

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet



**Az ABC transzporterek szerepe a patkány uterusz
kontraktilitásának szabályozásában**

Ph.D. tézis összefoglaló

Lovász Norbert

Témavezető: Prof. Dr. Falkay György

Szeged
2013

1. Bevezetés

A WHO definíciója szerint koraszülésnek nevezzük, ha a szülés a 20. és 37. gesztációs hét között következik be. A koraszülést a perinatális és neonatális morbiditás és mortalitás vezető okaként tartják számon. A hosszú távú következmények (idegrendszeri elváltozások, látás-hallászavarok és egyéb neurológiai kórképek), a koraszülöttek egész életét meghatározzák. A születés idejének késleltetése jelentősen növeli magzat túlélési esélyeit és csökkenti az éretlenségből adódó állapotok kialakulásának valószínűségét és súlyosságát. A koraszülés oka és az azt indukáló kórélettani folyamatok nagyrészt ismeretlenek. Magyarországon a koraszülés incidenciája 8-9%, és nem csökkent az elmúlt években a kiterjedt kutatások ellenére sem. Így továbbra is kihívás a tudomány számára új, szelektív tokoliticumok fejlesztése vagy a már ismert és alkalmazott szerek hatásmechanizmusának jobb megértése, így a terápia hatásosabbá tétele.

Az ABC (ATP binding cassette) transzporterek az egyik legősibb fehérjecsalád tagjai megtalálhatóak a prokariótáktól az emberig. Jelenlegi tudásunk szerint 49 humán ABC transzportert ismerünk. Ezek a fehérjék jelentős szerepet játszanak a membránon történő transzport folyamatokban úgy, mint transzporter vagy, mint ion-csatorna. A transzporter funkciónak elsősorban barrierékben van jelentős szerepe (vér-agy gát, placentáris transzfer, vér-liquor gát). A barrierékben efflux pumpa funkcióval bírnak, csökkentik a szubsztrát intracelluláris koncentrációját. Az efflux transzporterek szubsztrátspecifitása igen széles, a szubsztrátok között találhatóak uterusz-relaxáló anyagok is (pl.: nifedipin és prazosin). Emellett egyes anyagok képesek gátolni az efflux pumpákat (pl.: KO-134), így képesek a szubsztrát intracelluláris koncentrációját emelni. A leggyakrabban vizsgált efflux transzporterek egyike az ABCG2, mely jelentős mennyiségben található reprodukciós szövetekben, mint például uteruszban, prosztatában vagy placentában. Az ion-csatornáknak regulátor szerepük van más ion-csatorna proteinek mellett. Az ABCC8 és ABCC9 a K_{ATP} csatornáknak felépítésében játszik szerepet, mint ion-csatorna regulátor a hasnyálmirigy β sejtjeiben, vaszkuláris simaizomban, valamint a szívben. Az ion-csatorna regulátorok alapvetően befolyásolják a csatorna farmakológiai reaktivitását, és mivel a csatornák felépítése szövetspecifikus így eltérő farmakológiai tulajdonságú K_{ATP} csatornákat különböztünk meg. A K_{ATP} csatorna nyitását serkentő anyagok (KCOk) (diazoxid és pinacidil) jó simaizom relaxáló hatással bírnak.

2. Célkitűzések

1. Az ABCG2 efflux transzporter expressziójának meghatározása a patkány uterusban a terhesség folyamán. Valamint megvizsgálni az ABCG2 szubsztrát nifedipin uterus-relaxáló hatását KO-134 jelenlétében *in vivo*.
2. A K_{ATP} csatorna ion-csatorna regulátor fehérjéinek (ABCC8/SUR1 és ABCC9/SUR2) meghatározása a patkány uterusban terhesség ideje alatt, valamint lehetséges összefüggések keresése a KCOk (diazoxid és pinacidil) farmakológiai reaktivitása és a K_{ATP} csatornák expressziója között *in vitro*.
3. A K_{ATP} csatornák funkciójának vizsgálata a β_2 -AR agonisták (szalmeterol és ritodrin) hatásmechanizmusában kora terhesség (6. nap), valamint terminusban (22. nap); K_{ATP} csatorna agonista pinacidil és antagonistá glibenklamid jelenlétében, *in vitro*.

3. Anyagok és módszerek

Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottságának és a Csongrád Megyei Mezőgazdasági, Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével végeztük (engedélyszám: IV./01758-21/10082).

Az állatok pároztatása

Ivarérett nőstény (180-200 g) és hím (240-260 g) Sprague-Dawley patkányokat pároztattunk. A pároztatás kezdetétől számított 4-5 órán belül a nőstény állatoktól hüvelykenetet vettünk és mikroszkóp alatt hímivarsejteket kerestünk. Amennyiben a keresés pozitív eredménnyel zárult, akkor az állatot elkülönítettük, mint az 1. napos vemhes nőstényt.

Szövetgyűjtés

A PCR és western blot vizsgálatokhoz nem terhes valamint 6, 8, 10, 12, 14, 15, 18, 20, 21, 22 napos terhes uteruszokkal használtunk, valamint a terhesség 6. illetve 10. napján implantációs és interimplantációs helyeket külön gyűjtve is feldolgoztuk. Az uterusz eltávolítása után, a szöveteket fiziológias sóoldatban mostuk majd ribonukleáz inhibitor tartalmú oldatba helyeztük. A mintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd a felhasználásig $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tároltuk.

Real-Time PCR analízis

A mintákat folyékony nitrogénben fagyasztva mechanikusan porítottuk ezután a mintákból PARIS Kit segítségével RNS-t és fehérjét izoláltunk. Az RNS mennyiségi és minőségi meghatározása nanodrop technika alkalmazásával történt. Az reverz transzkripció (RT) lépésben $2\mu\text{g}$ RNS-t és High Capacity RNA-to-cDNA Kitet használtunk. A felszorzás TaqMan Gene Expression Master Mix alkalmazásával ABI StepOne Real-Time cycler gépen történt. A következő primereket használtuk: ABCC8/SUR1 (Rn01476318_m1), ABCC9/SUR2 (Rn01463198_m1) és endogén kontrollként a GAPDH-t (Rn99999916_s1) használtunk. Az ABCG2 (Rn01639905-m1) esetén β -actint (Rn00667869- m1) használtunk endogen kontrollként.

