Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

A leptin, adiponektin és kisspeptin szerepe a patkány méhizomzat nyugalmának fenntartásában vemhesség során

Ph.D. tézis összefoglaló

Dr. Schaffer Annamária

Szeged

2022

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszerhatástan, biofarmácia, klinikai gyógyszerészet Ph.D program
Programvezető: Prof. Dr. Zupkó István, az MTA doktora

SZTE SZAOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet
Témavezető: Dr. habil. Gáspár Róbert

Dr. Schaffer Annamária

A leptin, adiponektin és kisspeptin szerepe a patkány méhizomzat nyugalmának fenntartásában vemhesség során

Komplex Vizsga Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Soós Gyöngyvér, Ph.D.
Tagok: Dr. Ducza Eszter, Ph.D.
Prof. Dr. Borsodi Anna, Ph.D.

Bírálói bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szakonyi Zsolt, az MTA doktora

Opponensek: Prof. Dr. Halmos Gábor, Ph.D.
Dr. Gáspár-Surányi Andrea, Ph.D.

Tagok: Dr. Orosz Andrea, Ph.D.
Dr. Vasas Andrea, Ph.D..

Bevezetés

Sokáig a zsírszövet csak az energiaraktározó szerepéről volt ismert. Az elmúlt évtizedekben egy új koncepció került elfogadásra, amely a zsírszövet endokrin funkcióin alapult, és ma már széles körben ismert, hogy az adipociták számos biológiailag aktív anyagot képesek termelni, melyeket összefoglalóan adipokineknek nevezünk. A különböző adipokineknek elsősorban az anyagcsere-folyamatokat moduláló hatásai ismertek, de a reprodukciós folyamatok szabályozásában betöltött szerepüket is dokumentálták már korábban.

A leptin kiemelt szereppel bír az étvágy, az energiahomeosztázis és a lipidanyagcsere szabályozásában. Ennél is lényegesebb tulajdonsága, hogy információt közvetít a központi idegrendszer felé a szervezet energiaraktárainak állapotáról, illetve mediátorként szerepel a reproduktív tengely és a központi idegrendszer között. Amellett, hogy a HPG tengely egyik fontos szabályozójaként ismerjük, a leptin simaizom működésre gyakorolt hatásai is jól dokumentáltak. Ismert, hogy terhesség alatt elsősorban a placenta felelős a leptinszekrécióért, mely tény magyarázza a terhesség során megemelkedett anyai plazma koncentrációt, és a szülést követően tapasztalt gyors csökkenést a vérszintben. A leptin receptor, melynek hat izoformája ismert, a citokin receptorok I-es családjába tartozik. Stimulációja elsősorban a JAK2/STAT és a MAPK jelátviteli útvonalak aktiválódását eredményezi, ezek felelősek elsődlegesen a leptin hatások kialakításáért.

Az adiponektin a legnagyobb mennyiségben előforduló adipokin az emberi plazmában. A leptinnel ellentétben szérumszintje fordítottan arányos a BMI-vel. Az adiponektin gyulladáscsökkentő és antiatherogén hatása jól ismert, emellett szabályozza a lipidanyagcserét és a glükózfelvételt is. Ezen hatásait két fő receptoron keresztül fejti ki: AdipoR1 és AdipoR2. A receptorok stimulálása az AMPK, a p38 MAPK és a PPARα kaszkádok aktiválódását eredményezi. Ezenkívül egy APPL1 nevű adaptor fehérjéről is beszámoltak, amely a szakirodalom szerint a receptorok jelátvitelében közvetítő szerepet tölt be. Az adiponektin rendszer jelenlétét a perifériás reproduktív szövetekben korábban már igazolták. Mégis, a korábbi eredmények arra utalnak, hogy az adiponektinnek nincs jelentős szerepe a reproduktív rendszer megfelelő működésében. A keringő adiponektin koncentráció a terhesség korai szakaszában szintén emelkedett. Szakirodalmi adatok alapján azonban a plazmaszint negatív korrelációt mutat az anyai BMI-vel, tehát a terhesség vége felé haladva a vérszintben csökkenés tapasztalható. Az adiponektinnek a méh aktivitására gyakorolt hatására vonatkozóan kevesebb bizonyíték áll rendelkezésre, de feltételezhető, hogy az anyagcsere-állapot és a terhesség kimenetele közötti összefüggésekben az adiponektinnek is szerepe van.

Az elmúlt évtizedekben az egyik legtöbbet vizsgált neuropeptid a kisspeptin volt. A kisspeptinek egy nagyobb inaktív preprohormon proteolitikus hasításának termékei. Minden fragmens képes kötődni és aktiválni a Kiss1r receptort, amely egy G-fehérje kapcsolt receptor. A kisspeptin/Kiss1r rendszer elemeit a perifériás reproduktív szövetekben már azonosították korábban. A kisspeptin azonban leginkább a központi idegrendszerben kifejtett szabályozó szerepéről ismert: fokozza a GnRH szekréciót, ezáltal szabályozza a pubertáskori fejlődést. Annak ellenére, hogy elsősorban a neuroendokrin szerepe ismert, a kisspeptint gyakran sorolják az adipokinek közé, azon tények alapján, hogy a szintézisében a zsírszövet is rész veszt, illetve mediátor szerepet tölt be az energiahomeosztázis és a reproduktív rendszer között.

Célkitűzések

A LEPR, AdipoR és Kiss1r szerepét és ontogenezisét a vemhesség alatt korábban még nem tisztázták. Ellentmondásos adatok állnak rendelkezésünkre a leptin, az adiponektin és a kisspeptin méh simaizomzat működésre gyakorolt hatásairól. Kutatásunk fő célja, hogy további információkat gyűjtsünk az endometriális és a miometriális receptorok jelentőségéről, valamint arról, hogy ezek hogyan befolyásolják a leptin, az adiponektin és a kisspeptin hatását a nem terhes és terhes méhösszehúzódásokra. Ezeknek a tisztázására az alábbi célokat tűztük ki:

- Első célunk az volt, hogy megvizsgáljuk a leptin, az adiponektin és a kisspeptin hatását a nem terhes és az 5, 15, 18, 20 és 22 napos terhes méh kontraktilitására.
- A vizsgálat második célja a LEPR, az AdipoR1, az AdipoR2 és a Kiss1r receptorok expressziójának mérése volt a nem vemhes méhszövetben, valamint ezen expressziók változásának vizsgálata a vemhesség alatt.
- Következő célunk annak vizsgálata volt, hogy az endometriumban található receptorok módosítják-e a leptin, az adiponektin és a kisspeptin méh kontrakciókra kifejtett hatását.
- Végül a negyedik célunk az volt, hogy fluoreszcens immunhisztokémiával szemléltessük a LEPR, az AdipoR1, az AdipoR2 és a Kiss1r receptorok eloszlását a nem vemhes méhszövetben, valamint ennek változásait a vemhesség során.

Anyagok és módszerek

Az állatkísérleteket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (engedélyszám: IV./3071/2016.) engedélyével végeztük. A kísérleteinkhez ivarérett, nem vemhes, ciklusban lévő Sprague-Dawley nőstény patkányokat választottunk ki. A hím és nőstény patkányokat egy speciális ketrecben pároztattuk. A pároztatástól számított 4-5 órán belül a nőstény állatokból hüvelykenetet vettünk. Pozitív minta esetén a nőstény patkányokat elkülönítettük, mint 1. napos vemhes állatok.

In vitro kontraktilitási mérések

Az állatok CO_2 gázzal történő terminálását követően 5 mm hosszú uterusz gyűrűket metszettünk. A preparált szöveteket karbogénnel átáramoltatott de Jong puffert tartalmazó izolált szervfürdő kádba helyeztük, melynek hőmérsékletét 37°C-on tartottuk. Ezt követően 1,5 g-os előfeszítést alkalmaztunk, majd a szöveteket 60 percen át inkubáltuk, miközben a puffert 15 percenként lecseréltük. 25 mM koncentrációjú KCl-oldat hozzáadásával szabályos kontrakciókat idéztünk elő. Ezt követően felvettük a kisspeptin (10^{-12}–10^{-7} M), leptin (10^{-12}–10^{-8} M), illetve adiponektin (10^{-12}–10^{-8} M) kumulatív dózis-hatás görbéjét. Az adipokinek hatását a KCl által kiváltott kontrakciókhoz viszonyítottuk és a kontrakciós görbék alatti területet vizsgáltuk a kontroll AUC-hez viszonyítva. A kísérleteket denudált szöveteken is elvégeztük. A kisspeptin hatását 5 napos vemhes uterusz szöveteken, kisspeptin-234 trifluoroacetát jelenlétében is vizsgáltuk. Az uterusz kontrakciókat SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System (MDE Ltd., Budapest, Hungary) segítségével regisztráltuk és dolgoztuk fel.

