ennek kapcsán igazoltuk, hogy P4 kezelés képes módosítani a terbutalin kiváltotta  $\beta_2$ -AR-on keresztüli G-fehérje aktivációt a vemhesség utolsó napján, és a G-protein aktiválódás csökkenéséből növekedést eredményezett. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a terbutalin hatásának csökkenését a késői vemhességben a P4 plazmaszintjének esése okozza, ami a  $\beta_2$ -AR-okhoz kapcsolt aktivált G-fehérjék mennyiségének jelentős csökkenését eredményezi. Így P4 szint emelése patkányban a vemhesség végén elősegíti a  $\beta_2$ -AR agonista hatás fokozódását. Ennek további igazolására in vivo koraszülés modellben vizsgáltuk meg a kombináció hatásosságát. Vizsgálatainkban  $\beta_2$ -AR agonistaként salmeterolt használtunk, mivel a hatóanyaggal kapcsolatosan rendelkezésre állt olyan dózis a szakirodalomban, amivel sikerült izomnövekedést indukálni, azaz szisztémás hatást elérni patkányban [83]. Így abból indultunk ki, hogy a szisztémás hatású salmeterol nagy valószínűséggel vemhes méhizomzat gátló hatást is képes kifejteni. A salmeterollal kombinációban mind P4-t, mind pedig a terápiában preventív céllal sok évig használt 17OHP-t 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<sub>2</sub> beadása előtti 1 napos gesztagénkezelés is potenciózta a salmeterol hatását. Mindez azt sugallja, hogy a gesztagének szinergizáló hatása gyorsan, 1 napon belül kialakulhat. 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  $\beta_2$ -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  $\beta_2$ -AR agonistákat **Ca<sup>2+</sup> -csatorna blokkolókkal** is kombináltuk, melyre nifedipint használtunk. A Ca<sup>2+</sup> -csatorna blokkolók mellékhatásai és korlátjaik ellenére is jelentős szerepet tölthetnek be a tokolitikus terápiaiban kombinációs alkalmazás során is [186]. Korábban kimutatták, hogy a dihidropiridineket kötő L-típusú Ca<sup>2+</sup> csatornák expressziója több mint háromszorosára nő a vemhesség végén patkány miometriumban [187], ezért 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 potenciózta 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, ami azt sejteti, hogy a  $\beta_2$ -AR agonisták mellékhatásai nifedipinnel történő együttes alkalmazás során dóziscsökkenéssel mérsékelhetők lehetnek. A biztató in vitro eredmények alapján a nifedipin-salmeterol kombináció hatékonyságát hormonálisan indukált koraszülés modellben is megvizsgáltuk. A korábbi vizsgálatokban már bevált salmeterol dózis alkalmaztuk, míg a nifedipin esetén a vemhes patkányokban a hatóanyagra megadott farmakokinetikai paraméterek felhasználásával terveztük meg az adagolást, mely az irodalmi adatok alapján nem okoz jelentős változásokat a szívfrekvenciában vagy a vérnyomásban, de kifejezett uterorelaxáns hatással bír [188]. 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.



vevhességi napon megkezdett rövidebb távú kezelés 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 koraszüléssel vizsgálataink során és ezért ígéretes kombinációnak tűnik egy esetleges klinikai kipróbálásra elsősorban preventív céllal, bár akut esetben sem zárható ki hatásossága.

A **PDE-gátlókkal** való kombináció során a patkány kísérletekben a normál vemhességből származó uterus mellett az LPS indukált, gyulladásos koraszülés modellből származó szöveteken is végeztünk vizsgálatokat. Mivel a gyulladás szerepet játszik a korai fájástevékenység létrejöttében [189], ezért előnyös lehet gyulladáscsökkentő hatással rendelkező tokolitikumok alkalmazása is. Mind a  $\beta_2$ -AR agonisták, mind a PDE4-gátlók gyulladáscsökkentő hatása is ismert [190–192], így kombinációjuk is ígéretes a gyulladásos hátterű koraszülés kezelésében. Az immunsejtekben, ahol a PDE4 nagy mennyiségben fordul elő, a megnövekedett cAMP-szint gátolja a gyulladásos mediátorok, citokinek és a ROS szintézisét és felszabadulását [193]. A PDE4 gátlók klinikai alkalmazása behatárolt, mivel monoterápia esetén mellékhatásként nehezen tolerálható hányinger és hányás jelentkezik [194], de egy hatásos kombináció esetén a PDE4 gátlók dózisának csökkentésével ezen mellékhatás intenzitása is mérsékelhető. 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 további megerősítése annak, hogy a cAMP-függő mechanizmusok gyulladás esetén jelentős szerepet játszanak a méhben. Az uterusban a terbutalin vagy a rolipram önmagában csak kismértékben tudta fokozni a szöveti cAMP-szintet. A terbutalin és a rolipram kombinációjának jelentős uterorelaxáns hatását a szöveti cAMP-szint emelkedés is igazolta, a legmagasabb értékeket az LPS-kezelt patkányoknál találtuk. Megfigyeléseink összhangban vannak azzal a korábbi klinikai megfigyeléssel, hogy a cAMP lebomlásának PDE4-gátlókkal történő megakadályozása erősíti a  $\beta_2$ -AR agonisták simaizom relaxáns hatását a légutakban asthma bronchiale és krónikus obstruktív tüdőbetegség esetén [195]. Gyulladás esetén a késői vemhes uterus nagyobb érzékenységgel reagált 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 uterusban is fokozta a terbutalin relaxáló hatását a normál és koraszüléssel terhességéből származó mintákon, potenciáló hatása a legkifejezettebb alacsonyabb terbutalin koncentráció és koraszülés esetén volt. A szöveti cAMP-szintek összhangban voltak az in vitro kontraktilitási vizsgálatok eredményeivel, ami arra utal, hogy a szinergizmus hátterében az intracelluláris cAMP-szint emelkedése áll. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy négy PDE4 izoenzim expresszálódik a humán terhesség végén a miometrium citoszol frakciójában [196], valamint, hogy a PDE4 gátlók nagyobb hatékonyságot mutatnak a terhes, mint a nem terhes miometriumban [197]. Az is ismert volt, hogy a PDE4 izoenzimjei szerepet játszanak a gyulladási folyamatokban [198], de vizsgálatainkig nem voltak adatok arra vonatkozóan, hogy miként expresszálódnak a koraszüléssel származó humán uterusban. Koraszüléssel mintákban a PDE4B expresszió növekedését mutattuk ki a normál terminusból származó szövetekhez képest, ami a koraszüléshez vezető gyulladási folyamatok következménye lehet. A PDE4D expressziója kisebb volt a normál terhességéből származó mintákban a PDE4B-hez képest, ami egybevág a korábbi tapasztalatokkal [199], 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 jelentősen csökken, vagy akár megszűnik a nemkívánatos hányást okozó mellékhatás [200]. Ezek alapján a  $\beta_2$ -AR agonisták és a szelektív PDE4-gátlók lehetséges terápiás kombinációi fokozhatják a humán tokolitikus terápia hatékonyságát. Az ilyen gyógyszerkombinációk előnye, hogy lehetővé teszik a  $\beta_2$ -AR agonisták alacsonyabb dózisainak beadását, ezáltal késleltetve a  $\beta_2$ -AR receptorok hatáscsökkenését. Az új PDE4B-szelektív gátlók fejlesztése tovább fokozhatja a tokolízis hatékonyságát és tovább mérsékelheti a mellékhatásokat.

Az egyik különleges  $\beta_2$ -AR agonista kombináció az **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  $\beta_2$ -AR-okon keresztül indukált cAMP-termelődést a 22. napos vemhes patkány uterusban. Az AKAP-PKA inhibitor jelenlétében a terbutalin koncentrációjának növelése 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 [201]. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a cAMP-szintézis szabályozását a miometriumban - a szívizomsejtekhez hasonlóan - a  $\beta_2$ -AR stimulációja által indukált cAMP-szintézist

megszüntető AKAP-PKA kapcsolódás szabályozza. Így az AKAP-PKA rendszerre ható kis molekulás inhibitorok a  $\beta_2$ -AR izgatókkal adva szintén egy lehetséges új kombináció a koraszülés terápiájára.

Az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistákkal (5-MU, WB4101) való kombináció jelentősen növelte a  $\beta_2$ -AR agonisták (terbutalin, ritodrin) uterorelaxáns hatását. Önmagában a vizsgált két  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistá hatékonyasága elmaradt a  $\beta_2$ -AR agonistákétól, ami azt sejteti, hogy monoterápiában valószínűleg nem lesznek elegendők a megfelelő terápiás hatáshoz. Ugyanakkor a kombinációban tapasztalt  $\beta_2$ -AR agonista  $EC_{50}$  érték jelentős csökkenése és az  $E_{max}$  növekedése lehetőséget adhat  $\beta_2$ -AR agonista dózis csökkentésére, így kisebb lehet a tokolitikus terápia súlyos mellékhatásainak kockázata, amelyet általában a nagy dózisban alkalmazott  $\beta_2$ -AR agonisták okoznak. Az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistákkal való kombináció alkalmas lehet a terhességi toxémia (preeclampsia) kezelésére is, mely fokozott szimpatikus aktivitással jár együtt [202]. A kombináció előnyös lehet még olyan terhesség esetében is, ahol az anya hipertóniában szenved, mivel az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistá vérnyomáscsökkentő hatást is kifejthet, ráadásul magas vérnyomás esetén egyébként is nagyobb a koraszülés kockázata [203]. Az  $\alpha_{1A}$ -AR antagonistákat a szülészeti gyakorlatban nem alkalmazzák, ugyanakkor érdemes lenne klinikailag is megvizsgálni a  $\beta_2$ -AR agonistákkal való együttes alkalmazásuk lehetséges előnyeit a tokolitikus terápiában.

### 6.2.2. $\alpha_1$ -AR antagonistá kombinációk jelentősége

A nemi hormonoknak és az adrenerg rendszernek is jelentős szerepe van a terhesség alatti uterusz kontrakciókban, ezért megvizsgáltuk az E2 és a P4 előkezelés hatását az  $\alpha_1$ -AR altípusok működésére és expressziójára a késői vemhes patkány uteruszban in vitro. A NA  $\alpha_1$ -AR-szelektív hatását az  $\alpha_2$ -AR gátló yohimbin és a nem szelektív  $\beta$ -AR antagonistá propranolol együttes adásával érték el. Az E2 és P4 előkezelés dózisékat és időtartamát olyan, részben saját korábbi vizsgálatok alapján választottuk ki, melyben a kezelést követően kimutatható volt a hormonok  $\beta_2$ -AR expressziót és működést megváltoztató hatása patkány uteruszon [81,204]. Azt feltételeztük, hogy ezek a dózisék elegendők ahhoz, hogy a többi adrenerg receptoron is változásokat indukáljanak. E feltételezésünk helyessége az eredmények alapján beigazolódott.

Mivel korábban igazoltuk, hogy  $\alpha_{1B}$ -AR-ok nem mutathatók ki a késői vemhes patkány uteruszban [67], ezért a kombinációs vizsgálatok során csak  $\alpha_{1A}$ - és  $\alpha_{1D}$ -AR-okra fókuszáltunk. Az E2 előkezelés csökkentette az  $\alpha_1$ -AR-okon keresztül a NA maximális

összehúzó hatását és jobbra tolta a NA koncentráció-válasz görbét, ami a receptorok NA iránti csökkent érzékenységét jelzi. Ez ellentétes a korábbi megfigyeléssel, mely szerint az ellés előtt 6 órával végzett E2-előkezelés az  $\alpha_1$ -AR-ok expressziójának növekedését és fokozott válaszkészséget okozott [205]. A P4 előkezelés több mint felére csökkentette a NA maximális összehúzó hatását, összhangban a korábbi megfigyelésekkel [206]. Az altípus szelektív  $\alpha_1$ -AR blokkolók jelenlétében a NA hatása csökkent, ami megerősíti, hogy mind az  $\alpha_{1A}$ -AR, mind pedig az  $\alpha_{1D}$ -AR részt vesz az uterusz kontrakciók létrehozásában.

Az  $\alpha_{1A}$ -AR blokkoló WB4101 jelenlétében a NA csak az  $\alpha_{1D}$ -AR-okat stimulálta. Sem az E2, sem a P4 nem változtatta meg az  $\alpha_{1D}$ -AR-ok mRNS expresszióját, ami nem ad magyarázatot arra, hogy a P4 előkezelés miért csökkentette a NA hatását. Az E2 előkezelés nem okozott semmilyen változást, míg a P4 előkezelés az  $\alpha_{1D}$ -AR-on keresztül csökkentette a NA  $EC_{50}$  és  $E_{max}$  értékeit. A jelenség okainak feltárása érdekében végeztük el a [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötődési vizsgálatokat. Ismert, hogy az  $\alpha_1$ -AR-ok elsősorban  $G_{q/11}$ -proteinhez kapcsolódnak [207], ugyanakkor a [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötődési vizsgálat a teljes G-protein aktivációt méri. A WB4101 jelenlétében a NA mérsékelten növelte a [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S aktiválódást, amit a P4 előkezelést tovább fokozott. Mindez magyarázhatja a P4 okozta csökkent kontrakciós választ. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az  $\alpha_1$ -AR-ok bizonyos esetekben  $G_i$ -proteinhez is kapcsolódhatnak [208], ezért megvizsgáltuk a [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S aktiválódást a  $G_i$ -protein gátló PTX jelenlétében. PTX és WB4101 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  $\alpha_{1D}$ -AR  $G_i$ -proteinhez is kapcsolódik, valamint, hogy a P4 előkezelés az  $\alpha_{1D}$ -AR  $G_{q/11}$ -protein kapcsolódás gátlásához vezet, ami az intracelluláris  $Ca^{2+}$  és a NA által kiváltott kontrakciók csökkenését eredményezheti.

A BMY7378 jelenlétében a NA csak az  $\alpha_{1A}$ -AR-okat tudta stimulálni. A P4 előkezelés nem változtatta meg az  $\alpha_{1A}$ -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 $\gamma$ S-kötési vizsgálatokban az  $\alpha_{1A}$ -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 kezelést követően a P4 előkezelés kiváltotta G-fehérje stimuláció gátlássá változott, ami azt jelenti, hogy a P4-kezelést követően az  $\alpha_{1A}$ -AR esetében is csökken a  $G_{q/11}$ -protein kapcsoltság.

Mindezek alapján kijelenthető, hogy az  $\alpha_{1A}$ -AR expressziója erősen E2-érzékeny, ellentétben a korábbi adatokkal. A P4 előkezelésnek nincs hatása az  $\alpha_{1A}$ -, vagy  $\alpha_{1D}$ -AR

mRNS expressziójára, viszont hatással van a G-protein kapcsoltságra: a  $G_{q/11}$ -protein kapcsoltság gátlása révén csökkenti a vemhes uterusz kontrakciókat. Összeségében ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a nemi hormonok szintjének változása jelentősen befolyásolhatja az  $\alpha_1$ -AR altípusokon végbemenő jelátviteli folyamatokat, a P4 előkezelés erősíti a potenciálisan tokolitikus antagonisták uterorelaxáns hatását. Bár a preventív P4 kezelés hatékonysága vitatott, de egyes vizsgálatok szerint mégis meghosszabbítja a gesztációs időt [209], így a P4 prevencióban részesült veszélyeztetett várandósok  $\alpha_1$ -AR altípus szelektív antagonistákkal való kezelése fokozhatja az uterorelaxáns hatást és ezáltal a tokolitikus terápia hatékonyságát.

### 6.2.3. $\alpha_2$ -AR antagonista kombinációk jelentősége

Mivel feltételeztük, hogy a női nemi hormonok hatással vannak az  $\alpha_2$ -AR-ok expressziójára és működésére is, ezért olyan kísérletsorozatot is végeztünk, amelyben kifejezetten az  $\alpha_2$ -AR altípusok uterus kontraktilitásban játszott szerepének változását vizsgáltuk E2 vagy P4 előkezelést követően. Az előkezelések dózisa és időtartama megegyezett az  $\alpha_1$ -AR esetén végzett kísérletsorozatával. A kísérleteket az  $\alpha_1$ -AR blokkoló doxazosin és a nem szelektív  $\beta$ -AR blokkoló propranolol jelenlétében végeztük, hogy elkerüljük a NA  $\alpha_1$ - vagy  $\beta$ -adrenerg hatásait. Az  $\alpha_2$ -AR altípusok szerepét szelektív vagy részben szelektív antagonisták segítségével vizsgáltuk a NA kontrakciót fokozó képességének változásán keresztül 22. napos vemhes patkány uteruszon in vitro.

Az E2 előkezelés csökkentette az  $\alpha_2$ -AR altípusainak mRNS- és fehérjeexpresszióját, és az  $\alpha_2$ -AR-okon keresztül csökkentette a NA által kiváltott kontrakciót is, ami hasonló volt az  $\alpha_{1A}$ -AR eredményeinkhez [104]. Úgy tűnik, hogy az E2 eltérően befolyásolja az  $\alpha_2$ -AR-ok expresszióját a különböző szövetekben, mivel az uteruszal ellentétben a gerincvelőben és a bőr artériákban növeli a receptorok expresszióját [172,177].

Az izolált szervfürdő-vizsgálatokban az E2 előkezelés csökkentette az  $\alpha_2$ -AR-okon keresztül a NA által kiváltott kontrakciók nagyságát, de nem módosította az  $\alpha_{2A}$ -AR-okon keresztül a relaxáló hatást. Ugyanakkor megszüntette az  $\alpha_{2B}$ -AR-okon keresztül az összehúzóhatást fokozó hatást. Mivel nem állnak rendelkezésre olyan antagonisták, amelyek csak  $\alpha_{2C}$ -AR stimulációt válthatnánk ki (azaz  $\alpha_{2A/B}$ -AR blokkolók), így csak valószínűsíthető, hogy az E2 nem módosította az  $\alpha_{2C}$ -AR-okon keresztüli relaxáló hatást sem.

Annak érdekében, hogy magyarázatot találjunk az E2 előkezelést követő,  $\alpha_{2B}$ -AR altípuson keresztüli gyengébb kontrakciókra, megmértük az uteruszban a cAMP-szintet, mivel a cAMP részt vehet az  $\alpha_2$ -AR-ok uteruszra gyakorolt hatásának közvetítésében, mivel azok

nemcsak a  $G_i$ -fehérje  $\alpha$ -alegységéhez, hanem a  $G_s$ -fehérjékhez is kapcsolódhatnak [177]. Az E2 előkezelés növelte a cAMP-szintet, ami alátámasztja az  $\alpha_2$ -AR-okon keresztüli csökkent NA hatást. Az E2 előkezelés nem módosította a NA indukált cAMP-szint változást az  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztül, ugyanakkor fokozta azt az  $\alpha_{2B}$ -AR-okon keresztül, ami magyarázatot adhat a NA gyengébb kontrakciós hatására.

Az ösztrogének csökkentik az  $\alpha_2$ -AR-ok G-fehérjéhez való kapcsolódását [210]. A tapasztalt cAMP-változások háttérének további tisztázása érdekében megmértük az  $\alpha_2$ -AR altípusok NA stimulációja során mérhető [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S aktivációt E2 előkezelést követően és PTX jelenlétében. Az E2 nem módosította a NA  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztüli [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S aktivációját (ARC239 jelenlétében), azonban PTX kezelést követően az  $\alpha_{2A}$ - és  $\alpha_{2B}$ -AR-okon keresztül (spiroxatrine jelenlétében) csökkent a NA [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S aktiválódásra gyakorolt hatása, lényegében a stimuláció gátlásba fordult át. Ezek alapján az E2 előkezelés elsősorban az  $\alpha_{2B}$ -AR G-protein kapcsoltságát módosítja, míg az  $\alpha_{2A}$ -AR G-fehérje kötődését nem változtatja meg. Ennek további bizonyítására megmértük az  $\alpha_{2B}$ -AR altípuson keresztüli [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S aktivációt spiroxatrine + BRL44408 jelenlétében. Az E2 előkezelés csökkentette az aktivált G-fehérje mennyiségét, ami az  $\alpha_{2B}$ -AR kapcsán lehetséges, hogy az E2 indukált G-fehérjéktől való szétkapcsolódás következménye [210]. Ugyanakkor ez nem befolyásolta a NA kontrakciós hatását a hormonkezelt kontrollhoz képest. Az E2 előkezelés csökkentette az  $\alpha_2$ -AR altípusok expresszióját, és a vemhes uterusz cAMP-szintjének emelkedéséhez vezetett, de nem módosította az  $\alpha_{2A}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR-okon keresztül mediálódó uterusz relaxáló hatást. E receptorok esetében feltételezzük, hogy az E2 elsősorban a  $G_i$ -fehérje  $\beta\gamma$  alegységének aktiválódását idézi elő, ami a simaizom cAMP-szintjének emelkedését váltja ki, mivel ez az aktiváció felülírja a  $G_i$ -fehérje  $\alpha$  alegységének aktivációját kísérő cAMP gátló hatást [211].

