

Szegedi Tudományegyetem

Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet



**AZ AQUAPORINOK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA AZ UTERUS
KONTRAKCIÓK SZABÁLYOZÁSÁBAN ÉS A KORASZÜLÉS
MEGELŐZÉSÉBEN**

Ph.D. tézis összefoglaló

Kemény Kata Kira

Témavezető:

Ducza Eszter Ph.D.

2025

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszerhatástan, biofarmácia és klinikai gyógyszerészet Ph.D. program

Programvezető: Prof. Dr. Zupkó István

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Témavezető: Dr. Ducza Eszter

dr. Kemény Kata Kira

**Az aquaporinok szerepének vizsgálata az uterus kontrakciók szabályozásában és a
korszülés megelőzésében**

Komplex vizsga Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Szatmári István

Tagok:

Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna

Dr. Sztojkov-Ivanov Anita

Bíráló bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Ambrus Rita

Opponensek:

Dr. Szőke Éva

Dr. Orosz Andrea

Tagok: Dr. Katona Gábor

Dr. Szűcs Kálmán

1. BEVEZETÉS

Az aquaporinok (AQP) kis integrált membránfehérjék, amelyek a biológiai membránokon keresztüli vízszállításért felelősek és kulcsfontosságúak a sejtek túlélésében és az anyagcsere folyamatokban. Működésük szabályozható genetikai módosítással, foszforilációval és különböző környezeti tényezők, mint például a pH-érték, a hőmérséklet, vagy az oldott anyagok koncentrációjának változtatásával. Az AQP-ok széles körben elterjedtek a szervezetben, kulcsszerepet játszva a víz homeosztázisának fenntartásában. Tizenegy AQP izoformát azonosítottak napjainkig az emlős reproduktív rendszerben. Nőkben az AQP-ok szabályozzák a magzatvíz áramlását, a méhlepény működését, a myometrium összehúzódásait és a méhnyak érését. A reproduktív rendszer vízháztartásának AQP-okon keresztüli egyensúlya elengedhetetlen az egészséges terhességhez és szüléshez.

Az AQP5 a klasszikus aquaporinok családjába tartozik, szelektíven vizet szállít, de elősegítheti kismolekulák, mint például a H_2O_2 és a CO_2 áthaladását is a membránokon. Széles körben expresszálódik szekréciós szövetekben, belső szervekben, reproduktív szövetekben és neurológiai struktúrákban is. A reproduktív rendszerben az AQP5 jelen van a terhes méhben, ahol a terhesség alatt dinamikusan változik az expressziója. Ezt a változást a progeszteronszint ingadozása erősen befolyásolja. Az AQP5 expresszió változásai a terhes méhszövetben korrelálnak a méhműködéssel és a szülés megindulásának kezdetével.

Koraszülésként a betöltött 37. terhességi hét előtt történő szülést definiáljuk. A koraszülés a csecsemőkori mortalitás és morbiditások egyik vezető oka. A klinikumban jelenleg olyan tokolitikumokat alkalmaznak a koraszülés kezelésére, mint például a β -mimetikumok, COX-gátlók, kalciumcsatorna-blokkolók, magnézium-szulfát és oxitocin receptor-antagonisták. Ezek a kezelések azonban csak rövid ideig képesek késleltetni a szülést, illetve sok mellékhatással járhatnak, ami indokolja az új terápiás lehetőségek feltérképezésének szükségességét. Az AQP-ok, különösen az AQP5, ígéretes célpontok lehetnek az uterus simaizom-aktivitásának és a szülés megindulásának szabályozásában.

A tranziens receptor potenciál (TRP) csatornacsalád nem szelektív kalcium-permeábilis fehérjékből áll, amelyek különböző ingerek molekuláris szenzoraként működnek. A TRPV (vanilloid) alcsalád hat tagot foglal magában (TRPV1-6), amelyek közül a TRPV4 döntő szerepet játszik az ozmotikus szabályozásban és a mechanoszenzoros érzékelésben. A TRPV4 széles körben expresszálódik a simaizomsejtekben, beleértve a méhet is, ahol hozzájárul a kalcium-homeosztázishoz és a kontraktilitás szabályozásához.

Az AQP és a TRPV4 csatornák több fiziológiai rendszerben, többek között az agyban, a vesékben és a légzőrendszerben is kölcsönhatásba lépnek. A reprodukív rendszerben az AQP5 és a TRPV4 inverz expressziós mintázatot mutat a terhesség alatt, amelyet a progeszteron szabályoz. Az AQP5 expressziója progeszteron hatására nő, míg a TRPV4 expressziója csökken. A szüléshez közeledve a progeszteronszint csökken, ami fokozott TRPV4-expresszióhoz és kalcium-beáramláshoz vezet, ez pedig hozzájárulhat a méhösszehúzódnásokhoz. Ez a kölcsönhatás arra utal, hogy az AQP5-TRPV4 kölcsönhatás célzott kezelése új terápiás megközelítést jelenthet a koraszülés megelőzésére.

2. CÉLOK

A kutatás fő célja az AQP5 méhösszehúzódnásokban betöltött szerepének vizsgálata és ezáltal a korszülés folyamatában betöltött szerepének meghatározása. Vizsgálataink célja (I.) az ozmotikus útvonal, azon belül az AQP5 és a TRPV4-csatornák együttműködésének vizsgálata volt a patkány méhben, a természetes TRPV4 antagonist citrál segítségével *in vitro* és *in vivo* kísérletekben egyaránt. Továbbá bizonyítani szeretnénk volna (II.) az AQP5 fiziológiás szerepét a szülésben, az uterus kontrakciókra gyakorolt hatására összpontosítva siRNS állatmodell segítségével. Következő célunk (III.) a receptor-közvetített útvonal feltárása volt az AQP5 és az adrenerg rendszer közötti kölcsönhatás vizsgálatával, terbutalin, doxazozin és HgCl₂ kezelés segítségével. Végezetül (IV.) megvizsgáltuk az AQP5 expressziós mintázatát humán uterus-, placenta- és plazmamintákban a terhesség különböző szakaszaiban, valamint az elhízáshoz kapcsolódó terhességi szövődményekben való lehetséges részvételét.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. ÁLLATKÍSÉRLETEK

A Sprague-Dawley patkányokat ellenőrzött körülmények között tartottuk (22 ± 3 °C, 30-70% páratartalom, 12/12 órás világos/sötét ciklus). Standard rágcsálótápot és vizet *ad libitum* kaptak. Az állatokon végzett kísérleteket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács jóváhagyásával végeztünk (nyilvántartási szám: IV/2767/2020). Az ivarérett patkányokat időzített kapuval ellátott ketrecekben pároztattuk. Hüvelykenetek vételével állapítottuk meg a vemhességet.