RT-PCR vizsgálat

Az RT-PCR vizsgálatokat nem vemhes és vemhes patkány uterusz szöveteken végeztük. A teljes RNS-t guanidinium tiocianát-sav-fenol-kloroformmal, Chomzynski és Sacchi protokollja szerint vontuk ki. A PCR termékek reverz transzkripcióját és amplifikációját TaqMan RNA-to-CT TM Step One Kit és ABI StepOne Real-Time cycler használatával végeztük. Minden mintával három párhuzamos mérést végeztünk, kontrollként β-actint használtunk. A próbák fluoreszcens intenzitását a PCR ciklus szám függvényében ábrázoltuk.

Western blot analízis

25 µg fehérje mintát használtunk zsebenként elektroforézishez 4-12% NuPAGE Bis-Tris gélre XCell SureLock Mini-Cell Units készülékben. A fehérjét nitrocellulóz membránra transzformáltuk iBlot Gel Transfer alkalmazásával. A mintákat Kiss1r, AdipoR1, AdipoR2 vagy LEPR elsődleges poliklonális antitesttel egy éjszakát inkubálódni hagytuk blokkoló oldatban. Az antitestek kötődését Western Breeze® Chromogenic immunodetection kit segítségével detektáltuk. A képek elemzése az EDAS290 képalkotó rendszerrel, az immunreaktív sávok optikai denzitásának meghatározása Kodak ID Images szoftverrel történt. Belső kontrollként β-aktint használtunk a szemi-kvantitatív eljáráshoz.

Immunhisztokémiai vizsgálat

A nem vemhes és vemhes uterusz szöveteket előkészítettük az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz. A kisspeptin esetében a szöveteket blokkoló oldatba helyeztük, melyhez nyúl anti-Kiss1r elsődleges antitestet, valamint anti-nyúl Alexa Fluor 488 másodlagos antitestet adtunk. Az adiponektin, illetve leptin esetében az inkubációt nyúl anti-AdipoR1, egér anti-AdipoR2 vagy csirke anti-Leptin R elsődleges antitest hozzáadásával végeztük. Ezután az inkubációt anti-nyúl Alexa Fluor 488, anti-egér CyTM3 és anti-csirke Alexa Fluor 647 másodlagos antitesttel végeztük. Fluoreszcens festékként 4',6–diamidino–2–fenilindolt alkalmaztunk. A metszeteket kamerával felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, illetve azokról felvételeket készítettünk.

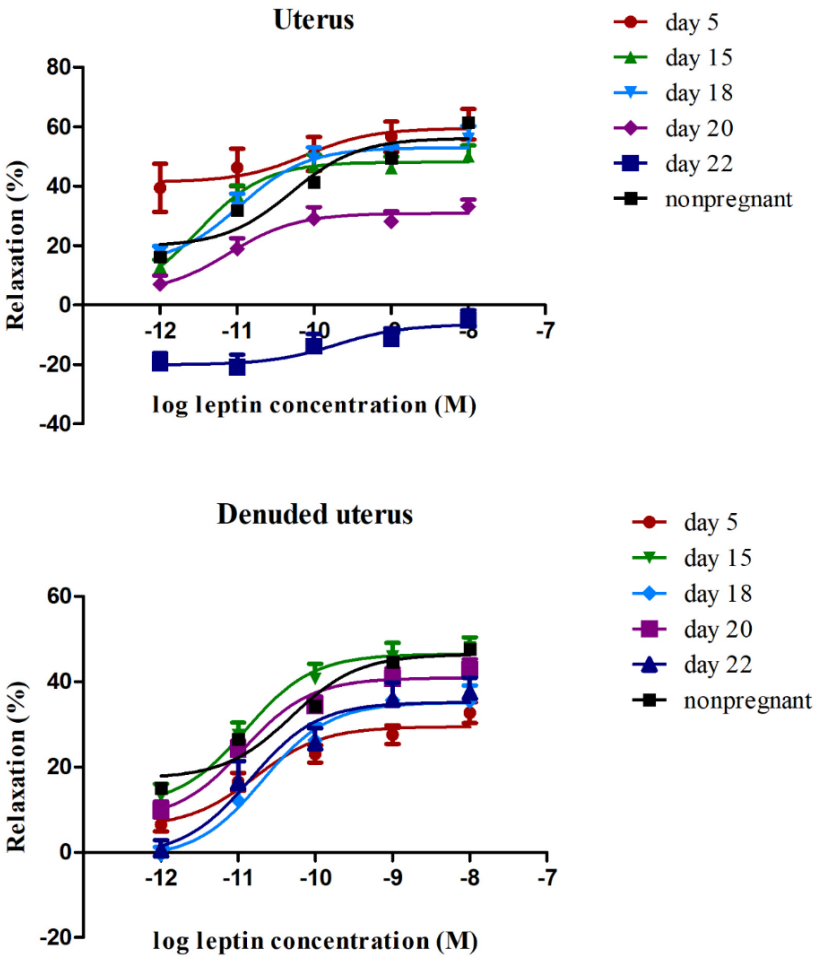
Statisztikai analízis

A kísérleti adatokat a Prism 5.01 számítógépes program segítségével értékeltük ki, az eredmények statisztikai elemzését párosítatlan t-próbával, valamint ANOVA Tukey teszttel végeztük.

Eredmények

In vitro eredmények

A leptin gátolta a nem vemhes méhösszehúzódásokat, az endometrium eltávolítása azonban jelentősen gyengítette ezt a hatást. A vemhesség korai szakaszában a leptin relaxálta az ép uterusz szöveteket, de a vemhesség vége felé a hatás drámai csökkenését tapasztaltuk. Ezzel szemben, az endometrium hiánya esetén a leptin meg tudta őrizni relaxáló hatását a vemhesség teljes időszaka alatt. Az E_{max} értékeket összehasonlítva elmondható, hogy a leptin által kiváltott relaxáló hatás az 5. és 18. vemhességi napon szignifikánsan lecsökken, ha előzőleg eltávolítottuk az endometriumot. A 20. és 22. napon ezzel szemben a hatás növekedését tapasztaltuk (1. ábra, 1. táblázat).

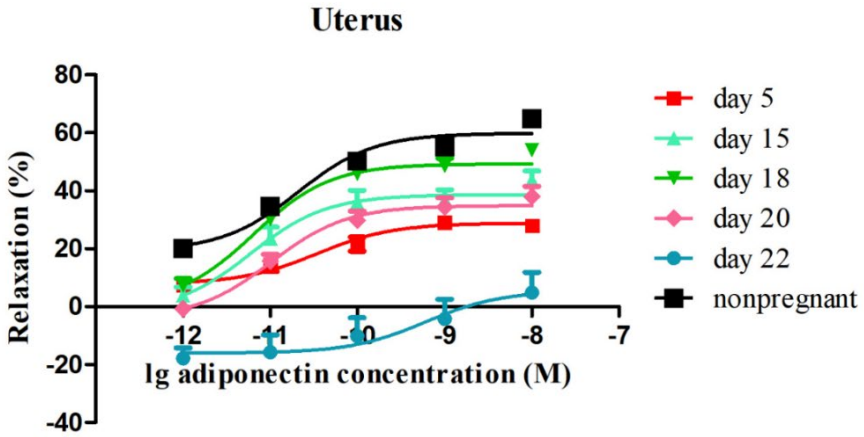


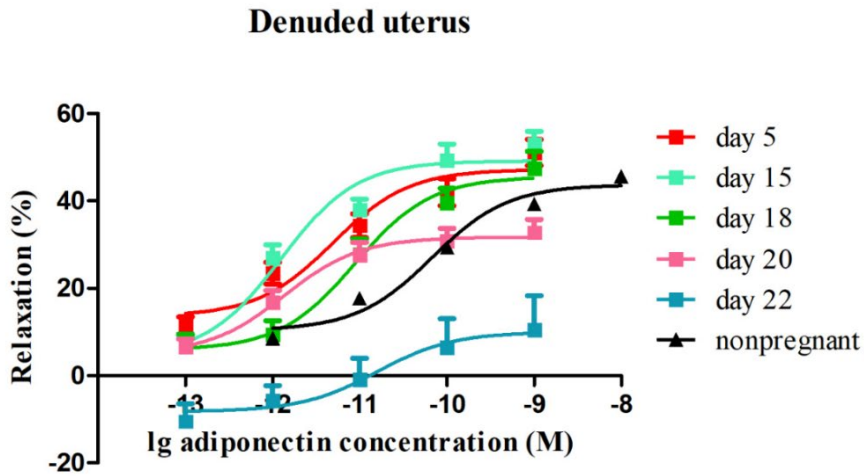
1. ábra: A leptin dózis-hatás görbéje nem vemhes és vemhes uteruszon, illetve miometriumon.