A P4 előkezelés fokozta a 22 napos vemhes uteruszban az  $\alpha_2$ -AR altípusok mRNS és fehérje expresszióját, de csökkentette a NA által kiváltott kontrakciókat, ami megegyezik az  $\alpha_1$ -AR kapcsán mért P4 okozta változásokkal. A P4 előkezelés gyakorlatilag megszüntette a NA  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztüli kontrakciós hatását, emellett gátolta az  $\alpha_{2B}$ -AR-on keresztüli (BRL44408 és spiroxatrine jelenlétében) összehúzó hatását is. Feltételezzük, hogy a P4 az  $\alpha_{2C}$ -AR megnövekedett száma és fokozott működése révén idézi elő a NA hatásában tapasztalható csökkenést. A P4 előkezelés megnövelte az uteruszban a cAMP-szintet, ami az  $\alpha_2$ -AR-okon keresztüli csökkent NA hatást magyarázza. Az  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztül (ARC239 jelenlétében) nem növelte, azonban az  $\alpha_{2B}$ -AR-on keresztül (spiroxatrine +

BRL44408 jelenlétében) fokozta a cAMP-szintet, ami magyarázhatja a NA gyengébb kontrakciós hatását.

Ismert, hogy az  $\alpha_2$ -AR-ok  $G_i/G_s$ -protein aktiváló tulajdonsága patkányokban a vemhesség során megváltozik, ami különbségekhez vezet a vemhesség közepén és a terminusban is az uterusz adenil-cikláz aktivitásának szabályozásában [172]. Ezenkívül  $\alpha_1$ -AR kapcsán igazoltuk, hogy a P4 önmagában is változást idéz elő az  $\alpha_{1AD}$ -AR  $G_q/G_i$ -protein aktiváló tulajdonságában. Ezért azt is megvizsgáltuk, hogy a P4 módosítja-e az  $\alpha_2$ -AR altípusok [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S aktiváló képességét a  $G_i$  fehérje blokkoló PTX jelenlétében a vemhesség végén. A PTX kezelés után a P4 nem változtatta meg az  $\alpha_{2A}$ -AR-on keresztüli, ugyanakkor kifejezetten gátolta az  $\alpha_{2B}$ -AR-on keresztüli [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S aktivációt. Ebből arra következtetünk, hogy a P4 túlsúly esetén az  $\alpha_{2B}$ -AR -legalább részben-  $G_s$ -fehérjéhez kapcsolódik, ami az adenil-cikláz aktiválásához vezet, és csökkenti a NA által kiváltott kontrakciót. A P4 növeli az egyes  $\alpha_2$ -AR altípusok expresszióját, és csökkenti a NA által kiváltott uterusz kontrakciót a receptor altípusok összességén keresztül. A P4 gátolja a G-fehérje-kapcsolást és a cAMP-termelődést az  $\alpha_{2A}$ -AR-on. Az  $\alpha_{2C}$ -AR esetében, feltehetően az E2 előkezeléshez hasonlóan, a P4 a  $G_i$ -fehérje  $\beta\gamma$  alegységének aktiválódását indukálja, és így emeli az uterusz cAMP szintjét [211]. Az  $\alpha_{2B}$ -AR esetében a  $G_s$ -protein kapcsoltság meghatározó tényező a P4 kezelést követően, ami a cAMP-szint emelkedéséhez és a kontrakció csökkenéséhez vezet.

A humán szülés során ösztrogén túlsúly van [212,213], ugyanakkor az is előfordulhat, hogy magzatvízben kialakuló magas E2 szint fájásgyengességgel párosul [214]. Így az ösztrogén szint terhesség alatti diszregulációja változásokat okozhat az  $\alpha_2$ -AR altípusok működésében, és akár koraszülést vagy túlhordást eredményezhet. Másrészt a P4 iránti uterusz érzékenység csökken a terhesség végén, ami alapján azt feltételezzük, hogy ez fokozza az  $\alpha_2$ -AR-ok szerepét a kontrakciók létrejöttében. Összességében úgy gondoljuk, hogy az  $\alpha_{2C}$ -AR agonisták P4-nal való együtt adása terápiás értékű lehet egy kombinációs tokolitikus fejlesztés során.

### **6.3. A peptid támadáspontok jelentősége a vemhes uterusz kontrakciók gátlásában**

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

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

### 6.3.1. Nociceptin és nocistatin

A nociceptin és a nocistatin hatását és élettani szerepét elsősorban a központi idegrendszerben vizsgálták. Mindkét peptid a PPNOC prekursor fehérjéből származik, mely jelentős mennyiségben expresszálódik az agyban és a gerincvelőben, de az endogén ópiátokhoz hasonlóan a periférián is megtalálható (pl. fehérvérsejt, bőrszövet, petefészek, here) [215–217]. Számos endogén peptid vesz részt a méh kontraktilitásának szabályozásában (pl. oxitocin, tachykininek), amelyek elősegítik a kontrakciókat [218,219], de ismertek relaxáló peptidek is, mint amilyen a CGRP [111]. Mind a CGRP, mind pedig a tachykininek a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződésekben lokalizálódnak [220]. A vajúdás és a szülés fájdalommal jár, a nociceptin és nocistatin pedig szerepet játszanak a fájdalom percepciójában [221], ezért logikusnak tűnt megvizsgálni, hogy ezek a PPNOC eredetű peptidek a fájdalomérzet szabályozása mellett részt vesznek-e az uterusz kontrakciók szabályozásában is.

Igazoltuk, hogy a PPNOC lokálisan expresszálódik a vemhes patkány és a terhes humán uteruszban is. Patkányban a vemhesség végén lényegesen nagyobb expressziót mértünk, míg a terhes humán mintákban a koraszülésből származó uteruszokban volt magasabb a PPNOC expresszió. Patkányban a vemhesség végén az uteruszban megemelkedik a nociceptin és receptorának (ORL1) expressziója. A nocistatin esetében szintén a vemhesség végén mérhető a legmagasabb szint az uteruszban. ugyanakkor a plazmában mérhető szintje nem változik. Mindezek az eredmények azt támasztják alá, hogy PPNOC és a belőle keletkező nociceptin és nocistatin jelen vannak az uteruszban és lokálisan szabályozzák a működését. Vizsgáltuk azt is, hogy a nociceptin és nocistatin hogyan hatnak az uterusz kontrakciókra vemhes patkány és humán terhes uteruszon. A nociceptin gátolta a KCl által kiváltott ritmikus összehúzódásokat. Annak érdekében, hogy kizárjuk az ópiát receptorokon keresztüli hatást, nociceptin hatását NX jelenlétben is megmértük. A NX jelentősen növelte a nociceptin relaxáló hatását, azonban önálló relaxáló hatása nem volt. Így a NX nociceptint potenciózó hatása váratlan, ugyanakkor vannak humán adatok arra nézve, hogy ópiátok intratekális beadását követően a szülés során erősödik a méhkontrakció [222], amiből kiindulva esetleg az endogén ópiátoknak kontrakció fokozó hatása lehet, melyet a NX csillapíthat.



Az ORL1 jelentős homológiát mutat az ópiát receptorokkal,  $G_i$ -protein kapcsolt receptor, gátolja az adenil-cikláz aktivitást és csökkenti a cAMP képződést, aktiválja a  $K^+$ -csatornákat és gátolja a feszültségfüggő  $Ca^{2+}$  csatornákat [223]. Megvizsgáltuk a nociceptin G-protein-aktiváló hatását késői vemhességből származó patkány uteruszokon, és 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. Ismert, hogy a GnRH receptorok több útvonalat is képesek aktiválni a különböző G-fehérjékhez való kapcsolódással [224]. A  $\beta$ -AR-ok  $G_s$ -fehérjékhez való kapcsolódása az adenilát-cikláz és aktiválódásához és a PKA foszforilációjához vezet, amely foszforilálja a receptort és csökkenti a  $G_s$ -proteinhez való kapcsolódását, ugyanakkor növeli a  $G_i$ -fehérjéhez való kötődését [225]. Valószínűleg ehhez hasonlóan a NX beavatkozik a nociceptin által aktivált intracelluláris útvonalakba, és elősegíti a  $G_s$ -fehérjéhez való kapcsolódását, ami az uterusz cAMP-szintjét emeli és csökkenti a kontrakciókat.

A cAMP-szint változása mellett más intracelluláris jelút vonal is szerepet játszik a nociceptin uterusz relaxáló hatásában az ORL1-en keresztül. A nociceptin fokozza a kifelé irányuló  $K^+$ -áramot, ami csökkenti az idegsejtek ingerelhetőségét és a transzmitterek felszabadulását az agyban [223]. Az uteruszban a  $BK_{Ca}$  nagy mennyiségben fordul elő, és fontos szerepet játszik a depolarizáció gátlásában, ezáltal a relaxációban. Humán miometriális sejtekben a  $BK_{Ca}$  egy cAMP-függő foszforilációs kaszkád aktivációja alatt áll [226]. Kísérleteinkben a  $K^+$  csatornák TEA vagy 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  $BK_{Ca}$  közvetíti. Mivel nem volt különbség a TEA és a PAX gátló hatása között, ezért feltételezzük, hogy a  $BK_{Ca}$  döntő szerepet játszik a nociceptin hatásában. TEA vagy PAX jelenlétében azonban a nociceptin relaxáló hatása nem szűnik meg teljesen, amely feltehetően a cAMP-szintre gyakorolt emelő hatásnak köszönhető.

Vizsgáltuk a nocistatin szerepét is az uterusz kontrakciókban. A nocistatinnal kapcsolatosan vizsgálatainkat megelőzően senki nem számolt be perifériás hatásokról. A nocistatin expressziója a vemhesség utolsó napján magas a korábbi vemhességi napokhoz képest, melynek mértéke körülbelül 10-szerese volt a nociceptinhez képest, így úgy tűnik, hogy a

vemhes uterusban a PPNOC mRNS nagyobb arányban transzlálódik nocistatinná, mint nociceptinné. Mivel a nocistatin plazmaszintje nem változott a vemhesség végén, így valószínű, hogy az uterusban talált nocistatin elsősorban helyileg termelődik és nem a vérárammal szállítódik oda.

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 interakció helyett szinergizmust tapasztaltunk a két peptid között az uterusz simaizomzatán. 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 [118], így ez a gátlás valószínűleg nem az ópiát receptorok által közvetített. Mivel a NX a befelé irányuló  $Ca^{2+}$ -áramokat indukálja [227], ezért megvizsgáltuk, hogy a nocistatin gátló hatásában szerepet játszanak-e a  $Ca^{2+}$ -áramok. A  $Ca^{2+}$ -szegény környezetben a NX nem gátolta a nocistatin hatását, így feltételezzük, hogy alacsony extracelluláris  $Ca^{2+}$ -koncentráció esetén a NX nem képes indukálni a  $Ca^{2+}$ -beáramlást. A koncentráció-hatás görbék balra tolódása a normál  $Ca^{2+}$ -tartalmú pufferhez képest valószínűleg a gyengébb szöveti összehúzódásnak és a könnyebb gátolhatóságnak köszönhető, amelyet az alacsonyabb  $Ca^{2+}$ -tartalom okoz.

A nociceptinhez hasonlóan a nocistatin esetében is megvizsgáltuk a  $BK_{Ca}$  szerepét az uterusz relaxáló hatásban. A PAX a nocistatin esetén is gátolta a relaxációt, így a  $BK_{Ca}$  a nocistatin esetén is szerepet játszik az intracelluláris jelátvitelében.

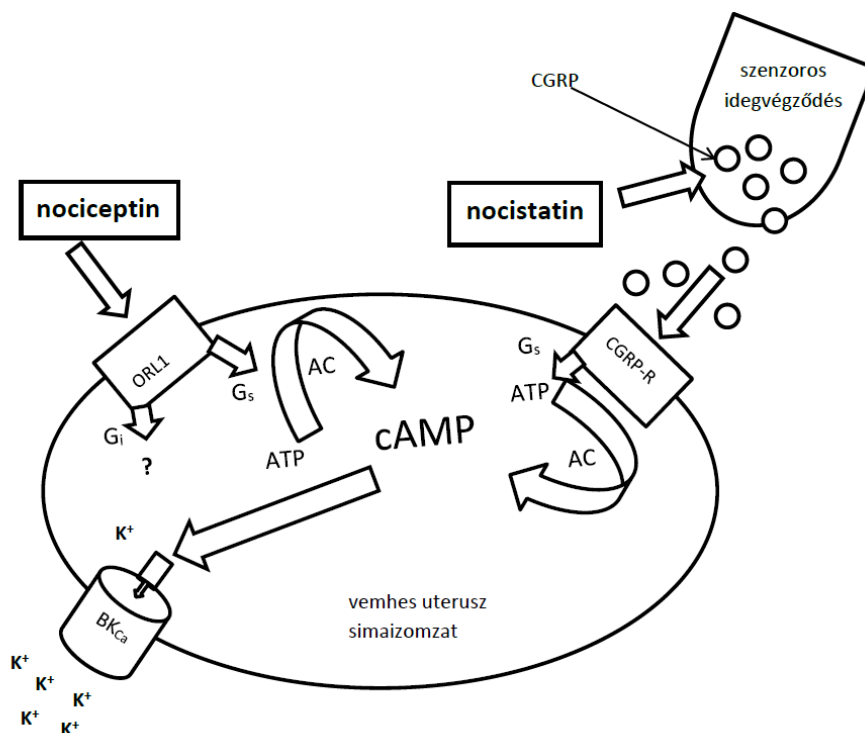
A nocistatin gátolja a hiperalgéziát és az allodíniát, így szabályozó szerepe van a fájdalom érzékelésben, ami megmagyarázhatja funkcionális jelentőségét a szülés során. Emellett a gyulladásos mediátorok is szerepet játszanak a szülés megindulásában, melyek közül a CGRP relaxáló hatással rendelkezik. A CGRP gátolja a simaizom összehúzódását számos szövetben, beleértve a vemhes patkány uteruszt is [111]. Ezért a CGRP lehetséges szerepét is megvizsgáltuk a nocistatin relaxáló hatásában. Ismert, hogy a kapszaicin a CGRP kiürülését okozza a szenzoros idegvégződésekből, amit az idegvégződés képes újra felvenni [228,229]. Vizsgálatainkban a kapszaicin kezelés blokkolta nocistatin relaxáló hatását, amely azonban helyreállt, miután a szövetmintákat CGRP-vel inkubáltuk. Ez alapján feltételezzük, hogy a CGRP is fontos tényező nocistatin uterorelaxáns hatásában. Feltételezzük, hogy nocistatin az opioid peptidekhez és a nociceptinhez hasonlóan elősegítheti a neuropeptidek felszabadulását az érzőidegekből [230]. Egyúttal ez a mechanizmus magyarázhatja nocistatin hatástalanságát az oxitocin által kiváltott

kontrakciókra, mivel a CGRP-agonista adrenomedullin szintén nem képes gátolni oxitocin által kiváltott összehúzódásokat, míg a spontán és a bradikinin által kiváltott kontrakciókat csökkentette [231].

A nocistatin - a nociceptinhez hasonlóan - fokozta az intracelluláris cAMP-szintet a vemhes uterusban. A nociceptin jelenlétében ez még tovább fokozódott, ami a CGRP felszabadulás cAMP-akkumuláló hatásával magyarázható [232]. Az in vitro kontraktilitási vizsgálatokkal összhangban a NX csökkentette nocistatin cAMP-szintet emelő hatását, ami arra utal, hogy a NX a G-protein aktiváció szintjén is beavatkozik nocistatin hatásba.

A nociceptin és nocistatin relaxáló hatását megvizsgáltuk humán szövetmintákon is. Mind a nociceptin, mind pedig a nocistatin gátolta az oxitocin kiváltotta kontrakciókat, de egymás hatását 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 uteruszon a CGRP mediált hatás nem igazán jelentős, de lehet annak is a következménye, hogy a limitált méretű és mennyiségű humán szövetek, melyek kimetszésekor a lehető legkisebb ártalmat kívánták okozni, csak részben származtak olyan szöveti területről, mely aktívan részt vesz a kontrakciók kialakításában. Mindez nem kizárja az ORL1-en keresztüli tokolitikus hatás lehetőségét.

Összegezve elmondható, hogy a nociceptin és a nocistatin lokálisan szintetizálódik mind a patkány vemhes, mind pedig a humán terhes uterusban, ahol gátolják a kontrakciókat. Bár a cAMP-emelkedésre és az azt követő  $BK_{Ca}$  megnyílására gyakorolt hatásuk alapvetően azonos, úgy tűnik, hogy fő hatásmechanizmusuk eltérő. A nociceptin direkt módon, míg a nocistatin a CGRP felszabadulásán keresztül gátolja a méhösszehúzódást (**94. ábra**).



**94. ábra. A nociceptin és a nocistatin vemhes uteruszra gyakorolt relaxáló hatásának feltételezett mechanizmusai.** A nociceptin a nociceptin receptorhoz (ORL1) kapcsolódik, a  $G_s$ -fehérje és az adenil-cikláz (AC) aktiválásán keresztül szöveti cAMP-szint emelkedést idéz elő. A megemelkedett cAMP hatására nyílik a  $BK_{Ca}$ , a  $K^+$ -ionok fokozott kiáramlása hiperpolarizációt és simaizom relaxációt eredményez. A nociceptin képes stimulálni a  $G_i$ -protein útvonalat is, de nem ismert, hogy ez az útvonal hogyan járul hozzá a relaxációhoz. A nocistatin fokozza a CGRP felszabadulását a szenzoros idegvégződésekből. A CGRP kötődik receptorához (CGRP-R), növeli az intracelluláris cAMP-szintet és megnyitja a  $BK_{Ca}$ -csatornákat, ami a nocistatin fő relaxációt kiváltó mechanizmusa a vemhes uteruszban.

Mindkettő képes a másik relaxáló hatását erősíteni, bár a nociceptin beadását a humán uterusz estén meg kell előznie nocistatin bevitelének. További vizsgálatokra van szükség a nociceptin és nocistatin fiziológiai, patofiziológiai szerepének és a terhes méh kontraktilitásra gyakorolt hatásainak minden aspektusának tisztázásához. A fájdalom és a méhösszehúzódások elválaszthatatlanok a szülés során. E természetes szabályozási folyamatok és társfunkciók mélyebb megértése segíthet feltárni a szülés megindulásának és a korai összehúzódások okait. A nociceptin és nocistatin analógok új hatásmechanizmussal szolgálhatnak a tokolitikus terápia számára.

### 6.3.2. Kisspeptin

A kisspeptin és a Kiss1R már korábban azonosításra került az uteruszban [126,233], de a méhösszehúzódásokban betöltött szerepük nem volt tisztázott, ezért vemhes és nem vemhes

patkány uteruszokon in vitro vizsgálatokat végeztünk. Az általunk használt fragmentum (KISS1 94-121) 28 aminosavból áll, nagy affinitású a Kiss1R iránt, jó vízdékonyságú, valamint sokkal jobb stabilitással rendelkezik, mint a kisspeptin más, rövidebb fragmentumai [234]. A kisspeptin mind a nem vemhes, mind pedig a vemhes uteruszon koncentráció függően gátolta a kontrakciókat. Specifikus Kiss1R antagonistája jelenlétében a hatás csökkent, így igazoltuk, hogy a relaxáló hatás valóban a Kiss1R-on keresztül valósul meg.

A kisspeptin relaxáló hatása a nem vemhes és a korai vemhes (5. nap) uteruszokban volt a legerősebb, míg a vemhesség előrehaladtával a gátló hatása fokozatosan csökkent, a legalacsonyabb értéket a vemhesség utolsó napján (22. nap) tapasztaltuk. Hasonló csökkenést találtunk a Kiss1R mRNS és fehérje expressziójában, valamint az immunfestődés intenzitásának változásában is. Bár az immunhisztokémiai vizsgálat nem volt kvantitatív, a nem vemhes, illetve az 5. és 22 napos vemhes minták közötti különbségek látványosak voltak. A legintenzívebb Kiss1R festődést a nem vemhes szöveteken tapasztaltuk, míg a legalacsonyabb receptor-expressziót az utolsó vemhességi napon találtuk, amikor a festődés gyakorlatilag csak a miometriális rétegben volt kimutatható. Általánosságban a receptorok túlnyomórészt a miometrium hosszanti, kisebb részben körkörös izomrétegében helyezkedtek el, míg a leggyengébb expressziót az endometriumban találtuk. Ezt alátámasztotta az endometrium eltávolítása is, amely nem módosította jelentősen a Kiss1R fehérje expresszióját egyik vemhességi napon sem, sőt még a nem vemhes uterusban sem. Ezek alapján a Kiss1R leginkább egy miometriális receptor, amely közvetlenül részt vesz a méh simaizom összehúzódás gátlásában. Mindezt tovább erősíti, hogy a Kiss1R legmagasabb expresszióját a nem vemhes és az 5. napos vemhes mintákban találtuk. A nem vemhes méh kontraktilitása patkányokban általában alacsony, míg az 5. vemhességi nap patkányokban az embrió beágyazódásának időszaka, ami az uterusz aktivitásának viszonylagos nyugalomát igényli [235].

A kisspeptin az endometrium eltávolításával erősebb uterorelaxáns hatást fejtett ki a nem vemhes és a 20. napos vemhes szöveteken, illetve megszűnt a kisspeptin relaxáló hatásának fokozatosan csökkenő tendenciáját a vemhesség előrehaladtával, ami arra utal, hogy a miometriumhoz képest jelentéktelen mennyiségű endometriális Kiss1R mégis meghatározó lehet a méhkontrakciókban. Elképzelhető, hogy az uterusz kontraktilitás szabályozásában a Kiss1R jelenleg ismeretlen mechanizmuson keresztül (pl. más receptorokkal vagy endometriális szekréciós válaszokkal való kapcsolódás révén) is részt vehet. A központi idegrendszerben és a reproduktív szervekben lévő kisspeptin neuronokkal már bizonyított a

kapcsolat [236,237], de az uteruszra vonatkozóan nem állnak rendelkezésre adatok e tekintetben.

