

Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet



**A nociceptin és a nocisztatin  
uterusz kontraktilitásra kifejtett hatásának  
vizsgálata in vitro**

Ph.D. tézis összefoglaló

Deák Beáta

**Szegedi Tudományegyetem**  
**Gyógyszertudományok Doktori Iskola**

**Ph.D. program:** Gyógyszerhatástan, biofarmácia és klinikai gyógyszerészet

**Programvezető:** Dr. Falkay György MTA doktor

**Intézet:** Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

**Témavezető:** Dr. Gáspár Róbert Ph.D. és Dr. Klukovits Anna Ph.D.

***Szigorlati Bizottság:***

**Elnök:**

Dr. Zupkó István Ph.D.

**Tagok:**

Dr. Benyhe Sándor MTA doktor

Dr. Földesi Imre Ph.D.

***Bírálati bizottság:***

**Elnök:**

Dr. Hohmann Judit MTA doktor

**Opponensek:**

Dr. Helyes Zsuzsanna MTA doktor

Dr. Sántha Péter Ph.D.

**Tag:**

Dr. Jurányi Zsolt Ph.D.

**Titkár:**

Dr. Lázár László Ph.D.

## Bevezetés

A koraszülés jelentős népegészségügyi probléma. Magas újszülött kori mortalitás és morbiditás jellemzi mind a neonatális időszakban, mind pedig a fejlődés későbbi szakaszaiban. Mivel a kiváltó tényezők és a szignálmechanizmus ez idáig nem teljesen tisztázott, érdemes megvizsgálni az endogén anyagok részvételét az uterusz kontraktilitásának szabályozásában új tokolitikus irányvonalak keresése céljából.

A nociceptin peptidet (N/OFQ) 1995-ben izolálták először. Receptora (NOP) az ópiát receptorokéhoz hasonló szerkezetű, valamint a peptid is hasonlóságot mutat aminosav összetételében az endogén ópiátokéhoz. A N/OFQ az agyban neurotranszmitterként viselkedik, amely szabályozza a nociceptív és a lokomotor viselkedést. Szerepet játszik a gyulladási folyamatok szabályozásában, javítja az étvágyat és anxiolitikus peptidként a stresszhez való adaptációban is részt vesz. Ellensúlyozza a kábítószer által okozott eufóriát és a tanulási képességet is gátolja. Olyan kóros állapotokban, mint a női fibromyalgia szindróma és a szülés utáni depresszió, szintje emelkedik az emberi plazmában. A férfi nemi működés szabályozásában az FSH hatásokban mediátoranyagként viselkedik, valamint szabályozza az LH kiáramlást és a petefészek működését is. A N/OFQ szintek változása szerepet játszik a női és férfi nemi működésben. A NOP receptor a központi idegrendszerben számos helyen expresszálódik, de megtalálható például a patkány bélben, ondóvezetékben, retinában és a szívben, a sertés gastrointesztinális rendszerben és vesében, valamint a tengeri malac ganglionokban is.

A nocisztatint (NST) szarvasmarha agyból izolálták és antinociceptív hatással bír. Nem kötődik a NOP receptorhoz. A feltételezett receptora G protein kapcsolt. Az endogén ópiátok izomrelaxáns hatását alapul véve valószínűsíthető, hogy ezek a neuropeptidek részt vesznek a méhműködés szabályozásában.

## Célkitűzések

1. A kutatás fő célkitűzése a N/OFQ és a NST méhműködés szabályozásában betöltött szerepének tisztázása és a jelátviteli folyamatok felderítése terminusban levő patkány és császármetszésből származó humán mintákon terminusban és koraszülésben egyaránt.
2. Célul tűztük ki a N/OFQ és a NST uterusz kontraktilitásra kifejtett hatásának vizsgálatát izolált szervrendszerben *in vitro*, terminusban levő patkány és humán uteruszban és koraszüléssel humán mintákon.

3. A N/OFQ és NST expresszióját a patkány miometriumban radioimmunoassay technikával és a közös prekursor *PNO*C mRNS jelenlétét RT-PCR módszerrel próbáltuk kimutatni.
4. Célul tűztük ki a N/OFQ és a NST jelátviteli folyamatainak tanulmányozását az uterusban [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötő technikával, enzim immunoassayvel és *in vitro* kontraktilitási vizsgálatok segítségével. A Ca<sup>2+</sup>-függő K<sup>+</sup> csatornák (BK<sub>Ca</sub>) és a szenzoros neuropeptid, a kalcitonin g $\alpha$ relációs peptid (CGRP) felszabadulás lehetséges szerepét is megvizsgáltuk, valamint a Ca<sup>2+</sup> szegény környezet befolyását a NST+naloxon (NX) kombináció uterus relaxáló hatásában.

## **Anyagok és módszerek**

### Szövetminták

Ivarérett nőstény és hím Sprague-Dawley patkányokat pároztattunk a hajnali órákban. Néhány óra elteltével a nőstény állatokból hüvelykenetet vettünk és mikroszkóp alatt vizsgáltuk. Amennyiben hímivarsejteket találtunk, akkor az állatot elkülönítettük és a vizsgálat napját tekintettük a vemhesség 1. napjának. A humán császármetszésből származó minták a terhesség harmadik trimeszterében lettek kivéve. Két csoportba soroltuk őket: terminusban lévő (37-41. terhességi hét) valamint koraszülésből származó mintákra (33-36. hét).