	EC50 (M ± S.E.M.)		Emax (% ± S.E.M)		Ép és denudált uterus összehasonlítása	
	Uterusz	Denudált uterusz	Uterusz	Denudált uterusz	EC50	Emax
nem vemhes	$4.9x10^{-10} \pm 1.7x10^{-10}$	$1.1x10^{-10} \pm 2.1x10^{-11}$	61.2 ± 2.9	51.4 ± 1.9	#	#
5. nap	$7.7x10^{-10} \pm 5.3x10^{-11}$	$3.3x10^{-11} \pm 6.9x10^{-12}$	63.0 ± 5.1	30.9 ± 2.0	ns	###
15. nap	$2.9x10^{-11} \pm 1.6x10^{-12}$	$2.5x10^{-11} \pm 6.5x10^{-12}$	57.1 ± 3.3	46.0 ± 2.9***	ns	ns
18. nap	$6.0x10^{-11} \pm 1.8x10^{-12}$	$2.4x10^{-11} \pm 5.0x10^{-12}$	56.9 ± 4.5	39.7 ± 2.6	ns	###
20. nap	$3.0x10^{-10} \pm 1.9x10^{-11}$	$2.1x10^{-11} \pm 3.9x10^{-12}$	32.2 ± 2.2***	40.3 ± 2.3	ns	#
22. nap	$1.1x10^{-9} \pm 5.5x10^{-10}$	$1.0x10^{-10} \pm 4.7x10^{-11}$	-4.5 ± 3.4***	37.7 ± 3.5	ns	###

1. táblázat: A leptin kalkulált EC50 és E_{max} értékei. *: előző vemhességi naphoz viszonyítva; #: ép uteruszhoz hasonlítva; #p<0.05, ###p<0.001, ***p<0.001, ns: nem szignifikáns

Az adiponektin csökkentette mind a nem vemhes, mind a vemhes patkány méh kontraktilitását (2. ábra). Az endometrium eltávolítása szignifikánsan csökkentette a relaxáló hatást nem vemhes szövetekben. A vemhes uterusz kontraktilitásának vizsgálatakor az E_{max} értékben növekedést figyeltünk meg az 5. naptól a 18. napig, majd a 20. naptól a hatás csökkenését tapasztaltuk. Az adiponektin relaxáló hatása az utolsó vemhességi napon gyakorlatilag eltűnik. Endometrium hiányában, a vemhesség korai szakaszában az adiponektin jelentősen gátolta a kontrakciókat, hatása azonban a 22. vemhességi napon jelentősen lecsökkent. A denudált uterusz esetében a kalkulált E_{max} értékek szignifikánsan magasabbak voltak az 5., 15. és 22. napon (2. táblázat).



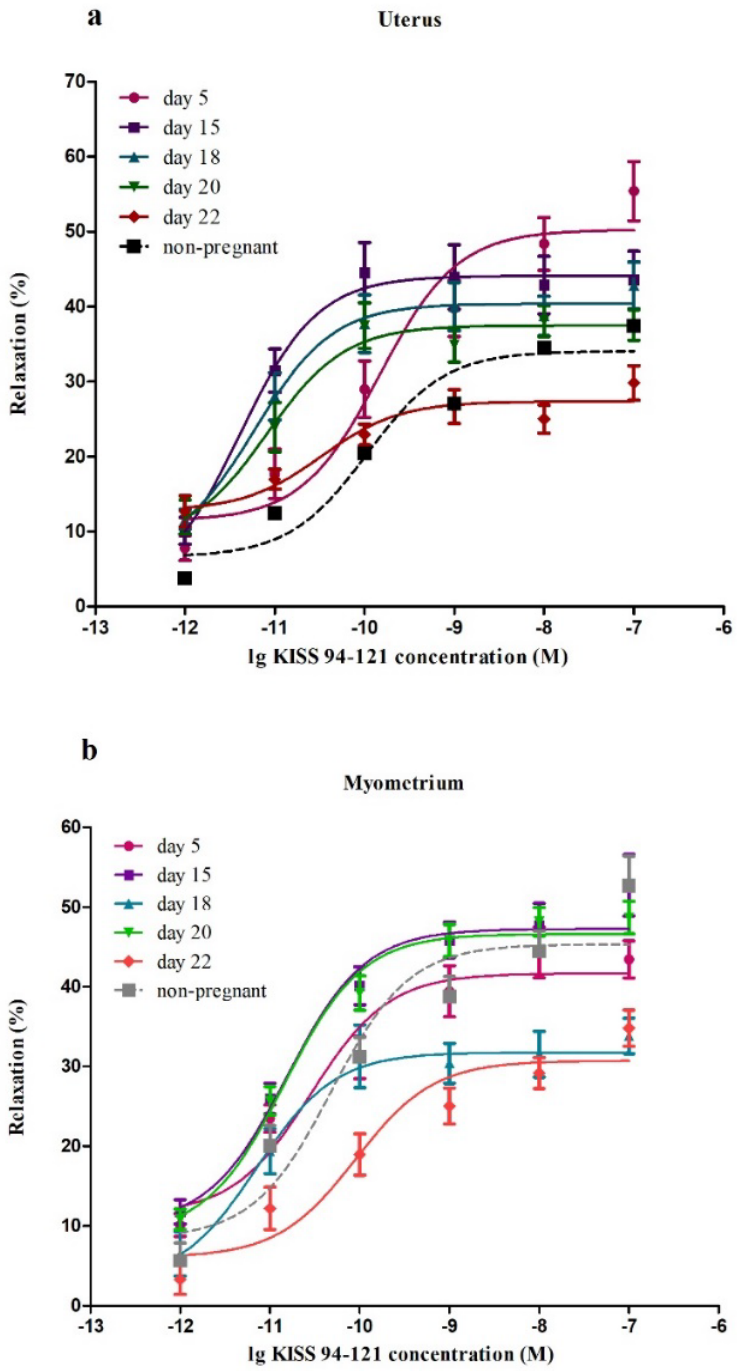


2. ábra: Az adiponektin dózis-hatás görbéje nem vemhes és vemhes uteruszon, illetve miometriumon.

	EC50 (M ± S.E.M.)		Emax (% ± S.E.M)		Ép és denudált uterus összehasonlítása	
	Uterusz	**Denudált uterusz**	**Uterusz**	**Denudált uterusz**	**EC50**	**Emax**
nem vemhes	$4.0x10^{-11} \pm 8.6x10^{-12}$	$2.3x10^{-10} \pm 9.9x10^{-11}$	62.7 ± 2.6	46.4 ± 2.8	ns	###
5. nap	$5.2x10^{-11} \pm 1.6x10^{-12}$	$4.7x10^{-12} \pm 7.8x10^{-13}$	30.2 ± 2.5	48.8 ± 2.8	##	###
15. nap	$2.1x10^{-10} \pm 1.1x10^{-11}$	$2.3x10^{-12} \pm 6.0x10^{-13}$	37.6 ± 3.0	49.7 ± 2.9	#	##
18. nap	$2.3x10^{-11} \pm 7.9x10^{-12}$	$1.6x10^{-11} \pm 5.7x10^{-12}$	50.8 ± 2.7***	45.9 ± 3.7	ns	ns
20. nap	$1.1x10^{-11} \pm 1.5x10^{-12}$	$2.6x10^{-12} \pm 5.9x10^{-13}$	36.2 ± 2.8**	32.9 ± 2.5**	###	ns
22. nap	$8.4x10^{-10} \pm 6.8x10^{-11}$	$2.8x10^{-11} \pm 7.3x10^{-12}$	6.5 ± 6.8***	17.0 ± 6.4**	ns	#