Eredményeink arra utalnak, hogy a Kiss1R relaxáló hatást közvetít a nem vemhes és vemhes patkány uteruszban. Ahogy a vemhesség előrehaladtával az összehúzódások intenzívebbek lesznek, a Kiss1R expressziója fokozatosan csökken, ami az uterusz nyugalmi állapotának fenntartásában betöltött szerepére utal. Az endometriális Kiss1R uterusz relaxációban betöltött pontos szerepe nem tisztázott, valószínűleg eddig fel nem tárt rendszerekkel lehet kapcsolatban. 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.

### 6.3.3. Leptin, adiponectin

Ismert, hogy az adipokinek befolyásolják a simaizomzat működését. A leptin gátolja az kontrakciót mind patkány, mind pedig humán uteruszon [238]. Arról azonban nem álltak adatok rendelkezésre, hogy a leptin hatása hogyan változik a vemhesség előrehaladtával. Az adiponectin tekintetében pedig egyáltalán nem voltak ismertek az uterusz hatások. Mivel az adipokinek számos metabolikus és gyulladáshoz vezető folyamat résztvevői, ezért fontosnak tartottuk, hogy a fent említett két adipokin uterusz kontraktilitásra kifejtette hatását és annak hátterét megvizsgáljuk.

A molekuláris (RT-PCR, WB) és az immunhisztokémiai vizsgálataink alapján a LEPR főként a nem vemhes méh miometriális rétegében expresszálódik. Bár az endometrium eltávolítása az LEPR expressziót nem csökkentette jelentősen, mégis a nem vemhes miometriumban a leptinre adott relaxációs válasz csökkenését észleltük. A vemhesség korai szakaszában (5. vemhességi nap) a LEPR expressziója jelentősen megnövekedett, különösen az endometriumban. A vemhesség közepén (15. és 18. nap) azonban az expresszió csökkent, és a receptorok többsége újra a miometriumban helyezkedett el. A leptin által kiváltott relaxáló hatás az uteruszban a vemhesség vége felé fokozatosan csökkent, de az endometrium réteg eltávolításával a relaxáló hatás fenntartható, bár méréseink alapján az endometriális receptor expresszió szinte elhanyagolható. Hasonló jelenséget tapasztaltunk a Kiss1R esetén is [129]. 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, vagy akár megszűnő gátló hatásért a terminusban. Mivel a LEPR fő jelátviteli útvonala a JAK/STAT kaskád, lehetséges, hogy a különböző fehérjék megváltozott foszforilációja/defoszforilációja felelős

a változásért [132]. Emellett a leptin számos más jelátviteli mechanizmust befolyásolhat, például az intracelluláris  $Ca^{2+}$  szint növelésével vazokonstriktiót indukálhat az erekben [239], vagy a neurális NOS expressziójának indukálásával endothel függő relaxációt idézhet elő [240]. E mechanizmusok bármelyikének változása módosíthatja a méh simaizomzatának válaszát is, ugyanakkor ezek tisztázására további vizsgálatok szükségesek.

Az adiponectin rendszer esetén az AdipoR1 és AdipoR2 jelenlétét korábban már azonosították korai vemhes sertés uterusban [241], a vizsgálatainkban pedig igazoltuk, hogy az adiponectin gátló hatással van az uterusz kontrakciókra. Az adiponectin hatása összetettebb a leptinhez képest, mivel két receptor is közvetíti. Ezeknek a receptoroknak a stimulálása elsősorban az AMPK és a PPAR $\alpha$  útvonalakat aktiválja [242]. Az 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 megmaradt, azonban a vemhesség utolsó napján hatása megszűnt, akár teljes uteruszon, akár miometriumon vizsgáljuk. Ezzel párhuzamosan mindkét AdipoR expressziója csökkent a vemhesség előrehaladtával, a változások immunhisztokémiai módszerrel is egyértelműen kimutathatók mind a miometrium, mind az endometrium rétegeiben. Úgy tűnik, hogy az endometriális AdipoR-ok vemhességben inkább a méh kontrakciókban játszanak szerepet, hiszen az 5. és 15. vemhességi napon az adiponectin relaxáló hatása az endometrium hiányában fokozódik. Feltételezzük, hogy a korai vemhességben az endometriális AdipoR-ok simaizom összehúzó hatást közvetíthetnek. Ugyanakkor a vemhesség 18., 20. és 22. napján nem mértünk szignifikáns különbségeket az uterusz és a miometrium relaxáló hatásban, ami arra utal, hogy az endometriális AdipoR-oknak késő vemhességben nincs jelentős szerepük a kontrakciókban. Az utolsó vemhességi napon azonban az endometrium eltávolítása ismét fokozza a relaxációt. A maximális gátló hatás értékének növekedése azonban kisebb, mint a leptin esetében, ami arra utal, hogy az endometriális LEPR fontosabb szerepet játszik a terminusban. Az adiponectin relaxáló hatásának módosulása párhuzamosan zajlott az AdipoR-ok változásával, ami arra utal, hogy az AdipoR1 és AdipoR2 érzékenysége és jelátviteli mechanizmusa valószínűleg nem változik jelentősen a vemhesség alatt.

Ezek alapján mind a leptin, mind pedig az adiponectin szerepet játszik a vemhes patkány uterusz relaxációjában, de hatékonyságuk a vemhesség vége felé jelentősen csökken.

Feltételezzük, hogy mindkét adipokinnek szerepe van az uterusz nyugalmi állapotának fenntartásában a vemhesség elején és közepén. Egyéb tényezők mellett az endometriális LEPR és AdipoR szabályozó szerepet játszik a méhösszehúzódnak finomhangolásában mind nem vemhes, mind pedig vemhes állapotban. Hasonlóan a kisspeptinhez, a leptin és adiponectin analógok is alkalmasak lehetnek a koraszülés megelőzésében, mint új hatásmechanizmusú hatóanyagok.

#### **6.3.4. Obezitás és gyulladás: adipokinnek és citokinnek hatása a kontrakciókra**

Az elhízás jelentősen befolyásolhatja a terhesség kimenetelét, megváltoztathatja a gesztációs időt, amelyben a zsírszövetben termelődő adipokinnek nem pontosan feltárt szerepet játszanak [146]. Az obezitás és a gyulladás vemhes uterusz kontrakciókra gyakorolt következményeit, illetve az adipokinnek és a terbutalin hatásmódosulását kétféle vemhes patkány modellben vizsgáltuk.

Az elhízást HFHSD segítségével idéztük elő [243]. A 9 hetes (beleértve a 3 hetes vemhességet) HFHSD növelte a testtömeget és csökkentette a glükóztoleranciát, ami megerősíti a HFHSD hatékonyságát az elhízás, illetve a következményes prediabetészes állapot kialakulásában [244]. A HFHSD csökkentette az uterusz, a placenta és a magzatok tömegét, illetve fokozta a magzat/placenta tömeg arányt, mely változások korábbról vemhes patkány obezitás modell esetén már ismertek [245]. Ezek a változások magyarázattal szolgálnak arra, hogy miért nem különbözött szignifikánsan a testtömeg az SD és a HFHSD csoportok között a vemhesség utolsó napján. Egy vemhes patkány uteruszban a magzatok átlagos száma 6-10 között van, ezért tömegük csökkenése jelentősen befolyásolja a vemhes állat teljes testtömegét.

A HFHSD módosította a teljes zsírtömeget és a különböző típusú zsírszövetek eloszlását is. Bár a barna zsírszövet aránya változatlan maradt, a vizcerális és a pink zsírszövetek jelentős, míg a gonadális zsírszövetek mérsékelt növekedést mutattak. Ugyanakkor az emlőmirigyben a szubkután fehér zsírszövetből differenciálódó pink zsír aránya csökkent a vizcerális vagy gonadális zsírokhoz képest. Mivel a pink zsírszövet döntő fontosságú a laktáció fenntartásához [246], így az elhízás nemcsak a magzatok méretét és méhen belüli növekedését csökkenti, hanem kedvezőtlenül befolyásolhatja patkányoknál a laktációt is.

Az általunk vizsgált adipokinnek közül elhízásban a leptin megemelkedik és részt vesz a kis intenzitású gyulladásos folyamatokban [247]. Az adiponectint az elhízás okozta oxidatív folyamatokat kiegyensúlyozó, gyulladáscsökkentő adipokinnek tartják [248], míg a kisspeptin az elhízásban inkább adipokinneként viselkedik [249]. Kísérleteink során a HFHSD



növelte a Kiss1R és LEPR, de nem változtatta meg az AdipoR-ok expresszióját a 22. napos vemhes uterusban. Az adipokinek közül csak a leptin plazmaszintje emelkedett. Mind a receptor-expresszió, mind a plazmaszint növekedése fokozhatja az adott adipokin hatását, mely alapján eredményeink arra utalnak, hogy a leptin útvonalnak van a legerősebb, míg az adiponectin útvonalnak lehet a leggyengébb hatása a HFHSD által kiváltott méhösszehúzódnás módosulásában. Emellett a HFHSD jelentősen megnövelte a 22. napos vemhes patkányok P4 szintjét, ami az uterus relaxációt támogatja [250]. Ez azonban ellentétes azzal a korábbi megfigyeléssel, miszerint a LEPR expressziót a vemhesség alatt a magas E2 szint növeli [251]. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a LEPR expressziója multifaktoriális kontroll alatt áll, melyet patkányokban nem kizárólagosan csak a nemi hormonok aránya határoz meg.

A zsírszövet tömegének növekedése általában a gyulladáscsökkentő citokinek magasabb szintjét eredményezi [252], mi azonban azt találtuk, hogy bár a gyulladáscsökkentő citokin IL-10 plazmaszintje csökkent, két másik gyulladáskeltő citokin (KC és TNF $\alpha$ ) szintje is mérséklődött. A zsírszövetekben is jelentősen csökkent a gyulladáskeltő citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-6 és TNF $\alpha$ ) szintje. Összességében e citokinek együttes változása inkább a gyulladáscsökkentő folyamatok túlsúlyára utal.

A HFHSD okozta változások a nemi hormon, adipokin és citokin szintekben előrevetítették az uterus kontraktilitás változásait. A spontán összehúzódnások csökkentek, míg az oxitocin vagy a PGF $_{2\alpha}$  által kiváltott válaszok nem változtak, ami arra utal, hogy az elhízás csökkenti az alapaktivitást (valószínűleg a magas P4 és leptin, illetve az alacsony gyulladáskeltő citokin szintek miatt), de nem befolyásolja a vemhes uterus stimulálhatóságát. Korábban a HFHSD indukált elhízásról feltételezték, hogy patkánymodellben csökkent uterus kontrakciókat okoz [245], amit izolált szervi eredményeink alátámasztanak. Az adipokinek uterus kontrakciókra gyakorolt hatását oxitocin vagy a PGF $_{2\alpha}$  által kiváltott összehúzódnásokkal szemben vizsgáltuk, mivel mindkét anyag szerepet játszanak a fiziológiás összehúzódnásokban és a cervix érésében [253]. Korábban a nem elhízott vemhes és nem vemhes uterus minták esetén a peptid hatóanyag vizsgálatoknál KCl-dal váltottuk ki a kontrakciókat, aminek elsősorban az volt az oka, hogy a nem vemhes és a vemhes uterus szöveteknek (gesztációs időtől függően) eltérő az oxitocin és PGF $_{2\alpha}$  érzékenysége [254,255], ami az ontogenitási vizsgálatokban lehetetlenné tette volna az összehasonlítást. Az obezitás modellben azonban csak 22. napos vemhes uteruszt használtunk, így minden szövet egyformán érzékeny volt ezekre hatóanyagokra. Az oxitocin által kiváltott

összehúzóadások esetében a HFHSD megszüntette a kisspeptin relaxáló és a leptin kontraháló hatását. Korábbi mérésekben azt találták, hogy a leptin nem módosította sem a spontán, sem az oxitocin által kiváltott kontrakciókat [136], bár egy másik kísérletben bizonyították relaxáló hatását humán uteruszon [256]. Egy vizsgálat bebizonyította, hogy a leptin a NO és cGMP útvonalakon keresztül gátolja a spontán és az oxitocin által kiváltott méhkontrakciókat késői vemhes egerekben [257]. Így a leptin oxitocin kontrakciót fokozó hatása nem várt és patkányspecifikus jelenség lehet, amit azonban az elhízás megszüntet. A vizsgált adipokinek közül az adiponectin az oxitocin kontrakciókra nem váltott ki semmilyen hatást sem az SD, sem pedig a HFHSD csoportban.

A  $PGF_{2\alpha}$  kontrakciók esetében a kisspeptin relaxáló hatása erősebb volt a HFHSD csoportban. Az adiponectin csak a HFHSD csoportban váltott ki relaxáló hatást, míg a leptin hatástalannak bizonyult. Az adipokinek hatása SD patkányokban összhangban van az korábbi ontogenitási vizsgálatokban kapott eredményekkel, míg a HFHSD csoportban mutatott relaxáló hatásuk tovább erősíti az elhízás okozta kontraktilitási gyengeség valószínűségét.

A cervix rezisztencia és érés szintén döntő fontosságú a terhesség fenntartása és a szülés szempontjából. A gyulladáskeltő és gyulladáscsökkentő citokinek arányának megváltozása befolyásolhatja az érési folyamatot [258]. Bár humán obezításban ismert, hogy a cervix érése gátolt a PG-okkal szembeni kisebb érzékenység miatt [259], az adipokinek cervix rezisztenciára gyakorolt hatásairól korábban nem álltak rendelkezésre adatok. Vizsgálatainkban a kisspeptin és az adiponectin a SD patkányokban csökkentette a cervix rezisztenciát, míg a leptin hatástalan volt. A humán tapasztalatokkal ellentétben 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, lehetséges, hogy patkányokban a rezisztencia fokozó és csökkentő tényezők kompenzálják egymást a vemhesség végén. 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, ami leginkább a gyulladáskeltő citokinek csökkenésében mutatkozik meg a humán esetben tapasztalt emelkedés helyett.

Az obezításban kialakuló kis intenzitású gyulladás mellett azt is megvizsgáltuk, hogy miként befolyásolja az intrauterin gyulladás a tokolitikus terápiában korábban sokáig egyeduralgkodó  $\beta_2$ -AR agonisták relaxáló hatását vemhes patkány modellen. Az LPS-kezelt patkányok uterusza érzékenyebb volt terbutalinra, amit a koncentráció-hatás görbe balra tolódása jelzett. A  $\beta_2$ -AR expressziója nem változott a gyulladás következtében, azonban megnövekedett a terbutalin hatására keletkező intracelluláris cAMP mennyisége, ami magyarázatot ad a fokozott érzékenységre. Ismert, hogy TNF $\alpha$  hatására humán epiteliális sejtekben megnövekszik a cAMP-mennyisége, mivel fokozza az adenil-cikláz aktivitását [260]. Emellett humán légúti simaizomsejtekben az epidermális növekedési faktor receptorok transzaktiválása révén az adenil-cikláz enzim raf-1 kináz által közvetített foszforilációját és aktiválódását is eredményezi [261], ami szintén fokozza a cAMP szintet. Ezek alapján feltételeztük, hogy az LPS indukált gyulladásban is szerepet játszó TNF $\alpha$  lehet a felelős a terbutalin hatás érzékenyítésért. Ezért a méréseket elvégeztük a TNF $\alpha$  gátló thalidomide [262] jelenlétében is. A thalidomide előkezelés kivédte a TNF $\alpha$  LPS által kiváltott emelkedését és megakadályozta a terbutalin koncentráció-hatás görbéjének balra tolódását, valamint a cAMP szint növekedését is. Ezzel igazoltuk, hogy gyulladás miatt megnövekedett TNF $\alpha$  szint lehet felelős az uterusban tapasztalt terbutalinra adott relaxációs válasz érzékenyítéséért a fokozott cAMP termelődésen keresztül. Ezek alapján a tokolitikus terápia során a gyulladás indukálta koraszülés kapcsán a TNF $\alpha$  gátlás biztosan csökkenti a gyulladás intenzitását, de egyúttal csökkentheti a tokolitikumok hatékonyságát, legalábbis a  $\beta_2$ -AR agonisták esetén. Autoimmun kórképekben a TNF $\alpha$  gátló antitestek terhesség alatti alkalmazása lehetséges, az első trimeszterben nem jutnak át a placentán, a második és harmadik trimeszterben is csak alacsony kockázatot jelentenek [263], így esetlegesen a tokolitikus kezelés során fellépő interakciónak lehet klinikai jelentősége.

#### **6.4. Antioxidáns hatás jelentősége az uterusz és cervix kontraktilitásában**

Fiziológiás körülmények között a mitokondriális ROS-termelés és az antioxidáns rendszerek (pl. szuperoxid-dizmutáz, kataláz és glutation-peroxidáz) között egyensúly van. Oxidatív károsodás vagy oxidatív stressz akkor következik be, amikor a szabad gyökök szintje megnő az antioxidáns szinthez képest [264]. A ROS egyes ligandumok, köztük különböző növekedési faktorok és az adrenerg szignálmechanizmus másodlagos hírvivőjeként is működik [265], melyek szerepet játszanak a vemhes méh simaizomzatának szabályozásában

is. Ezért feltételeztük, hogy az antioxidánsok kölcsönhatásba léphetnek a  $\beta$ -AR-ok szignálmechanizmusával. Az interakció jelentőségét növeli, hogy a várandósok gyakran fogyasztanak antioxidáns tartalmú étrendkiegészítőket egészségi állapotuk javítása és fenntartása, valamint a komplikációmentes terhesség érdekében [266].

#### **6.4.1. $\beta$ -AR agonista hatás módosítása antioxidánssal**

Az antioxidáns tokoferol jelenléte nem befolyásolta a  $\beta$ -AR agonista terbutalin uterusz relaxáló és cervix rezisztenciát fokozó hatását. A 7 napig tartó P4 előkezelés, mely fokozza a  $\beta$ -AR expressziót [184], 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  $\beta$ -AR-hoz kötött cAMP-szint emeléshez a P4 indukált cervixben, míg a vemhes uteruszban jelentősége elhanyagolható. Mindez felveti a ROS termelés  $\beta$ -AR-stimulációt követő szövetspecifikus szabályozását a simaizomzatban.

Egy adott szövet ROS termelése a TOS és TAS meghatározásával jellemezhető, amelyek aránya adja az OSI-t, az oxidatív státusz elfogadott paraméterét [267]. Bár az általunk alkalmazott metodika nem tudott különbséget tenni a ROS és a szabad gyökök között, korábbi vizsgálatok során a ROS túlsúlyát mutatták ki az uteruszban lejátszódó folyamatokban [268]. Méréseinkben a cervixben nagyobb OSI értéket kaptunk, mint az uteruszban. 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  $\beta$ -AR szignálmechanizmusában. A nem vemhes szövetek OSI értékei magasabbak voltak a vemhes mintákhoz képest, ami alátámasztja a korábbi megállapításokat, melyek szerint az antioxidáns enzimek aktivitása a terhesség alatti fokozódik [269,270]. Eredményeink alapján az antioxidáns hatás ronthatja a  $\beta$ -AR agonisták cervix rezisztenciát fokozó hatását a terhesség végén, ami csökkentheti tokolitikus hatékonyságukat.

#### **6.4.2. Az antioxidáns COX-gátló hatást módosító effektusa**

Azt is megvizsgáltuk, hogy a COX-gátlók uterusz és cervikális hatását hogyan befolyásolja az antioxidáns jelenléte. A PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , és a COX szintje eltérő a nem terhes és a terhes méhben [271,272]. A COX állítja elő a PG-okat, melyek fontos szerepet játszanak a szülés

folyamatában, ugyanakkor vitatott, hogy az izoenzimek (COX-1, COX-2) szerepe milyen mértékű a folyamatban [27]. Patkány endometriumban ismert, hogy az ellés idején a COX-1 expressziója megnő, míg a COX-2 aktivitás csökken [273]. Más vizsgálatok szerint az ellés során a COX-2 expressziója egér uterusban fokozódik, ezért a COX-2-ből származó PG-oknak lehet nagyobb jelentősége [274]. Humán terhesség során a COX-2 fokozott expressziója magas PGE<sub>2</sub>-szinthez vezet, a COX-1 expressziója pedig alacsony marad, ami a terhesség előrehaladtával sem változik [275].

Méréseink alapján patkányban a nem vemhes méhben a COX-1 és COX-2 aktivitás nagyjából azonos volt, míg a vemhes uterusban a COX-2 aktivitása kisebbnek mutatkozott. Emellett a vemhes méh teljes COX aktivitása magasabb volt a nem vemheshez képest. A szelektív COX-2 gátló rofecoxib relaxáló hatása nagyobb volt a diklofenákhhoz 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 méhösszehúzódadásokban, de a relaxációs hatás kifejezettebb a COX-2 gátlásán keresztül. A diklofenák és a rofecoxib relaxáló hatása erősebb volt a nem vemhes méhben, ami a kisebb mértékű COX-1 és COX-2 aktivitással magyarázható.

A tokoferol képes csökkenteni sejtenyészetben a spontán vagy az LPS indukált COX-2 aktivitást [276,277]. Ugyanakkor hatása nem volt ismert a funkcionáló (kontraháló) uteruszon. A tokoferol nem befolyásolta a nem szelektív COX-gátló diklofenák és a szelektív COX-2 gátló 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 méhösszehúzóadásban 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. Korábban több tanulmány vizsgálta a PG-ok szerepét a cervix terhesség alatti átalakulásában. A PGE<sub>2</sub> növeli a humán cervikális kollagenáz aktivitást és a gyulladási választ, elősegítve a méhnyak felpuhulását [278], ami indometacinnal gátolható [279]. Emellett a PG-ok emelik a citokin szintet is [280]. Azt is kimutatták, hogy a COX-2 fokozott szintje és a PG-dehidrogenáz

csökkent aktivitása döntő fontosságú a PGE<sub>2</sub> által indukált érési folyamat szempontjából a cervixben [281].