### PCR vizsgálatok

A vemhesség végén (18, 20 és 22. napon) a patkányokat CO<sub>2</sub>-dal telített altatókádiban leöltük, kivettük az uterusokat, megtisztítottuk és a placentát eltávolítottuk. A patkány és a humán mintákat egyaránt folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztottuk és -70 °C-on tároltuk a felhasználásig. A teljes RNS-t TRIsure Kit-tel izoláltuk. A totál RNS-ből 1  $\mu$ g-ot használtunk minden mintából a reverz transzkripcióhoz és amplifikációhoz (TaqMan RNA-to-C<sub>T</sub> 1-Step Kit és a Sensi FAST Probe Hi-Rox One-Step Kit).

### N/OFQ és NST szint mérés patkány uterusban radioimmunoassay (RIA) technikával

Az uterusban a N/OFQ tartalmat nem vemhes és 22-napos vemhes állatokban mértük, valamint a NST szintet is meghatároztuk különböző vemhességi napokon (nem vemhes, 15, 18, 20 és 22 napos vemhes állatokban). A N/OFQ és a NST kivonása az uterusból validált módszerrel történt. A kivonatokat 1 pg/ml-es minimum szenzitivitású <sup>125</sup>I-N/OFQ RIA Kit-re és 10 pg/ml-es minimum szenzitivitású <sup>125</sup>I-Nocistatin RIA Kit-re vittük fel. Az adatok

értékelése Isodata 20/20 és RIA-Mat 280 programmal történt. A szignifikancia értékeket ANOVA Newman-Keuls teszttel és párosítatlan *t*-próbával számoltuk.

#### Radioligand-kötés vizsgálatok

A méréseket nem vemhes és 22 napos vemhes állatok uteruszán végeztük. A fehérje tartalmat Bradford módszerrel határoztuk meg. A specifikus kötés meghatározásakor az összes kötött tartalomból kivontuk a nem-specifikusan kötött molekulákat. A kísérleteket értékeltük és meghatároztuk a  $B_{\max}$  és a  $K_d$  értékeket.

#### [<sup>35</sup>S]GTPγS-kötés vizsgálat

A N/OFQ hatását NX ( $10^{-6}$  M) jelenlétében vizsgáltuk. A N/OFQ és NX G fehérje aktiváló hatását 500 ng pertussis toxin (PTX)/ml jelenlétében is megmértük.

#### cAMP szint meghatározás az uteruszban

Az uterusz szövetmintákat de Jongh oldatban inkubáltuk 37 °C-on. A cAMP szinteket a nem specifikus foszfodiészteráz gátló 3-isobutil-1-metilxantin (IBMX;  $10^{-3}$  M; 10 perc), OFQ ( $10^{-8}$  M; 10 perc) illetve annak NX-nal való kombinációjának, NST ( $10^{-8}$  M; 10 perc), illetve annak a N/OFQ-nel vagy NX-nal történő kombinációjának, valamint az adenil cikláz aktivátor forskolin ( $10^{-5}$  M; 10 perc) jelenlétében határoztuk meg. Az uterusz cAMP szinteket cAMP enzim immunoassay (EIA) kittel mértük.

#### In vitro kontraktilitási vizsgálatok

Állatkísérletek: A vemhesség 22. napján (terminus) az állatokat CO<sub>2</sub> belélegeztetéssel leöltük, az uteruszokat eltávolítottuk és előkészítettük az *in vitro* kontraktilitási vizsgálatokra.

Az izolált uterusz szarvakat azonnal karbogénnel átáramoltatott, 37 °C-os, de Jongh oldatot tartalmazó vízfürdőbe helyeztük, letisztítottuk és a placentákat eltávolítottuk. Az izolált uterusz gyűrűkben 25 mM-os KCl-dal ritmikus kontrakciókat váltottunk ki. A N/OFQ és a NST uterusz kontrakciókra kifejtett hatását  $10^{-12}$  –  $10^{-6}$  M koncentrációs tartományban vizsgáltuk, nem kumulatív módon. Más mérési elrendezésnél a méhösszehúzóásokat  $10^{-8}$  M-os oxytocinnal váltottuk ki, és a N/OFQ hatását a nem-szelektív K<sup>+</sup> csatorna blokkoló tetraetilammónium (TEA;  $10^{-3}$  M) és a BK<sub>Ca</sub> csatorna-szelektív gátló paxillin (PAX;  $5 \times 10^{-6}$  M) jelenlétében vizsgáltuk.

A NST és a NX közös hatását alacsony  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú (0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) de Jongh pufferben is tanulmányoztuk, amely a standard de Jongh pufferhez képest fele koncentrációban tartalmazta a  $\text{Ca}^{2+}$ -ot. A  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$  csatornáknak a NST hatásának közvetítésében betöltött szerepét is megvizsgáltuk, ebben az esetben a kísérleteket a szelektív  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  csatorna blokkoló PAX ( $5 \times 10^{-6}$  M) jelenlétében végeztük el, spontán uterusz kontrakciókhoz viszonyítva.