2. táblázat: Az adiponektin kalkulált EC50 és E_{max} értékei. *: előző vemhességi naphoz viszonyítva; #: ép uteruszhoz hasonlítva; #P<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001, **p<0.01, ***p<0.001, ns: nem szignifikáns

A KISS1 94-121 fragmens csökkentette a nem vemhes méhszövet kontraktilitását (3a és 3b ábra). Az endometrium eltávolítása azonban szignifikánsan fokozta a relaxáló hatást (3. táblázat). A KISS1 94-121 képes volt gátolni a vemhes méh kontrakcióit is, simaizom relaxáló hatása a vemhesség 5. napján volt a legerősebb. Bár a számított E_{max} értékek fokozatos csökkenést mutattak a vemhesség végéhez közeledve, a relaxáló hatás még a vemhesség utolsó napján is kimutatható volt. Ezzel szemben a denudált uterusz kontraktilitásának vizsgálatakor nem tapasztaltunk hasonló, fokozatosan csökkenő tendenciát a hatásban. A 18. és 22. napon jelentős csökkenést, míg a 20. napon átmeneti növekedést tapasztaltunk. A kalkulált E_{max} értékek alapján a KISS1 94-121 hatékonyabban relaxálta a méhizomzatot a vemhesség végén, amikor az endometriumot előzőleg eltávolítottuk, bár az E_{max} értékek közötti különbség csak a 20. napon volt szignifikáns.

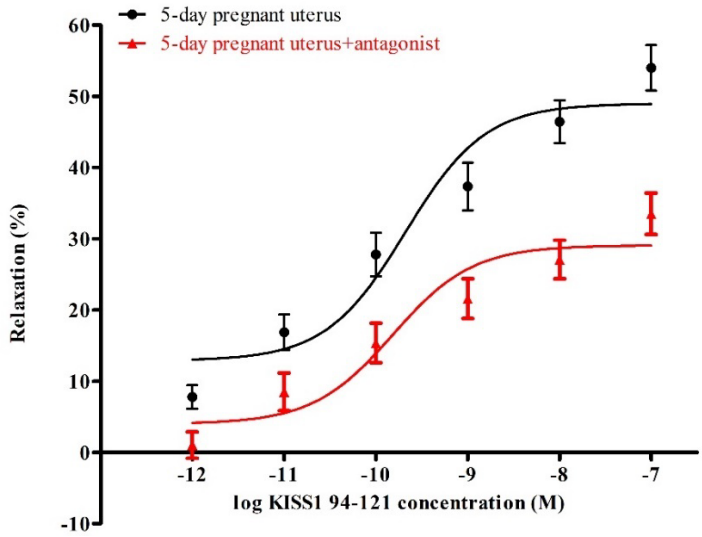


3. ábra: A kisspeptin dózis-hatás görbéje nem vemhes és vemhes uteruszon (**a**), illetve miometriumon (**b**).

EC_{50} (M ± S.E.M.)			
	Uterusz	**Denudált uterusz**	**Ép és denudált uterus összehasonlítása**
nem vemhes	$1.1x10^{-10} \pm 4.5x10^{-10}$	$4.8x10^{-11} \pm 3.2x10^{-11}$	a
5. nap	$1.5x10^{-10} \pm 1.4x10^{-10}$ ns	$2.8x10^{-11} \pm 9.8x10^{-12}$ ns	b
15. nap	$4.0x10^{-12} \pm 1.2x10^{-11}$ ns	$1.5x10^{-11} \pm 1.1x10^{-11}$ ns	ns
18. nap	$6.0x10^{-12} \pm 5.4x10^{-12}$ ns	$7.1x10^{-12} \pm 8.9x10^{-11}$ ns	ns
20. nap	$8.2x10^{-12} \pm 4.2x10^{-12}$ ns	$1.4x10^{-11} \pm 5.6x10^{-12}$ ns	ns
22. nap	$3.3x10^{-11} \pm 8.4x10^{-9}$ ns	$9.0x10^{-11} \pm 2.2x10^{-10}$ ns	ns
E_{max} (% ± S.E.M.)			
	Uterusz	**Denudált uterusz**	**Ép és denudált uterus összehasonlítása**
nem vemhes	34.1 ± 2.0	45.3 ± 1.8	a
5. nap	50.3 ± 2.3 [b]	41.7 ± 1.7 [ns]	ns
15. nap	44.1 ± 1.8 [ns]	47.3 ± 1.4 [ns]	ns
18. nap	40.4 ± 1.6 [ns]	31.8 ± 1.8 [c]	ns
20. nap	37.5 ± 1.4 [ns]	46.6 ± 1.1 [c]	c
22. nap	27.4 ± 1.2 [a]	30.7 ± 1.5 [c]	ns

3. táblázat: A kisspeptin kalkulált EC50 és E_{max} értékei. ns: nem szignifikáns, aP<0.05, bP<0.01, cP<0.001

A kontraktilitási vizsgálatokat az 5. napos vemhes uterusz esetében, kisspeptin-234 trifluor-acetát (Kiss1r antagonista) jelenlétében is elvégeztük annak igazolására, hogy a hatás valóban a Kiss1r receptoron keresztül jön létre. A kisspeptin-234 trifluoracetát gátolta a KISS1 94-121 relaxáló hatását, hiszen a maximális hatás 40%-os csökkenését tapasztaltuk (4. ábra, 4. táblázat).



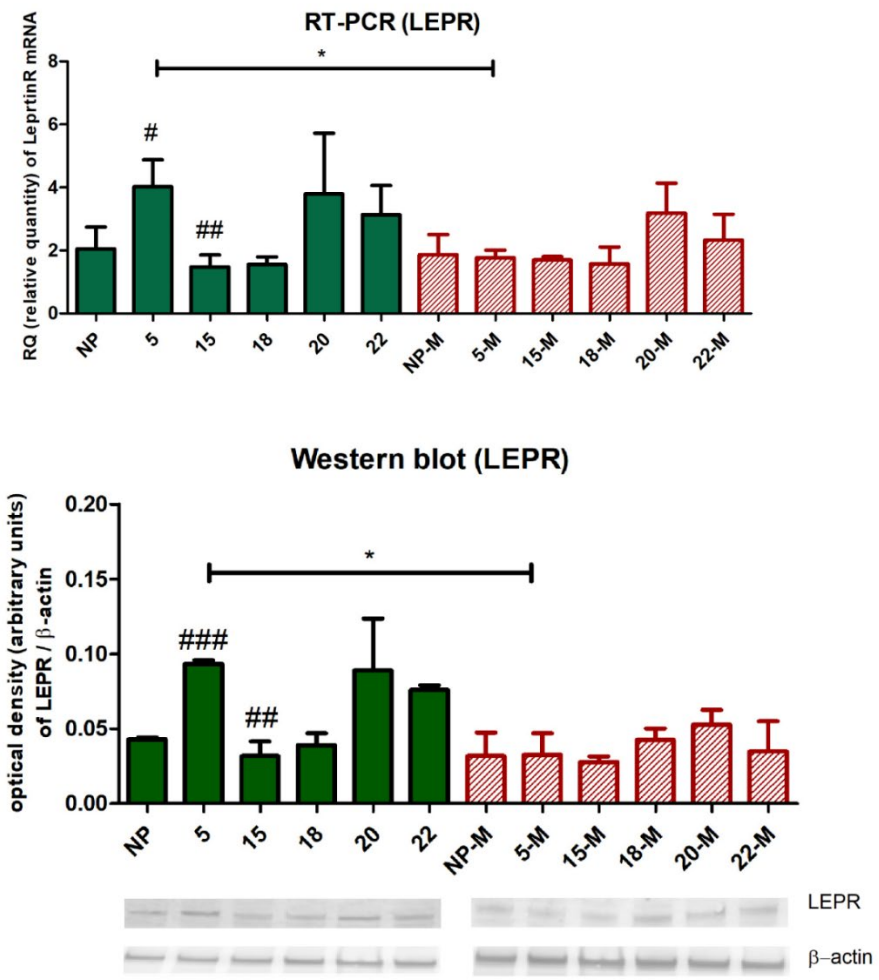
4. ábra: A kisspeptin dózis-hatás görbéje 5 napos vemhes uterusz esetében, a Kiss1r antagonista kisspeptin-234 trifluoroacetát jelenlétében.