Western blot analízis

Mintánként $30\mu\text{g}$ fehérjét 4-12%-os gélen elektroforézisnek vetettünk alá. A fehérjét a nitrocellulóz membránra helyeztük át, félszáraz blotoló eljárással. Mosás után a membránt szobahőmérsékleten ABCC8/SUR1, ABCC9/SUR2 ABCG2 β -actin és GAPDH poliklonális antitestekkel, blokkoló pufferben 1 órán át inkubáltuk. Az immunreaktív sávokat WesternBreeze Chromogenic Western blot immune detection kit segítségével láthatóvá tettük, majd elektronikusan rögzítettük az EDAS290 imaging system segítségével. Az optikai denzitás meghatározása Kodak 1D Images softwareal történt.

***In vivo* kontraktilitás vizsgálat**

Az *in vivo* kontraktilitási vizsgálatokhoz egy klasszikus mikroballonos intrauterin nyomásmérő módszert alkalmaztunk Millar katéterrel (Csapo 1963). Az állatokat 24 órával szülés után ketamin-xylazin kombinációjával altattuk. A juguláris vénát kiperaráltuk a

későbbi intravénás adagolás céljából. Ezután az állat hasfalát felnyitottuk és egy apró bevágást ejtettünk a cervix felett, ahol a Millar katétert felhelyeztük az uterusba, majd rögzítettük. 45 perc inkubáció után megkezdjük a vizsgálati anyagok adagolását.

***In vitro* vizsgálatok**

Uterusz preparálása

Kísérleteink során nem terhes valamint 6, 8, 18 és 22 napos terhes patkány uterusokat használtunk. Az állatok CO₂-al történő leölése után az uterusokból 5mm hosszúságú gyűrűket metszettünk. A preparátumokat karbogénnel átáramoltatott de Jongh oldatot tartalmazó, 37 °C-os szervfürdőbe helyeztük. Az inkubálási periódus letelte után az uterus kontrakciókat váltottuk ki, majd megkezdjük a vizsgálati anyagok adagolását.

KCO vizsgálatok

A pinacidil és diazoxid (10^{-8} – 10^{-4} M) uterus-relaxáló hatását az uterus preparálás részben leírtak alapján végeztük oxytocin (10^{-6} M) indukálta kontrakciókon. A vizsgálatokat megismételtük K_{ATP} csatorna antagonistá glibenklamid (10^{-6} M) jelenlétében is. A pinacidil hatását EFS (Elektromos Térerő Ingerlés) indukálta kontrakciókon is megvizsgáltuk nem terhes valamint 22 napos terhes uterusokon. Az uterus preparálása a fennemlített módon történt, azzal a kivétellel, hogy ebben az esetben a szöveteket egy speciális szervtartóra rögzítettük, amelyen két platina elektród található. A szövetet a két elektród közé erősítettük majd a kontrakciókat elektromos térerőingerléssel indukáltuk. Ebben az esetben a pinacidil hatásának vizsgálatát kumulatív módon végeztük 20 perces TEA (tetraetil-ammonium) (10^{-3} M) előinkubálás után. A kísérlet paraméterei a következők voltak; PW:30 s (egy elektromos stimulus hossza) és PP: 50 ms (két elektromos stimulus közt eltelt idő).

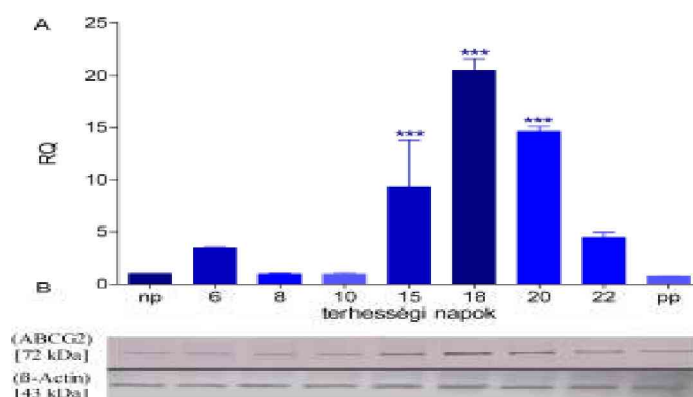
β₂-AR agonisták, piacidil és glibenklamid kombinációi

A β₂-AR agonista szalmeterol és ritodrin (10^{-10} - 10^{-5} M) uterus-relaxáló hatását az uterus preparálás részben leírtak alapján végeztük spontán kontrakciókon. A vizsgálatok kora terhes (6 napos) illetve terminusban (22 napos) lévő patkány uterusokon történtek. Először a szalmeterol és a ritodrin önálló hatását vizsgáltuk, majd 10^{-6} M glibenklamid előinkubáció valamint különböző dózis pinacidil (10^{-9} , 10^{-8} és 10^{-7} M) jelenlétében.

4. Eredmények

ABCG2 expresszió a patkány uteruszban

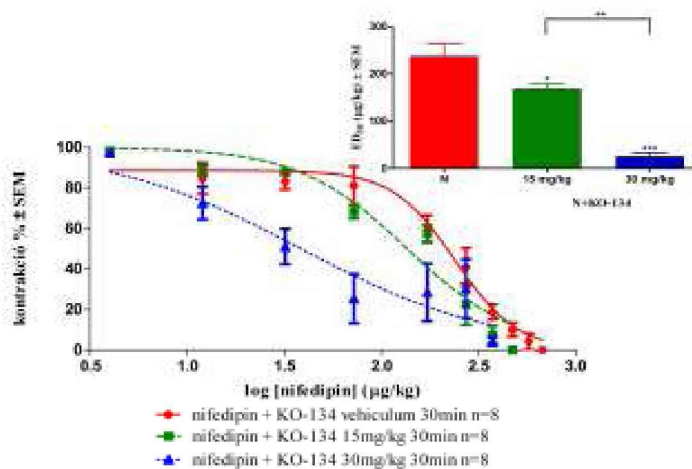
A Real-Time PCR és Western blot analízis igazolta, hogy az ABCG2 efflux fehérje karakterisztikusan változik a terhesség folyamán; nem terhes és kora terhes uteruszban alacsony mennyiségben van jelen, majd a 15 napon megemelkedik és a maximumot a 18. napon éri el, majd csökken a terhesség végéig (1. ábra).