A NST hatáskifejtésében a CGRP lehetséges szerepét is tanulmányoztuk az uterusz szöveten. Ebben az elrendezésben kapszaicint (1  $\mu\text{M}$ , 10 perc) alkalmaztunk a CGRP-nak az uterusz szenzoros idegvégződésekből való kiürítésére. Alapos kimosás után, a szöveteket CGRP-vel inkubáltuk (0.1  $\mu\text{M}$ ; 20 perc) és újra átmostuk őket, ezután a NST hatásait a fenti módon vizsgáltuk.

Humán vizsgálatok: A szövetmintákat szülés után nyertük az anyai miometriumból, de még azelőtt, hogy az anya oxytocint kapott volna. Krebs–Henseleit oldatot tartalmazó 37 °C-os szervfürdőben az izolált uterusz gyűrűkön  $10^{-8}$  M-os oxytocinnal ritmikus kontrakciókat váltottunk ki. A N/OFQ és a NST uterusz kontrakciókra kifejtett hatását  $10^{-12}$  –  $10^{-6}$  M koncentrációs tartományban vizsgáltuk, nem kumulatív módon. A NST uterusz relaxáló hatását N/OFQ jelenlétében is megvizsgáltuk, ugyanakkor a N/OFQ hatását is megmértük NST jelenlétében.

A miometrium gyűrűk kontrakcióit nyúlásmérővel mértük. A görbék regisztrálását, az adatok rögzítését és feldolgozását SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System segítségével végeztük. A NST, N/OFQ és NX gátló hatását a KCl/oxytocin által kiváltott vagy a spontán ritmikus kontrakciókhoz viszonyítottuk és a kontrakciós görbék alatti területet (AUC) értékeltük (4 és 6 perces regisztrátumét) a kontrol görbe alatti területhez viszonyítva. Az eredmények statisztikai elemzését Prism 4.0 program segítségével ANOVA Newman-Keuls teszttel végeztük.

## **Eredmények**

### **Állatkísérletek**

#### **N/OFQ és NST szöveti mérések**

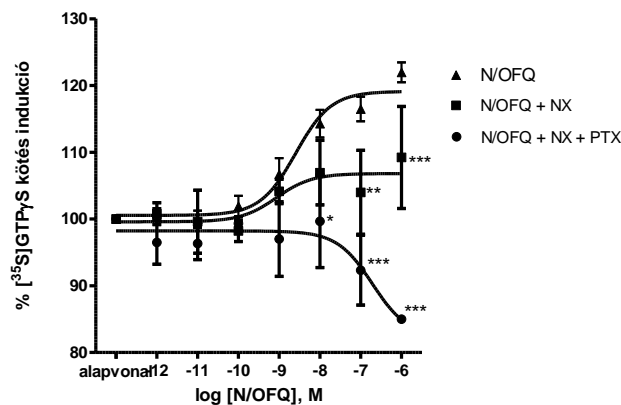
22 napos vemhes patkány uteruszban a N/OFQ koncentráció magasabb ( $P < 0,05$ ) volt a nem vemhes uteruszban mért értéknél. A NST szint az uteruszban a vemhesség előrehaladtával emelkedett.

## Radioligand-kötés vizsgálatok

A NOP receptorok jelenlétét radioligand-kötés vizsgálatokkal mértük az uterusban. Nem találtunk szignifikáns különbséget a nem vemhes nőstény állatok és a 22 napos vemhes patkányok uterusában mért  $B_{max}$  és  $K_d$  értékek között ( $P>0,05$ ).

### [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-kötés vizsgálat

A N/OFQ-indukált G protein aktivációt 22 napos vemhes patkányok uterusán mértük (**1. ábra**). A N/OFQ stimulálta a [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötődést a NOP receptorokon keresztül. NX jelenlétében a N/OFQ-indukált G protein aktiváció csökkent. A  $G_i$  protein gátló PTX és NX jelenlétében azonban a maximális G protein aktiváció tovább csökkent, egészen az alapaktivitás szintje alá.



1. ábra. Nociceptin (N/OFQ) hatása az aktivált G protein mennyiségére vemhes patkány miometriumban *in vitro*. n=6; \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$ .