	EC_{50} (M ± S.E.M.)	**E_{max} (% ± S.E.M.)**
5 napos vemhes uterusz	$2.1x10^{-10} \pm 3.3x10^{-10}$	49.0 ± 3.1
5 napos vemhes uterusz + antagonista	$1.5x10^{-10} \pm 1.0x10^{-10\ ns}$	29.1 ± 3.1^{c}

4. táblázat: A kisspeptin kalkulált EC50 és E_{max} értékei Kiss1r antagonista jelenlétében. ns: nem szignifikáns, cP < 0.001

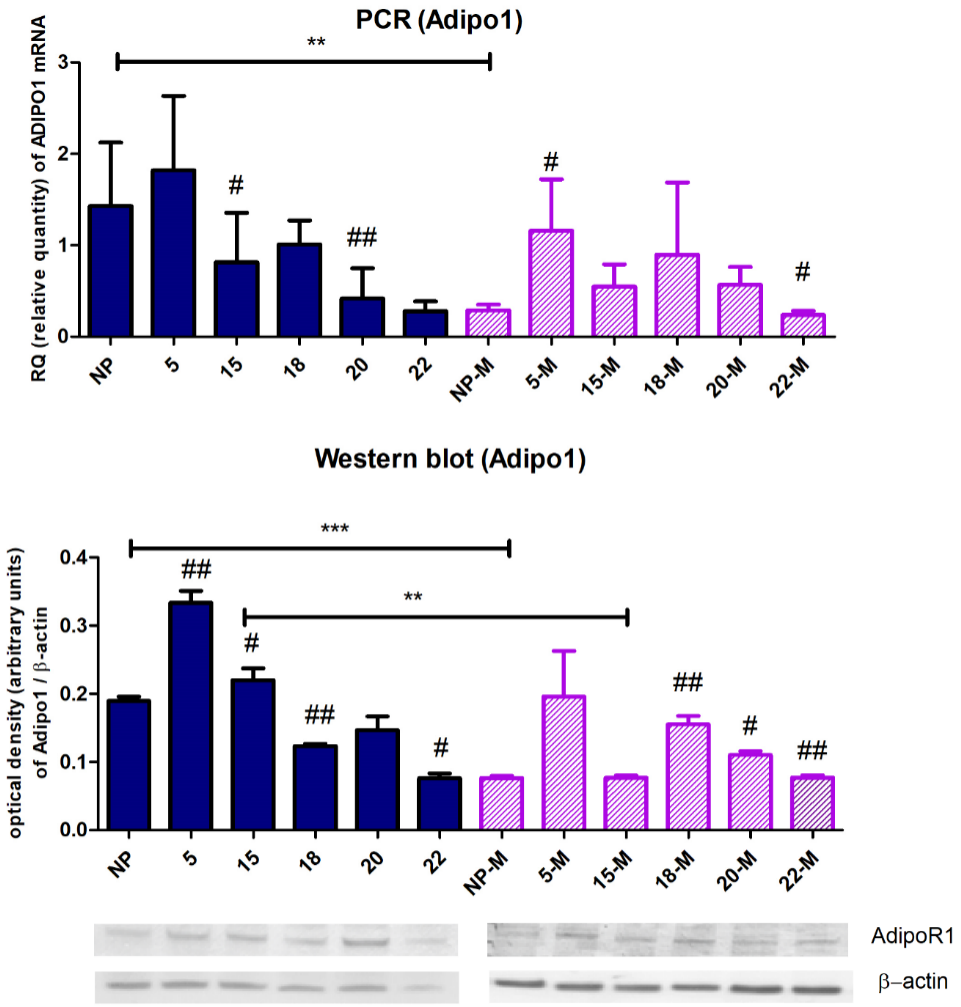
RT-PCR és Western blot analízis eredményei

Kijelenthető, hogy a LEPR receptorok jelenléte szignifikáns mind a nem vemhes, mind a vemhes patkány méhszövetben. A legmagasabb mRNS és fehérje expressziót az 5. vemhességi napon, valamint a vemhesség késői szakaszában mértük. A 15. és 18. napon az expresszióban átmeneti csökkenést tapasztaltunk. Az endometrium eltávolítása csak a vemhesség 5. napján eredményezett szignifikáns csökkenést az mRNS és fehérje mennyiségében (5. ábra).

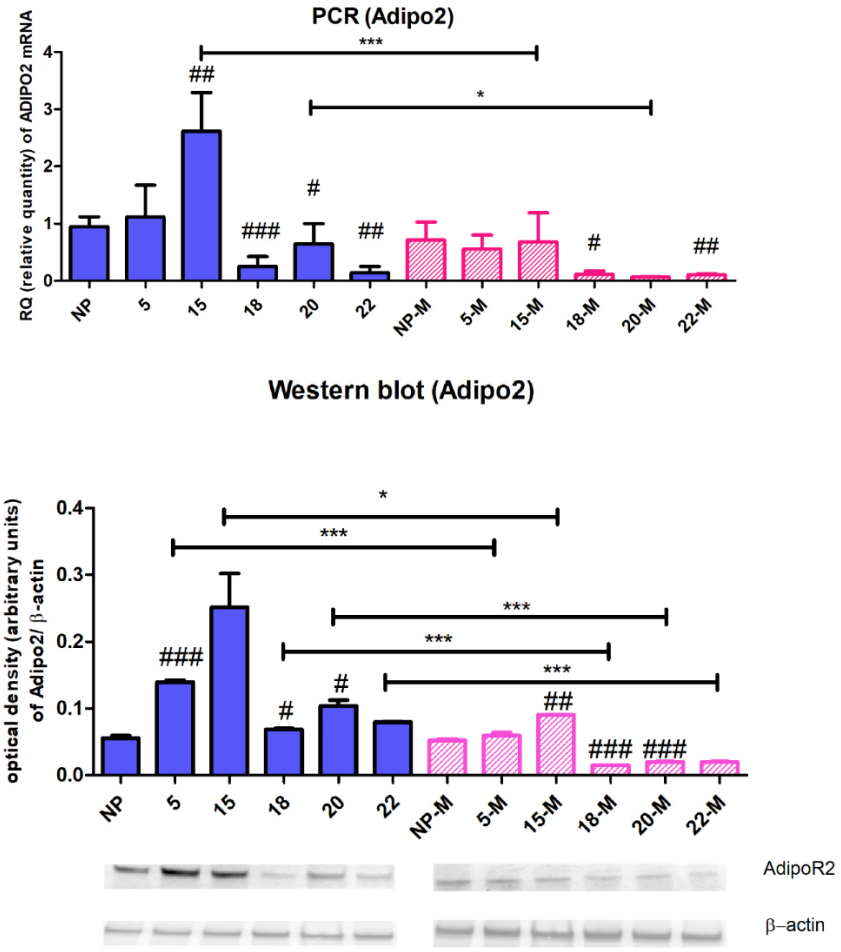


5. ábra: A RT-PCR és Western blot analízis eredményei. A LEPR mRNS és fehérje expressziója nem vemhes, illetve vemhes ép (teli oszlopok), valamint denudált (sávozott oszlopok) méhszövetben. NP: nem vemhes ép uterusz, NP-M: nem vemhes denudált uterusz (miometrium), #: előző vemhességi naphoz viszonyítva; *: ép uteruszhoz hasonlítva; *p<0.05, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001

Az AdipoR1 expressziója a nem vemhes és az 5 napos vemhes méhszövetben volt a legnagyobb. Nem vemhes szövetekben az endometrium eltávolítása szignifikánsan csökkentette az mRNS és fehérje expressziót. Vemhesség során a 15. naptól mérsékelt csökkenést tapasztaltunk a receptor expresszióban. A 18. vemhességi naptól az endometrium eltávolítása nem csökkentette szignifikánsan az mRNS és a fehérje mennyiségét (6. ábra).
Az AdipoR2 mRNS és fehérje expressziója a 15. napon volt a legmagasabb. Az endometrium eltávolítása drámaian csökkentette a receptor mRNS expresszióját a 15. és 20. napon, valamint a fehérje expressziót a vemhesség teljes időszaka alatt. A vemhesség késői szakaszában az AdipoR2 jelenléte a miometriumban gyakorlatilag minimális volt (7. ábra).