A korábbi eredmények alapján azt vártuk, hogy a COX-gátlók a PG-ok szintjének csökkentése révén fokozni fogják a vemhes cervix rezisztenciáját (a nem vemhes esetben semmilyen hatást nem lehet kimutatni a rendkívül erős alaprezisztencia miatt). Meglepő módon azonban COX-1 szelektív gátló SC-560 nem volt hatásos, míg a nem szelektív gátló diklofenák és a COX-2 szelektív gátló rofecoxib csökkentette a rezisztenciát a vemhes mintákon. Mivel méréseinket a 22. vemhességi napon végeztük el, így a cervix minták már áttestek az érési folyamaton.

Az elmúlt években a cervix simaizomzatának terhességben betöltött jelentőségével kapcsolatban új megközelítés született. Korábban elsősorban a kollagéntartalomra fókuszáltak és alábecsülték a simaizomzat jelentőségét, a cervikális elégtelenséget kizárólag a kollagénhálózat zavaraként értelmezték [282]. Ugyanakkor felmerült, hogy a cervikális simaizomzat szerepet játszik az érés során lejátszódó remodelling folyamatában is [283]. 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. Bár a cervikális COX-2 aktivitás nem változott jelentősen patkányban a vemhesség végére, de a COX-1/COX-2 arány a COX-2 dominancia irányába tolódott el. Mindez némileg ellentmondásos azzal a korábbi megállapítással, miszerint a COX-2 expressziója fokozódik a vemhesség végén patkányban, de abban a kísérletben csak a COX fehérjeexpresszióját mérték, a valós enzimaktivitás detektálása nem történt meg [161].

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 összehúzódásában a szülés során.

Tekintettel arra, hogy a COX gátlók és a tokoferol kombinációja az uteruszon a koraszülést gátló, míg cervixen a koraszülést elősegítő hatással bír, megvizsgáltuk in vivo ellési modellben is, hogy a két ellentétes hatás eredőjeként hogyan módosul az ellés ideje. A tokoferol és a rofecoxib 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 értelemszerűen akár a koraszüléshez vagy a koraszülés terápiajának gátlásához, melynek humán igazolására további mérések, esetlegesen retrospektív klinikai vizsgálatok szükségesek.

## 7. Összefoglalás

A korai fájástevékenység leállítása (tokolízis) a koraszülés megakadályozásának egyik kulcskérdése. Farmakoterápiás szempontból e célra a legkézenfekvőbb olyan hatóanyagok alkalmazása, melyek gátolják a terhes méh kontrakciókat és megakadályozzák, vagy legalábbis lassítják a cervix érési folyamatait, fokozzák a cervix rezisztenciát. Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan gyógyszer vagy gyógyszeres kombináció, amely tokolitikumként hatékonyan gátolná a korai fájástevékenységet és jelentősen (hetekkel vagy akár hónapokkal) megnyújtaná a gesztációs periódust. Éppen ezért újabb gyógyszer célpontokra és hatásmechanizmusokra van szükség, valamint az is valószínűsíthető, hogy a sikeres terápiához nem egyetlen hatóanyag, hanem a különféle támadáspontú hatóanyagok optimális kombinációjára van szükség. A hangsúly az optimális kombinációra helyeződik, hiszen voltak már ilyen jellegű próbálkozások a klinikumban, melyek nem vezettek eredményre. Erre klasszikus példa a nifedipin és salbutamol klinikai kombinációjának sikertelensége, melyben beigazolódott, hogy a nifedipin klinikai hatását a salbutamol nem tudta fokozni, ugyanakkor több mellékhatást eredményezett [284].

Ezen szempontok alapján a disszertációban tárgyalt mechanizmusok és kombinációk mind azzal a céllal lettek megvizsgálva, hogy alkalmasak lehetnek-e a tokolitikus terápia jövőbeli gazdagítására és erősítésére.

A  **$\beta_2$ -AR agonista** hatások közül a cervix rezisztencia fokozó hatást vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy a vemhesség végén a  $\beta_2$ -AR agonista hatásra fokozódik a cervix rezisztencia, melynek hátterében a receptor  $G_i$ -protein kapcsoltságának dominanciája áll. Ez alapján a  $\beta_2$ -AR agonista hatás mind az uterusz, mind pedig a cervix esetében a koraszülés folyamatait gátolja, így terápiás alkalmazása továbbra is megfontolandó.

Az  **$\alpha_1$ -AR altípus szelektív gátlók** kapcsán igazoltuk, hogy patkányban a vemhesség előrehaladtával az  $\alpha_{1A}$ -AR gátlók uterusz relaxáló és cervix rezisztencia növelő hatása erősödik (az  $\alpha_{1B}$ -és  $\alpha_{1D}$ -AR gátlók vagy hatástalanok, vagy a vemhesség előrehaladtával gyengülő hatást mutatnak), illetve azok az  $\alpha_{1A}$ -AR-gátlók, melyek 5-HT agonista hatással is rendelkeznek, gyengébb uterorelaxáns hatást fejtenek ki. Így tokolitikus céllal valószínűleg a szerotonerg hatással nem rendelkező  $\alpha_{1A}$ -AR-blokkolók fejlesztése lehet a helyes irány, mivel mind uterorelaxáns, mind pedig cervix rezisztencia fokozó hatással bírnak.

Az  **$\alpha_2$ -AR altípus szelektív gátlók** kapcsán igazoltuk, hogy ellés előtt a vemhes patkány uteruszban  $\alpha_{2B}$ -AR dominancia van, mely az összehúzódásokért felelős, ugyanakkor nem elhanyagolható az  $\alpha_{2A}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR jelenlét sem, melyek csökkentik a kontrakciókat.



Amennyiben hasonló megoszlás és funkció található a humán uterusban, akkor  $\alpha_{2A}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR izgatók vagy  $\alpha_{2B}$ -AR gátlók lehetnek potenciális tokolitikumok. Az altípus szelektív  $\alpha_{2}$ -AR gátlók egyike sem volt képes befolyásolni a cervix rezisztenciát a vemhesség utolsó napján, ugyanakkor az utolsó előtti napon az  $\alpha_{2B/C}$ -AR gátlás képes volt növelni a rezisztenciát. Az uterorelaxáns és a cervikális hatások összegzése alapján az  $\alpha_{2}$ -AR gátlók közül az  $\alpha_{2B}$ -AR gátlók tűnnek a legígéretesebb potenciális tokolitikumnak.

Az **adrenerg kombinációk** közül a legtöbb vizsgálatot a  **$\beta_2$ -AR agonistákkal** végeztük. Igazoltuk, hogy az 1 hétig tartó *P4 előkezelés* jelentősen megnöveli a  $\beta_2$ -AR agonisták uterorelaxáns hatékonyságát, melynek hátterében nemcsak a  $\beta_2$ -AR expresszió növekedése áll, hanem a P4 hatására a vemhesség utolsó napján jelentősen fokozódik a  $G_s$ -protein által közvetített intracelluláris cAMP emelkedés. A kombináció in vivo koraszülés modellen is hatásosnak bizonyult, így az egyik legbiztonságosabban alkalmazható eszköze lehet a koraszülés terápiájának, hiszen mind a  $\beta_2$ -AR agonisták, mind pedig a P4 terhesség alatti biztonságossága és toxicitása jól ismert. Ez alapján a P4 prevencióban részesült veszélyeztetett várandósok  $\beta_2$ -AR agonistákkal való kezelése fokozhatja az uterorelaxáns hatást. A  $\beta_2$ -AR agonisták uterorelaxáns hatása  $Ca^{2+}$ -csatorna blokkolók jelenlétében fokozódik a legnagyobb mértékben, amit patkány izolált szervi és in vivo koraszüléssel modellen is igazoltunk, valamint humán terhes szöveten is kimutattuk. Patkányban a koraszüléssel modellen ez a kombináció lényegében a normál vemhességi terminus végéig nyújtotta a gesztációs időt, patkány és humán szöveten pedig főleg a  $\beta_2$ -AR agonista alacsony koncentrációinál eredményezett jelentős hatásvövedést. Habár ilyen jellegű a kombinációval volt már korábban egy sikertelen klinikai vizsgálat, eredményeink alapján érdemes lehet ennek újra megvizsgálása a  $\beta_2$ -AR agonista dózis jelentős csökkentésével, ami a mellékhatások jelentős csökkenéséhez vezethet a markáns tokolitikus hatás megtartásával. A  $\beta_2$ -AR agonisták *PDE4 gátlókkal* való kombinációja szintén ígéretes uterorelaxáns hatást eredményezett, különösen gyulladással (LPS-indukált) patkány koraszülés modellen, illetve koraszülésből származó humán mintákon. A mechanizmus hátterében a két hatás szinergizáló cAMP szint emelő képessége áll. Igazoltuk, hogy a gyulladással vemhes és a koraszüléssel humán uterusban a PDE4B expresszió megnő, ezért PDE4B szelektív hatóanyagok fejlesztése jó lehetőség lehet a tokolitikus terápia számára. A  $\beta_2$ -AR agonisták és a PDE4 gátlók kombinációjának elősorban a gyulladás miatt bekövetkező koraszüléssel folyamatok gátlásában lehet jelentősége. A  $\beta_2$ -AR agonista *AKAP-PKA gátlóval* való kombinációja során a vemhes patkány uterusban fokozódott a  $\beta_2$ -AR-okon keresztüli

cAMP termelődés, melynek háttérében az AKAP-PKA gátlás miatti ugrásszerű szöveti cAMP szint emelkedés áll. Habár az AKAP-PKA gátlóknak elsősorban a szívizomzat működésének szabályozásában tulajdonítanak nagy jelentőséget, a  $\beta_2$ -AR agonistákkal való kombinációjuk új utat nyithat a tokolitikus terápia számára is. A  $\beta_2$ -AR agonista  $\alpha_{1A}$ -AR *antagonistákkal* való kombinációja szintén jelentősen növelte az uterorelaxáns hatást. Ez a potenciális tokolitikus kombináció előnyös lehet a megnövekedett szimpatikus aktivitással kísért preeclampsia, valamint terhességi hipertónia esetén is.

Az *altípus szelektív  $\alpha_1$ -AR gátlók* kapcsán igazoltuk, hogy az  $\alpha_{1A}$ -AR expressziója E2 szenzitív (csökken), míg a P4 előkezelés hatással van mind az  $\alpha_{1A}$ -AR, mind pedig az  $\alpha_{1D}$ -AR G-protein kapcsoltságára, valószínűleg a  $G_{q/11}$ -protein kapcsolódás gátlása révén csökkenti a vemhes uterusz kontrakcióit. Ezek alapján a P4 előkezelés erősíti a  $\alpha_{1A}$ - és  $\alpha_{1D}$ -AR antagonisták uterorelaxáns hatását, így a P4 prevencióban részesült veszélyeztetett várandósok  $\alpha_{1A}$ - és  $\alpha_{1D}$ -AR altípus szelektív antagonistákkal való kezelése fokozhatja az uterorelaxáns hatást és ezáltal a tokolitikus terápia hatékonyságát.

Az *altípus szelektív  $\alpha_2$ -AR antagonisták* kapcsán igazoltuk, hogy valamennyi  $\alpha_2$ -AR altípus expressziója csökken az E2 előkezelés következtében, ugyanakkor ez a kontrakciós válaszban csak az  $\alpha_{2B}$ -AR mediált kontrakciót csökkenti, melynek háttérében a  $G_i$ -protein alegységek változó aktiválása állhat. Mindez tovább erősíti egy  $\alpha_{2B}$ -AR-gátló, mint lehetséges tokolitikus szer iránti igényt. A P4 előkezelés hatására valamennyi receptor altípus expressziója fokozódik és jelentős kontrakció csökkenés tapasztalható, melynek háttérében a megváltozott G-protein kapcsoltság és a megemelkedett szöveti cAMP szint igazolható. Összeségében P4 kombinációban leginkább egy  $\alpha_{2C}$ -AR agonista tűnik a legígéretesebbnek, mint potenciális tokolitikum, míg egy  $\alpha_{2B}$ -AR antagonistá hatása ebben a kombinációban nem lenne kedvező.

Több lehetséges **peptid** támadáspontot és mechanizmust vizsgáltunk potenciális terápiás uterorelaxáns hatás megtalálása érdekében. Igazoltuk, hogy a *nociceptin és a nocistatin* a gesztációs időszakban mind a patkány, mind pedig a humán uteruszban helyileg termelődik és mindkét neuropeptid szerepet játszik a méhkontrakciók gátlásában. A hatásuk eredményeként emelkedik az intracelluláris cAMP szint a simaizomzatban, amely  $BK_{Ca}$  aktivációval jár. A nociceptin ezt a hatást direkt módon az ORL1 receptoron keresztül, míg a nocistatin indirekt módon, a CGRP felszabadulásán keresztül fejt ki. Mind a nociceptin, mind a nocistatin analógok potenciális tokolitikumok lehetnek, melyek a kontrakciók gátlása mellett esetleg kedvezően módosíthatják a korai kontrakciókkal járó fájdalmat is. A

*kisspeptin, leptin és adiponectin* kapcsán bizonyítottuk, hogy vemhes patkány uteruszban a KCl indukálta kontrakciókat gátolják, mely hatásuk a vemhesség előrehaladtával gyengül, Ez arra utal, hogy a gesztációs periódus kezdeti és középső szakaszában elsősorban az uterusz nyugalmi állapotának fenntartásában játszhatnak fontos szerepet. Ugyanakkor az endometriális Kiss1R, LEPR és AdipoR-ok pontos funkciói a kontrakciók szabályozásában egyelőre nem ismertek. A cervixre gyakorolt hatásuk tekintetében igazoltuk, hogy a kisspeptin és az adiponectin a vemhesség végén csökkenti a cervix rezisztenciát, ami esetleg hátrányos lehet a gesztációs periódus utolsó szakaszában a tokolitikus terápia során. Patkány vemhességi obezitásban a megemelkedett P4 és gyulladáscsökkentő citokin szint következtében a spontán kontraktilitás csökken, illetve megszűnik a kisspeptin és a leptin oxitocin indukált uterusz kontrakciót gátló hatása, míg az adiponectin nem elhízott állatokból származó szöveteken is hatástalan. A  $PGF_{2\alpha}$  indukált kontrakciók esetén az elhízott állatok uteruszán a kisspeptin relaxáló hatása fokozódik, a leptin a normál uteruszhoz hasonlóan hatástalan marad. Az adiponectin képes gátolni a kontrakciókat, de csak az elhízott állatokból származó uteruszon. Az obezitás megszünteti a kisspeptin és az adiponectin cervix rezisztenciát csökkentő hatását, ugyanakkor a leptin elhízásban csökkenti a rezisztenciát. Összeségében normál terhességben feltehetően a leptin analógok lehetnek a legalkalmasabbak egy tokolitikus vagy habituális vetélést megakadályozó szer fejlesztésének kiindulópontjaként, mivel uterorelaxáns hatással bírnak, de nem rontják a cervix rezisztenciát. Obezitásban azonban a kisspeptin vagy adiponectin analógok lehetnek a legjobbak, mivel az obezitás növeli az uterusz relaxáló képességüket, és emellett megszünteti a cervix rezisztenciát csökkentő hatásukat. Gyulladásos koraszülés modellben igazoltuk, hogy a megnövekedett  $TNF\alpha$  szint szerepet játszik a  $\beta_2$ -AR agonista terbutalin megnövekedett relaxációs hatásában, melynek hátterében a fokozott cAMP termelődés állhat. A  $TNF\alpha$  gátlása csökkenti ugyan a gyulladás intenzitását, de ezzel a terbutalin uterorelaxáns hatása is csökken, így a  $TNF\alpha$  gátlás hátrányos lehet a  $\beta_2$ -AR agonista tokolitikus terápia szempontjából.

Az **antioxidáns** tokoferol a terbutalin cervix rezisztenciát fokozó hatását gyengíti, a COX-gátlók esetén tovább fokozza a rezisztenciát csökkentő hatást, ami patkányban a gesztációs idő rövidüléséhez vezet. Ezek alapján a tokoferol terhesség alatti használata gyengítheti más tokolitikus szerek hatékonyságát.

A vizsgált célpontok és kombinációk lehetséges tokolitikus jelentőségét a **3. táblázat** foglalja össze.

Célpont	Hatás	+ E2	+P4	+CCB	+PDE4i	+AKAPi	+ $\alpha_{1A}$ ARi	+ $\beta_2$ ARA	+COXi	TNF $\alpha$ i	NS	NX
$\beta_2$ AR	agonista: UR, CR $\uparrow$		UR $\uparrow\uparrow$	UR $\uparrow\uparrow$	UR $\uparrow$ (GYUL)	UR $\uparrow$	UR $\uparrow$ (PE, GHT)	-		UR $\downarrow$		
$\alpha_{1A}$ AR	antagonista: UR, CR $\uparrow$	$\emptyset$	UR $\uparrow$					UR $\uparrow$ (PE, GHT)				
$\alpha_{1B}$ AR	antagonista: $\emptyset$											
$\alpha_{1D}$ AR	antagonista: UR	UR $\uparrow$	UR $\uparrow\uparrow$									
$\alpha_{2A}$ AR	agonista: UR, CR $\uparrow$	$\emptyset$	$\emptyset$									
$\alpha_{2B/C}$ AR	antagonista: UR, CR $\uparrow$	UR $\uparrow$	UR $\downarrow$									
$\alpha_{2C}$ AR	agonista: UR, CR $\downarrow$	$\emptyset$	UR $\uparrow$									
ORL1	agonista: UR										UR $\uparrow$	UR $\uparrow$
KissR	agonista: UR, CR $\downarrow$ ; OB: UR											
LEPR	agonista: UR, OB: CR $\downarrow$											
AdipoR	agonista: UR, CR $\downarrow$ , OB: UR											
ROS	gátló: $\emptyset$							CR $\downarrow$	CR $\downarrow$			

**3. táblázat. Az értekezésben leírt lehetséges tokolitikus célpontok, hatásmechanizmusok és kombinációk.** A kombinációk esetén a zöld szín a tokolitikus hatást növelő, a piros tokolitikus hatást csökkentő, a kék a hatást nem befolyásoló, míg a szürke szín a nem vizsgált kölcsönhatásokat jelöli. A zárójeles megjegyzések a kombinációk specifikus használhatóságát jelölik egyes kórállapotokban. A disszertációban eddig nem használt rövidítések magyarázata: CCB: Ca<sup>2+</sup> csatorna blokkoló; PDE4i: PDE4 inhibitor; AKAPi: AKAP-inhibitor;  $\beta_2$ ARA:  $\beta_2$ -AR agonista; COXi: COX-inhibitor; TNF $\alpha$ i: TNF $\alpha$ -inhibitor; NS: nocistatin; OB: obezitás; UR: uterorelaxáns; CR: cervix rezisztencia; GYUL: gyulladás; PE: preeclampsia; GHT: gesztációs hipertónia;  $\uparrow$ : fokozás;  $\uparrow\uparrow$ : erős fokozás;  $\downarrow$ : gátlás;  $\emptyset$ : hatás nem változik

## 8. Új megállapítások

1. Patkányban a vemhesség végén  $\beta_2$ -AR agonista hatásra fokozódik a cervix rezisztencia, melynek háttérében a  $\beta_2$ -AR  $G_i$ -protein kapcsoltságának dominanciája áll.
2. Patkányban a vemhesség előrehaladtával az  $\alpha_{1A}$ -AR gátlók uterusz relaxáló és cervix rezisztencia növelő hatása erősödik. A szerotonerg hatással nem rendelkező  $\alpha_{1A}$ -AR-blokkolók relaxáló hatása erősebb.
3. Patkány uteruszban a vemhesség végén  $\alpha_{2B}$ -AR gátlása uterorelaxáns és cervix rezisztencia növelő hatással bír. A kontrakciók gátlására az  $\alpha_{2A}$ - és  $\alpha_{2C}$ -AR izgatók is alkalmasak, az egyes  $\alpha_2$ -AR altípusok G-protein kapcsoltsága a vemhesség utolsó napjain jelentős diverzitást mutat.
4. A P4 előkezelés jelentősen megnöveli a  $\beta_2$ -AR agonisták uterorelaxáns hatását, melynek háttérében a vemhesség utolsó napján a  $G_s$ -protein kapcsoltság fokozása áll.
5. A  $\beta_2$ -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  $\beta_2$ -AR agonisták PDE4 gátlókkal kombinálva elsősorban gyulladássos patkány koraszülés modellben, illetve koraszülésből származó humán mintákon hatékonyak. Utóbbi szövetekben PDE4B izoenzim dominancia mérhető.
7. A  $\beta_2$ -AR agonisták AKAP-PKA gátlóval való kombinációja során a vemhes patkány uteruszban nagymértékben fokozódik a  $\beta_2$ -AR-okon keresztüli cAMP termelés és relaxáció.
8. A  $\beta_2$ -AR agonisták  $\alpha_{1A}$ -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  $\alpha_{1A}$ - és  $\alpha_{1D}$ -AR antagonisták uterorelaxáns hatását.
10. Valamennyi  $\alpha_2$ -AR altípus expressziója csökken E2 előkezelés következtében, ami csökkenti az  $\alpha_{2B}$ -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 $\alpha$  szint szerepet játszik a  $\beta_2$ -AR agonista terbutalin megnövekedett relaxációs hatásában, melynek hátterében a fokozott cAMP termelés 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.