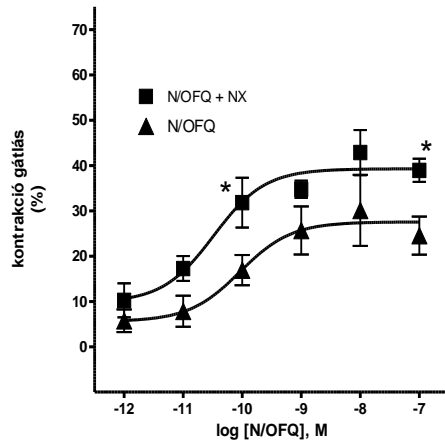
## *In vitro* kontraktilitási vizsgálatok

### A N/OFQ, NST és NX uterus relaxáló hatásának vizsgálata

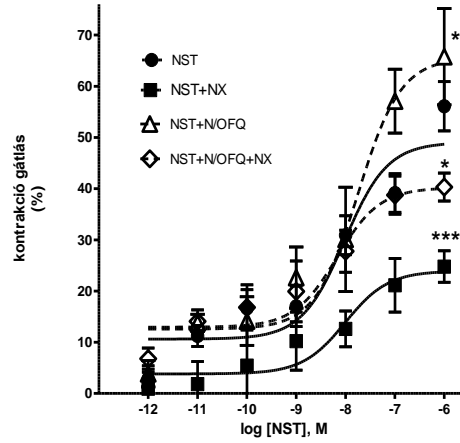
A N/OFQ csökkentette a KCl által kiváltott ritmikus kontrakciókat a vemhes patkány uterusban, koncentrációfüggő módon. Az ópiát-antagonista NX ( $10^{-8}$  M) jelenlétében a N/OFQ maximális kontrakció gátló hatása nőtt (**2.A ábra**). A NST önmagában is koncentrációfüggően csökkentette a KCl által kiváltott kontrakciókat, N/OFQ-nel ( $10^{-8}$  M) való együttadáskor viszont nőtt a NST maximális koncentráció gátló hatása is;  $P<0,05$  (**2.B ábra**). A NX ( $10^{-8}$  M) csökkentette a NST maximális kontrakció gátló hatását;  $P<0,001$ . A

NX a NST+N/OFQ kombináció maximális kontrakció gátló hatását is csökkentette;  $P < 0,05$  (2.B ábra).

A.



B.



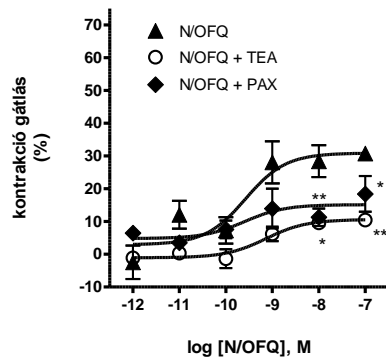
2. ábra. A nociceptin (N/OFQ), nocisztatin (NST) és naloxon (NX) kontrakció gátló hatása vemhes patkány uteruszon *in vitro*.  $n=8$ ; \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

BK<sub>Ca</sub> csatornák szerepének vizsgálata a N/OFQ és a NST hatásának közvetítésében

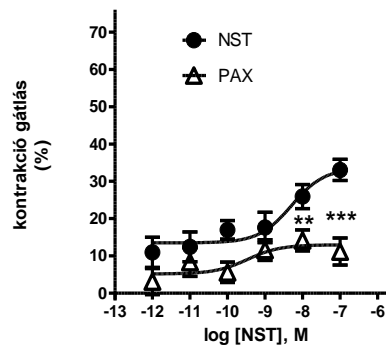
Mivel a N/OFQ és a NX központi idegrendszeri hatásainak közvetítésében a BK<sub>Ca</sub> csatornák aktiválása és a neuronok hiperpolarizációja szerepet játszik, a N/OFQ vemhes patkány uteruszon kifejtett hatását a nem szelektív K<sup>+</sup> csatorna gátló TEA (10<sup>-3</sup> M) és a BK<sub>Ca</sub> csatorna-szelektív gátló PAX (5x10<sup>-6</sup> M) jelenlétében is megvizsgáltuk (3.A ábra). A TEA és a PAX gátolta a N/OFQ hatását az oxytocin kiváltott ritmikus kontrakciókon.

A NST terminusban levő vemhes patkány uterusz spontán kontrakcióira kifejtett hatását megvizsgáltuk a szelektív BK<sub>Ca</sub> csatorna gátló PAX (5x10<sup>-6</sup> M) jelenlétében is (3.B ábra). PAX jelenlétében a NST maximális kontrakció gátló hatása csökkent.

A.



B.



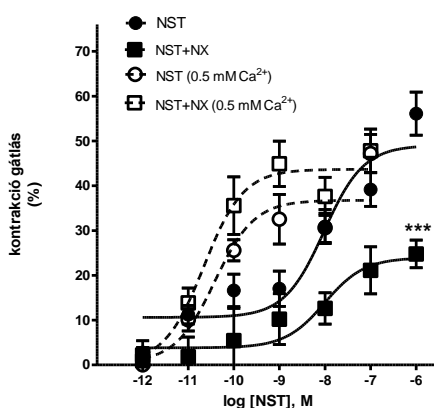
3. ábra. K<sup>+</sup> csatorna gátlók hatásának vizsgálata a nociceptin (N/OFQ) és a nocisztatin (NST) vemhes kontrakció gátló hatására *in vitro*. A) A kontrakciókat 10<sup>-8</sup> M-os oxytocinnal váltottuk ki 22-napos vemhes patkány uterusz gyűrűkön.

B) A spontán kontrakciókat 22-napos vemhes patkány uterusz gyűrűkön rögzítettük.  $n=8$ ; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .