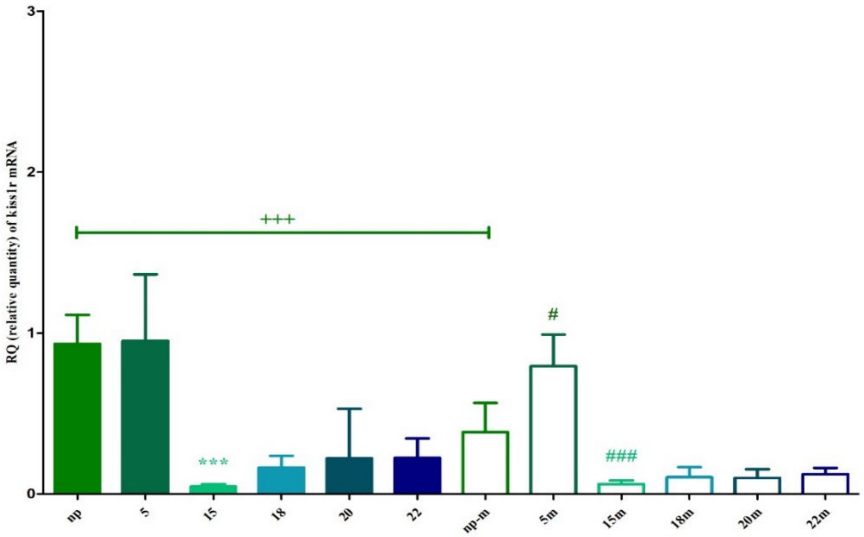


6. ábra: A RT-PCR és Western blot analízis eredményei. Az AdipoR1 mRNS és fehérje expressziója nem vemhes, illetve vemhes ép (teli oszlopok), valamint denudált (sávozott oszlopok) méhszövetben. NP: nem vemhes ép uterusz, NP-M: nem vemhes denudált uterusz (miometrium), #: előző vemhességi naphoz viszonyítva; *: ép uteruszhoz hasonlítva; **p<0.01, ***p<0.001, #p<0.05, ##p < 0.01

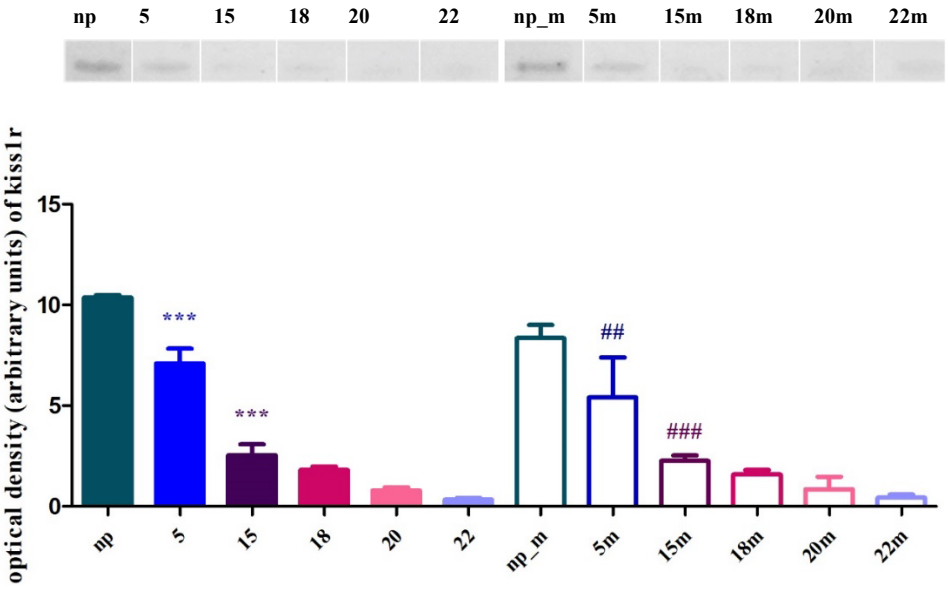


7. ábra: A RT-PCR és Western blot analízis eredményei. Az AdipoR2 mRNS és fehérje expressziója nem vemhes, illetve vemhes ép (teli oszlopok), valamint denudált (sávozott oszlopok) méhszövetben. NP: nem vemhes ép uterusz, NP-M: nem vemhes denudált uterusz (miometrium), #: előző vemhességi naphoz viszonyítva; *: ép uteruszhoz hasonlítva; *p<0.05, ***p<0.001, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001

A Kiss1r expressziójának meghatározásakor a legmagasabb mRNS szintet a nem vemhes és az 5 napos vemhes méhszövet esetében, a legalacsonyabb expressziót pedig a 15. vemhességi napon észleltük (8. ábra). Az endometrium eltávolítása csak a nem vemhes méhszövet esetében okozott szignifikáns csökkenést a receptor mRNS mennyiségében. A legmagasabb Kiss1r receptor fehérje szintet a nem vemhes ép, illetve denudált uteruszban mértük (9. ábra), de szignifikáns expressziót tapasztaltunk az 5. napon is. Jelentős csökkenés figyelhető meg a Kiss1r receptor fehérje mennyiségében az 5. naptól a 15. napig. Az endometrium eltávolítása csökkentette az expresszált Kiss1r mennyiségét, de ezek a változások nem voltak statisztikailag szignifikánsak.



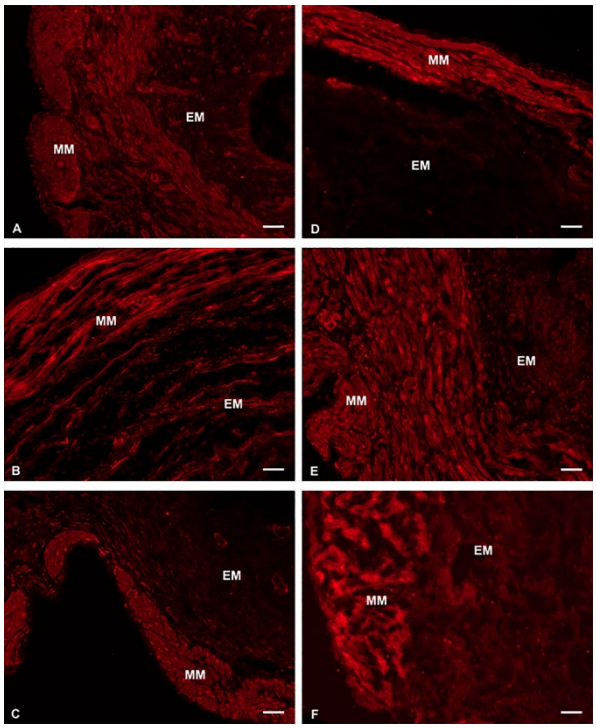
8. ábra: A Kiss1r mRNS expressziójának változása a vemhesség során ép (teli oszlopok), valamint denudált (sávos oszlopok) uteruszban. +: ép uteruszhoz hasonlítva; * és #: előző vemhességi naphoz hasonlítva. np: nem vemhes ép uterusz, np_m: nem vemhes denudált uterusz (miometrium), +P<0.05, ###P<0.001, ***P<0.001, n=4



9. ábra: A Kiss1r fehérje expressziójának változása a vemhesség során ép (teli oszlopok), valamint denudált (sávos oszlopok) uteruszban. * és #: előző vemhességi naphoz hasonlítva. np: nem vemhes ép uterusz, np_m: nem vemhes denudált uterusz (miometrium), ***P<0.001, ##P<0.01, ###P<0.001, n=4-7

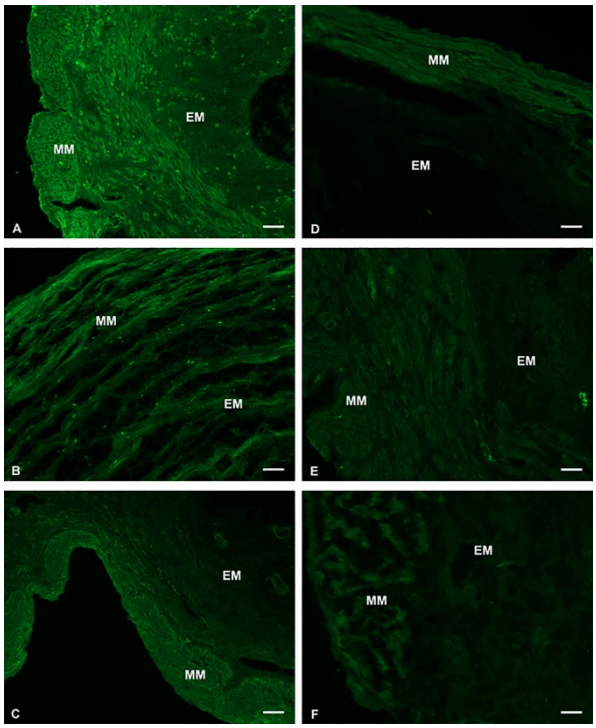
Fluoreszcens immunhisztokémia

A LEPR receptorok festődésének intenzitása erős volt mind a nem vemhes, mind a vemhes uterusz mintákban, azonban a receptorok expressziója a nem vemhes szövetek simaizom rétegeiben volt a legmarkánsabb. A vemhes szövetek esetében is a LEPR jelenléte elsősorban a miometriumra korlátozódott, kivéve az 5. napot, amikor az endometriumban nagyobb intenzitást észleltünk (10. ábra).