## 9. 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)  
Q2, Független idéző: 7
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)  
Q2, Független idéző: 3
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)  
D1, Független idéző: 5
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)  
Q1, Független idéző: 3
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)  
D1, Független idéző: 16
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)  
Q2, Független idéző: 16
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)  
Q2, Független idéző: 6
8. Gálik 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)  
D1, Független idéző: 5
9. Gal A, Ducza E, Minorics R, Klukovits A, Galik M, Falkay G, **Gaspar R**: The roles of  $\alpha$ 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)  
Q2, Független idéző: 7
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)  
Q1, Független idéző: 8
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)  
Q1, Független idéző: 3

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)  
Q1, Független idéző: 7
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)  
D1, Független idéző: 4
14. Klukovits A, Tekes K, Gündüz Çinar 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)  
D1, Független idéző: 17
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, Goettert H, Joshi M, Reif B, Haase H, Morano I, Grossmann S, Klukovits A, Verli J, **Gaspar R**, Noack C, Bergmann M, Kass R, Hampel K, Kashin D, Genieser HG, Herberg FW, Willoughby D, Cooper DM, Baillie GS, Houslay MD, von Kries JP, Zimmermann B, Rosenthal W, 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)  
D1, Független idéző: 67
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)  
Q2, Független idéző: 6
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)  
-, Független idéző: 0
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)  
Q2, Független idéző: 16
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)  
Q1, Független idéző: 33
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)  
D1, Független idéző: 4
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)  
Q2, Független idéző: 7
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.  
-, Független idéző: 1



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)  
Q2, Független idéző: 3
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)  
Q1, Független idéző: 9
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)  
Q2, Független idéző: 18
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).  
D1, Független idéző: 1
27. Kothencz A, Hajagos-Toth J, Szucs KF, Schaffer A, **Gaspar R**:  $\alpha$ -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)  
Q1, Független idéző: 1
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)  
Q1, Független idéző: 2
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)  
D1, Független idéző: 1
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, Sztójkov-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)  
Q2, Független idéző: 0

## 10. Tudománymetriai táblázat

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

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Tudományos folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	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 <sup>3</sup>		1	61	89
összefoglaló közlemény		6	66	72
rövid közlemény		2	2	10
<b>II. Könyvek</b>	1			
<b>a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként</b>	1			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		1	0	0
<b>b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként</b>	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
<b>III. Könyvrészlet</b>	3			
idegen nyelvű		2	1	1
magyar nyelvű		1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvrészlet		0	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>4</sup></b>	1		0	0
<b>Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)</b>		1	0	0
<b>Tudományos közlemények összesen (I.-IV)</b>		124	804	1160
<b>Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)</b>	125		804	1160

<b>V. További tudományos művek</b>	9			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is		9	0	1
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		0	0	0
Oltalmak (szabadalmak)		0	0	0
<b>VI. Hivatkozott absztraktok<sup>5</sup></b>	0		0	0
<b>Összes hivatkozás<sup>1</sup></b>			804	1161
<b>Hirsch index<sup>6</sup></b>	19			
<b>g index<sup>6</sup></b>	28			

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	12	127
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	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 <sup>7</sup>	0	0

## 11. Irodalomjegyzék

1. Nomura, K.; Karita, K.; Araki, A.; Nishioka, E.; Muto, G.; Iwai-Shimada, M.; Nishikitani, M.; Inoue, M.; Tsurugano, S.; Kitano, N.; et al. For Making a Declaration of Countermeasures against the Falling Birth Rate from the Japanese Society for Hygiene: Summary of Discussion in the Working Group on Academic Research Strategy against an Aging Society with Low Birth Rate. *Environ Health Prev Med* **2019**, *24*, doi:10.1186/s12199-019-0768-x.
2. Malamitsi-Puchner, A. Preterm Birth in Ancient Greece: A Synopsis. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **2017**, *30*, doi:10.3109/14767058.2016.1165201.
3. Obladen, M. Historical Notes on Immaturity. Part 2: Surviving against the Odds. *J Perinat Med* **2011**, *39*, doi:10.1515/JPM.2011.057.
4. Chawanpaiboon, S.; Vogel, J.P.; Moller, A.B.; Lumbiganon, P.; Petzold, M.; Hogan, D.; Landoulsi, S.; Jampathong, N.; Kongwattanakul, K.; Laopaiboon, M.; et al. Global, Regional, and National Estimates of Levels of Preterm Birth in 2014: A Systematic Review and Modelling Analysis. *Lancet Glob Health* **2019**, *7*, doi:10.1016/S2214-109X(18)30451-0.
5. Vogel, J.P.; Chawanpaiboon, S.; Watananirun, K.; Lumbiganon, P.; Petzold, M.; Moller, A.B.; Thinkhamrop, J.; Laopaiboon, M.; Seuc, A.H.; Hogan, D.; et al. Global, Regional and National Levels and Trends of Preterm Birth Rates for 1990 to 2014: Protocol for Development of World Health Organization Estimates. *Reprod Health* **2016**, *13*, doi:10.1186/s12978-016-0193-1.
6. Oltman, S.P.; Rogers, E.E.; Baer, R.J.; Jasper, E.A.; Anderson, J.G.; Steurer, M.A.; Pantell, M.S.; Petersen, M.A.; Partridge, J.C.; Karasek, D.; et al. Newborn Metabolic Vulnerability Profile Identifies Preterm Infants at Risk for Mortality and Morbidity. *Pediatr Res* **2021**, *89*, doi:10.1038/s41390-020-01148-0.
7. Zhu, Z.; Yuan, L.; Wang, J.; Li, Q.; Yang, C.; Gao, X.; Chen, S.; Han, S.; Liu, J.; Wu, H.; et al. Mortality and Morbidity of Infants Born Extremely Preterm at Tertiary Medical Centers in China from 2010 to 2019. *JAMA Netw Open* **2021**, doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.9382.
8. Glass, H.C.; Costarino, A.T.; Stayer, S.A.; Brett, C.M.; Cladis, F.; Davis, P.J. Outcomes for Extremely Premature Infants. *Anesth Analg* **2015**, *120*, doi:10.1213/ANE.0000000000000705.
9. Waitzman, N.J.; Jalali, A.; Grosse, S.D. Preterm Birth Lifetime Costs in the United States in 2016: An Update. *Semin Perinatol* **2021**, *45*, doi:10.1016/j.semperi.2021.151390.
10. Goldenberg, R.L.; Iams, J.D.; Das, A.; Mercer, B.M.; Meis, P.J.; Moawad, A.H.; Miodovnik, M.; VanDorsten, J.P.; Caritis, S.N.; Thurnau, G.R.; et al. The Preterm Prediction Study: Sequential Cervical Length and Fetal Fibronectin Testing for the Prediction of Spontaneous Preterm Birth. *Am J Obstet Gynecol* **2000**, *182*, doi:10.1067/mob.2000.104212.
11. Belousova, V.S.; Strizhakov, A.N.; Timokhina, E. V.; Svitich, O.A.; Bogomazova, I.M.; Pitskhelauri, E.G. Preterm Birth: From Understanding of Pathogenesis to Pregnancy Management. *Obstetrics, Gynecology and Reproduction* **2019**, *12*.

12. Tanpradit, K.; Kaewkiattikun, K. The Effect of Perceived Stress during Pregnancy on Preterm Birth. *Int J Womens Health* **2020**, *12*, doi:10.2147/IJWH.S239138.
13. Elias, D.; Gimenez, L.; Poletta, F.; Campaña, H.; Gili, J.; Ratowiecki, J.; Pawluk, M.; Rittler, M.; Santos, M.R.; Uranga, R.; et al. Preterm Birth and Genitourinary Tract Infections: Assessing Gene–Environment Interaction. *Pediatr Res* **2021**, *90*, doi:10.1038/s41390-020-01200-z.
14. Jaiman, S.; Romero, R.; Bhatti, G.; Jung, E.; Gotsch, F.; Suksai, M.; Gallo, D.M.; Chaiworapongsa, T.; Kadar, N. The Role of the Placenta in Spontaneous Preterm Labor and Delivery with Intact Membranes. *J Perinat Med* **2022**, *50*, doi:10.1515/jpm-2021-0681.
15. Younger, J.D.; Reitman, E.; Gallos, G. Tocolysis: Present and Future Treatment Options. *Semin Perinatol* 2017, *41*.
16. Chang, C.Y.; Nguyen, C.P.; Wesley, B.; Guo, J.; Johnson, L.L.; Joffe, H. V. Withdrawing Approval of Makena — A Proposal from the FDA Center for Drug Evaluation and Research. *New England Journal of Medicine* **2020**, *383*, doi:10.1056/nejmp2031055.
17. Yaju, Y.; Nakayama, T. Effectiveness and Safety of Ritodrine Hydrochloride for the Treatment of Preterm Labour: A Systematic Review. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2006, *15*.
18. F., L.; P., G.  $\beta$ -Agonist Tocolytic Therapy. *Obstet Gynecol Clin North Am* **2005**, *32*.
19. Engelhardt, S.; Zieger, W.; Kassubek, J.; Michel, M.C.; Lohse, M.J.; Brodde, O.-E. Tocolytic Therapy with Fenoterol Induces Selective Down-Regulation of  $\beta$ -Adrenergic Receptors in Human Myometrium 1 . *J Clin Endocrinol Metab* **1997**, *82*, doi:10.1210/jcem.82.4.3885.
20. Neilson, J.P.; West, H.M.; Dowswell, T. Betamimetics for Inhibiting Preterm Labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, *2014*.
21. Yee, J.; Hwang, H.S.; Chung, J.E.; Park, J.Y.; Lee, K.E.; Kim, Y.J.; Gwak, H.S. Effects of PDE4 Gene Polymorphisms on Efficacy and Adverse Drug Events of Ritodrine Therapy in Preterm Labor Patients: A Prospective Observational Study. *Eur J Clin Pharmacol* **2019**, *75*, doi:10.1007/s00228-019-02719-9.
22. Fomin, V.P.; Gibbs, S.G.; Vanam, R.; Morimiya, A.; Hurd, W.W. Effect of Magnesium Sulfate on Contractile Force and Intracellular Calcium Concentration in Pregnant Human Myometrium. *Am J Obstet Gynecol* **2006**, *194*, doi:10.1016/j.ajog.2005.11.045.
23. Crowther, C.A.; Brown, J.; Mckinlay, C.J.D.; Middleton, P. Magnesium Sulphate for Preventing Preterm Birth in Threatened Preterm Labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, *2014*.
24. Chollat, C.; Sentilhes, L.; Marret, S. Protection of Brain Development by Antenatal Magnesium Sulphate for Infants Born Preterm. *Dev Med Child Neurol* 2019, *61*.
25. Ueda, A.; Kondoh, E.; Kawasaki, K.; Mogami, H.; Chigusa, Y.; Konishi, I. Magnesium Sulphate Can Prolong Pregnancy in Patients with Severe Early-Onset Preeclampsia. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **2016**, *29*, doi:10.3109/14767058.2015.1114091.

26. Dutta, E.H.; Behnia, F.; Harirah, H.; Costantine, M.; Saade, G. Perinatal Outcomes after Short versus Prolonged Indomethacin for Tocolysis in Women with Preterm Labor. In Proceedings of the American Journal of Perinatology; 2016; Vol. 33.
27. Urrego, D.; Liwa, A.C.; Cole, W.C.; Wood, S.L.; Slater, D.M. Cyclooxygenase Inhibitors for Treating Preterm Labour: What Is the Molecular Evidence?1. *Can J Physiol Pharmacol* 2019, 97.
28. Flenady, V.; Wojcieszek, A.M.; Papatsonis, D.N.M.; Stock, O.M.; Murray, L.; Jardine, L.A.; Carbonne, B. Calcium Channel Blockers for Inhibiting Preterm Labour and Birth. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, 2014.
29. Guerra, D.D.; Hurt, K.J. Gasotransmitters in Pregnancy: From Conception to Uterine Involution. *Biol Reprod* 2019, 101.
30. Duckitt, K.; Thornton, S.; O'Donovan, O.P.; Dowswell, T. Nitric Oxide Donors for Treating Preterm Labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, 2014.
31. Ferreira, J.J.; Butler, A.; Stewart, R.; Gonzalez-Cota, A.L.; Lybaert, P.; Amazu, C.; Reinl, E.L.; Wakle-Prabagaran, M.; Salkoff, L.; England, S.K.; et al. Oxytocin Can Regulate Myometrial Smooth Muscle Excitability by Inhibiting the Na<sup>+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel, Slo2.1. *Journal of Physiology* **2019**, 597, doi:10.1113/JP276806.
32. Volz, J.; Heinrich, U.; Volz-Köster, S. Conception and Spontaneous Delivery after Total Hypophysectomy. *Fertil Steril* **2002**, 77, doi:10.1016/S0015-0282(01)03198-3.
33. Flenady, V.; Reinebrant, H.E.; Liley, H.G.; Tambimuttu, E.G.; Papatsonis, D.N.M. Oxytocin Receptor Antagonists for Inhibiting Preterm Labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2014, 2014.
34. Di Renzo, G.C.; Tosto, V.; Giardina, I. The Biological Basis and Prevention of Preterm Birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2018, 52.
35. Nelson, D.B.; McIntire, D.D.; McDonald, J.; Gard, J.; Turrichi, P.; Leveno, K.J. 17-Alpha Hydroxyprogesterone Caproate Did Not Reduce the Rate of Recurrent Preterm Birth in a Prospective Cohort Study. *Am J Obstet Gynecol* **2017**, 216, doi:10.1016/j.ajog.2017.02.025.
36. Sfakianaki, A.K.; Norwitz, E.R. Mechanisms of Progesterone Action in Inhibiting Prematurity. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2006, 19.
37. Luo, G.; Abrahams, V.M.; Tadesse, S.; Funai, E.F.; Hodgson, E.J.; Gao, J.; Norwitz, E.R. Progesterone Inhibits Basal and Tnf- $\alpha$ -Induced Apoptosis in Fetal Membranes: A Novel Mechanism to Explain Progesterone-Mediated Prevention of Preterm Birth. *Reproductive Sciences* **2010**, 17, doi:10.1177/1933719110363618.
38. Manuck, T.A.; Watkins, W.S.; Esplin, M.S.; Biggio, J.; Bukowski, R.; Parry, S.; Zhan, H.; Huang, H.; Andrews, W.; Saade, G.; et al. Pharmacogenomics of 17-Alpha Hydroxyprogesterone Caproate for Recurrent Preterm Birth: A Case-Control Study. *BJOG* **2018**, 125, doi:10.1111/1471-0528.14485.
39. Jarde, A.; Lutsiv, O.; Beyene, J.; McDonald, S.D. Vaginal Progesterone, Oral Progesterone, 17-OHPC, Cerclage, and Pessary for Preventing Preterm Birth in

- at-Risk Singleton Pregnancies: An Updated Systematic Review and Network Meta-Analysis. *BJOG* 2019, 126.
40. Goldenberg, R.L.; Culhane, J.F.; Iams, J.D.; Romero, R. Epidemiology and Causes of Preterm Birth. *The Lancet* 2008, 371.
  41. Smaill, F.M.; Vazquez, J.C. Antibiotics for Asymptomatic Bacteriuria in Pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019, 2019.
  42. Lamont, R.F.; Nhan-Chang, C.L.; Sobel, J.D.; Workowski, K.; Conde-Agudelo, A.; Romero, R. Treatment of Abnormal Vaginal Flora in Early Pregnancy with Clindamycin for the Prevention of Spontaneous Preterm Birth: A Systematic Review and Metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol* 2011, 205.
  43. Bellad, M.B.; Hoffman, M.K.; Mallapur, A.A.; Charantimath, U.S.; Katageri, G.M.; Ganachari, M.S.; Kavi, A.; Ramdurg, U.Y.; Bannale, S.G.; Revankar, A.P.; et al. Clindamycin to Reduce Preterm Birth in a Low Resource Setting: A Randomised Placebo-Controlled Clinical Trial. *BJOG* **2018**, 125, doi:10.1111/1471-0528.15290.
  44. Lee, A.C.; Mullany, L.C.; Quaiyum, M.; Mitra, D.K.; Labrique, A.; Christian, P.; Ahmed, P.; Uddin, J.; Rafiqullah, I.; DasGupta, S.; et al. Effect of Population-Based Antenatal Screening and Treatment of Genitourinary Tract Infections on Birth Outcomes in Sylhet, Bangladesh (MIST): A Cluster-Randomised Clinical Trial. *Lancet Glob Health* **2019**, 7, doi:10.1016/S2214-109X(18)30441-8.
  45. McClure, E.M.; Goldenberg, R.L. Use of Antibiotics to Reduce Preterm Birth. *Lancet Glob Health* 2019, 7.
  46. Tabatabaei, N.; Eren, A.M.; Barreiro, L.B.; Yotova, V.; Dumaine, A.; Allard, C.; Fraser, W.D. Vaginal Microbiome in Early Pregnancy and Subsequent Risk of Spontaneous Preterm Birth: A Case–Control Study. *BJOG* **2019**, 126, doi:10.1111/1471-0528.15299.
  47. Strus, M.; Chmielarczyk, A.; Kochan, P.; Adamski, P.; Chełmicki, Z.; Chełmicki, A.; Pałucha, A.; Heczko, P.B. Studies on the Effects of Probiotic Lactobacillus Mixture given Orally on Vaginal and Rectal Colonization and on Parameters of Vaginal Health in Women with Intermediate Vaginal Flora. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **2012**, 163, doi:10.1016/j.ejogrb.2012.05.001.
  48. Ma, L.; Su, J.; Su, Y.; Sun, W.; Zeng, Z. Probiotics Administered Intravaginally as a Complementary Therapy Combined with Antibiotics for the Treatment of Bacterial Vaginosis: A Systematic Review Protocol. *BMJ Open* 2017, 7.
  49. Dirandeh, E.; Towhidi, A.; Ansari Pirsaraei, Z.; Adib Hashemi, F.; Ganjkanlou, M.; Zeinoaldini, S.; Rezaei Roodbari, A.; Saberifar, T.; Petit, H. V. Plasma Concentrations of PGFM and Uterine and Ovarian Responses in Early Lactation Dairy Cows Fed Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids. *Theriogenology* **2013**, 80, doi:10.1016/j.theriogenology.2013.03.012.
  50. Caldari-Torres, C.; Rodriguez-Sallaberry, C.; Greene, E.S.; Badinga, L. Differential Effects of N-3 and n-6 Fatty Acids on Prostaglandin F 2 $\alpha$  Production by Bovine Endometrial Cells. *J Dairy Sci* **2006**, 89, doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72162-2.
  51. Ciesielski, T.H.; Bartlett, J.; Williams, S.M. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake Norms and Preterm Birth Rate: A Cross-Sectional Analysis of 184 Countries. *BMJ Open* **2019**, 9, doi:10.1136/bmjopen-2018-027249.