### A NST és a NX kontrakció gátló hatásának vizsgálata $Ca^{2+}$ -hiányos közegben

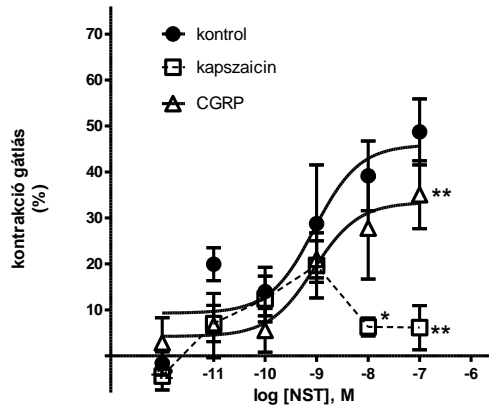
$Ca^{2+}$ -hiányos közegben a NST és a NX-nal együtt adott NST koncentráció—hatás görbéje is balra tolódott, a standard de Jongh oldatban felvett görbékhez képest. A  $\log EC_{50}$  értékek is mindkét görbe esetén alacsonyabbak voltak a  $Ca^{2+}$ -szegény közegben ( $P < 0,05$ ). Ugyanakkor a NX nem tudta gátolni a NST kontrakció gátló hatását, ahogy azt tette a standard pufferben. A NST maximális kontrakció gátló hatása nem különbözött a NST+NX kombináció kontrakció gátló hatásától  $Ca^{2+}$ -szegény pufferben (4. ábra).



4.ábra. Nocisztatin (NST) és naloxon (NX) hatása a vemhes uterusz kontrakciókra  $Ca^{2+}$ -hiányos közegben *in vitro*.  
n= 6; \*\*\* $P < 0,001$ .

### CGRP szerepének vizsgálata a NST hatásának közvetítésében

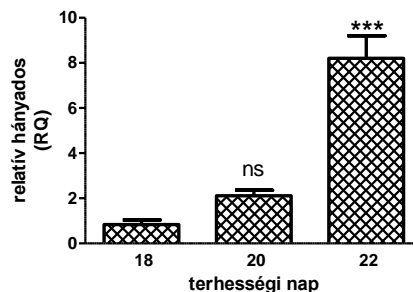
Mivel a NST pontos hatásmechanizmusa továbbra sem világos, ezért megvizsgáltuk, vajon a kapszaicin-szenzitív szenzoros idegvégződésekből történő neuropeptid felszabadulás befolyásolásán keresztül is kifejti-e hatását a vemhes patkány uteruszban. A kapszaicin-szenzitív primer afferensekből történő neuropeptid kiürítést kapszaicinnal idéztük elő (5. ábra). A NST maximális kontrakció gátló hatását csökkentette a kapszaicines ( $1 \mu M$ ) előinkubálás ( $P < 0,01$ ). A kapszaicin oldószere (kontrol) nem változtatta meg a NST hatását ( $P > 0,05$ ). Mikor a neuropeptid kiürítést CGRP ( $0,1 \mu M$ ) hozzáadása követte, a NST maximális kontrakció gátló hatása nagyobb volt, mint a kapszaicines inkubálást követően ( $P < 0,01$ ). A CGRP hozzáadása visszaállította a NST gátló hatását a kontrolhoz viszonyítva ( $P > 0,05$ ).



5. ábra. A kalcitonin gén-relációs peptid (CGRP) szerepe a nocisztatin (NST) kontrakció gátló hatására *in vitro*. n= 6; \*P<0,05, \*\*P<0,01.

### ***PNOC* mRNS mérés a patkány uteruszban**

A miometriumban a *PNOC* mRNS szintek szignifikánsan növekedtek a terminus közeledtével. A PCR vizsgálat azt mutatta, hogy a *PNOC* mRNS/ $\beta$ -*aktin* mRNS szintek a vemhesség 18. napján voltak legalacsonyabbak. A *PNOC* mRNS-ének relatív expressziója a 20. napon nem különbözött szignifikánsan a 18. nap értékeitől, de emelkedett a 22. napon, az ellés napján; P<0,001 (6. ábra).

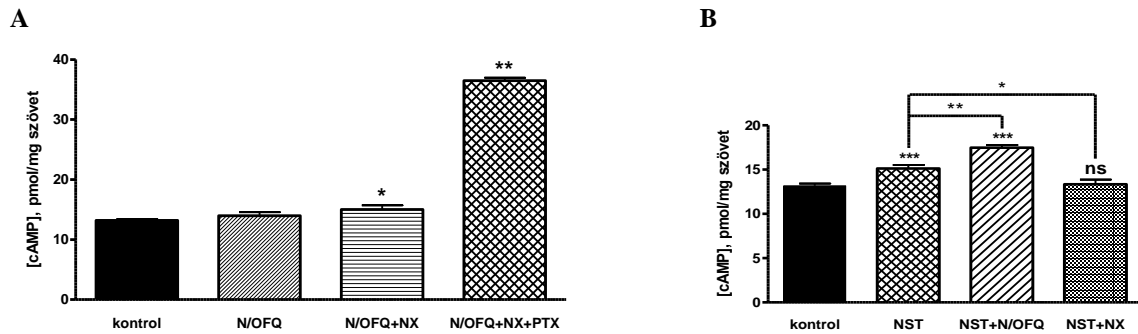


6.ábra. *PNOC* mRNS expresszió a patkány uteruszban a vemhesség 18, 20 és 22. napján. n=3; \*\*\*P<0,001, ns: nem szignifikáns; a szignifikanciákat az előző oszlop értékeihez viszonyítottuk.