1. ábra: ABCG2 mRNA és fehérje expressziója a patkány uteruszban. *** $p < 0.001$. S.E.M: standard error of mean, $n = 5$

Nifedipin uterusz-relaxáló hatása KO-134 jelenlétében, *in vivo*

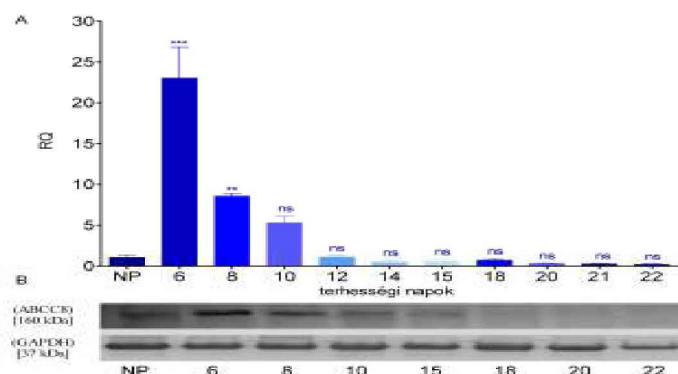
A nifedipin hatásosnak bizonyult az *in vivo* kontraktilitás vizsgálatok folyamán. A KO-134 kombináció szignifikánsan és dóziszfüggően növelte a nifedipin uterusz-relaxáló hatását, melyet az ED_{50} értékek is jól tükrözik.



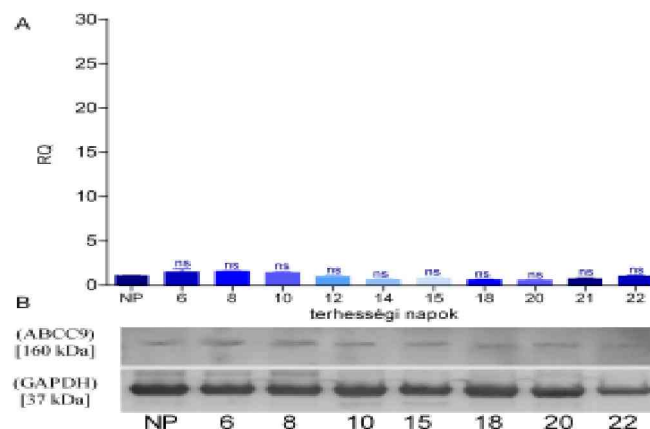
2. ábra: A nifedipin uterusz-relaxáló hatása önmagában, valamint 15 mg/kg és 30 mg/kg KO-134 jelenlétében, *in vivo*. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ és * $p < 0.05$. S.E.M: standard error of mean, $n = 8$

ABCC8/SUR1 és ABCC9/SUR2 expressziója a patkány uteruszban

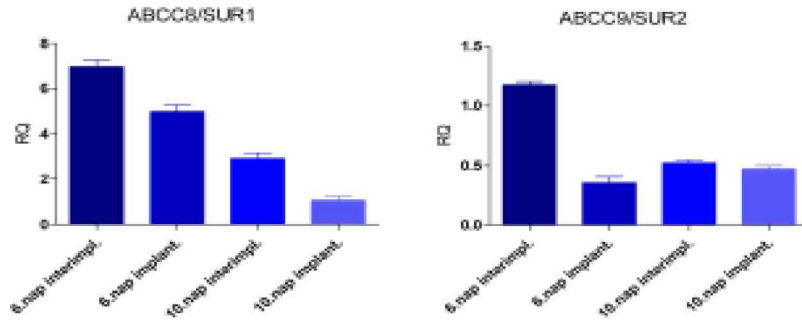
A Real-Time PCR és Western blot analízis igazolta, hogy mindkét SUR alegység kimutatható a nem terhes és a terhes patkány uteruszban. A SUR1 esetén mind az mRNS és a fehérje szintje drámaian megemelkedett a terhesség elején (6. nap) majd csökkent a 8. naptól a 12. napig és utána változatlan maradt a terhesség végéig (3. ábra). A SUR2 esetén nem tapasztaltunk számottevő változást a terhesség folyamán (4. ábra). A SUR1 esetén tapasztalt markáns emelkedés kapcsán a 6. illetve a 10. terhességi napokon az implantációs és az interimplantációs helyeket külön gyűjtve is megvizsgáltuk mindkét SUR alegység kapcsán (5. ábra).



3. ábra (A): ABCC8/SUR1 mRNS expressziója a terhességi napok függvényében. Az RQ (Relative Quantity) értékek statisztikai összehasonlítást a nem terhes állapotban kapott értékekhez viszonyítva tüntettük fel; ns: nem szignifikáns, **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, S.E.M: standard error of mean, $n = 5$. **(B): (felül)** ABCC8/SUR1 fehérje expressziója terhességi napok függvényében (NP: nem terhes), **(alul)** endogén kontroll GAPDH.



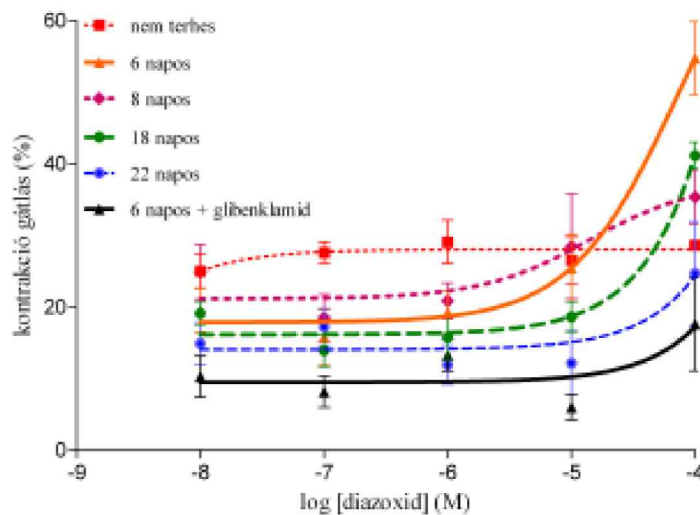
4. ábra (A): ABCC9/SUR2 mRNS expressziója a terhességi napok függvényében. Az RQ (Relative Quantity) értékek statisztikai összehasonlítást a nem terhes állapotban kapott értékekhez viszonyítva tüntettük fel; ns: nem szignifikáns, S.E.M: standard error of mean, $n = 5$. **(B): (felül)** ABCC9/SUR2 fehérje expressziója terhességi napok függvényében (NP: nem terhes), **(alul)** endogén kontroll GAPDH.