3.1.1. *In vivo* vizsgálatok

Citrál kezelés és koraszülés modell: A patkányokat öt csoportra osztottuk: kontroll, vivőanyag-kontroll (olívaolaj, *per os*), citrál (240 mg/kg, *per os*), LPS (50 µg, *i.p.*) és LPS+citrál. A koraszülés megindulását a mobilitás, a fészeképítés és a hüvelyi vérzés alapján határoztuk meg. *siRNS kezelés:* Az állatokat a vemhesség 21. napján kezeltük AQP5 siRNS-sel (1 mg/kg, *i.p.*), meghatároztuk az ellés idejét, és megmértük az AQP5 expresszió változásait.

Terbutalin és doxazozin kezelés: A patkányokat terbutalinnal (10 mg/kg, s.c.) és doxazozinnal (5 mg/kg, *per os*) kezeltük, majd a kezelés után 30, 60 és 90 perccel gyűjtöttünk méhszöveteket.

3.1.2. *In vitro* vizsgálatok

A 22 napos vemhes patkányok uterus szöveteit eltávolítottuk, és izolált szervfürdőbe helyeztük. Ezt követően a KCl-oldattal kiváltott myometriális kontrakciókat mértük, és értékeltük a citrál, az siRNS és a HgCl₂ kezelések hatását.

3.2. HUMÁN VIZSGÁLATOK

Mintagyűjtés: A Szegedi Tudományegyetemen elektív császármetszéssel átesett normális és elhízott (BMI > 30 kg/m²) terhes nők kerültek felvételre. Befogadási kritériumok: magzati kockázattal járó egyes, tehát nem ikerterhességek. A humán vizsgálati protokollt a Szegedi Tudományegyetem Klinikai Kutatásietikai Bizottsága hagyta jóvá (Ref. sz. 57/2020-SZTE). A vizsgálatot a Helsinki Nyilatkozat elvei szerint végeztük. Minden résztvevő teljeskörű tájékoztatást követően írásbeli beleegyezést adott. Uterus, placenta és vérmintákat gyűjtöttünk.

3.3. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK

RT-PCR vizsgálatok: A totál RNS-t patkány és humán uterus szövetekből a Chomczynski és Sacchi által leírt guanidinium-tiocianát-fenol-kloroform extrakciós eljárással nyertük ki. Az AQP5 és a TRPV4 génexpressziójának elemzésére valós idejű, RT-PCR-t alkalmaztunk. A PCR technológia kivitelezéséhez ABI StepOne Real-Time készüléket használtunk, reakcióelegyként pedig a TaqMan RNA-to-C_T-Step One Kit szolgált. Minden minta mRNS tartalmának meghatározását háromszor ismételtük meg. Az áttörési ciklusszám a fluoreszcens jel alapján C_T-ként lett definiálva.

Western Blot analízis: A fehérjemintákat homogenizáltuk, 50 µg fehérje mintát használtunk az elektroforézishez 4-12%-os NuPAGE Bis-Tris gélen XCell SureLock Mini-Cell Units készülékben. A fehérjéket a gélekről nitrocellulóz membránra transzformáltuk iBlot Gel Transfer System segítségével. A membránokat AQP5, TRPV4 és β-aktin elsődleges poliklonális antitesttel (1:200) egy éjszakát inkubáltuk blokkoló oldatban. Az antitestek kötődését Western Breeze® Chromogenic immunodetection kit segítségével detektáltuk.

ELISA vizsgálatok: Az AQP5 koncentrációt humán plazmában és a CREB szinteket patkány uterus szövetmintákban ELISA kitekkel mértük. A vérmintákat EDTA-val bevont polietilén csövekbe gyűjtöttük, 1500 g-vel centrifugáltuk 10 percig 5 °C-on, ezután pedig -80 °C-on tároltuk későbbi elemzés céljából. A humán plazma AQP5 koncentrációját és a CREB koncentrációt a patkány uterus szövetben ELISA kitek segítségével a gyártó utasításait követve

mértük meg. Az optikai denzitás értékeket SPECTROStar Nano mikroplate spektrofotométerrel állapítottuk meg 450 nm-en.

3.4. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adatokat a Prism 10.2.1 szoftver (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) segítségével elemeztük. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszt (Dunnett's post hoc teszttel) vagy párosítatlan t-próba segítségével határoztuk meg, és az eredményeket átlag $\pm$ az átlag standard hibája (SEM) formájában mutattuk be. A szignifikancia szintje $p < 0,05$ volt.