### **cAMP szint mérés az uteruszban**

A N/OFQ cAMP szintet befolyásoló hatását is megvizsgáltuk (7.A ábra). A N/OFQ önmagában nem emelte a kontrollhoz képes a cAMP szintet az uteruszban (P>0,05). NX-nal együtt adva viszont növelték a cAMP szintet az uteruszban (P<0,05). Ugyanakkor, ha a mintákat előinkubáltuk a G<sub>i</sub> protein gátló PTX-nal (500 ng/ml), a N/OFQ+NX kombináció tovább emelte a cAMP szintet (P<0,01), ami arra utal, hogy G<sub>s</sub>-proteinek is szerepet játszanak a N/OFQ és a NX jelátviteli folyamatában a vemhes patkány uteruszban.

A cAMP szint emelkedés lehetséges szerepét is megvizsgáltuk a NST kontrakció gátló hatásának kifejtésében (7.B ábra). A NST emelte a cAMP szintet az uterusban az alap aktivitáshoz viszonyítva ( $P < 0,001$ ). N/OFQ jelenlétében további emelkedést tapasztaltunk a cAMP szintekben ( $P < 0,01$ ). Azonban, ha NX-t adtunk együtt a NST-nal, akkor csökkent a cAMP szint a NST önálló hatásához viszonyítva ( $P < 0,05$ ).



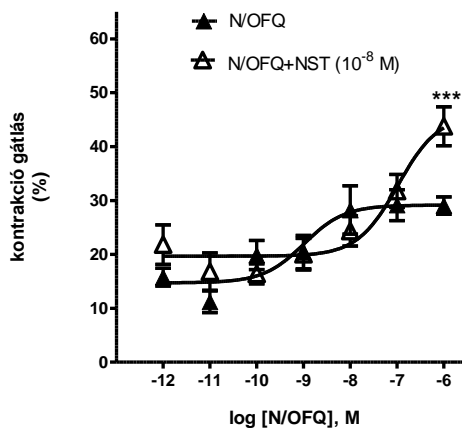
7. ábra. A nociceptin (N/OFQ) és a nocisztatin (NST) hatása az intracelluláris cAMP szintekre a vemhes patkány uterusban.  $n=6$ ; \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

### Humán miometrium vizsgálatok

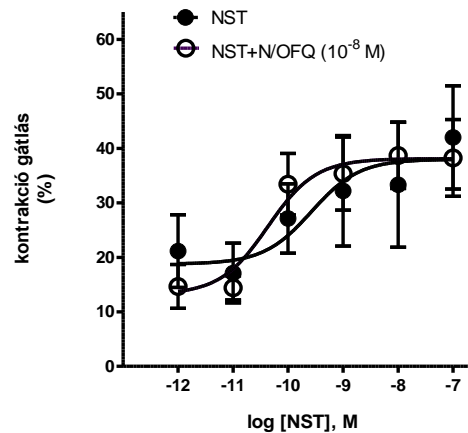
#### *In vitro* kontraktilitási vizsgálatok terminusban lévő humán mintákon

A N/OFQ önmagában csökkentette az uterusz kontrakciókat koncentrációfüggő módon. A NST ( $10^{-8}$  M) szignifikánsan növelte a N/OFQ kontrakció gátló hatását ( $P < 0,001$ ; 8.A ábra). A NST önmagában uterusz kontrakciókat csökkentő hatást fejtett ki. Ugyanakkor N/OFQ-nel ( $10^{-8}$  M) együtt adva nem változott ez a gátló hatás ( $P > 0,05$ ; 8.B ábra).

**A.**



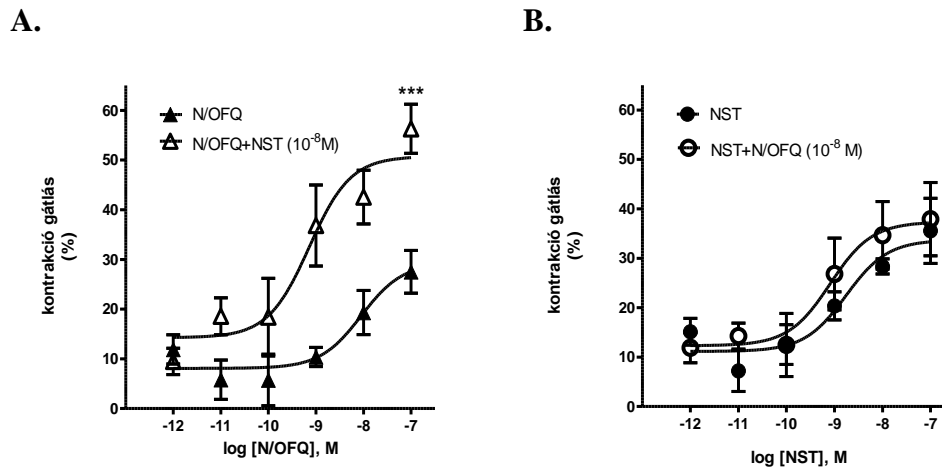
**B.**



8. ábra. A nociceptin (N/OFQ) és a nocisztatin (NST) kontrakció gátló hatásának vizsgálata terminusban levő humán miometriumon *in vitro*. A kontrakciókat  $10^{-8}$  M-os oxytocinnal váltottuk ki.  $n=6$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