5. ábra: Az ABCC8/SUR1 és az ABCC9/SUR2 expressziója a terhesség 6. és 10. napján az implantációs és interimplantációs helyeket külön vizsgálva. S.E.M: standard error of mean n = 5

A nem szelektív SUR agonista diazoxid uterusz relaxáló hatása

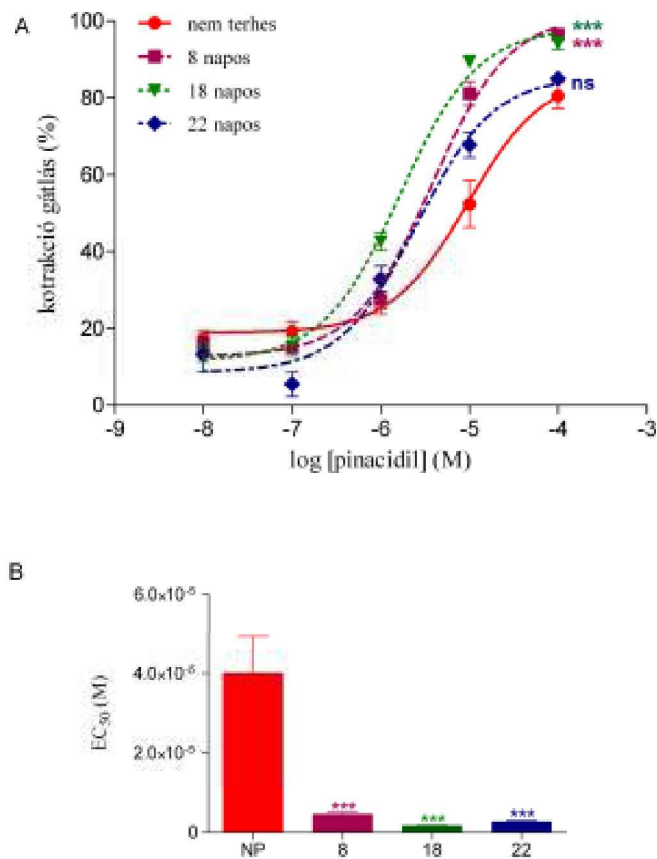
A diazoxid kontrakció gátló hatása a terhesség 6. napján volt a legerősebb (60%), majd a 8. és 18 napon csökkent (40%). Azonban hatástalannak bizonyult a nem terhes valamint a 22 napos terhes uteruszon. A terhesség 6. napján tapasztalt kontrakció gátló hatást 10^{-6} M glibenklamiddal blokkolni tudtuk (6. ábra).



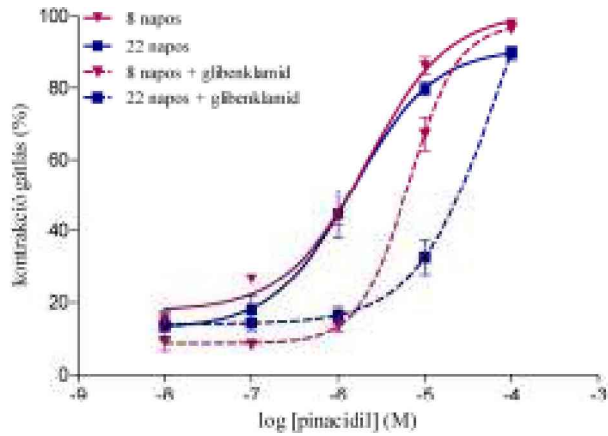
6. ábra: A nem szelektív SUR agonista diazoxid (10^{-8} - 10^{-4} M) kontrakció gátló hatása oxytocin (10^{-6} M) stimulálta kontrakciókra a nem terhes és a terhesség 6., 8., 18., és 22. napján, valamint glibenklamid (10^{-6} M) jelenlétében a terhesség 6. napján. S.E.M: standard error of mean, n = 6

A SUR2 szelektív agonista pinacidil uterusz relaxáló hatása

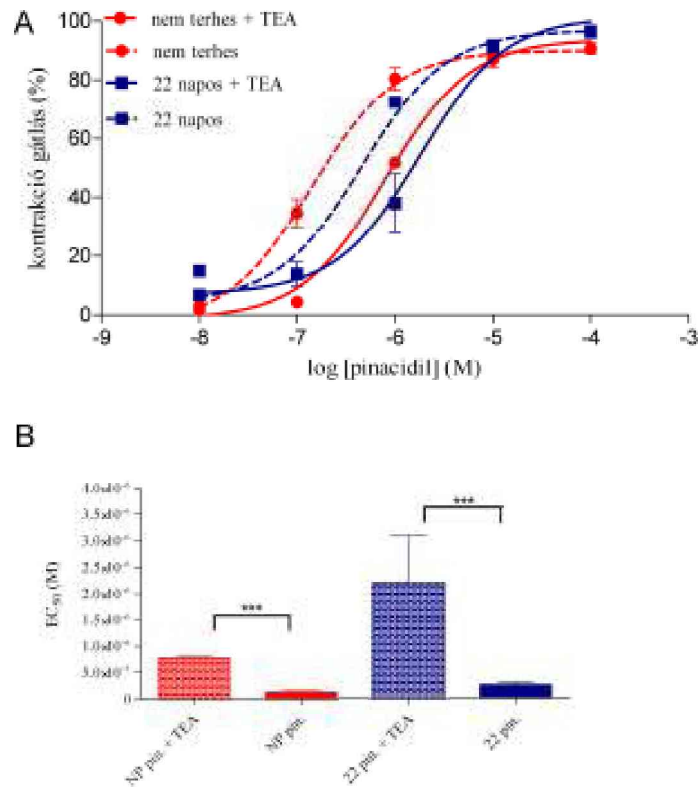
A pinacidil (10^{-8} - 10^{-4} M) dózisfüggően gátolta az oxytocin indukálta kontrakciókat a nem terhes valamint 8, 18 és 22 napon terhes uteruszon. Az EC_{50} értékeket tekintve hatása kifejezettebb volt a terhes uteruszokon a nem terheshez viszonyítva. Azonban az E_{max} értékeket tekintve a terhesség 8. és 18. napján volt a leghatásosabb, míg a 22. napon a nem terheshez hasonló értéket tapasztaltunk (7. ábra). A pinacidil uterusz-relaxáló hatása a terhesség 8. illetve 22. napján blokkolható volt 10^{-6} M glibenklamiddal (8. ábra). Az EFS indukálta kontrakciókat a pinacidil szintén dózisfüggően gátolta, míg 10^{-3} M TEA jelenlétében a dózis-hatás görbék szignifikánsan jobbra tolódtak (9. ábra).