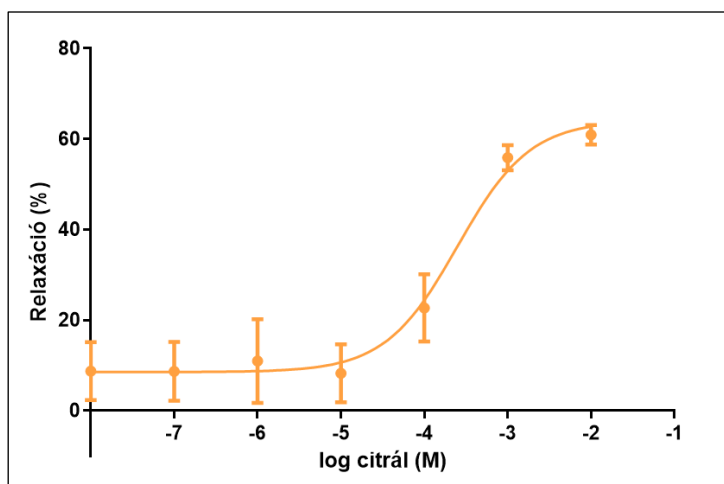
4. EREDMÉNYEK

4.1. AZ ÁLLATKÍSÉRLETEK EREDMÉNYEI

4.1.1. Citrál kezelés

4.1.1.1. Kontraktilitási vizsgálatok

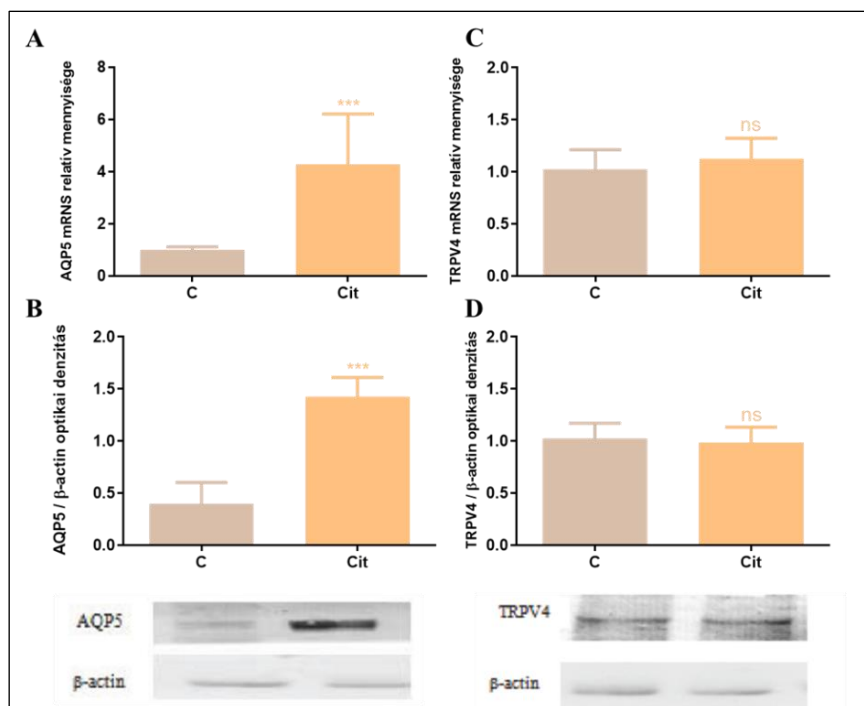
A KCl által indukált kontrakciós választ a citrál kezelés (10^{-8} – 10^{-2} M) dózis függően gátolta a 22 napos vemhes patkány uterusban (**1. ábra**). A relaxáló hatás alacsonyabb koncentrációban (10^{-8} – 10^{-5} M) kevésbé volt szignifikáns, mint a magasabb koncentrációknál (10^{-4} – 10^{-2} M), ahol meredeken nőtt. A citrál maximális relaxáló hatása $62,9\% \pm 2,5$ volt, míg az EC_{50} érték $2.16 \times 10^{-4} \pm 6.07 \times 10^{-5}$ M volt.



1. ábra. A citrál kezelés (10^{-8} – 10^{-2} M) *in vitro* kumulatív koncentráció-válasz görbéje 22 napos vemhes patkány uterusban. A kontrakció változását a görbe alatti terület (AUC) módszerrel határoztuk meg, és a KCl által kiváltott kontrollkontrakciók AUC-jával összehasonlítva $\% \pm$ S.E.M. értékben fejeztük ki. $n = 6$.

4.1.1.2. Molekuláris biológiai vizsgálatok

A 22 napos terhes uterusok *in vitro* citrál kezelését ($10 \mu\text{M}$ 2 órán keresztül) követően az AQP5 mRNS és fehérje expressziója szignifikánsan megnőtt a kontrollhoz képest (**2. ábra A, B**). A TRPV4 expressziójának változása azonban nem volt szignifikáns (**2. ábra C, D**).

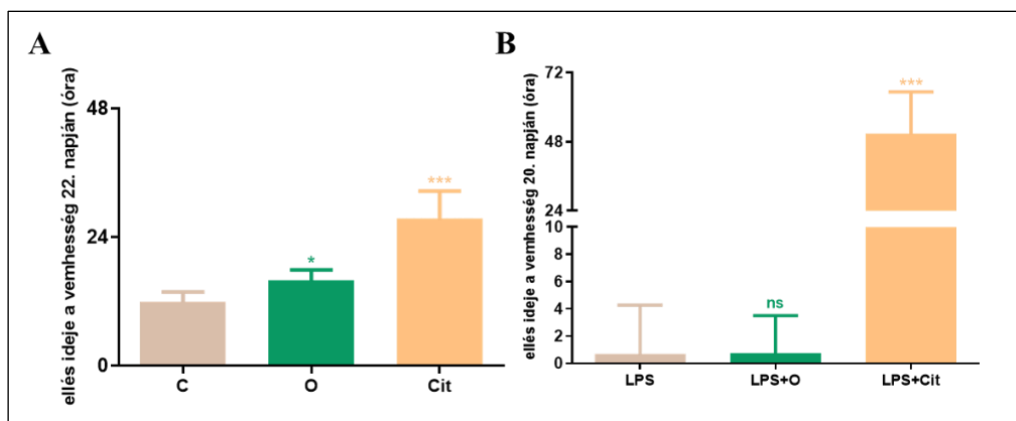


2. ábra. Az AQP5 mRNS (A) és fehérje (B, 35 kDa), valamint a TRPV4 mRNS (C) és fehérje (D, 105 kDa) expressziójának változása 22 napos vemhes patkány uterusban citrál kezelést követően, *in vitro*. β -aktint (43 kDa) használtunk endogén kontrollként. C: kontroll uterus, Cit: citrállal kezelt uterus, ns > 0,05; *** p < 0,001; a kontroll uterus mintához hasonlítva. n = 6.

4.1.1.3. A vemhesség hosszának *in vivo* vizsgálata

A kontroll patkányoknál az ellés időpontja általában a 22. vemhességi nap reggelére esett ($t = 11,9 \pm 0,5$ óra). A vemhességi időszak hossza szignifikánsan megnőtt (a 22. napi átlagos ellési idő: $15,9 \pm 0,9$ h) a vivőanyaggal (olívaolajjal) történő kezelést követően. A citrál kezelést követően a vemhességi időszak tovább hosszabbodott ($t = 28,6 \pm 2,3$ h) normál vemhességhez viszonyítva (**3. ábra A**). A vizsgálatok során egyik csoportban sem tapasztaltunk adverz hatásokat.

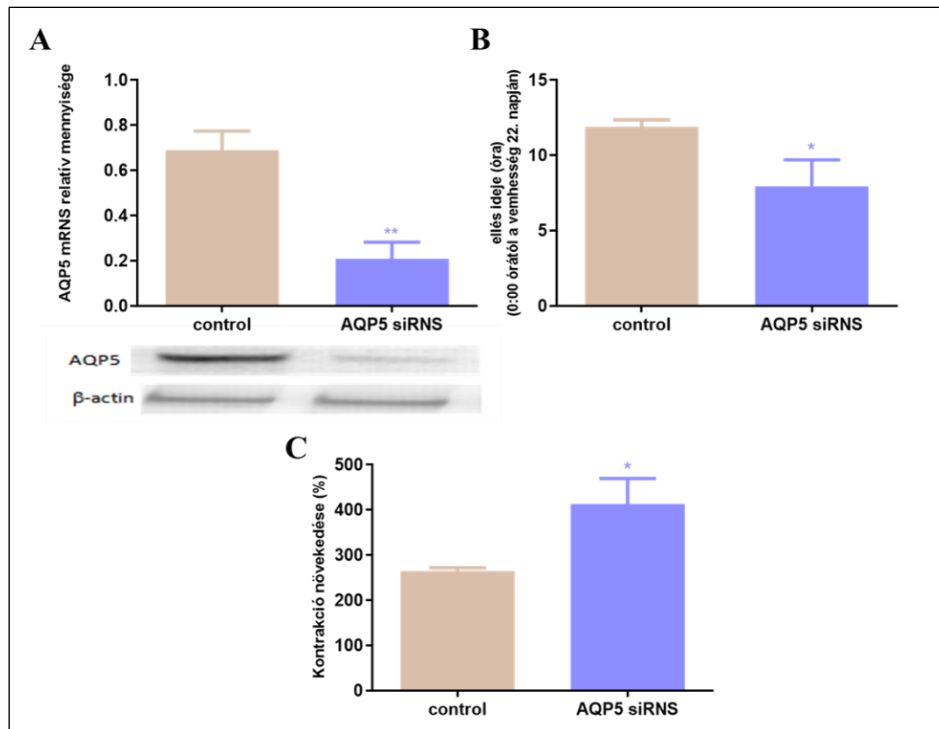
A gyulladás által indukált koraszülés modellben (LPS-kezelés) az ellés időpontja a vemhesség 20. napjának éjszakájára esett ($t = 0,8 \pm 1,5$ óra). Az LPS-kezelt állatokban az ellés időpontjában ($t = 1,6 \pm 1,0$ h) a vivőanyag-kontroll kezelést követően nem észleltünk szignifikáns változásokat. A citrál kezelés szignifikánsan hosszabb vemhességi időt eredményezett az LPS-kezelt patkánycsoportban, az ellés időpontja a vemhesség 22. napjának hajnalára tolódott ki ($t = 54 \pm 5,5$ h) (**3. ábra B**).