### ***In vitro* kontraktilitási vizsgálatok koraszüléssel humán miometriumban**

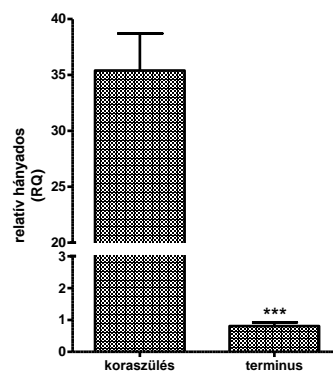
A N/OFQ önállóan csökkentette az uterusz kontrakciókat koncentrációfüggő módon. A NST ( $10^{-8}$  M) növelte a N/OFQ kontrakció gátló hatását ( $P < 0,001$ ; **9.A ábra**). A NST önállóan uterusz kontrakciókat csökkentő hatást fejtett ki, amit a N/OFQ-nel ( $10^{-8}$  M) való együtt adás nem befolyásolt ( $P > 0,05$ ; **9.B ábra**).



**Fig. 9.** A nociceptin (N/OFQ) és a nocisztatin (NST) uterusz-relaxáló hatásának vizsgálata koraszüléssel humán miometriumban *in vitro*. A kontrakciókat  $10^{-8}$  M-os oxytocinnal váltottuk ki.  $n=6$ ;  $***P < 0,001$ .

### ***PNOC* mRNS mérés a humán uteruszban**

A *PNOC* mRNS szintek magasabbak voltak a miometriumban koraszüléssel mintákban, a terminusban levő mintákhoz viszonyítva;  $P < 0,001$  (**10. ábra**).



**10. ábra.** *PNOC* mRNS expresszió a humán uteruszban koraszüléssel és terminusos mintákban.  $n=3$ ;  $***P < 0,001$ .

## Megbeszélés

Mivel a N/OFQ és a NST közös prekursorának, a PNOC-nek az mRNS-e lokálisan expresszálódik a patkány és humán uterusban, eredményeinkből arra következtetünk, hogy a N/OFQ és a NST helyileg szintetizálódik. A RIA mérések megerősítették a N/OFQ és a NST jelenlétét a nem vemhes és a vemhes patkány uterusban. Terminusban a NST sokkal nagyobb mennyiségben van jelen, mint a N/OFQ, ami arra utal, hogy a PNOC mRNS-éből főként NST hasítódik. Jellemző kötőhelyeket találtunk a NOP receptorra is mind nem vemhes, mind vemhes patkány uterusban.

A N/OFQ gátolta mind a KCl-, mind pedig az oxytocin-indukált ritmikus kontrakciókat. A NX fokozta a N/OFQ uterus relaxáló hatását. A N/OFQ növelni tudta a NST kontrakció gátló hatását is. Így elmondhatjuk, hogy a NST nem fejt ki ellentétes hatást a N/OFQ-nel a miometrium kontraktilitására, ahogyan arra a központi idegrendszeri hatásuk alapján számítottunk. A NX gátolja a NST kontrakció gátló hatását. A NX egy befelé irányuló  $Ca^{2+}$  áramot indukál, ezért  $Ca^{2+}$  szegény környezetben vizsgáltuk a két anyag hatását, amikor a NX nem volt képes  $Ca^{2+}$  beáramlást előidézni, és így nem tudta befolyásolni a NST által okozott relaxációt sem. A NX a NST és N/OFQ közös kontrakció gátló hatását is csökkenteni tudta.

Szignifikáns emelkedést tapasztaltunk a [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S kapcsolódásban a NOP receptorokon keresztül. Ezért a G proteinek legalábbis részben, részt vesznek a N/OFQ hatásainak közvetítésében az uteruszon. A NX csökkentette a maximális [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S kapcsolódás mértékét. A NX valószínűleg kölcsönhatásba lép a N/OFQ  $G_i$  protein-aktiváló hatásával. NX és PTX jelenlétében azonban drámai esést tapasztaltunk a N/OFQ-indukált G protein aktiválásban.

A NX N/OFQ-nel való együtt adása emelte a cAMP szintet az uterusban. Azt a következtetést vontuk le, hogy a N/OFQ és a NX versengenek az intracelluláris  $G_i$  protein aktivációért. A NST is cAMP szint emelkedést okozott. N/OFQ jelenlétében a NST tovább emelte a cAMP szintet, ami a N/OFQ- és NST-indukált CGRP-felszabadító hatásnak a cAMP szintet emelő képességével magyarázható. A NX csökkentette a NST által okozott cAMP szint emelkedést, ami arra utal, hogy a NX kölcsönhatásba lép a NST-nal a G-protein aktiváció szintjén is.