52. Arora, C.P.; Kacerovsky, M.; Zinner, B.; Ertl, T.; Ceausu, I.; Rusnak, I.; Shurpyak, S.; Sandhu, M.; Hobel, C.J.; Dumesic, D.A.; et al. Disparities and Relative Risk Ratio of Preterm Birth in Six Central and Eastern European Centers. *Croat Med J* **2015**, *56*, doi:10.3325/cmj.2015.56.119.
53. Numerato, D.; Fattore, G.; Tediosi, F.; Zanini, R.; Peltola, M.; Banks, H.; Mihalicza, P.; Lehtonen, L.; Sveréus, S.; Heijink, R.; et al. Mortality and Length of Stay of Very Low Birth Weight and Very Preterm Infants: A EuroHOPE Study. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0131685.
54. Gáspár, R.; Földesi, I.; Havass, J.; Márki, A.; Falkay, G. Characterization of Late-Pregnant Rat Uterine Contraction via the Contractility Ratio in Vitro. Significance of A1-Adrenoceptors. *Life Sci* **2001**, *68*, 1119–1129, doi:10.1016/S0024-3205(00)01014-6.
55. Szucs, E.; Büki, A.; Kékesi, G.; Horváth, G.; Benyhe, S. Mu-Opioid (MOP) Receptor Mediated G-Protein Signaling Is Impaired in Specific Brain Regions in a Rat Model of Schizophrenia. *Neurosci Lett* **2016**, *619*, doi:10.1016/j.neulet.2016.02.060.
56. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem* **1987**, *162*, doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2.
57. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
58. Unal, E.; Eris, C.; Kaya, B.; Uzun, H.; Cavdar, F.; Yildar, M.; Kiziler, A.R.; Aydemir, B.; Gunes, P.; Kutanis, R.; et al. Paraoxonase and Arylesterase Activities, Lipid Profile, and Oxidative Damage in Experimental Ischemic Colitis Model. *Gastroenterol Res Pract* **2012**, doi:10.1155/2012/979506.
59. Erel, O. A New Automated Colorimetric Method for Measuring Total Oxidant Status. *Clin Biochem* **2005**, *38*, doi:10.1016/j.clinbiochem.2005.08.008.
60. Erel, O. A Novel Automated Direct Measurement Method for Total Antioxidant Capacity Using a New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clin Biochem* **2004**, *37*, doi:10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.
61. Rechberger, T.; Abramson, S.R.; Woessner, J.F. Onapristone and Prostaglandin E2 Induction of Delivery in the Rat in Late Pregnancy: A Model for the Analysis of Cervical Softening. *Am J Obstet Gynecol* **1996**, *175*, doi:10.1053/ob.1996.v175.a74254.
62. Elovitz, M.A.; Mrinalini, C. Animal Models of Preterm Birth. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **2004**, *15*.
63. Szucs, K.F.; Grosz, G.; Süle, M.; Nagy, A.; Tiszai, Z.; Samavati, R.; Gáspár, R. Identification of Myoelectric Signals of Pregnant Rat Uterus: New Method to Detect Myometrial Contraction. *Croat Med J* **2017**, *58*, doi:10.3325/cmj.2017.58.141.
64. John, S.; Kale, M.; Rathore, N.; Bhatnagar, D. Protective Effect of Vitamin E in Dimethoate and Malathion Induced Oxidative Stress in Rat Erythrocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2001**, *12*, doi:10.1016/S0955-2863(01)00160-7.
65. Halpin, R.A.; Geer, L.A.; Zhang, K.E.; Marks, T.M.; Dean, D.C.; Allen, N.; Jones, A.; Melillo, D.; Doss, G.; Vyas, K.P. The Absorption, Distribution,

- Metabolism and Excretion of Rofecoxib, a Potent and Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor, in Rats and Dogs. *Drug Metabolism and Disposition* **2000**, *28*.
66. Langer, S.Z. Nomenclature and State of the Art on A1-Adrenoceptors. In *Proceedings of the European Urology*; 1998; Vol. 33.
67. Ducza, E.; Gáspár, R.; Falkay, G. Altered Levels of mRNA Expression and Pharmacological Reactivity of A1-Adrenergic Receptor Subtypes in the Late-Pregnant Rat Myometrium. *Mol Reprod Dev* **2002**, *62*, 343–347, doi:10.1002/mrd.10148.
68. Castillo, C.; Ibarra, M.; Márquez, J.A.; Villalobos-Molina, R.; Hong, E. Pharmacological Evidence for Interactions between 5-HT1A Receptor Agonists and Subtypes of A1-Adrenoceptors on Rabbit Aorta. *Eur J Pharmacol* **1993**, *241*, doi:10.1016/0014-2999(93)90195-N.
69. Chidlow, G.; Cupido, A.; Melena, J.; Osborne, N.N. Flesinoxan, a 5-HT1A Receptor Agonist/A1-Adrenoceptor Antagonist, Lowers Intraocular Pressure in NZW Rabbits. *Curr Eye Res* **2001**, *23*, doi:10.1076/ceyr.23.2.144.5480.
70. Mihályi, A.; Ducza, E.; Gáspár, R.; Falkay, G. Investigation of the Role of the Serotonergic Activity of Certain Subtype-Selective A1A Antagonists in the Relaxant Effect on the Pregnant Rat Uterus in Vitro. *Mol Hum Reprod* **2003**, *9*, 475–480.
71. Macmillan, L.B.; Lakhani, P.; Lovinger, D.; Limbird, L.E. Alpha2-Adrenergic Receptor Subtypes: Subtle Mutation of the A2A-Adrenergic Receptor in Vivo by Gene Targeting Strategies Reveals the Role of This Subtype in Multiple Physiological Settings. *Recent Prog Horm Res* **1998**, *53*.
72. Li, J.K.H.; Lai, P.F.; Tribe, R.M.; Johnson, M.R. Transcription Factors Regulated by CAMP in Smooth Muscle of the Myometrium at Human Parturition. *Biochem Soc Trans* 2021, *49*.
73. Gáspár, R.; Gál, A.; Gálik, M.; Ducza, E.; Minorics, R.; Kolarovszki-Sipiczki, Z.; Klukovits, A.; Falkay, G. Different Roles of A2-Adrenoceptor Subtypes in Non-Pregnant and Late-Pregnant Uterine Contractility in Vitro in the Rat. *Neurochem Int* **2007**, *51*, 311–318, doi:10.1016/j.neuint.2007.06.029.
74. Nelson, S.M.; Khan, A.H.; Norman, J.E. Cervical and Myometrial Physiology and Preterm Labor. *Expert Rev Obstet Gynecol* **2007**, *2*, doi:10.1586/17474108.2.2.179.
75. Gáspár, R.; Kolarovszki-Sipiczki, Z.; Ducza, E.; Páldy, E.; Benyhe, S.; Borsodi, A.; Falkay, G. Terbutaline Increases the Cervical Resistance of the Pregnant Rat in Vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2005**, *371*, 61–71, doi:10.1007/s00210-004-1010-x.
76. Kolarovszki-Sipiczki, Z.; Gáspár, R.; Ducza, E.; Páldy, E.; Benyhe, S.; Borsodi, A.; Falkay, G. Effect of A1-Adrenoceptor Subtype-Selective Inverse Agonists on Non-Pregnant and Late-Pregnant Cervical Resistance in Vitro in the Rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2007**, *34*, 42–47, doi:10.1111/j.1440-1681.2007.04529.x.
77. Murata, T.; Higuchi, T. Progesterone Receptor mRNA Levels during Pregnancy, Labor, Lactation and the Estrous Cycle in Rat Uterus. *Journal of Reproduction and Development* **2003**, *49*, doi:10.1262/jrd.49.425.
78. Minneman, K.P. A1-Adrenergic Receptor Subtypes, Inositol Phosphates, and Sources of Cell Ca<sup>2+</sup>. *Pharmacol Rev* 1988, *40*.



79. Gál, A.; Ducza, E.; Minorics, R.; Klukovits, A.; Gálik, M.; Falkay, G.; Gáspár, R. The Roles of A2-Adrenoceptor Subtypes in the Control of Cervical Resistance in the Late-Pregnant Rat. *Eur J Pharmacol* **2009**, *615*, doi:10.1016/j.ejphar.2009.04.067.
80. Shynlova, O.; Tsui, P.; Jaffer, S.; Lye, S.J. Integration of Endocrine and Mechanical Signals in the Regulation of Myometrial Functions during Pregnancy and Labour. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **2009**, *144*, doi:10.1016/j.ejogrb.2009.02.044.
81. Gáspár, R.; Ducza, E.; Mihályi, A.; Márki, Á.; Kolarovszki-Sipiczki, Z.; Páldy, E.; Benyhe, S.; Borsodi, A.; Földesi, 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* **2005**, *130*, 113–122, doi:10.1530/rep.1.00490.
82. Gálik, 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. *Am J Obstet Gynecol* **2008**, *198*, 319.e1-319.e5, doi:10.1016/j.ajog.2007.09.027.
83. Moore, N.G.; Pegg, G.G.; Sillence, M.N. Anabolic Effects of the B2-Adrenoceptor Agonist Salmeterol Are Dependent on Route of Administration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **1994**, *267*, doi:10.1152/ajpendo.1994.267.3.e475.
84. Alsulmi, E.S.; Alfaraj, M.; Faden, Y.; Al Qahtani, N. The Use of Progesterone during Pregnancy to Prevent Preterm Birth. *Saudi Med J* **2020**, *41*, doi:10.15537/SMJ.2020.4.25036.
85. Helguera, G.; Olcese, R.; Song, M.; Toro, L.; Stefani, E. Tissue-Specific Regulation of Ca<sup>2+</sup> Channel Protein Expression by Sex Hormones. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **2002**, *1569*, doi:10.1016/S0304-4165(01)00234-3.
86. Moynihan, A.T.; Smith, T.J.; Morrison, J.J. The Relaxant Effect of Nifedipine in Human Uterine Smooth Muscle and the BKCa Channel. *Am J Obstet Gynecol* **2008**, *198*, doi:10.1016/j.ajog.2007.08.074.
87. Lever, A.M.L.; Corris, P.A.; Gibson, G.J. Nifedipine Enhances the Bronchodilator Effect of Salbutamol. *Thorax* **1984**, *39*, doi:10.1136/thx.39.8.576.
88. Hajagos-Tóth, J.; Falkay, G.; Gáspár, R. Modification of the Effect of Nifedipine in the Pregnant Rat Myometrium: The Influence of Progesterone and Terbutaline. *Life Sci* **2009**, *85*, 568–572, doi:10.1016/j.lfs.2009.08.008.
89. Hajagos-Tth, J.; Kormnyos, Z.; Falkay, G.; Pl, A.; Gspr, R. Potentiation of the Uterus-Relaxing Effects of  $\beta$ -Adrenergic Agonists with Nifedipine: Studies on Rats and the Human Myometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand* **2010**, *89*, doi:10.3109/00016349.2010.512064.
90. Johnson, K.R.; Nicodemus-Johnson, J.; Danziger, R.S. An Evolutionary Analysis of CAMP-Specific Phosphodiesterase 4 Alternative Splicing. *BMC Evol Biol* **2010**, *10*, doi:10.1186/1471-2148-10-247.
91. Lugnier, C. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE) Superfamily: A New Target for the Development of Specific Therapeutic Agents. *Pharmacol Ther* **2006**, *109*.

92. Al-Nema, M.; Gaurav, A.; Lee, V.S. Docking Based Screening and Molecular Dynamics Simulations to Identify Potential Selective PDE4B Inhibitor. *Heliyon* **2020**, *6*, doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04856.
93. Klukovits, A.; Verli, J.; Falkay, G.; Gáspár, R. Improving the Relaxing Effect of Terbutaline with Phosphodiesterase Inhibitors: Studies on Pregnant Rat Uteri in Vitro. *Life Sci* **2010**, *87*, 733–737, doi:10.1016/j.lfs.2010.10.010.
94. Verli, J.; Klukovits, A.; Kormányos, Z.; Hajagos-Tóth, J.; Ducza, E.; Seres, A.B.; Falkay, G.; Gáspár, R. Uterus-Relaxing Effect of B2-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* **2013**, *39*, 31–39, doi:10.1111/j.1447-0756.2012.01929.x.
95. Taylor, S.S.; Kim, C.; Cheng, C.Y.; Brown, S.H.J.; Wu, J.; Kannan, N. Signaling through CAMP and CAMP-Dependent Protein Kinase: Diverse Strategies for Drug Design. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **2008**, *1784*, doi:10.1016/j.bbapap.2007.10.002.
96. Gold, M.G.; Lygren, B.; Dokurno, P.; Hoshi, N.; McConnachie, G.; Taskén, K.; Carlson, C.R.; Scott, J.D.; Barford, D. Molecular Basis of AKAP Specificity for PKA Regulatory Subunits. *Mol Cell* **2006**, *24*, doi:10.1016/j.molcel.2006.09.006.
97. Hundsrucker, C.; Klussmann, E. Direct AKAP-Mediated Protein-Protein Interactions as Potential Drug Targets. *Handb Exp Pharmacol* **2008**, *186*, doi:10.1007/978-3-540-72843-6\_20.
98. Carnegie, G.K.; Means, C.K.; Scott, J.D. A-Kinase Anchoring Proteins: From Protein Complexes to Physiology and Disease. *IUBMB Life* **2009**, *61*.
99. Mauban, J.R.H.; O'Donnell, M.; Warriar, S.; Manni, S.; Bond, M. AKAP-Scaffolding Proteins and Regulation of Cardiac Physiology. *Physiology* **2009**, *24*.
100. Santana, L.F.; Navedo, M.F. Molecular and Biophysical Mechanisms of Ca<sup>2+</sup> Sparklets in Smooth Muscle. *J Mol Cell Cardiol* **2009**, *47*.
101. Sanborn, B.M.; Ku, C.Y.; Shlykov, S.; Babich, L. Molecular Signaling through G-Protein-Coupled Receptors and the Control of Intracellular Calcium in Myometrium. *J Soc Gynecol Investig* **2005**, *12*.
102. Christian, F.; Szaszák, M.; Friedl, S.; Drewianka, S.; Lorenz, D.; Goncalves, A.; Furkert, J.; Vargas, C.; Schmieder, P.; Götz, F.; et al. Small Molecule AKAP-Protein Kinase A (PKA) Interaction Disruptors That Activate PKA Interfere with Compartmentalized CAMP Signaling in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 9079–9096, doi:10.1074/jbc.M110.160614.
103. Mihályi, A.; Gáspár, R.; Csonka, D.; Falkay, G. Synergism between B2-Adrenoceptor Agonists and Subtype-Selective A1A-Adrenoceptor Antagonists in the Tocolytic Effect on Pregnant Rat Uterus in Vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2003**, *30*, 164–167, doi:10.1046/j.1440-1681.2003.03811.x.
104. 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 A1A- and A1D-Adrenoceptor Subtypes in the Late-Pregnant Rat Myometrium. *Eur J Pharmacol* **2015**, *769*, 177–184, doi:10.1016/j.ejphar.2015.11.015.
105. 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 A2-

- Adrenergic Receptor Subtypes in Rat Uterine Function in Late Pregnancy in Vitro. *Croat Med J* **2016**, *57*, doi:10.3325/cmj.2016.57.100.
106. 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* **2016**, *14*, doi:10.1186/s12958-016-0166-9.
107. Gimpl, G.; Fahrenholz, F. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiol Rev* 2001, *81*.
108. Blanks, A.M.; Thornton, S. The Role of Oxytocin in Parturition. *BJOG* **2003**, *110*, doi:10.1046/j.1471-0528.2003.00024.x.
109. Fuchs, A.R.; Fuchs, F.; Husslein, P.; Soloff, M.S. Oxytocin Receptors in the Human Uterus during Pregnancy and Parturition. *Am J Obstet Gynecol* **1984**, *150*, doi:10.1016/0002-9378(84)90677-X.
110. Petraglia, F.; Imperatore, A.; Challis, J.R.G. Neuroendocrine Mechanisms in Pregnancy and Parturition. *Endocr Rev* 2010, *31*.
111. Pennefather, J.N.; Reynoldson, N.A.; Handberg, G.M. Inhibition of Rat Uterine Contractions by Rat and Human CGRP. *Peptides (N.Y.)* **1990**, *11*, doi:10.1016/0196-9781(90)90006-Q.
112. Anouar, A.; Schirar, A.; Germain, G. Relaxant Effect of the Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) on the Nonpregnant and Pregnant Rat Uterus. Comparison, with Vascular Tissue. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1998**, *357*, doi:10.1007/PL00005192.
113. Reinscheid, R.K.; Nothacker, H.P.; Bourson, A.; Ardati, A.; Henningsen, R.A.; Bunzow, J.R.; Grandy, D.K.; Langen, H.; Monsma, F.J.; Civelli, O. Orphanin FQ: A Neuropeptide That Activates an Opioidlike G Protein-Coupled Receptor. *Science (1979)* **1995**, *270*, doi:10.1126/science.270.5237.792.
114. Meunier, J.C.; Mollereau, C.; Toll, L.; Suaudeau, C.; Moisand, C.; Alvinerie, P.; Butour, J.L.; Guillemot, J.C.; Ferrara, P.; Monsarrat, B.; et al. Isolation and Structure of the Endogenous Agonist of Opioid Receptor-like ORL1 Receptor. *Nature* 1995, *377*.
115. Lachowicz, J.E.; Shen, Y.; Monsma, F.J.; Sibley, D.R. Molecular Cloning of a Novel G Protein-Coupled Receptor Related to the Opiate Receptor Family. *J Neurochem* **1995**, *64*, doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64010034.x.
116. Okuda-Ashitaka, E.; Ito, S. Nocistatin: A Novel Neuropeptide Encoded by the Gene for the Nociceptin/Orphanin FQ Precursor. *Peptides (N.Y.)* **2000**, *21*, doi:10.1016/S0196-9781(00)00247-3.
117. Zeilhofer, H.U.; Muth-Selbach, U.; Gühring, H.; Erb, K.; Ahmadi, S. Selective Suppression of Inhibitory Synaptic Transmission by Nocistatin in the Rat Spinal Cord Dorsal Horn. *Journal of Neuroscience* **2000**, *20*, doi:10.1523/jneurosci.20-13-04922.2000.
118. Johnson, E.E.; Connor, M. Towards a Receptor for Nocistatin? *Br J Pharmacol* 2007, *152*.
119. 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 & Sexual Disorders* **2013**, *02*, doi:10.4172/2161-038x.1000117.

120. Gáspár, R.; Deák, B.H.; Klukovits, A.; Ducza, E.; Tekes, K. *Effects of Nociceptin and Nocistatin on Uterine Contraction*; 2015; Vol. 97;.
121. Klukovits, A.; Tekes, K.; Gündüz Çinar, 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. *Biol Reprod* **2010**, *83*, 36–41, doi:10.1095/biolreprod.109.082222.
122. Deák, B.H.; Klukovits, A.; Tekes, K.; Ducza, E.; Falkay, G.; Gáspár, R. Nocistatin Inhibits Pregnant Rat Uterine Contractions in Vitro: Roles of Calcitonin Gene-Related Peptide and Calcium-Dependent Potassium Channel. *Eur J Pharmacol* **2013**, *714*, 96–104, doi:10.1016/j.ejphar.2013.05.037.
123. Ohtaki, T.; Shintani, Y.; Honda, S.; Matsumoto, H.; Hori, A.; Kanehashi, K.; Terao, Y.; Kumano, S.; Takatsu, Y.; Masuda, Y.; et al. Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Peptide Ligand of a G-Protein-Coupled Receptor. *Nature* **2001**, *411*, doi:10.1038/35079135.
124. Kotani, M.; Detheux, M.; Vandenberghe, A.; Communi, D.; Vanderwinden, J.M.; Le Poul, E.; Brézillon, S.; Tyldesley, R.; Suarez-Huerta, N.; Vandeput, F.; et al. The Metastasis Suppressor Gene KiSS-1 Encodes Kisspeptins, the Natural Ligands of the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR54. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, doi:10.1074/jbc.M104847200.
125. Castellano, J.M.; Gaytan, M.; Roa, J.; Vigo, E.; Navarro, V.M.; Bellido, C.; Dieguez, C.; Aguilar, E.; Sánchez-Criado, J.E.; Pellicer, A.; et al. Expression of KiSS-1 in Rat Ovary: Putative Local Regulator of Ovulation? *Endocrinology* **2006**, *147*, doi:10.1210/en.2006-0117.
126. Gaytán, F.; Gaytán, M.; Castellano, J.M.; Romero, M.; Roa, J.; Aparicio, B.; Garrido, N.; Sánchez-Criado, J.E.; Millar, R.P.; Pellicer, A.; et al. KiSS-1 in the Mammalian Ovary: Distribution of Kisspeptin in Human and Marmoset and Alterations in KiSS-1 mRNA Levels in a Rat Model of Ovulatory Dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2009**, *296*, doi:10.1152/ajpendo.90895.2008.
127. Han, S.K.; Gottsch, M.L.; Lee, K.J.; Popa, S.M.; Smith, J.T.; Jakawich, S.K.; Clifton, D.K.; Steiner, R.A.; Herbison, A.E. Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons by Kisspeptin as a Neuroendocrine Switch for the Onset of Puberty. *Journal of Neuroscience* **2005**, *25*, doi:10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005.
128. Scott, V.; Brown, C.H. Kisspeptin Activation of Supraoptic Nucleus Neurons in Vivo. *Endocrinology* **2011**, *152*, doi:10.1210/en.2011-1181.
129. 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. *Eur J Pharmacol* **2021**, *896*, doi:10.1016/j.ejphar.2021.173924.
130. Masuzaki, H.; Ogawa, Y.; Sagawa, N.; Hosoda, K.; Matsumoto, T.; Mise, H.; Nishimura, H.; Yoshimasa, Y.; Tanaka, I.; Mori, T.; et al. Nonadipose Tissue Production of Leptin: Leptin as a Novel Placenta-Derived Hormone in Humans. *Nat Med* **1997**, *3*, doi:10.1038/nm0997-1029.
131. Yarandi, S.S.; Hebbar, G.; Sauer, C.G.; Cole, C.R.; Ziegler, T.R. Diverse Roles of Leptin in the Gastrointestinal Tract: Modulation of Motility, Absorption, Growth, and Inflammation. *Nutrition* **2011**, *27*.