3. ábra. A normál vemhesség (A) és a bakteriális lipopoliszacharid (LPS) által indukált koraszülés (B) ellési idejének változásai. C: kontroll, O: olívaolajjal kezelt, Cit: citrállal kezelt, LPS + O: lipopoliszachariddal és olívaolajjal, LPS + Cit: lipopoliszachariddal és citrállal kezelt állatok. ns > 0,05, * p < 0,05, *** p < 0,001; a kontroll vagy LPS-sel kezelt állatokhoz képest. n = 6-8; kontroll n = 16

4.1.2. siRNS-sel történő vizsgálatok

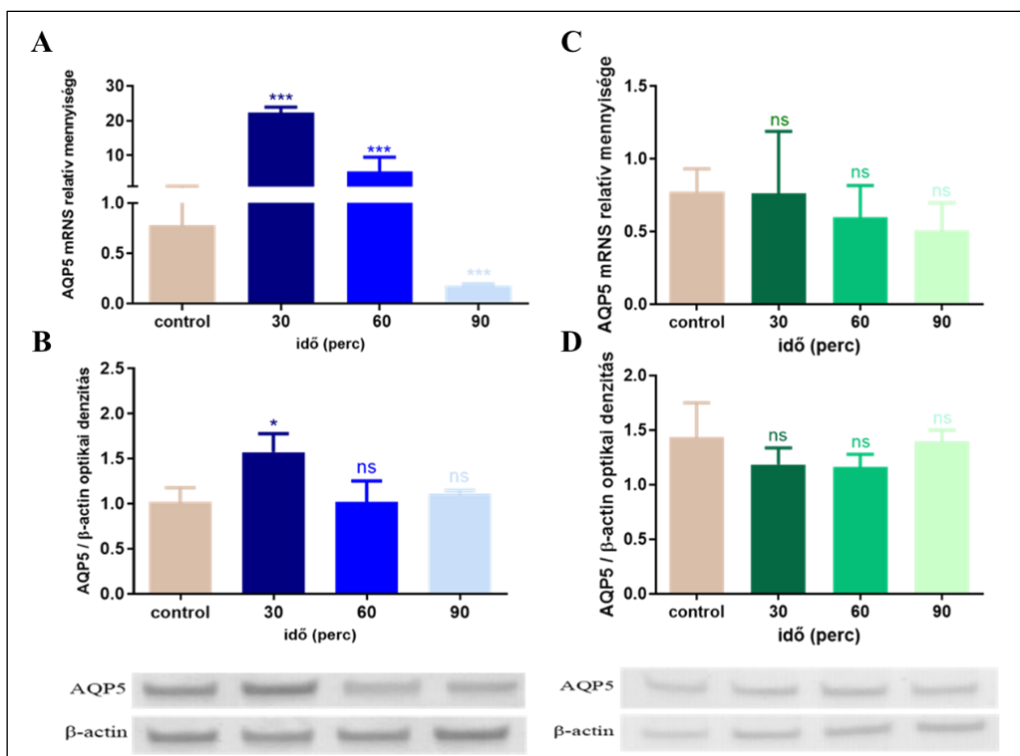
Az siRNS kezelés szignifikánsan csökkentette az AQP5 mRNS és fehérje expresszióját a kontroll csoporthoz képest (**4. ábra A**), amely azt mutatja, hogy a kezelés hatására az AQP5 csatornák down-regulációja következett be a vemhes patkány uterusban. A kontroll állatok fiziológiás sóoldatot kaptak, és a vemhesség 22. napjának reggelén ellettek ($11,88 \pm 0,4848$ óra), ezzel szemben az AQP5 siRNS-sel kezelt csoportban az állatok vemhességi ideje rövidebb volt ($7,95 \pm 1,758$ óra), szignifikánsan korábban ellettek, mint a kontroll vemhes patkányok (**4. ábra B**). A patkányok AQP5 siRNS-sel történő kezelése jelentősen megnövelte (különbség: $148,2 \pm 57,56$ %) a KCl által kiváltott *in vitro* méhösszehúzóásokat a kontroll állatokhoz képest (**4. ábra C**).



4. ábra. Az siRNA-kezelés hatásai. Az AQP5 mRNA és fehérje expressziójának változása (**A**), az ellés ideje (**B**) és az *in vitro* uterus kontrakciók (**C**) a kontroll és az AQP5 siRNA-sel kezelt patkány uterusban. * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest. $n = 6$

4.1.3. Terbutalin és doxazozin kezelés

30 és 60 perccel a terbutalin beadását követően az AQP5 expressziója szignifikánsan megnőtt a vemhes patkány uterusban, és szignifikánsan csökkent a 90. percben vett uterus mintákban (5. ábra A). Az AQP5 fehérje expressziójának változásai követték az mRNA expresszió változásait, és 30 perccel a beadást követően tetőztek (5. ábra B). A doxazozin beadását követően nem volt szignifikáns változás az AQP5 mRNA és fehérje expressziójában (5. ábra C, D).