7. ábra (A): A SUR2 szelektív pinacidil (10^{-8} - 10^{-4} M) kontrakció gátló hatása (10^{-6} M) oxytocinnal indukált kontrakciókra a nem terhes, 8, 18 és 22 napos terhes patkány uteruszon. Az E_{max} értékek statisztikai összehasonlítást a nem terhes állapotban kapott értékekhez viszonyítva tüntettük fel; ns: nem szignifikáns, ***: $p < 0.001$. S.E.M: standard error of mean, $n = 6$. **(B):** A pinacidil (10^{-8} - 10^{-4} M) EC_{50} értékei nem terhes (NP), 8, 18 és 22 napos terhes patkány uteruszon. A statisztikai összehasonlítást a nem terhes állapotban kapott értékekhez viszonyítva tüntettük fel. S.E.M: standard error of mean; ***: $p < 0.001$, $n = 6$.



8 ábra: SUR2 szelektív pinacidil (10^{-8} - 10^{-4} M) kontrakció gátló hatása (10^{-6} M) oxytocinnal indukált kontrakciókra 8 és 22 napos terhes patkány uteruszon (10^{-6} M) glibenklamid jelenlétében. S.E.M: standard error of mean, n = 6.



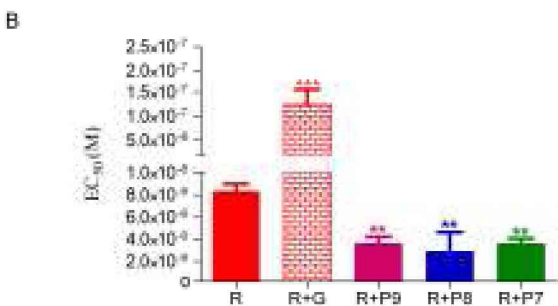
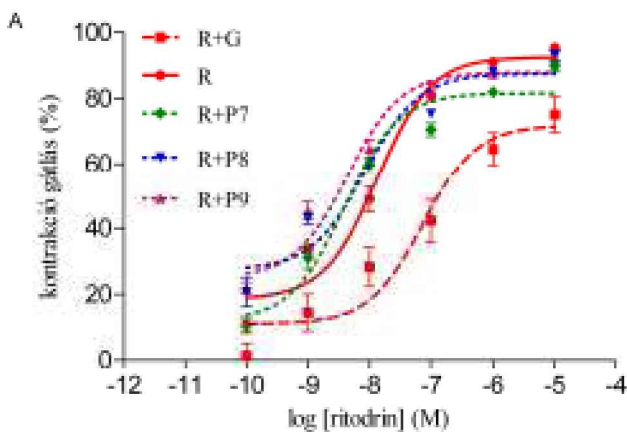
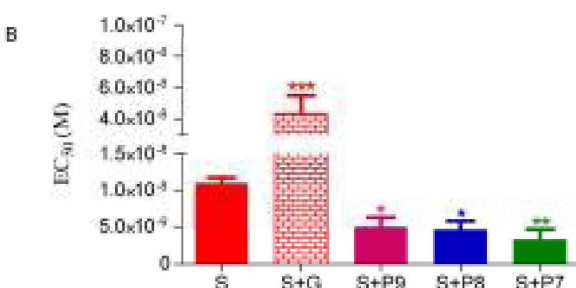
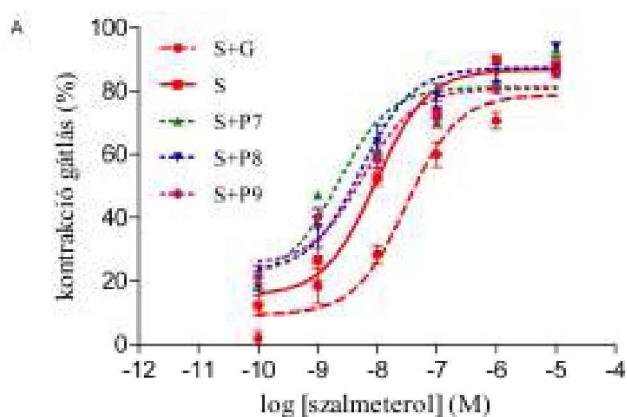
9 ábra (A): A SUR2 szelektív pinacidil (10^{-8} - 10^{-4} M) kontrakció gátló hatása EFS indukált kontrakciókra nem terhes és 22-napos terhes patkány uteruszon (10^{-3} M) tetraetil-ammónium (TEA) jelenlétében. **(B):** A pinacidil (10^{-8} - 10^{-4} M) EC₅₀ értékei önmagában és TEA jelenlétében. A statisztikai összehasonlítást a pinacidil hatásához viszonyítva tüntettük fel. S.E.M: standard error of mean; ***: p<0.001, n = 6.

β_2 -AR agonisták hatása piacidil és glibenklamid jelenlétében 6 napos patkány uteruszon

A β_2 -AR agonista szalmeterol és ritodrin (10^{-10} - 10^{-5} M) uterusz-relaxáló hatását 6 napos patkány uteruszon vizsgáltuk 10^{-6} M glibenklamid valamint különböző dózis piacidil (10^{-9} , 10^{-8} és 10^{-7} M) jelenlétében. Mind a glibenklamid és mind a piacidil is befolyásolta β -mimetikumok hatását a 6 napos patkány uteruszon. A glibenklamid gátolta a β -mimetikumok hatását; a dózis-hatás görbék jobbra tolódtak, valamint az EC_{50} értékek szignifikánsan emelkedtek a K_{ATP} csatorna antagonistá glibenklamid jelenlétében. A K_{ATP} csatorna agonista piacidil szinergista hatást mutatott; a dózis-hatás görbék balra tolódtak, valamint az EC_{50} értékek szignifikánsan csökkentek a jelenlétében (10. és 11. ábra).

β_2 -AR agonisták hatása piacidil és glibenklamid jelenlétében 22 napos patkány uteruszon

A β_2 -AR agonista szalmeterol és ritodrin (10^{-10} - 10^{-5} M) uterusz-relaxáló hatását 22 napos patkány uteruszon is megvizsgáltuk a fentiekkel azonos módon azonban sem a glibenklamid sem a piacidil nem befolyásolta a β -mimetikumok uterusz-relaxáló hatását (12. és 13. ábra).