132. Zhang, Y.; Chua, S. Leptin Function and Regulation. *Compr Physiol* **2018**, *8*, doi:10.1002/cphy.c160041.
133. Morris, D.L.; Rui, L. Recent Advances in Understanding Leptin Signaling and Leptin Resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, 297.
134. Pankov, Y.A. Kisspeptin and Leptin in the Regulation of Fertility. *Mol Biol* 2015, 49.
135. Moschos, S.; Chan, J.L.; Mantzoros, C.S. Leptin and Reproduction: A Review. *Fertil Steril* 2002, 77.
136. Mumtaz, S.; Alsaif, S.; Wray, S.; Noble, K. Inhibitory Effect of Visfatin and Leptin on Human and Rat Myometrial Contractility. *Life Sci* **2015**, *125*, doi:10.1016/j.lfs.2015.01.020.
137. Arita, Y.; Kihara, S.; Ouchi, N.; Takahashi, M.; Maeda, K.; Miyagawa, J.I.; Hotta, K.; Shimomura, I.; Nakamura, T.; Miyaoka, K.; et al. Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**, *257*, doi:10.1006/bbrc.1999.0255.
138. Takeuchi, T.; Adachi, Y.; Ohtsuki, Y.; Furihata, M. Adiponectin Receptors, with Special Focus on the Role of the Third Receptor, T-Cadherin, in Vascular Disease. *Med Mol Morphol* 2007, 40.
139. Kim, S.T.; Marquard, K.; Stephens, S.; Loudon, E.; Allsworth, J.; Moley, K.H. Adiponectin and Adiponectin Receptors in the Mouse Preimplantation Embryo and Uterus. *Human Reproduction* **2011**, *26*, doi:10.1093/humrep/deq292.
140. Vyas, V.; Guerra, D.D.; Bok, R.; Powell, T.; Jansson, T.; Hurt, K.J. Adiponectin Links Maternal Metabolism to Uterine Contractility. *FASEB Journal* **2019**, *33*, doi:10.1096/fj.201901646R.
141. Schaffer, A.; Ducza, E.; Bódi, N.; Bagyánszki, M.; Szalai, Z.; Mirdamadi, M.; Barna, T.; Szűcs, K.F.; Gáspár, R. The Ontogenies of Endometrial and Myometrial Leptin and Adiponectin Receptors in Pregnant Rats: Their Putative Impact on Uterine Contractility. *Life Sci* **2022**, *297*, 120465, doi:10.1016/j.lfs.2022.120465.
142. Reichetzeder, C. Overweight and Obesity in Pregnancy: Their Impact on Epigenetics. *Eur J Clin Nutr* 2021, 75.
143. Wang, A.M.; Lee, A.J.; Clark, S.M. The Effects of Overweight and Obesity on Pregnancy-Related Morbidity. *Clin Exp Obstet Gynecol* **2021**, *48*, doi:10.31083/j.ceog4805161.
144. Tanaka, K.; Osaka, M.; Takemori, S.; Watanabe, M.; Tanigaki, S.; Kobayashi, Y. Contraction-Associated Proteins Expression by Human Uterine Smooth Muscle Cells Depends on Maternal Serum and Progranulin Associated with Gestational Weight Gain. *Endocr J* **2020**, *67*, doi:10.1507/endocrj.EJ20-0037.
145. Liu, B.; Xu, G.; Sun, Y.; Du, Y.; Gao, R.; Snetselaar, L.G.; Santillan, M.K.; Bao, W. Association between Maternal Pre-Pregnancy Obesity and Preterm Birth According to Maternal Age and Race or Ethnicity: A Population-Based Study. *Lancet Diabetes Endocrinol* **2019**, *7*, doi:10.1016/S2213-8587(19)30193-7.
146. Hajagos-Tóth, J.; Ducza, E.; Samavati, R.; Vari, S.G.; Gaspar, R. Obesity in Pregnancy: A Novel Concept on the Roles of Adipokines in Uterine Contractility. *Croat Med J* **2017**, *58*, doi:10.3325/cmj.2017.58.96.

147. Goh, J.Y.; He, S.; Allen, J.C.; Malhotra, R.; Tan, T.C. Maternal Obesity Is Associated with a Low Serum Progesterone Level in Early Pregnancy. *Horm Mol Biol Clin Investig* **2016**, *27*, doi:10.1515/hmbci-2015-0030.
148. Fujimori, M.; França, E.L.; Morais, T.C.; Fiorin, V.; de Abreu, L.C.; Honório-França, A.C. Cytokine and Adipokine Are Biofactors Can Act in Blood and Colostrum of Obese Mothers. *BioFactors* **2017**, *43*, doi:10.1002/biof.1339.
149. Venkatesh, K.K.; Cantonwine, D.E.; Zera, C.; Arjona, M.; Smith, N.A.; Robinson, J.N.; McElrath, T.F. Is There an Association between Body Mass Index and Cervical Length? Implications for Obesity and Cervical Length Management in Pregnancy. *Am J Perinatol* **2017**, *34*, doi:10.1055/s-0036-1594242.
150. Vachharajani, V.; Granger, D.N. Adipose Tissue: A Motor for the Inflammation Associated with Obesity. *IUBMB Life* 2009, *61*.
151. Helmo, F.R.; Alves, E.A.R.; Moreira, R.A. de A.; Severino, V.O.; Rocha, L.P.; Monteiro, M.L.G. dos R.; Reis, M.A. dos; Etchebehere, R.M.; Machado, J.R.; Corrêa, R.R.M. Intrauterine Infection, Immune System and Premature Birth. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* 2018, *31*.
152. Watts, D.H.; Krohn, M.A.; Hillier, S.L.; Eschenbach, D.A. The Association of Occult Amniotic Fluid Infection with Gestational Age and Neonatal Outcome among Women in Preterm Labor. *Obstetrics and Gynecology* **1992**, *79*, doi:10.1097/00006250-199203000-00005.
153. Lindström, T.M.; Bennett, P.R. The Role of Nuclear Factor Kappa B in Human Labour. *Reproduction* 2005, *130*.
154. Gáspár, R.; Hajagos-Tóth, J.; Schaffer, A.; Kothencz, A.; Siska-Szabó, L.; Ducza, E.; Csányi, A.; Tábi, T.; Bagaméry, F.; Szökő, É.; et al. High Fat High Sucrose Diet Modifies Uterine Contractility and Cervical Resistance in Pregnant Rats: The Roles of Sex Hormones, Adipokines and Cytokines. *Life* **2022**, *12*, doi:10.3390/life12060794.
155. Klukovits, A.; Márki, A.; Páldy, E.; Benyhe, S.; Gálik, M.; Falkay, G.; Gáspár, R. Inflammatory Processes Enhance CAMP-Mediated Uterus Relaxation in the Pregnant Rat: The Role of TNF- $\alpha$ . *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2009**, *379*, 501–510, doi:10.1007/s00210-008-0381-9.
156. Ray, P.D.; Huang, B.W.; Tsuji, Y. Reactive Oxygen Species (ROS) Homeostasis and Redox Regulation in Cellular Signaling. *Cell Signal* 2012, *24*.
157. Thannickal, V.J.; Fanburg, B.L. Reactive Oxygen Species in Cell Signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, *279*.
158. Andersson, D.C.; Fauconnier, J.; Yamada, T.; Lacampagne, A.; Zhang, S.J.; Katz, A.; Westerblad, H. Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species Contributes to the  $\beta$ -Adrenergic Stimulation of Mouse Cardiomyocytes. *Journal of Physiology* **2011**, *589*, doi:10.1113/jphysiol.2010.202838.
159. Moniri, N.H.; Daaka, Y. Agonist-Stimulated Reactive Oxygen Species Formation Regulates  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Signal Transduction. *Biochem Pharmacol* **2007**, *74*, doi:10.1016/j.bcp.2007.03.016.
160. Zingg, J.M. Vitamin E: Regulatory Role on Signal Transduction. *IUBMB Life* 2019, *71*.
161. Dong, Y.L.; Gangula, P.R.R.; Fang, L.; Yallampalli, C. Differential Expression of Cyclooxygenase-1 and -2 Proteins in Rat Uterus and Cervix during the Estrous

- Cycle, Pregnancy, Labor and in Myometrial Cells. *Prostaglandins* **1996**, 52, doi:10.1016/0090-6980(96)00059-7.
162. 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 Sci* **2018**, 192, doi:10.1016/j.lfs.2017.11.048.
163. Kothencz, A.; Hajagos-Tóth, J.; Szucs, K.F.; Schaffer, A.; Gáspár, R. A-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* **2019**, 368, doi:10.1124/jpet.118.251850.
164. Hódi, Á.; Földesi, I.; Ducza, E.; Hajagos-Tóth, J.; Seres, A.B.; Klukovits, A.; Gáspár, 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 Sci* **2014**, 105, 48–55, doi:10.1016/j.lfs.2014.04.023.
165. Dodd, J.M.; Crowther, C.A.; Middleton, P. Oral Betamimetics for Maintenance Therapy after Threatened Preterm Labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, 2012.
166. Chen, F.; Chen, X.; Qiu, Z.; Wang, M.; Yang, S.; Khamis, M.; Yu, M.; Yu, X.; Liu, Z.; Wang, L.; et al. Functional Analysis of a Novel Antagonistic Antibody against the Short Epitope of the A1A-Adrenergic Receptor. *Cardiovasc Res* **2012**, 93, doi:10.1093/cvr/cvr318.
167. Legrand, C.; Mhaouty, S.; Rigolot, C.; Maltier, J.P. Heterogeneity of Alpha-2 Adrenoceptors in Pregnant Rat Uterus: Identification of Subtypes and Autoradiographic Distribution. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1993**, 266.
168. Bouet-Alard, R.; Mhaouty-Kodja, S.; Limon-Boulez, I.; Coudouel, N.; Maltier, J.P.; Legrand, C. Heterogeneity of A2-Adrenoceptors in Human and Rat Myometrium and Differential Expression during Pregnancy. *Br J Pharmacol* **1997**, 122, doi:10.1038/sj.bjp.0701555.
169. Uhlén, S.; Lindblom, J.; Johnson, A.; Wikberg, J.E.S. Autoradiographic Studies of Central  $\alpha(2A)$ - and  $\alpha(2C)$ -Adrenoceptors in the Rat Using [3H]MK912 and Subtype-Selective Drugs. *Brain Res* **1997**, 770, doi:10.1016/S0006-8993(97)00860-3.
170. Renouard, A.; Widdowson, P.S.; Millan, M.J. Multiple Alpha2 Adrenergic Receptor Subtypes. I. Comparison of [3H]RX821002-Labeled Rat R(Alpha-2A) Adrenergic Receptors in Cerebral Cortex to Human H(Alpha2A) Adrenergic Receptor and Other Populations of Alpha-2 Adrenergic Subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1994**, 270.
171. Uhlén, S.; Xia, Y.; Chhajlani, V.; Felder, C.C.; Wikberg, J.E.S. [3H]-MK 912 Binding Delineates Two A2-adrenoceptor Subtypes in Rat CNS One of Which Is Identical with the Cloned PA2d A2-adrenoceptor. *Br J Pharmacol* **1992**, 106, doi:10.1111/j.1476-5381.1992.tb14446.x.
172. Mhaouty, S.; Cohen-Tannoudji, J.; Bouet-Alard, R.; Limon-Boulez, I.; Maltier -, J.P.; Legrand, C. Characteristics of the A2/B2-Adrenergic Receptor-Coupled Adenylyl Cyclase System in Rat Myometrium during Pregnancy. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, 270, doi:10.1074/jbc.270.18.11012.

173. O'Brien, C.M.; Vargis, E.; Rudin, A.; Slaughter, J.C.; Thomas, G.; Newton, J.M.; Reese, J.; Bennett, K.A.; Mahadevan-Jansen, A. In Vivo Raman Spectroscopy for Biochemical Monitoring of the Human Cervix throughout Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* **2018**, *218*, doi:10.1016/j.ajog.2018.01.030.
174. Kitazawa, T.; Nakagoshi, K.; Teraoka, H.; Taneike, T. 5-HT7 Receptor and B2-Adrenoceptor Share in the Inhibition of Porcine Uterine Contractility in a Muscle Layer-Dependent Manner. *Eur J Pharmacol* **2001**, *433*, doi:10.1016/S0014-2999(01)01504-7.
175. Melien, Ø.; Sandnes, D.; Johansen, E.J.; Christoffersen, T. Effects of Pertussis Toxin on Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in Hepatocytes by Hormones and Receptor-Independent Agents: Evidence Suggesting a Stimulatory Role of G(i) Proteins at a Level Distal to Receptor Coupling. *J Cell Physiol* **2000**, *184*, doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200007)184:1<27::AID-JCP3>3.0.CO;2-Q.
176. Karim, F.; Roerig, S.C. Differential Effects of Antisense Oligodeoxynucleotides Directed against G $\alpha$  and Go $\alpha$  on Antinociception Produced by Spinal Opioid and A2 Adrenergic Receptor Agonists. *Pain* **2000**, *87*, doi:10.1016/S0304-3959(00)00279-7.
177. Offermanns, S. G-Proteins as Transducers in Transmembrane Signalling. *Prog Biophys Mol Biol* **2003**, *83*.
178. Hein, L. Adrenoceptors and Signal Transduction in Neurons. *Cell Tissue Res* **2006**, *326*.
179. Small, K.M.; Schwarb, M.R.; Glinka, C.; Theiss, C.T.; Brown, K.M.; Seman, C.A.; Liggett, S.B. A2A- and A2C-Adrenergic Receptors Form Homo- and Heterodimers: The Heterodimeric State Impairs Agonist-Promoted GRK Phosphorylation and  $\beta$ -Arrestin Recruitment. *Biochemistry* **2006**, *45*, doi:10.1021/bi052074z.
180. Mackeen, A.D.; Seibel-Seamon, J.; Muhammad, J.; Baxter, J.K.; Berghella, V. Tocolytics for Preterm Premature Rupture of Membranes. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2014**, *2014*.
181. Doret, M.; Kayem, G. Tocolysis for Preterm Labor without Premature Preterm Rupture of Membranes. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* **2016**, *45*, doi:10.1016/j.jgyn.2016.09.018.
182. Engström, T.; Vilhardt, H.; Bratholm, P.; Christensen, N.J. Desensitization of B2-Adrenoceptor Function in Non-Pregnant Rat Myometrium Is Modulated by Sex Steroids. *Journal of Endocrinology* **2001**, *170*, doi:10.1677/joe.0.1700147.
183. Chanrachakul, B.; Pipkin, F.B.; Warren, A.Y.; Arulkumaran, S.; Khan, R.N. Progesterone Enhances the Tocolytic Effect of Ritodrine in Isolated Pregnant Human Myometrium. *Am J Obstet Gynecol* **2005**, *192*, doi:10.1016/j.ajog.2004.07.077.
184. Vivat, V.; Cohen-Tannoudji, J.; Revelli, J.P.; Muzzin, P.; Giacobino -, J.P.; Maltier, J.P.; Legrand, C. Progesterone Transcriptionally Regulates the B2-Adrenergic Receptor Gene in Pregnant Rat Myometrium. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267*, doi:10.1016/s0021-9258(18)42394-0.
185. Cohen-Tannoudji, J.; Mhaouty, S.; Elwardy-Merezak, J.; Lecrivain, J.L.; Robin -, M.T.; Legrand, C.; Maltier, J.P. Regulation of Myometrial Gi2, Gi3, and Gq



- Expression during Pregnancy. Effects of Progesterone and Estradiol. *Biol Reprod* **1995**, *53*, doi:10.1095/biolreprod53.1.55.
186. Gáspár, R.; Hajagos-Tóth, J. Calcium Channel Blockers as Tocolytics: Principles of Their Actions, Adverse Effects and Therapeutic Combinations. *Pharmaceuticals* **2013**, *6*, 689–699, doi:10.3390/ph6060689.
187. Mershon, J.L.; Mikala, G.; Schwartz, A. Changes in the Expression of the L-Type Voltage-Dependent Calcium Channel during Pregnancy and Parturition in the Rat. *Biol Reprod* **1994**, *51*, doi:10.1095/biolreprod51.5.993.
188. Downing, S.J.; Hollingsworth, M. Nifedipine Kinetics in the Rat and Relationship between Its Serum Concentrations and Uterine and Cardiovascular Effects. *Br J Pharmacol* **1988**, *95*, doi:10.1111/j.1476-5381.1988.tb16544.x.
189. Boyle, A.K.; Rinaldi, S.F.; Norman, J.E.; Stock, S.J. Preterm Birth: Inflammation, Fetal Injury and Treatment Strategies. *J Reprod Immunol* **2017**, *119*.
190. Francischi, J.N.; Yokoro, C.M.; Poole, S.; Tafuri, W.L.; Cunha, F.Q.; Teixeira, M.M. Anti-Inflammatory and Analgesic Effects of the Phosphodiesterase 4 Inhibitor Rolipram in a Rat Model of Arthritis. *Eur J Pharmacol* **2000**, *399*, doi:10.1016/S0014-2999(00)00330-7.
191. Farmer, P.; Pugin, J.  $\beta$ -Adrenergic Agonists Exert Their “anti-Inflammatory” Effects in Monocytic Cells through the I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B Pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2000**, *279*, doi:10.1152/ajplung.2000.279.4.1675.
192. Hatzelmann, A.; Schudt, C. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Potential of the Novel PDE4 Inhibitor Roflumilast in Vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, *297*.
193. Brown, D.M.; Hutchison, L.; Donaldson, K.; MacKenzie, S.J.; Dick, C.A.J.; Stone, V. The Effect of Oxidative Stress on Macrophages and Lung Epithelial Cells: The Role of Phosphodiesterases 1 and 4. *Toxicol Lett* **2007**, *168*, doi:10.1016/j.toxlet.2006.10.016.
194. Dyke, H.J.; Montana, J.G. Update on the Therapeutic Potential of PDE4 Inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs* **2002**, *11*.
195. Lipworth, B.J. Phosphodiesterase-4 Inhibitors for Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lancet* **2005**, *365*.
196. Leroy, M.J.; Lugnier, C.; Merezak, J.; Tanguy, G.; Olivier, S.; Le Bec, A.; Ferré, F. Isolation and Characterization of the Rolipram-Sensitive Cyclic AMP-Specific Phosphodiesterase (Type IV PDE) in Human Term Myometrium. *Cell Signal* **1994**, *6*, doi:10.1016/0898-6568(94)90087-6.
197. Oger, S.; Méhats, C.; Barnette, M.S.; Ferré, F.; Cabrol, D.; Leroy, M.J. Anti-Inflammatory and Utero-Relaxant Effects in Human Myometrium of New Generation Phosphodiesterase 4 Inhibitors. *Biol Reprod* **2004**, *70*, doi:10.1095/biolreprod.103.023051.
198. Franova, S.; Janicek, F.; Visnovsky, J.; Dokus, K.; Zubor, P.; Sutovska, M.; Nosalova, G. Utero-Relaxant Effect of PDE4-Selective Inhibitor Alone and in Simultaneous Administration with B2-Mimetic on Oxytocin-Induced Contractions in Pregnant Myometrium. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* **2009**, *35*, doi:10.1111/j.1447-0756.2008.00839.x.
199. Méhats, C.; Tanguy, G.; Paris, B.; Robert, B.; Pernin, N.; Ferré, F.; Leroy, M.J. Pregnancy Induces a Modulation of the CAMP Phosphodiesterase 4- Conformers

- Ratio in Human Myometrium: Consequences for the Utero-Relaxant Effect of PDE4-Selective Inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, 292.
200. Azam, M.A.; Tripuraneni, N.S. Selective Phosphodiesterase 4B Inhibitors: A Review. *Sci Pharm* 2014, 82.
  201. Dodge, K.L.; Carr, D.W.; Sanborn, B.M. Protein Kinase A Anchoring to the Myometrial Plasma Membrane Is Required for Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Regulation of Phosphatidylinositide Turnover. *Endocrinology* **1999**, 140, doi:10.1210/endo.140.11.7133.
  202. Wacker, J.; Werner, P.; Walter-Sack, I.; Bastert, G. Treatment of Hypertension in Patients with Pre-Eclampsia: A Prospective Parallel-Group Study Comparing Dihydralazine with Urapidil. *Nephrology Dialysis Transplantation* **1998**, 13, doi:10.1093/oxfordjournals.ndt.a027825.
  203. Berger, H.; Melamed, N.; Davis, B.M.; Hasan, H.; Mawjee, K.; Barrett, J.; McDonald, S.D.; Geary, M.; Ray, J.G. Impact of Diabetes, Obesity and Hypertension on Preterm Birth: Population-Based Study. *PLoS One* **2020**, 15, doi:10.1371/journal.pone.0228743.
  204. Song, Y.S.; Jin, C.; Jung, K.J.; Park, E.H. Estrogenic Effects of Ethanol and Ether Extracts of Propolis. *J Ethnopharmacol* **2002**, 82, doi:10.1016/S0378-8741(02)00159-9.
  205. Legrand, C.; Maltier, J.P.; Benghan-Eyene, Y. Rat Myometrial Adrenergic Receptors in Late Pregnancy. *Biol Reprod* **1987**, 37, doi:10.1095/biolreprod37.3.641.
  206. Anesini, C.; Borda, E. Hormonal Influence on Expression and Functionality of A1-Adrenoceptor in Rat Submandibular Gland. *Auton Neurosci* **2003**, 103, doi:10.1016/S1566-0702(02)00066-8.
  207. Berridge, M.J. Inositol Trisphosphate and Calcium Signalling Mechanisms. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2009, 1793.
  208. Otani, H.; Oshiro, A.; Yagi, M.; Inagaki, C. Pertussis Toxin-Sensitive and -Insensitive Mechanisms of A1-Adrenoceptor-Mediated Inotropic Responses in Rat Heart. *Eur J Pharmacol* **2001**, 419, doi:10.1016/S0014-2999(01)00979-7.
  209. Kashanian, M.; KaramiAbd, T.; Sheikhansari, N.; AminiMoghaddam, S.; Jangjoo, S. Efficacy of Daily Rectal Micronized Progesterone for Prevention of Preterm Delivery: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **2022**, 35, doi:10.1080/14767058.2020.1712709.
  210. Ansonoff, M.A.; Etgen, A.M. Receptor Phosphorylation Mediates Estradiol Reduction of A2-Adrenoceptor Coupling to G Protein in the Hypothalamus of Female Rats. *Endocrine* **2001**, 14, doi:10.1385/ENDO:14:2:165.
  211. Zhou, X.B.; Wang, G.X.; Hüneke, B.; Wieland, T.; Korth, M. Pregnancy Switches Adrenergic Signal Transduction in Rat and Human Uterine Myocytes as Probed by BK(Ca) Channel Activity. *Journal of Physiology* **2000**, 524, doi:10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00339.x.
  212. Kamel, R.M. The Onset of Human Parturition. *Arch Gynecol Obstet* **2010**, 281, doi:10.1007/s00404-010-1365-9.
  213. Romero, R.; Scoccia, B.; Mazor, M.; Wu, Y.K.; Benveniste, R. Evidence for a Local Change in the Progesterone/ Estrogen Ratio in Human Parturition at Term. *Am J Obstet Gynecol* **1988**, 159, doi:10.1016/S0002-9378(88)80029-2.