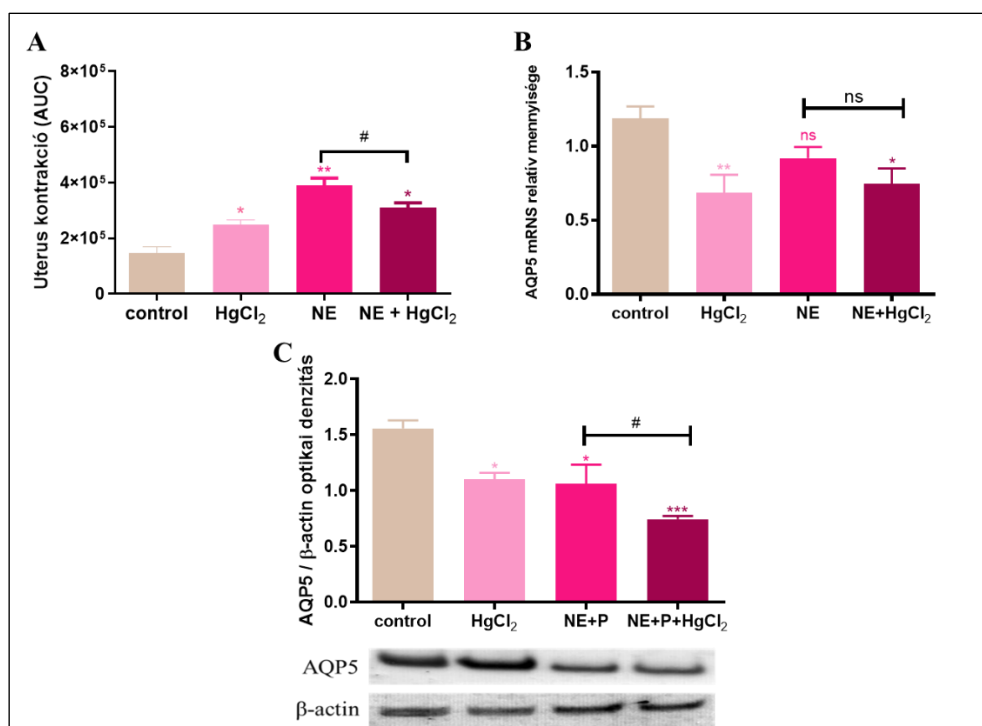


5. ábra. Az AQP5 mRNS (A) és fehérje expressziójának változása terbutalin (B) és doxazozin kezelés (C, D) után a vemhes patkány uterusban. ns > 0,05; *p < 0,05, ***p < 0,001; a kontroll uterus mintákhoz képest. n = 8

4.1.4. HgCl₂ vizsgálatok

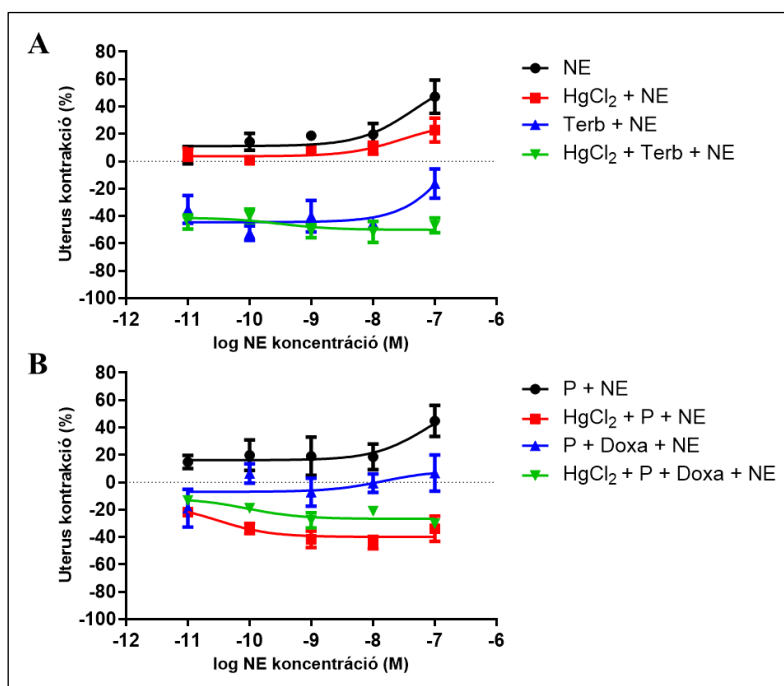
A 22 napos vemhes patkány uterusok *in vitro* izolált szervfürdő vizsgálatában a HgCl₂ kezelés növelte az uterus kontrakciók aktivitását, amit a spontán összehúzódások megnövekedett AUC (görbe alatti terület) értékei alapján mértünk. A másik csoportban a HgCl₂ kezelést követően a noradrenalin (NE) által kiváltott összehúzódások drámaian csökkentek (**6. ábra A**).

A HgCl₂-dal kezelt csoportokban az AQP5 mRNS expressziója jelentősen csökkent a kontrollcsoportokhoz képest (**6. ábra B**). A HgCl₂ szignifikánsan csökkentette a fehérje expresszióját NE jelenlétében az NE-vel kezelt kontrollcsoportban lévő uterusokhoz képest (**6. ábra C**).



6. ábra. Az uterus simaizom összehúzódásának (A), az AQP5 mRNA (B) és a fehérje expressziójának (C) görbe alatti terület (AUC) értékeinek változása a spontán és NE-indukált méhösszehúzódásokban a HgCl₂ kezelés előtt és után. ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest. # $p < 0,05$ az NE-vel kezelt uterusához képest.

Az NE koncentrációfüggő uterus kontrakciót váltott ki, amelyet a HgCl₂ kezelés csökkentett. Terbutalin jelenlétében az NE koncentráció-válasz görbéje lefelé tolódott, ez a relaxáló hatás koncentrációfüggő csökkenését jelentette. A HgCl₂ kezelés megszüntette az NE relaxáló hatásának ezt a koncentrációfüggését terbutalin jelenlétében (7. ábra A). A propranolol nem módosította az NE uterus kontrakciót serkentő hatását, de a doxazozin lefelé tolta azt. Propranolol jelenlétében a HgCl₂ kezelés az NE hatását relaxációra fordította, ami doxazozin jelenlétében nem változott (7. ábra B).



7. ábra. A noradrenalin (NE, 10^{-11} – 10^{-7} M) dózisfüggő hatása a terhes uterus kontrakciókra (22. nap) önmagában vagy HgCl_2 , terbutalin (Terb) 10^{-7} M, propranolol (P) és doxazozin (Doxa) 10^{-7} M kombinációban.

Substance	EC ₅₀ (M)	E _{max} (%)
NE	$4.4 \pm 1.1 \times 10^{-8}$	62.9 ± 11.1
NE+T	$4.9 \pm 1.4 \times 10^{-7}$ *	63.0 ± 9.7
NE+ HgCl_2	$2.8 \pm 0.7 \times 10^{-8}$	28.1 ± 6.4 **
NE+ HgCl_2 +T	$3.1 \pm 1.8 \times 10^{-10}$ ***	-50.8 ± 8.3 ***

1. táblázat. A noradrenalin EC₅₀ és E_{max} értékek változása HgCl_2 kezelés nélkül vagy azt követően terbutalin jelenlétében vagy önmagában. NE: noradrenalin (10^{-11} - 10^{-7} M), T: terbutalin (10^{-7} M), EC₅₀: fél maximális hatékony koncentráció, E_{max}: maximális kontrakciós hatás (a negatív előjel relaxációt jelent), *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