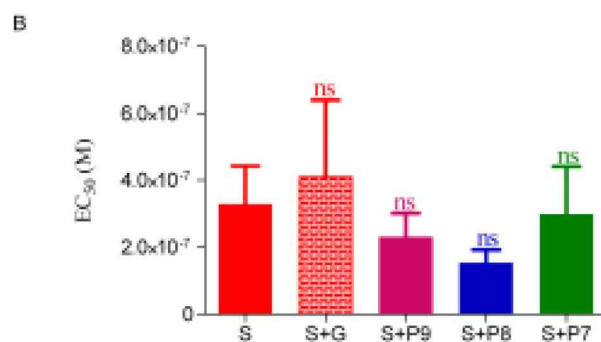
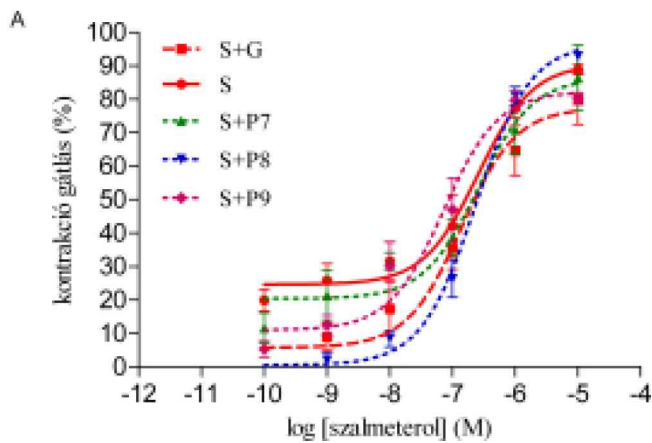


10. ábra (A): A szalmeterol (10^{-10} - 10^{-5} M) uterusz-relaxáló hatása 6 napos patkány uteruszon spontán kontrakciókra önmagában (S), glibenklamid jelenlétében (S+G), valamint különböző dózisu pinacidil jelenlétében (10^{-9} M: S+P9, 10^{-8} M: S+P8 and 10^{-7} M: S+P7).

(B): Az EC₅₀ értékek változása. Az EC₅₀ értékek statisztikai összehasonlítását a szalmeterolhoz viszonyítva tüntettük fel. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ és * $p < 0.05$. S.E.M: standard error of mean; $n = 6$.

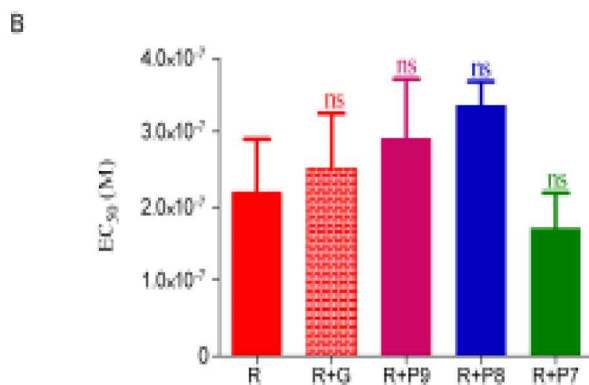
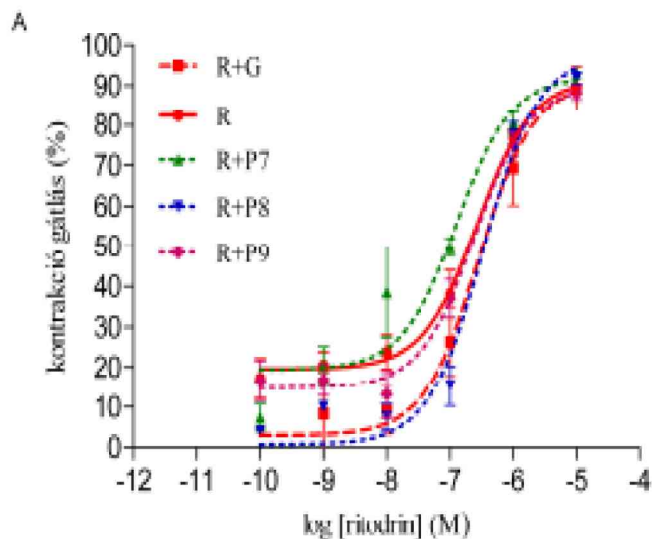
11. ábra (A): A ritodrin (10^{-10} - 10^{-5} M) uterusz-relaxáló hatása 6 napos patkány uteruszon spontán kontrakciókra önmagában (R), glibenklamid jelenlétében (R+G), valamint különböző dózisu pinacidil jelenlétében (10^{-9} M: R+P9, 10^{-8} M: R+P8 and 10^{-7} M: R+P7).

(B): Az EC₅₀ értékek változása. Az EC₅₀ értékek statisztikai összehasonlítását a ritodrinhoz viszonyítva tüntettük fel. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$. S.E.M: standard error of mean; $n = 6$.



12. ábra (A): A szalmeterol (10^{-10} - 10^{-5} M) uterusz-relaxáló hatása 22 napos patkány uteruszon spontán kontrakciókra önmagában (S), glibenklamid jelenlétében (S+G), valamint különböző dózisu pinacidil jelenlétében (10^{-9} M: S+P9, 10^{-8} M: S+P8 and 10^{-7} M: S+P7).

(B): Az EC₅₀ értékek változása. Az EC₅₀ értékek statisztikai összehasonlítását a szalmeterolhoz viszonyítva tüntettük fel. ns: nem szignifikáns. S.E.M: standard error of mean; n = 6.



11. ábra (A): A ritodrin (10^{-10} - 10^{-5} M) uterusz-relaxáló hatása 22 napos patkány uteruszon spontán kontrakciókra önmagában (R), glibenklamid jelenlétében (R+G), valamint különböző dózisu pinacidil jelenlétében (10^{-9} M: R+P9, 10^{-8} M: R+P8 and 10^{-7} M: R+P7).

(B): Az EC₅₀ értékek változása. Az EC₅₀ értékek statisztikai összehasonlítását a ritodrinhoz viszonyítva tüntettük fel. ns: nem szignifikáns. S.E.M: standard error of mean; n = 6.

Az eredmények értékelése, következtetések

A terhesség során végbemenő folyamatok eredményeként az uterus struktúrája drámai változáson megy keresztül. A terhesség végén, a fájástevékenység beindulásáig, a miometrium kontraktilitása enyhén fokozódik, majd szüléskor ugrásszerűen megnő. Az uterusz kontraktilitását szabályzó tényezők alaposabb megismerése molekuláris és celuláris szinten elengedhetetlen új tokolitikumok fejlesztésénél. Mivel a koraszülés incidenciája nem csökkent a kiterjedt kutatások ellenére sem így szükség van újabb hatékonyabb molekulák fejlesztésére, új cél molekulák keresésére, illetve új hatásmechanizmusok megismerésére. Az ABC transzporterek lehetnek az új irányvonalnak egyik fontos szereplői.