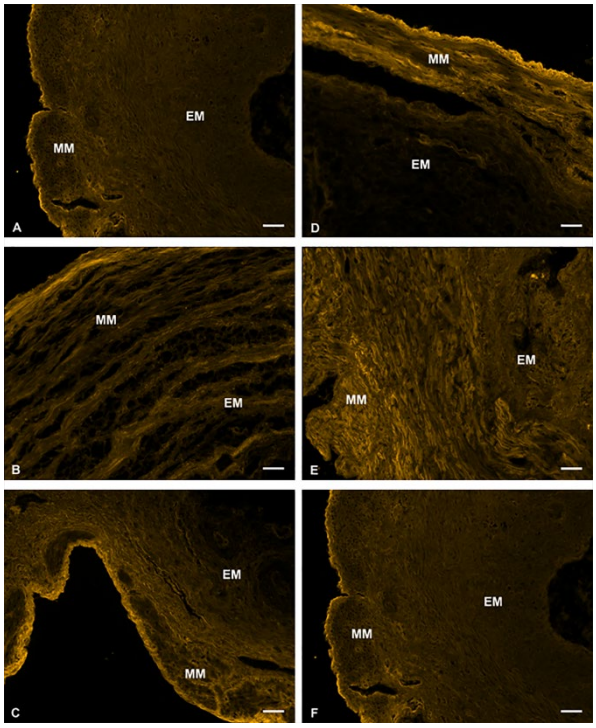


10. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek nem vemhes és vemhes patkány méhszövet metszeteiről LEPR immunhisztokémia után. A: nem vemhes, B: 5. nap, C: 15. nap, D: 18. nap, E: 20. nap, F: 22. nap, MM: miometrium, EM: endometrium. Skála: 50 µm

Az AdipoR1 receptorok esetében a nem vemhes és korai vemhes minták izom- és endometriális rétegei erős immunfestődést mutattak, amely azonban a vemhesség végéhez közeledve lecsökken (11. ábra). Az AdipoR2 mért legmagasabb expresszióját a 15. napon a fluoreszcens mikroszkópos felvételek is igazolják. A legalacsonyabb festődési intenzitás a nem vemhes, az 5 és a 18 napos vemhes szövetekben volt tapasztalható. Az AdipoR2 endometriális expressziója jelentős volt a vemhesség középső és késői szakaszában (12. ábra).

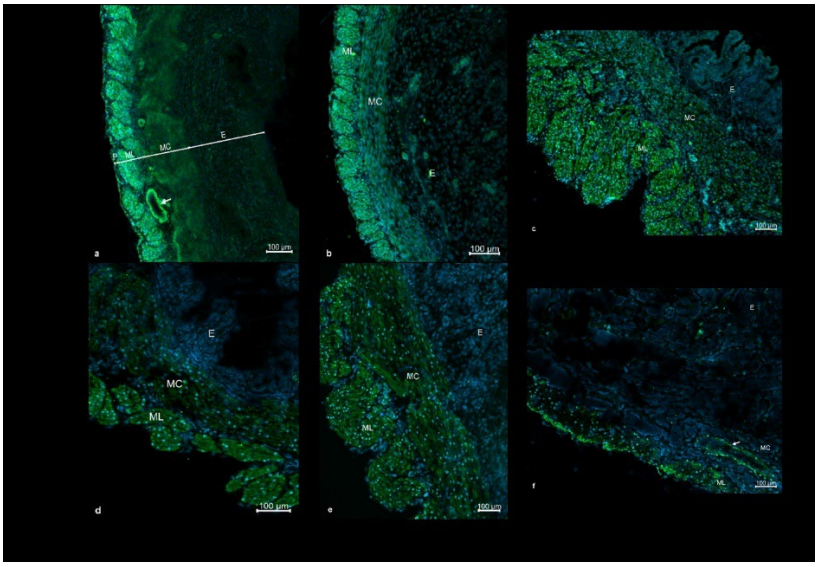


11. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek nem vemhes és vemhes patkány méhszövet metszeteiről AdipoR1 immunhisztokémia után. A: nem vemhes, B: 5. nap, C: 15. nap, D: 18. nap, E: 20. nap, F: 22. nap, MM: miometrium, EM: endometrium. Skála: 50 µm



12. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek nem vemhes és vemhes patkány méhszövet metszeteiről AdipoR2 immunhisztokémia után. A: nem vemhes, B: 5. nap, C: 15. nap, D: 18. nap, E: 20. nap, F: 22. nap, MM: miometrium, EM: endometrium. Skála: 50 µm

A Kiss1r receptorok legintenzívebb festődését a simaizomrétegekben tapasztaltuk, míg a receptorok endometriális jelenléte kevésbé volt szignifikáns (13. ábra). A nem vemhes és az 5 napos vemhes méhszövetben a receptorok jelenléte markáns volt, de az expresszió a vemhesség vége felé fokozatosan csökkent, és ez a csökkenés különösen az endometriumban volt látványos. A 18. vemhességi naptól kezdve a receptorok elsősorban a méh simaizomrétegeiben expresszálódnak.



13. ábra: Reprezentatív fluoreszcens mikroszkópos felvételek nem vemhes és vemhes patkány méhszövet metszeteiről Kiss1r immunhisztokémia után (zöld). A sejtmagok jelölésére DAPI-t használtunk (kék). P: perimetrium, ML: hosszanti simaizomzat, MC: körkörös simaizomzat, E: endometrium, ←:ér.

Diszkusszió

Eredményeinkkel igazoltuk, hogy a leptin, az adiponektin és a kisspeptin jelentősen befolyásolják a nem vemhes, illetve a vemhes patkány méhizomzat kontraktilitását. Bemutattuk továbbá a miometriális és endometriális receptorok expressziójának változásait a vemhesség során, valamint azt, hogy ezen adipokinek hatásai hogyan módosulnak a vemhességi időszak alatt.

Megerősítettük a korábbi feltételezéseket, melyek szerint a LEPR expresszálódik a méhszövetben. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a leptin receptorok a nem vemhes méh simaizomszövetében fejeződnek ki elsősorban. Bár az endometrium eltávolítása után tapasztalt csökkenés az expresszióban nem volt szignifikáns, a leptin által kiváltott relaxáló hatásban jelentős csökkenést tapasztaltunk. Eredményeink arra utalnak, hogy az endometriális receptorok módosíthatják a leptin méh kontraktilitásra gyakorolt hatását a nem vemhes szövetekben. Korai vemhességben a LEPR nagy mértékben expresszálódik az

endometriumban, a receptorok száma azonban a vemhesség közepén lecsökken, és a receptorok kifejeződése a miometriumban válik jelentőssé. A vemhesség vége felé közeledve mind az endometriális, mind a miometriális receptorok mennyisége újra megemelkedik. A leptin által kiváltott relaxáló hatás a vemhesség során fokozatosan csökkent, az endometrium hiányában azonban a leptin a vemhesség ideje alatt végig gátolni tudta a méhkontrakciókat. Az immunhisztokémiával szemléltetett változások a receptorok disztribúciójában jól korreláltak mind az RT-PCR, mind a Western blot vizsgálatok eredményeivel. Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy nem vemhes esetekben, valamint a vemhesség korai és középső szakaszában mind az endometriális, mind a miometriális leptin receptorok relaxáló hatást közvetítenek. A hatásban bekövetkezett módosulások azonban nem voltak összhangban azokkal a változásokkal, amelyeket a receptor mRNS és fehérje mennyiségekben tapasztaltunk. Feltételezzük, hogy a megfigyelt relaxáló hatás csökkenésének hátterében a jelátviteli mechanizmus vagy a leptin receptor érzékenységének esetleges megváltozása állhat.