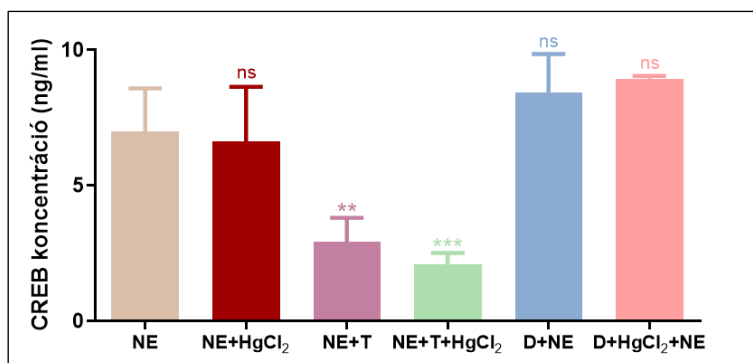
Substance	EC ₅₀ (M)	E _{max} (%)
NE+P	$7.5 \pm 1.9 \times 10^{-8}$	63.0 ± 15.6
NE+P+Doxa	$1.5 \pm 0.6 \times 10^{-8}$ *	8.6 ± 3.1 **
NE+P+ HgCl_2	$3.0 \pm 1.2 \times 10^{-11}$ ***	-40.0 ± 8.1 ***
NE+P+ HgCl_2 +Doxa	$9.1 \pm 2.7 \times 10^{-11}$ ***	-26.7 ± 9.5 ***

2. táblázat. A noradrenalin EC₅₀ és E_{max} értékek változása HgCl_2 kezelés nélkül vagy azt követően propranolol vagy propranolol-doxazozin kombináció jelenlétében. NE: noradrenalin (10^{-11} - 10^{-7} M), P: propranolol (10^{-7} M), Doxa: doxazozin (10^{-7} M), EC₅₀: fél maximális hatékony koncentráció, E_{max}: maximális kontrakció hatás (a negatív előjel relaxációt jelent), p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

4.1.5. CREB-esszé

Megvizsgáltuk a cAMP-reszponzív elem-kötő fehérje (CREB) szintjét az uterusban, amelyet *in vitro* kezeltünk noradrenalin (NE), HgCl_2 , terbutalin és doxazozin különböző kombinációival.

A HgCl_2 kezelés nem okozott változást a CREB szintjében a NE-vel kezelt uterusban, azonban a β_2 -receptor agonista terbutalin, szignifikánsan csökkentette a CREB fehérjeszintjét NE-kezelést követően, amit a HgCl_2 tovább fokozott. Ezzel szemben az α_1 -antagonista doxazozin nem okozott szignifikáns változást a CREB fehérjeszintjében sem HgCl_2 -dal, sem anélkül (8. ábra).



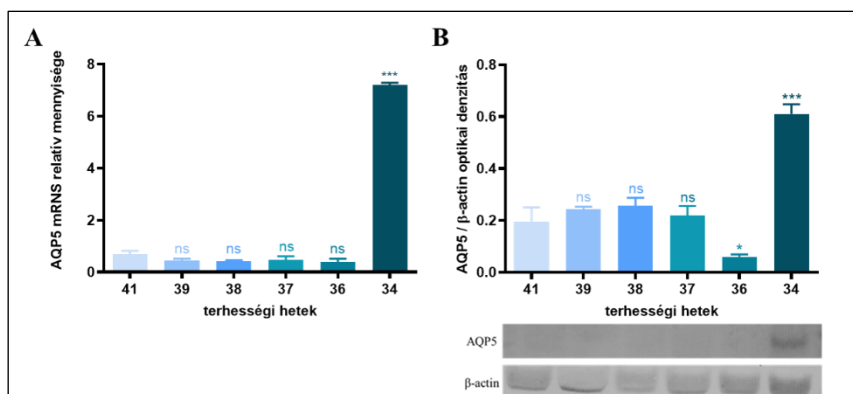
8. ábra. A cAMP-reszponzív elem-kötő fehérje (CREB) koncentrációjának változása HgCl_2 , terbutalin (T) és doxazozin (D) kezelés után noradrenalin (NE) által kiváltott kontrakciós mintákban. ns $p > 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ az NE-vel kezelt uterus mintákhoz képest.

4.2. A HUMÁN VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

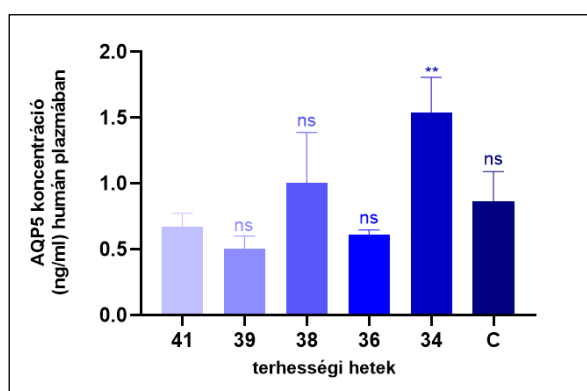
4.2.1. Az AQP5 expressziójának változása a méhben és a plazmában

Megvizsgáltuk az AQP5 mRNS és fehérje expressziójának változásait a humán uterusban különböző terhességi hetekben. Azt találtuk, hogy mind az AQP5 mRNS-, mind a fehérjeexpressziója jelentősen megnőtt a 34. héten a 41. terhességi héthez képest (9. ábra A). Míg a normál terhességi hetekben (36-41. terhességi hét) az AQP5 expressziója nem változott jelentősen, csak a fehérje expressziója csökkent a 36. terhességi héten (9. ábra B).

A terhesség 34. hetéből származó plazmamintákban az AQP5 koncentrációja jelentős növekedését mutatott a nem terhes kontroll és a normál terhesség többi hetéből származó mintákhoz képest képest (10. ábra).



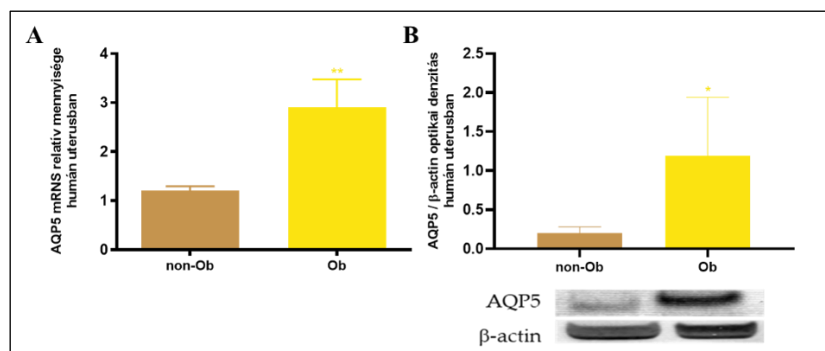
9. ábra. Az AQP5 mRNS (A) és fehérje (B) expressziójának változása a normál terhesség különböző heteiben humán uterus mintákban. ns $p > 0,05$, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ a terhesség 41. hetéhez képest.