Számos ABC transzportert azonosítottak az uteruszban melyek szerepe kevésbé ismert, vannak köztük efflux pumpaként működők, illetve vannak olyanok melyek ion csatornák felépítésében játszanak szerepet. Jelen munkánk célja, hogy jobban megismerjük ezen transzporterek funkcióit.

Ami az efflux transzportereket illeti, az ABCG2 az egyik legintenzívebben vizsgált tagja az ABC transzporternek. Jelentős mennyiségben található reprodukciós szövetekben, mint például uteruszban, prosztatában vagy placentában. Mivel efflux pumpaként működik így jelentősen befolyásolja szubsztrátjai intracelluláris koncentrációját. Számos anyag található az ABCG2 szubsztrát palettáján pl.: antivirális szerek, citosztatikumok, antibiotikumok...stb. A szubsztrátok között megtalálhatók uterusz-relaxáló anyagok is, mint például a nifedipin. A klinikai gyakorlatban a nifedipint alkalmazzák a koraszülés terápiájában. Számos tanulmány számol be arról, hogy a nifedipin mellékhatás profilja jobb, mint más klinikai gyakorlatban elterjedt tokolitikumoknak, a β_2 -AR agonistáknak. Eredményeink szerint az ABCG2 karakterisztikus változást mutat a terhesség folyamán; nem terhes és kora terhes uteruszban alacsony mennyiségben van jelen, majd a 15 napon megemelkedik és a maximumot a 18. napon éri el, majd csökken a terhesség végéig. A patkány uteruszban kapott eredményeink hasonlóak egy másik kutatócsoport (Cyglova és mtsi 2008) munkájával melyben a főtális ABCG2-t határozták meg. Az eredmények alapján elmondható, hogy az uteruszban és fötuszban végbemenő expressziós változások korrelálnak egymással. Így kimondható, hogy a terhesség végén végbemenő ABCG2 expresszió változás, egy speciális barrierként fogható fel mely az uterusz és fötusz(ok) védelmét szolgálja a xenobiotikumoktól. Farmakológiai szempontból a tokolitikumok is egyfajta xenobiotikumnak tekinthetők. Így tehát ha a védelmi mechanizmust ki lehetne kapcsolni úgy a tokolitikumok intracelluláris koncentrációja emelkedhetne mellyel párhuzamosan csökkenne az alkalmazott

dózis és így kedvezőbb lenne mellékhatás profil. Az *in vivo* kontraktilitás vizsgálatok alátámasztották ezen feltevésünket. A nifedipin és a párhuzamosan alkalmazott ABCG2 inhibitor, KO-134 együttes alkalmazása jelentősen növelte a nifedipin uterusz-relaxáló hatását.

Következésképpen elmondható, hogy a jövőben az efflux pumpa inhibitorok és tokolitikumok kombinációja ígéretes lehet. Azonban az efflux pumpa inhibitorok nagy hátránya, hogy nem elég szelektívek, így egy uterusz szelektív efflux pumpa inhibitor kifejlesztése szignifikáns terápiás értékkel bírna a korszülés terápiájában.

Az efflux transzporterek mellett az ion-csatorna regulátor funkcióval bíró ABC transzporterek szerepe is jelentős. A 49 ismert humán ABC transzporterből 3 funkcionál ion-csatorna regulatorként; ABCC7 a Cl csatornáknak, az ABCC8 és az ABCC9 a K_{ATP} csatornák felépítésében játszanak szerepet. A K_{ATP} csatornák felépítésére hetero-oktamer szekezet jellemző; 4 befelé irányuló K^+ csatorna protein ($Kir_{6,x}$) és 4 ion-csatorna regulátor (ABCC8/SUR1 vagy ABCC9/SUR2). A K_{ATP} csatornák összetétele nem egységes, hanem szövetspecifikus felépítés jellemzi; $Kir_{6,2}$ /SUR1 hasnyálmirigy β -sejtjeiben, $Kir_{6,2}$ /SUR2A a szívben, $Kir_{6,1}$ /SUR2B a vaszkuláris simaizomban és $Kir_{6,2}$ /SUR2B a nem vaszkuláris simaizomban. A különböző összetételű K_{ATP} csatornák eltérő farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. Mivel a K_{ATP} csatornák felépítése nem egységes, így elengedhetetlen ismernünk az uterusban lévő K_{ATP} -csatornák felépítését. Korábbi közlemények (Chien és mtsi 1999, Sawada és mtsi 2005) azt igazolták, hogy SUR2B alegység található a patkány uterusban. Curley és mtsi (2002), SUR1 és SUR2 mRNS izoláltak a humán miometriumban. A mi eredményeink azt igazolják, hogy mindkét alegység expresszálódik a patkány uteursban a terhesség folyamán és a SUR1 esetén karakterisztikus változás mutatható ki. Hasonlóan Curley és mtsi (2002) eredményeihez, mi is SUR1 csökkenést tapasztaltunk a terhesség végéhez közeledve. Feltehetően a SUR1 csökkenése az uterus kontraktilitásának fokozódását facilitálhatja. A KCOk (diazoxid és pinacidil) jelentős uterusz-relaxáló hatással bírnak, mely hatás kivédhető glibenklamid adásával. A diazoxid nem szelektív SUR agonistaként míg a pinacidil SUR2 szelektív agonistaként képes hatni a K_{ATP} csatornákon. A diazoxid hatása szoros összefüggést mutat a SUR1 expressziójának változásával, mivel a legerősebb diazoxid hatást akkor találtuk, amikor a SUR1 expresszió legmagasabb volt. Az is megerősítésre került, hogy az extrém magas SUR1 expresszió a terhesség 6. napján nem a vaszkularizációnak betudható, mivel az implantációs és interimplantációs helyeket külön vizsgálva nem tapasztaltunk jelentős különbséget sem SUR1 sem a SUR2 expressziója között. A SUR2 kapcsán nem tapasztunk olyan szintű változást, mint a SUR1 esetén, de a SUR2