214. Yan, J.; Chen, W. Observations on Serum and Amniotic Fluid Hormone Levels and Ultrastructure of Uterine Myometrium before and during Term Labor. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **1995**, *30*.
215. Leo, C.P.; Pisarska, M.D.; Hsueh, A.J.W. DNA Array Analysis of Changes in Preovulatory Gene Expression in the Rat Ovary. *Biol Reprod* **2001**, *65*, doi:10.1095/biolreprod65.1.269.
216. Johnson, K.J.; Robbins, A.K.; Wang, Y.; McCahan, S.M.; Chacko, J.K.; Barthold, J.S. Insulin-like 3 Exposure of the Fetal Rat Gubernaculum Modulates Expression of Genes Involved in Neural Pathways. *Biol Reprod* **2010**, *83*, doi:10.1095/biolreprod.110.085175.
217. Andoh, T.; Yageta, Y.; Takeshima, H.; Kuraishi, Y. Intradermal Nociceptin Elicits Itch-Associated Responses through Leukotriene B4 in Mice. *Journal of Investigative Dermatology* **2004**, *123*, doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22704.x.
218. Collins, J.J.; Usip, S.; McCarson, K.E.; Papka, R.E. Sensory Nerves and Neuropeptides in Uterine Cervical Ripening. *Peptides (N.Y.)* **2002**, *23*, doi:10.1016/S0196-9781(01)00593-9.
219. Pennefather, J.N.; Patak, E.; Pinto, F.M.; Candenas, M.L. Mammalian Tachykinins and Uterine Smooth Muscle: The Challenge Escalates. *Eur J Pharmacol* **2004**, *500*.
220. Shew, R.L.; Papka, R.E.; McNeill, D.L. Substance P and Calcitonin Gene-Related Peptide Immunoreactivity in Nerves of the Rat Uterus: Localization, Colocalization and Effects on Uterine Contractility. *Peptides (N.Y.)* **1991**, *12*, doi:10.1016/0196-9781(91)90107-Z.
221. Ito, S.; Okuda-Ashitaka, E.; Minami, T. Central and Peripheral Roles of Prostaglandins in Pain and Their Interactions with Novel Neuropeptides Nociceptin and Nocistatin. *Neurosci Res* **2001**, *41*.
222. Abrão, K.C.; Francisco, R.P.V.; Miyadahira, S.; Cicarelli, D.D.; Zugaib, M. Elevation of Uterine Basal Tone and Fetal Heart Rate Abnormalities after Labor Analgesia: A Randomized Controlled Trial. *Obstetrics and Gynecology* **2009**, *113*, doi:10.1097/AOG.0b013e31818f5eb6.
223. Hawes, B.E.; Graziano, M.P.; Lambert, D.G. Cellular Actions of Nociceptin: Transduction Mechanisms. *Peptides (N.Y.)* **2000**, *21*, doi:10.1016/S0196-9781(00)00232-1.
224. Knollman, P.E.; Conn, P.M. Multiple G Proteins Compete for Binding with the Human Gonadotropin Releasing Hormone Receptor. *Arch Biochem Biophys* **2008**, *477*, doi:10.1016/j.abb.2008.05.011.
225. Lefkowitz, R.J.; Pierce, K.L.; Luttrell, L.M. Dancing with Different Partners: Protein Kinase A Phosphorylation of Seven Membrane-Spanning Receptors Regulates Their G Protein-Coupling Specificity. *Mol Pharmacol* **2002**, *62*.
226. Chanrachakul, B.; Pipkin, F.B.; Khan, R.N. Contribution of Coupling between Human Myometrial B2- Adrenoreceptor and the BKCa Channel to Uterine Quiescence. *Am J Physiol Cell Physiol* **2004**, *287*, doi:10.1152/ajpcell.00236.2004.
227. Kai, L.; Wang, Z.F.; Hu, D.Y.; Shi, Y.L.; Liu, L.M. Modulation of Ca<sup>2+</sup> Channels by Opioid Receptor Antagonists in Mesenteric Arterial Smooth Muscle Cells of Rats in Hemorrhagic Shock. *J Cardiovasc Pharmacol* **2002**, *40*, doi:10.1097/00005344-200210000-00016.

228. Holzer, P. Capsaicin: Cellular Targets, Mechanisms of Action, and Selectivity for Thin Sensory Neurons. *Pharmacol Rev* 1991, 43.
229. Sams-Nielsen, A.; Orskov, C.; Jansen-Olesen, I. Pharmacological Evidence for CGRP Uptake into Perivascular Capsaicin Sensitive Nerve Terminals. *Br J Pharmacol* **2001**, 132, doi:10.1038/sj.bjp.0703910.
230. Moran, T.D.; Abdulla, F.A.; Smith, P.A. Cellular Neurophysiological Actions of Nociceptin/Orphanin FQ. *Peptides (N.Y.)* **2000**, 21, doi:10.1016/S0196-9781(00)00235-7.
231. Yanagita, T.; Yamamoto, R.; Sugano, T.; Kobayashi, H.; Uezono, Y.; Yokoo, H.; Shiraishi, S.; Minami, S.I.; Wada, A. Adrenomedullin Inhibits Spontaneous and Bradykinin-Induced but Not Oxytocin- or Prostaglandin F(2 $\alpha$ )-Induced Periodic Contraction of Rat Uterus. *Br J Pharmacol* **2000**, 130, doi:10.1038/sj.bjp.0703500.
232. Dong, Y.L.; Vegiraju, S.; Yallampalli, C. Ca<sup>2+</sup> Signaling in Human Fetoplacental Vasculature: Effect of CGRP on Umbilical Vein Smooth Muscle Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2005**, 289, doi:10.1152/ajpheart.00059.2005.
233. Cejudo Roman, A.; Pinto, F.M.; Dorta, I.; Almeida, T.A.; Hernández, M.; Illanes, M.; Tena-Sempere, M.; Candenas, L. Analysis of the Expression of Neurokinin B, Kisspeptin, and Their Cognate Receptors NK3R and KISS1R in the Human Female Genital Tract. *Fertil Steril* **2012**, 97, doi:10.1016/j.fertnstert.2012.02.021.
234. Kirby, H.R.; Maguire, J.J.; Colledge, W.H.; Davenport, A.P. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin Receptor Nomenclature, Distribution, and Function. *Pharmacol Rev* 2010, 62.
235. Ducza, E.; Gáspár, R.; Mihályi, A.; Kormányos, Z.; Falkay, G. The Roles of the A1-Adrenergic Receptor Subtypes in Rat Embryonic Implantation. *Fertil Steril* **2009**, 91, 1224–1229, doi:10.1016/j.fertnstert.2008.01.081.
236. Arthur, P.; Taggart, M.J.; Zielnik, B.; Wong, S.; Mitchell, B.F. Relationship between Gene Expression and Function of Uterotonic Systems in the Rat during Gestation, Uterine Activation and Both Term and Preterm Labour. *Journal of Physiology* **2008**, 586, doi:10.1113/jphysiol.2008.164004.
237. D'Occhio, M.J.; Campanile, G.; Baruselli, P.S. Peripheral Action of Kisspeptin at Reproductive Tissues-Role in Ovarian Function and Embryo Implantation and Relevance to Assisted Reproductive Technology in Livestock: A Review. *Biol Reprod* 2020, 103.
238. Alsaif, S.; Mumtaz, S.; Wray, S. A Short Review of Adipokines, Smooth Muscle and Uterine Contractility. *Life Sci* 2015, 125.
239. Gomart, S.; Gaudreau-Ménard, C.; Jaspers, P.; Dilek, O.G.; Hupkens, E.; Hanthazi, A.; Naeije, R.; Melot, C.; Labranche, N.; Dewachter, L.; et al. Leptin-Induced Endothelium-Independent Vasoconstriction in Thoracic Aorta and Pulmonary Artery of Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Calcium Channels and Stores. *PLoS One* **2017**, 12, doi:10.1371/journal.pone.0169205.
240. Benkhoff, S.; Loot, A.E.; Pierson, I.; Sturza, A.; Kohlstedt, K.; Fleming, I.; Shimokawa, H.; Grisk, O.; Brandes, R.P.; Schröder, K. Leptin Potentiates Endothelium-Dependent Relaxation by Inducing Endothelial Expression of

- Neuronal NO Synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2012**, *32*, doi:10.1161/ATVBAHA.112.251140.
241. Smolinska, N.; Maleszka, A.; Dobrzyn, K.; Kiezun, M.; Szeszko, K.; Kaminski, T. Expression of Adiponectin and Adiponectin Receptors 1 and 2 in the Porcine Uterus, Conceptus, and Trophoblast during Early Pregnancy. *Theriogenology* **2014**, *82*, doi:10.1016/j.theriogenology.2014.07.018.
242. Kadowaki, T.; Yamauchi, T. Adiponectin Receptor Signaling: A New Layer to the Current Model. *Cell Metab* 2011, *13*.
243. La Fleur, S.E.; Luijendijk, M.C.M.; Van Der Zwaal, E.M.; Brans, M.A.D.; Adan, R.A.H. The Snacking Rat as Model of Human Obesity: Effects of a Free-Choice High-Fat High-Sugar Diet on Meal Patterns. *Int J Obes* **2014**, *38*, doi:10.1038/ijo.2013.159.
244. Andreazzi, A.E.; Grassioli, S.; Marangon, P.B.; Martins, A.G.; De Oliveira, J.C.; Torrezan, R.; Gravena, C.; Garcia, R.M.G.; De Freitas Mathias, P.C. Impaired Sympathoadrenal Axis Function Contributes to Enhanced Insulin Secretion in Prediabetic Obese Rats. *Exp Diabetes Res* **2011**, *2011*, doi:10.1155/2011/947917.
245. Christians, J.K.; Lennie, K.I.; Wild, L.K.; Garcha, R. Effects of High-Fat Diets on Fetal Growth in Rodents: A Systematic Review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2019, *17*.
246. Giordano, A.; Smorlesi, A.; Frontini, A.; Barbatelli, G.; Cinti, S. White, Brown and Pink Adipocytes: The Extraordinary Plasticity of the Adipose Organ. *Eur J Endocrinol* 2014, *170*.
247. Francisco, V.; Pino, J.; Campos-Cabaleiro, V.; Ruiz-Fernández, C.; Mera, A.; Gonzalez-Gay, M.A.; Gómez, R.; Gualillo, O. Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Front Physiol* 2018, *9*.
248. Matsuda, M.; Shimomura, I. Roles of Adiponectin and Oxidative Stress in Obesity-Associated Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Rev Endocr Metab Disord* **2014**, *15*, doi:10.1007/s11154-013-9271-7.
249. Abbas, S.J.; Abed, F.S.; Dhefer, I.H. Does Kisspeptin Act as a Neuropeptide or as an Adipokine in Obese People? *J Taibah Univ Med Sci* **2022**, *17*, doi:10.1016/j.jtumed.2021.07.010.
250. Soloff, M.S.; Jeng, Y.J.; Izban, M.G.; Sinha, M.; Luxon, B.A.; Stamnes, S.J.; England, S.K. Effects of Progesterone Treatment on Expression of Genes Involved in Uterine Quiescence. *Reproductive Sciences* **2011**, *18*, doi:10.1177/1933719111398150.
251. Casabiell, X.; Piñeiro, V.; Vega, F.; De La Cruz, L.F.; Diéguez, C.; Casanueva, F.F. Leptin, Reproduction and Sex Steroids. *Pituitary* **2001**, *4*, doi:10.1023/A:1012999130035.
252. Jarmund, A.H.; Giskeødegård, G.F.; Ryssdal, M.; Steinkjer, B.; Stokkeland, L.M.T.; Madssen, T.S.; Stafne, S.N.; Stridsklev, S.; Moholdt, T.; Heimstad, R.; et al. Cytokine Patterns in Maternal Serum From First Trimester to Term and Beyond. *Front Immunol* **2021**, *12*, doi:10.3389/fimmu.2021.752660.
253. Carlson, N.S.; Hernandez, T.L.; Hurt, K.J. Parturition Dysfunction in Obesity: Time to Target the Pathobiology. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2015, *13*.

254. Alotaibi, M.F. The Response of Rat and Human Uterus to Oxytocin from Different Gestational Stages in Vitro. *Gen Physiol Biophys* **2017**, *36*, doi:10.4149/gpb\_2016022.
255. Reiner, O.; Marshall, J.M. Action of Prostaglandin, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , on the Uterus of the Pregnant Rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **1976**, *292*, doi:10.1007/BF00517384.
256. Moynihan, A.T.; Hehir, M.P.; Glavey, S. V.; Smith, T.J.; Morrison, J.J. Inhibitory Effect of Leptin on Human Uterine Contractility in Vitro. *Am J Obstet Gynecol* **2006**, *195*, doi:10.1016/j.ajog.2006.01.106.
257. Srinivasan, G.; Parida, S.; Pavithra, S.; Panigrahi, M.; Sahoo, M.; Singh, T.U.; Madhu, C.L.; Manickam, K.; Shyamkumar, T.S.; Kumar, D.; et al. Leptin Receptor Stimulation in Late Pregnant Mouse Uterine Tissue Inhibits Spontaneous Contractions by Increasing NO and CGMP. *Cytokine* **2021**, *137*, doi:10.1016/j.cyto.2020.155341.
258. Dubicke, A.; Fransson, E.; Centini, G.; Andersson, E.; Byström, B.; Malmström, A.; Petraglia, F.; Sverremark-Ekström, E.; Ekman-Ordeberg, G. Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Human Preterm and Term Cervical Ripening. *J Reprod Immunol* **2010**, *84*, doi:10.1016/j.jri.2009.12.004.
259. Gauthier, T.; Mazeau, S.; Dalmay, F.; Eyraud, J.L.; Catalan, C.; Marin, B.; Aubard, Y. Obesity and Cervical Ripening Failure Risk. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **2012**, *25*, doi:10.3109/14767058.2011.575485.
260. Gogarten, W.; Lindeman, K.S.; Hirshman, C.A.; Emala, C.W. Tumor Necrosis Factor Alpha Stimulates Adenylyl Cyclase Activity in Human Myometrial Cells. *Biol Reprod* **2003**, *68*, doi:10.1095/biolreprod.102.004168.
261. Osawa, Y.; Yim, P.D.; Xu, D.; Panettieri, R.A.; Emala, C.W. Raf-1 Kinase Mediates Adenylyl Cyclase Sensitization by TNF- $\alpha$  in Human Airway Smooth Muscle Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2007**, *292*, doi:10.1152/ajplung.00123.2006.
262. Kim, Y.S.; Kim, J.S.; Jung, H.C.; Song, I.S. The Effects of Thalidomide on the Stimulation of NF-KB Activity and TNF- $\alpha$  Production by Lipopolysaccharide in a Human Colonic Epithelial Cell Line. *Mol Cells* **2004**, *17*.
263. Djokanovic, N.; Klieger-Grossmann, C.; Pupco, A.; Koren, G. Safety of Infliximab Use during Pregnancy. *Reproductive Toxicology* **2011**, *32*.
264. Wang, X.; X. Hai, C. ROS Acts as a Double-Edged Sword in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Is Nrf2 a Potential Target for the Treatment? *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*, doi:10.2174/138955711797247761.
265. Corbi, G.; Conti, V.; Russomanno, G.; Longobardi, G.; Furgi, G.; Filippelli, A.; Ferrara, N. Adrenergic Signaling and Oxidative Stress: A Role for Sirtuins? *Front Physiol* **2013**, *4 NOV*.
266. Diaz-Garcia, H.; Vilchis-Gil, J.; Garcia-Roca, P.; Klünder-Klünder, M.; Gomez-Lopez, J.; Granados-Riveron, J.T.; Sanchez-Urbina, R. Dietary and Antioxidant Vitamins Limit the DNA Damage Mediated by Oxidative Stress in the Mother–Newborn Binomial. *Life* **2022**, *12*, doi:10.3390/life12071012.
267. Bozkus, F.; San, I.; Ulas, T.; Iynen, I.; Yesilova, Y.; Guler, Y.; Aksoy, N. Evaluation of Total Oxidative Stress Parameters in Patients with Nasal Polyps. *Acta Otorhinolaryngol Ital* **2013**, *33*.

268. Vadzyuk, O.B.; Mazur, Y.Y.; Kosterin, S.O. Regulation of the Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel in Rat Uterus Cells by ROS. *Ukr Biokhim Zh* **2012**, *84*.
269. Kaya, S.; Keskin, H.L.; Kaya, B.; Ustuner, I.; Avsar, A.F. Reduced Total Antioxidant Status in Postterm Pregnancies. *Hippokratia* **2013**, *17*.
270. Ogbodo, S.; Okaka, A.; Nwagha, U.; Ejezie, F. Free Radicals and Antioxidants Status in Pregnancy: Need for Pre-and Early Pregnancy Assessment. *American Journal of Medicine and Medical Sciences* **2014**, *4*.
271. Challis, J.R.G. Mechanism of Parturition and Preterm Labor. *Obstet Gynecol Surv* **2000**, *55*.
272. Ramin, S.; Vidaeff, A. Potential Biochemical Events Associated with Initiation of Labor. *Curr Med Chem* **2008**, *15*, doi:10.2174/092986708783769786.
273. St-Louis, I.; Singh, M.; Brasseur, K.; Leblanc, V.; Parent, S.; Asselin, E. Expression of COX-1 and COX-2 in the Endometrium of Cyclic, Pregnant and in a Model of Pseudopregnant Rats and Their Regulation by Sex Steroids. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2010**, *8*, doi:10.1186/1477-7827-8-103.
274. Tsuboi, K.; Sugimoto, Y.; Iwane, A.; Yamamoto, K.; Yamamoto, S.; Ichikawa, A. Uterine Expression of Prostaglandin H2 Synthase in Late Pregnancy and during Parturition in Prostaglandin F Receptor-Deficient Mice. *Endocrinology* **2000**, *141*, doi:10.1210/endo.141.1.7236.
275. Slater, D.; Dennes, W.; Sawdy, R.; Allport, V.; Bennett, P. Expression of Cyclo-Oxygenase Types-1 and -2 in Human Fetal Membranes throughout Pregnancy. *J Mol Endocrinol* **1999**, *22*, doi:10.1677/jme.0.0220125.
276. Abate, A.; Yang, G.; Dennery, P.A.; Oberle, S.; Schröder, H. Synergistic Inhibition of Cyclooxygenase-2 Expression by Vitamin E and Aspirin. *Free Radic Biol Med* **2000**, *29*, doi:10.1016/S0891-5849(00)00425-1.
277. O'Leary, K.A.; De Pascual-Tereasa, S.; Needs, P.W.; Bao, Y.P.; O'Brien, N.M.; Williamson, G. Effect of Flavonoids and Vitamin E on Cyclooxygenase-2 (COX-2) Transcription. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2004**, *551*, doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.01.015.
278. Ravanos, K.; Dagklis, T.; Petousis, S.; Margioulas-Siarkou, C.; Prapas, Y.; Prapas, N. Factors Implicated in the Initiation of Human Parturition in Term and Preterm Labor: A Review. *Gynecological Endocrinology* **2015**, *31*.
279. Shi, L.; Shi, S.Q.; Saade, G.R.; Chwalisz, K.; Garfield, R.E. Studies of Cervical Ripening in Pregnant Rats: Effects of Various Treatments. *Mol Hum Reprod* **2000**, *6*, doi:10.1093/molehr/6.4.382.
280. Denison, F.C.; Calder, A.A.; Kelly, R.W. The Action of Prostaglandin E2 on the Human Cervix: Stimulation of Interleukin 8 and Inhibition of Secretory Leukocyte Protease Inhibitor. *Am J Obstet Gynecol* **1999**, *180*, doi:10.1016/S0002-9378(99)70263-2.
281. Kishore, A.H.; Liang, H.; Kanchwala, M.; Xing, C.; Ganesh, T.; Akgul, Y.; Posner, B.; Ready, J.M.; Markowitz, S.D.; Word, R.A. Prostaglandin Dehydrogenase Is a Target for Successful Induction of Cervical Ripening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2017**, *114*, doi:10.1073/pnas.1704945114.
282. Gedikbasi, A.; Yücel, B.; Arslan, O.; Giris, M.; Gedikbasi, A.; Abbasoglu, S.D. Dynamic Collagen Changes in Cervix during the First Trimester and Decreased

- Collagen Content in Cervical Insufficiency. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine* **2016**, 29, doi:10.3109/14767058.2015.1109623.
283. Vink, J.Y.; Qin, S.; Brock, C.O.; Zork, N.M.; Feltovich, H.M.; Chen, X.; Urie, P.; Myers, K.M.; Hall, T.J.; Wapner, R.; et al. A New Paradigm for the Role of Smooth Muscle Cells in the Human Cervix. In Proceedings of the American Journal of Obstetrics and Gynecology; 2016; Vol. 215.
284. Ng, Q.J.; Abdul Rahman, M.F. Bin; Lim, M.L.; Chee, J.J.; Tan, K.H. Single versus Combination Tocolytic Regimen in the Prevention of Preterm Births in Women: A Prospective Cohort Study. *J Perinat Med* **2015**, 43, doi:10.1515/jpm-2014-0216.



## 12. Köszönetnyilvánítás

Tekintettel arra, hogy a doktori értekezésem két évtized kutatómunkájának eredményeit tartalmazza, így nagyon sok embernek tartozom köszönettel.

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 alaposágukra, 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.

A közvetlen munkatársakon kívül számos együttműködő partnernek tartozom köszönettel a doktori disszertáció kapcsán.

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 antagonistákkal 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.