Korábbi kísérletek már bizonyították az adiponektin receptorok jelenlétét a patkány méhszövetben. Eredményeinkkel azonban igazoltuk, hogy jelentős különbségek vannak a két adiponektin receptor expressziójában és disztribúciójában. Az AdipoR1 expressziója a nem vemhes endometriumban jelentős, míg az AdipoR2 főként a simaizomszövetben van jelen. Az adiponektin csökkentette a kontrakciókat mind az ép, mind a denudált méhszövet esetében, azonban az endometrium hiánya csökkentette ezt a hatást. Eredményeink arra utalnak, hogy az endometriális AdipoR1 képes fokozni az adiponektin által kiváltott relaxáló hatást. A vemhesség előrehaladtával az adiponektin relaxáló hatásában szignifikáns csökkenést tapasztaltunk. Ezzel összhangban a receptorok mennyisége is lecsökken a vemhesség végére, melyet immunhisztokémiai vizsgálatokkal is igazolni tudtunk. Feltételezzük, hogy a korai terhességben az endometriális receptorok a kontraktilitás fokozásában játszanak szerepet, jelentőségünk azonban a vemhesség végére lecsökken.

A kisspeptin/Kiss1r rendszer elemeit szintén azonosították korábban a méhszövetben, de eddig nem álltak rendelkezésre egyértelmű adatok a kisspeptin uterusz kontraktilitásra gyakorolt hatásairól. Vizsgálatainkban a KISS1 94-121 gátolta a kontrakciókat mind a nem vemhes, mind a vemhes méh esetében. Bebizonyítottuk, hogy a kisspeptin valóban a Kiss1r receptorhoz kötődve fejti ki ezen hatásait, hiszen a KISS1 94-121 relaxáló hatását a kisspeptin-234 trifluoroacetát, amely egy Kiss1r antagonista, szignifikánsan csökkentette az 5 napos vemhes méhszövet vizsgálatakor. A KISS1 94-121 a vemhesség korai szakaszában, amikor a Kiss1r mRNS és fehérje mennyisége is szignifikáns volt, jelentősen csökkentette a méhkontraktilitást, azonban a vemhesség vége felé közeledve szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a relaxáló

hatásban. Ismert, hogy a nem vemhes méh aktivitása patkányok esetében általában alacsony, míg a vemhesség 5. napja az embrió beágyazódásának időszaka, amely folyamathoz szintén a méh relatív nyugalmi állapota szükséges. A Kiss1r expressziójának csökkenését az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei is megerősítették, mivel a vemhesség végének közeledtével a Kiss1r festődése egyre gyengébb intenzitást mutatott. Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy a kisspeptin receptorok a vemhesség során túlnyomórészt a méh simaizomszövetben expresszálódnak. Feltételezzük, hogy az endometriális receptoroknak mégis fontos szerepe lehet a kisspeptin relaxáló hatásának szabályozásában. Ismert ugyanis, hogy az endometrium szerepet játszik a kontraktilitás szabályozásában azáltal, hogy a simaizomzat működését befolyásoló anyagokat termel. Eredményeink arra utalnak, hogy bizonyos, jelenleg még nem teljesen ismert endometriális mechanizmusok befolyásolhatják a Kiss1r jelátvitelét, és ezáltal a kisspeptin hatását.

Konklúzió

Igazoltuk a leptin, az adiponektin és a kisspeptin receptorok jelenlétét a nem vemhes és vemhes méhszövetben, valamint bemutattuk ezen adipokinek méhkontraktilitásra gyakorolt hatásait. Eredményeinkből arra következtetünk, hogy az endometriális leptin, adiponektin és kisspeptin receptorok fontos szerepet töltenek be ezen adipokinek méhkontrakciókra gyakorolt hatásainak szabályozásában. Eredményeink alátámasztják azt az elképzelést, mely szerint egyes adipokinek hozzájárulnak a méh nyugalmi állapotának fenntartásához a terhesség korai és középső szakaszában, de azt is jelzik, hogy a vemhesség végéhez közeledve ezen adipokinek szerepe egyre kevésbé jelentőssé válhat. Összefoglalva, elsőként mutattuk be a leptin, adiponektin és kisspeptin receptorok expressziójában és disztribúciójában bekövetkező változásokat a vemhes méhszövetben, valamint ezen adipokinek méh simaizomszövetre gyakorolt hatásainak módosulását a terhesség előrehaladtával.

Publikációs lista

Az értekezés alapját képező közlemények

I. 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 SCIENCES 297 Paper: 120465, 12 p. (2022)
(**IF: 6,78**, Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics [miscellaneous] SJR indikátor: D1)

II. 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)
(**IF: 5,195**, Pharmacology SJR indikátor: Q1)

Előadások az értekezés témájában

I. Schaffer, A., Hajagos-Tóth, J., Ducza, E., Gáspár, R.:
The effects of kisspeptin, leptin and adiponectin on non-pregnant rat uterus *in vitro*
RECOOP 9th Annual Project Review Meeting, 2018.10.11-14., Pozsony, Szlovákia
(Poszter prezentáció)

II. Schaffer, A., Hajagos-Tóth, J., Ducza, E., Gáspár, R.:
Ontogeny of the effects of leptin, adiponectin and kisspeptin on pregnant rat uterine contractility *in vitro*
RECOOP 10th Annual Project Review Meeting, 2019.10.11-12, Wrocław, Lengyelország
(Poszter prezentáció)

III. Schaffer, A., Hajagos-Tóth, J., Ducza, E., Gáspár, R.:
A leptin, adiponektin és kisspeptin vemhes uterusz kontraktilitásra gyakorolt hatásának vizsgálata *in vitro*
XVI. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, 2020.09.10-12., Online konferencia
(Poszter prezentáció)

IV. Schaffer, A., Ducza, E., Bódi, N., Bagyánszki, M., Szalai, Z., Gáspár, R.:
Effects of kisspeptin on non-pregnant and pregnant uterine contractility
RECOOP 15th Bridges in Life Sciences Conference, 2020.10.02., Online konferencia
(Poszter prezentáció)

V. Schaffer, A., Ducza, E., Bódi, N., Bagyánszki, M., Szalai, Z., Gáspár, R.:
Role of leptin and adiponectin in the regulation of pregnant uterine contractility in rats
RECOOP 16th Bridges in Life Sciences Conference, 2021.04.16., Online konferencia
(Poszter prezentáció)

VI. Schaffer, A., Ducza, E., Bódi, N., Bagyánszki, M., Gáspár, R.:
The influencing role of leptin and adiponectin systems in pregnant rat uterine contractility
ISCTICO-HUPHAR-IUPHAR konferencia, 2021.10.27-30., Pécs, Magyarország
(Poszter prezentáció)

Egyéb közlemények

I. Gáspár, R.; Hajagos-Tóth, J.; **Schaffer, A**.; Kothencz, A.; Siska-Szabó, L.; Ducza, E.; Csányi, A.; Tábi, T.; Bagaméry, F.; Szökő, É.; Kovács, O.; Barna, T.; Samavati, R.; Mirdamadi, M.; Sztojkov-Ivanov, A.; Szűcs, K. F.; Vari, S. G.: 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)
(**IF: 3,251**, Biochemistry, Genetics and Molecular Biology [miscellaneous] SJR indikátor: Q2)

II. Seres-Bokor, A.; Kemény, K. K.; Taherigorji, H.; **Schaffer, A**.; Kothencz, A.; Gáspár, R.; Ducza, E.: The Effect of Citral on Aquaporin 5 and Trpv4 Expressions and Uterine Contraction in Rat - An Alternative Mechanism
LIFE-BASEL 11: 9 Paper: 897 , 9 p. (2021)
(**IF: 3,251**, Biochemistry, Genetics and Molecular Biology [miscellaneous] SJR indikátor: Q2)

III. Kothencz, A.; Hajagos-Tóth, J.; Szűcs, K. F.; **Schaffer, A**.; Gáspár, R.: α-Tocopherol Potentiates the Cervical Resistance Decreasing Effects of COX Inhibitors in Pregnant Rats: The Putative Role of Cyclooxygenase-2 Inhibition
JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS 368 : 2 pp. 292-298. , 7 p. (2019)
(**IF: 3.561**, Pharmacology SJR indikátor: Q1)