szelektív pinacidil meglepően erőteljes uterus-relaxáló hatással bírt a terhesség bármely időszakában. A glibenklamid történi vizsgálatok a 8. illetve a 22. napon sem hoztak választ kérdésünkre, hogy mitől ilyen erős a pinacidil hatása. A glibenklamid blokkoló hatásában különbség mutatkozott a 8. és 22. napon, de ennek az okát magyarázni nem tudjuk. Azonban a TEA-val végzett kísérletek bebizonyították, hogy a pinacidil feltehetően nemcsak a K_{ATP} csatornákon keresztül hat, hanem TEA szenzitív K^+ csatornák is involválva vannak a hatásában. Hasonlóan Bukarica és mtsi (2011) humán artérián kapott eredményeihez, a pinacidil hatása a mi vizsgálataink során is gátolható volt TEA-val. Így feltehetően, a humán artérián, úgy patkány uterusban is a pinacidil K_{ATP} csatornához való szelektivitása megkérdőjelezhető, amint azt mindkét esetben a TEA-val végzett kísérletek bizonyították.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy mindkét SUR alegység kimutatható a patkány uterusban terhesség alatt. A SUR nem szelektív diazoxid uterusz-relaxáló hatása akkor a legerősebb, amikor a SUR1 expressziója a legmagasabb. A SUR1 down-regulációja feltehetően elősegíti az uterusz kontraktilitásának fokozódását a terhesség végéhez közeledve. A SUR2 szelektív pinacidil uterusz-relaxáló hatása a terhesség bármely szakaszában vizsgálva erőteljesnek bizonyult, mely hatásban feltehetően nemcsak K_{ATP} csatornák, hanem TEA szenzitív K^+ csatornák is involválva vannak. Következésképpen, a közeljövőben egy uterus szelektív "pinacidil szerű" K_{ATP} csatorna opener kifejlesztése indokolt lehet, a koraszülés és korai fájástevékenység megakadályozásának terápiájában.

Az elmúlt 20 évben a K^+ csatornákat intenzíven vizsgálták különböző szöveteken. Számos közlemény foglalkozik a K^+ csatornáknak β -AR agonisták simaizom relaxáló hatásában betöltött szerepével patkányban a pulmonáris vazorelaxációban, rekeszizom mikrocirkulációjában, mesenterialis artéria relaxációban, detrusor izom relaxációban és nem terhes borjú uterusz relaxációban. Az eredményeink alapján a kora terhes patkány uteruszban a K^+ csatornák involválva vannak a β_2 -AR agonisták hatásában. Mivel mind a glibenklamid mind a pinacidil csak akkor befolyásolja a szalmeterol és a ritodrin hatását amikor a SUR1 expressziója a legmagasabb. A terhesség végén, amikor alacsony a SUR1 expresszió sem a glibenklamid sem a pinacidil nem volt hatással a β -mimetikumok uterusz-relaxáló hatására. Ez a hatásmechanizmus is magyarázhatja, hogy miért csökken a β_2 -AR agonisták uterusz-relaxáló hatása a terhesség végéhez közeledve.

Mivel a β_2 -AR agonista és K_{ATP} csatorna agonista szinergista hatása a terminusban nem volt kimutatható, így nem várható tehát, hogy a kombináció, mint tokoliticum alkalmazható legyen; azonban koraterhességben, a habituális vetélés terápiájára javasolható a jövőben.

Függelék

Az értekezés alapját képező közlemények:

- I. **N Lovasz**, E Ducza, R Gaspar and G Falkay. Ontogeny of sulfonilurea-binding regulatory subunits of K_{ATP} channels in the pregnant rat myometrium. *Reproduction* 2011;142; 175–181. **IF₂₀₁₁: 3.090**
- II. **Lovász N**, Ducza E, Gáspár R, Falkay Gy. A K_{ATP} csatorna szulfonilurea alegységeinek ontogenezise a terhes patkány miometriumban. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 2010;3; 109-114.
- III. **N Lovasz**, E Ducza, I Zupko , G Falkay. Increase of the Uterus-relaxant Effect of Nifedipine by the Abcg2 Efflux Protein Inhibitor KO134 in the Rat In Vivo. *IN VIVO* 2013; 27; 363-370. **IF₂₀₁₂: 1.219**

Egyéb kivonatok:

- I. **Lovász Norbert**, Minorics Renáta, Gáspár Róbert, Falkay György. Transzportfehérjék (ABCC8 és ABCC9) ontogenezise és a K_{ATP} csatornák szerepe a terhes patkány uterus kontraktilitásának szabályozásában. XIV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus; Budapest, 2009. november 13-15 (Poster).
- II. George Falkay, **Norbert Lovasz**, Eszter Ducza, Robert Gaspar. Variable expression of ABCC8 and ABCC9 transporters in the pregnant rat myometrium: the influence of gestation age. 16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology, 17-23 July 2010, Copenhagen, Denmark (Poster).
- III. **Lovász Norbert**, Ducza Eszter, Gáspár Róbert. ATP-szenzitív K-csatorna szulafanilurea alegységeinek (SUR1, SUR2) ontogenezise a terhes patkány uterusban. A Magyar Tudomány Ünnepe, Szeged, 2010. November 17 (Presentation).

- IV. Norbert Lovasz, Eszter Ducza, Istvan Zupko, George Falkay.** Increased tocolytic effect of nifedipine by ABCG2 efflux protein inhibitor KO-134 in rat in vivo. Pharmaceutical Sciences for the Future of Medicines. 3rd PharmSciFair, Prague, 14-17 June, 2011 (Poster).
- V. Lovász Norbert, Ducza Eszter, Gáspár Róbert.** A KATP- transzporter fehérjék szerepe a terhes uterusz farmakológiai reaktivitásában. XVIII. Szent-Györgyi Napok, Szeged, 2011. November 14-19 (Presentation).
- VI. George Falkay, Norbert Lovasz, Eszter Ducza, Istvan Zupko.** Increased tocolytic effect of nifedipine by ABCG2 efflux protein inhibitor KO-134 in rat in vivo. 14th World Congress on Human Reproduction Melbourne, 30 November–3 December, 2011 (Poster).
- VII. George Falkay, Eszter Ducza, Andrea Koncz, Norbert Lovasz.** Role of K_{ATP} channel in the tocolytic effect of β_2 -adrenoceptor agonist terbutaline in rat myometrium, *in vitro*. 6th European Congress of Pharmacology, Granada, 17-20 July, 2012 (Poster).
- VIII. Norbert Lovasz, Andrea Koncz, Eszter Ducza and George Falkay.** KATP channels are involved in the tocolytic effect of β_2 agonists in pregnant rat. Society for Endocrinology BES 2013 Harrogate 18 March- 21 March 2013 (Poster).