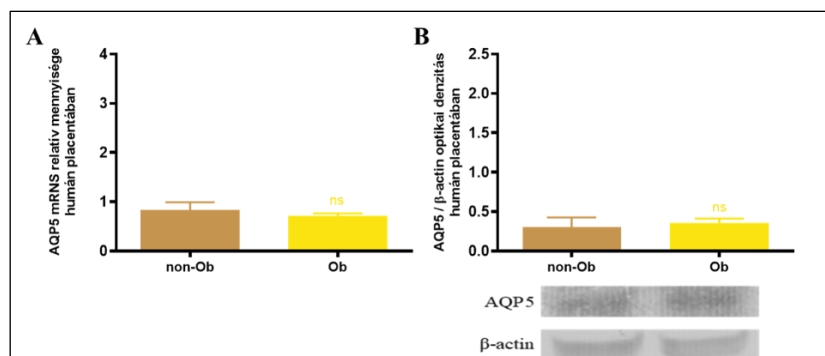
10. ábra. AQP5 koncentráció a különböző terhességi hetekben normál terhes és nem terhes (C) humán plazmamintákban. ns: $p > 0,05$, ** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest.

4.2.2. Az AQP5 expressziójának változása elhízott terhes nőkben

Az elhízott anyák méhében az AQP5 mRNS és fehérje expressziója szignifikánsan megnőtt (11. ábra) a normál súlyú anyákéhoz (kontroll) képest. Az elhízott anyák placenta szöveteinek a kontrolléval való összehasonlításakor az AQP5 mRNS és fehérje expressziójában nem tapasztaltunk változást (12. ábra).



11. ábra. Az AQP5 mRNS (A) és fehérje (B) expressziójának változása normál súlyú (non-Ob) és elhízott (Ob) anyák méhében a terhesség harmadik trimeszterében; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest.



12. ábra. Az AQP5 mRNS (A) és fehérje (B) expressziójának változása a terhesség harmadik trimeszterében elhízott (Ob) és nem elhízott (non-Ob) anyákból gyűjtött placenta szövetmintákban; ns $p > 0,05$ a nem elhízott anyákhoz képest.

5. DISZKUSSZIÓ

A koraszülés (KSz) továbbra is egy kritikus globális probléma, a csecsemőkori morbiditás és mortalitás vezető oka. Tekintettel a KSz többtényezős okaira, a hatékony megelőzési stratégiák meghatározása kihívást jelent. A KSz patomechanizmusának interdiszciplináris kutatása, beleértve az AQP5 csatorna uterus kontrakciókban betöltött szerepének megértését, a tokolízis lehetséges terápiás célpontjaihoz vezethet.

5.1. ÁLLATKÍSÉRLETES EREDMÉNYEK

A kutatócsoport korábbi munkái inverz korrelációt mutattak ki az AQP5 expresszió és az uterus kontrakciók között. Bebizonyítottuk, hogy az ozmotikus útvonal az egyik kulcsmechanizmus, ahol az AQP5 expressziós változásai befolyásolják az ozmotikus egyensúlyt a késői vemhes uterusban, befolyásolva a TRPV4 csatorna aktivitását és modulálva a myometrium kalciumszintjét. Patkányokon végzett *in vivo* kísérleteink megerősítették ezt az útvonalat, bizonyítva, hogy a TRPV4 és az AQP5 expressziója összefügg egymással. A citrál - egy természetes TRPV4-antagonista - használata lehetővé tette számunkra, hogy ezt a mechanizmust vemhes állatokban vizsgáljuk. A citrált a biztonsági profilja miatt választottuk, mivel farmakokinetikai paraméterei jól dokumentáltak, ellentétben a szintetikus TRPV4-antagonistákkal, amelyekre vonatkozóan nincs elegendő adat. A citrál megnyújtotta a vemhesség hosszát és dózisfüggő uterus relaxációt idézett elő, ami tovább erősíti az AQP5-TRPV4 kölcsönhatás jelentőségét az uterusban. Az olívaolaj, különösen annak oleokantál összetevője, szintén uterus relaxáló hatást mutatott, valószínűleg a kalcium/PGF₂ útvonal modulációján keresztül. Az LPS által kiváltott koraszülés modellben azonban az olívaolaj hatása nem volt megfigyelhető, ami összetett kölcsönhatására utal koraszülésben.

Továbbá, megvizsgáltuk az AQP5 szerepét a szülés megindulásában AQP5 siRNS segítségével, amely szignifikánsan csökkentette az AQP5 expresszióját. Ez a géncsendesítés fokozott uterus

kontrakciót és korábbi szülést eredményezett, amely alátámasztja azt a hipotézist, hogy a csökkent AQP5 expresszió indukálja a szülést.

A receptor-közvetített útvonal, amely potenciálisan együttműködik az adrenerg rendszerrel, az AQP5 másik szabályozási mechanizmusát jelenti. Az AQP5 közvetlen *in vivo* vizsgálata továbbra is kihívást jelent a szelektív farmakológiai eszközök hiánya miatt. Korábbi vizsgálatok azonban azt jelzték, hogy a cAMP befolyásolja az AQP5 expresszióját, amint az különböző szövetekben, többek között a tüdő epitelsejtjeiben és a myometriális szövetekben megfigyelhető. Úgy tűnik, hogy a terhes uterusban az AQP5 expresszióját a cAMP-szintet emelő szerek, például a terbutalin (β_2 -adrenerg receptor agonista) modulálják, ami az AQP5 transzlokációt indukálja és a PKA aktiválásán keresztül növeli az expressziót. Ezzel szemben a doxazozin, egy α_1 -adrenerg receptor antagonistája nem változtatja meg jelentősen az AQP5 expressziót, valószínűleg azért, mert nincs hatása a cAMP szintre. Ezenkívül a HgCl_2 , egy ismert AQP5-gátló, csökkentette az AQP5 expressziót és növelte a spontán méhösszehúzóásokat. Noradrenalin (NE) jelenlétében a HgCl_2 csökkentette az α_1 által közvetített összehúzóásokat anélkül, hogy befolyásolta volna a β -adrenerg válaszokat, ami receptorspecifikus kölcsönhatásokra utal. A terbutalin dózis függően gátolta a méhösszehúzóásokat, és ezt a hatást a HgCl_2 fokozta. A β -blokkoló propranolol nem volt hatással az α_1 -mediált összehúzóadásokra, míg a doxazozin fokozta az uterus relaxációját, amit a HgCl_2 tovább fokozott, ami az AQP5 részvételére utal. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AQP5 expressziója az adrenerg receptorok útján modulálja az uterus kontraktilitását. Továbbá a CREB, amely egy cAMP által aktivált transzkripciósfaktor, kritikus szerepet játszik a sejtek differenciálódásában és túlélésében. A β_2 -adrenerg receptorok terbutalinnal történő aktiválása a cAMP-szint és a CREB foszforiláció növekedéséhez vezetett, csökkentve az uterus kontrakciókat. A HgCl_2 -kezelés csökkentette a CREB-szintet, ami a cAMP-szignál, az AQP5 és az uterus relaxációja közötti kapcsolatra utal.

5.2. HUMÁN VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

Humán vizsgálatokban az AQP5 expresszióját a terhesség 34. és 41. hete között mértük. Az AQP5 szintje a 34. héten emelkedett, de a 36. hétre jelentősen csökkent, és a szülésig alacsony maradt, ami összhangban van az AQP5-nek a méh kontraktilitását moduláló szerepére utaló állatkísérletes adatokkal. Az AQP5 expressziójának változásait továbbá vizsgáltuk plazmamintákban, és a 34. héten jelentős változásokat tapasztaltunk, amelyeket valószínűleg befolyásolt a koraszülésnél gyakran alkalmazott glükokortikoid-kezelés (betametazon). A glükokortikoidokról ismert, hogy szabályozzák az AQP5 expresszióját különböző szövetekben, beleértve a tüdőt, ahol növelik az AQP5 expresszióját.

Elhízott nőknél a szülés megindulása gyakran késik, és adataink arra utalnak, hogy az uterus magasabb AQP5 expressziója az uterus kontrakciók csökkentésével hozzájárulhat ehhez a késéshez. Ez alátámasztja azt a hipotézist, hogy az uterus emelkedett AQP5-szintje más tényezőkkel, például az oxitocinnal és a progeszteronnal együtt befolyásolhatja a vajúadás időzítését. Érdekes módon az elhízott nők méhlepényében nem találtunk jelentős változásokat az AQP5 expressziójában. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AQP5 potenciális célpontként szolgálhat a terápiás stratégiák számára a szülés időzítésének kezelésére elhízott nőknél.

6. KONKLÚZIÓ

A koraszülés továbbra is jelentős globális kihívást jelent, részben a kiváltó mechanizmusainak korlátozott ismerete miatt. Eredményeink rávilágítottak egy új szabályozási útvonalra, amely az AQP5 csatornát érinti, és amely potenciális terápiás célpontként szolgálhat a koraszülés kezelésében.

Eredményeink azt mutatták, hogy **(I)** a TRPV4 citrál általi gátlása csökkenti az uterus kontrakciókat, miközben növeli az AQP5 expresszióját *in vivo*, valószínűleg a sejtek volumen expanziójának elnyomása és az ellés késleltetése révén. **(II)** AQP5 knockdown patkánymodellt használva megerősítettük az AQP5 esszenciális szerepét az ellés megindításában. **(III)** Az AQP5 és az adrenerg rendszer között a cAMP-n keresztül funkcionális kapcsolatot állapítottunk meg, amelyet a terbutalin, doxazozin és HgCl₂ kísérletek bizonyítottak. **(IV)** Az állatkísérletes eredményeink által alátámasztott humán vizsgálatok inverz korrelációt mutatnak az AQP5 expresszió és az uterus kontraktilitása között, amely az elhízott nők elhúzódó terhességének lehetséges következményeire utal.

Ezek az eredmények jelentős bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az AQP5 több útvonalon keresztül szabályozza az uterus kontrakciókat, beleértve az ozmotikus és receptor-mediált mechanizmusokat. Kutatásunk megalapozhatja a szülés megindulását moduláló jövőbeli terápiás stratégiákat.

PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

1. A doktori értekezéshez kapcsolódó publikációk

I. Seres-Bokor A, Kemény KK, 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)*. 2021 Aug 30;11(9):897. [IF: 3,253; Q2 in *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology (miscellaneous)* (2021)]

II. Kemény KK, Ducza E. Physiological Cooperation between Aquaporin 5 and TRPV4. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Oct 1;23(19):11634. [IF: 5,6; Q1 in *Medicine (miscellaneous)* (2022)]

III. Kemény KK, Kozinszky Z, Altorjay ÁT, Kolcsár B, Surányi A, Ducza E. Effect of Obesity on Aquaporin5 Expression in Human Placental and Uterus Tissues. *Journal of Clinical Medicine*. 2024;13(15):4490. [IF: 3,0; Q1 in *Medicine (miscellaneous)* (2023)]

IV. Kemény KK, Seres-Bokor A, Barna T, Mirdamadi M, Gáspár R, Surányi A, Ducza E. Cooperation of aquaporin 5 and the adrenergic system in the initiation of birth in rat model. *Heliyon*. 2024;10(17):e37329. [IF: 3,4; Q1 in *Multidisciplinary* (2023)]

2. A doktori értekezéshez kapcsolódó előadások

I. Kemény KK, Seres-Bokor A, Schaffer A, Gáspár R, Ducza E. Effect of citral treatment on the length of rat gestation period - *Semmelweis Symposium 'Excellence in Clinical Research and Innovation' 2021* (poszter prezentáció)

II. Kemény KK, Seres-Bokor A, Schaffer A, Barna T, Gáspár R, Ducza E. The possible role of AQP5 (and TRPV4) in the prevention of preterm birth - *17th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences 2022* (szóbeli prezentáció)

III. Kemény KK, Seres-Bokor A, Barna T, Mirdamadi M, Gáspár R, Ducza E. Az AQP5 (és a TRPV4) csatorna lehetséges szerepe a koraszülés megelőzésében - *MGYT Gyógyszerkutatói Szakosztály Fiatal Kutatók Fóruma 2022* (szóbeli prezentáció)

IV. Kemény KK, Surányi A, Altorjay ÁT, Németh G, Molnár A, Ducza E. AQP channels and pregnancy – molecular pharmacology studies in human samples - *18th RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences 2023* (szóbeli prezentáció)

V. Kemény KK, Surányi A, Altorjay ÁT, Németh G, Molnár A, Ducza E. Changes of AQP channels expression in pregnant human samples - 25. *Tavaszi Szél Konferencia 2023* (szóbeli prezentáció)

VI. Kemény KK, Ducza E. Az aquaporin 5 csatorna szerepének vizsgálata a koraszülés megelőzésében - XV. *Clauder Ottó Emlékverseny 2023* (szóbeli prezentáció)

VII. Kemény KK, Surányi A, Altorjay ÁT, Ducza E. Investigation of obesity-related factors in human placental tissue samples - 19th *RECOOP Bridges in Life Sciences Conferences 2024* (szóbeli prezentáció)

VIII. Kemény KK, Surányi A, Altorjay ÁT, Ducza E. The relationship between obesity and pregnancy - molecular biology studies in human placental samples - *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XVII. and EUFEPS Annual Meeting 2024* (szóbeli prezentáció)

IX. Kemény KK, Surányi A, Altorjay ÁT, Ducza E. Relationship between obesity-related factors and pregnancy complications - molecular biology studies - *EUGLOH Annual Summit 2024* (poszter prezentáció)

3. A doktori értekezéshez nem kapcsolódó egyéb publikáció

I. Osman, A. A., Laczkó, D., Vágvolgyi, M., Seres-Bokor, A., Sztojkov-Ivanov, A., Kemény, K. K., Hunyadi, A., Ducza, E. Investigation of calonysterone and 20-hydroxyecdysone effects in high-fat, high-sugar diet-induced obesity rat model. *Heliyon*, 11(3), e42435. (2025). [**IF: 3,4; Q1 in Multidisciplinary (2023)**]