Az uterusban a  $BK_{Ca}$  csatornák nagy számban vannak jelen és kulcsszerepet játszanak a depolarizáció csökkentésében, ezáltal az uterus simaizom relaxációjában. Azt találtuk, hogy ha a  $K^+$  csatornákat TEA-val vagy PAX-nel gátoltuk, a N/OFQ uterus relaxáló hatása nagyrészt megszűnt. A PAX pedig csökkentette a NST kontrakció gátló hatását. Azt

feltételezzük, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$  csatornák szerepet játszanak a N/OFQ és a NST intracelluláris jelátviteli folyamataiban.

Az ópiát típusú nociceptív peptidek neurotranszmitter felszabadulást okoznak a kapszaicin-szenzitív szenzoros neuronokból (ilyenek pl. a CGRP és a substance P is). A CGRP pedig gátolja a simaizom kontraktilitást számos szövetben, beleértve a vemhes patkány uteruszt is. Megvizsgáltuk a NST hatását kapszaicin-indukált CGRP-depletált uterusz mintákon és CGRP-val inkubált és regenerált mintákon is. A kapszaicin gátolta a NST kontrakció gátló hatását, amit a CGRP-vel való inkubálás helyreállított. Feltételezhetjük tehát, hogy a CGRP fontos tényező a NST relaxációs jelátviteli folyamatában.

A humán szövetekben a NST adásának meg kell előznie a N/OFQ adását annak érdekében, hogy emelkedjen a közös relaxáló hatás. Azt feltételezzük, hogy a NST CGRP-felszabadító hatása gyengébb relaxációt eredményez, mint a N/OFQ  $\text{K}^+$  csatorna-nyitó potenciálja. A NST számottevőbb uterusz relaxáló hatása a N/OFQ-indukált uterusz relaxációra koraszüléssel mintákon összefüggésben van azzal a megállapítással, hogy a *PNO*C mRNS koraszülésnél nagyobb mennyiségben van jelen.

Eredményeink tükrében megállapíthatjuk, hogy mind a N/OFQ mind pedig a NST lokálisan képződik és kontrakció gátló hatással rendelkezik a terhes patkány és humán uteruszon, és amikor együttesen vannak jelen, fokozni tudják egymás hatását. Ezt a mechanizmust főként a  $\text{Ca}^{2+}$ -függő  $\text{K}^+$  csatornák és a következményes hiperpolarizáció közvetíti. A NST emellett a szenzoros neuropeptid CGRP felszabadításán keresztül is kifejti hatását. A NX fokozza a N/OFQ relaxáló hatását, azonban gátolja a NST által kifejtett relaxáló hatást a befelé irányító  $\text{Ca}^{2+}$  csatornák aktiválásán keresztül, valamint a NST cAMP-t növelő képességének csökkentésével. Bebizonyítottuk, hogy a NOP receptorok többféle G proteinhez is képesek kapcsolódni. Feltételezzük, hogy a N/OFQ vagy NOP receptorhoz kapcsolódó (lehetőleg nem peptid szerkezetű) agonisták és a NST származékok is ígéretes tokolitikus célpontokká válhatnak. Ennek az *in vitro* tanulmánynak az eredményeit *in vivo* körülmények között is meg kell vizsgálni, valamint további, humán mintákon végzett kísérletek szükségesek ahhoz, hogy releváns következtetéseket vonhassunk le jelen megállapítások humán alkalmazásának megvalósíthatóságáról.

### **Az értekezés alapját képező közlemények:**

1. Klukovits A, Tekes K, Gündüz Cinar O, Benyhe S, Borsodi A, **Deák BH**, Hajagos-Tóth J, Verli J, Falkay G, Gáspár R. Nociceptin inhibits uterine contractions in term-pregnant rats by signaling through multiple pathways. *Biol Reprod* 2010; 83:36-41. **IF: 3.87**
2. **Deák BH**, Klukovits A, Tekes K, Ducza E, Falkay G, Gáspár R. Nocistatin inhibits pregnant rat uterine contractions in vitro: Roles of calcitonin gene-related peptide and calcium-dependent potassium channel. *Eur J Pharmacol* 2013; 714: 96-104. **IF: 2.592**
3. **Deák BH**, Klukovits A, Kormányos Z, Tekes K, Ducza E, Gáspár R. Uterus-Relaxing Effects of Nociceptin and Nocistatin: Studies on Preterm and Term-Pregnant Human Myometrium In vitro. *Reprod Sys Sexual Disorders* 2013; 2:117.

### **Az értekezéshez kapcsolódó kongresszusi absztraktok**

1. **Deák Beáta**, Klukovits Anna, Kormányos Zsolt, Falkay György, Gáspár Róbert. A nociceptin és nocisztatin hatása a terhes humán és patkány uterusz kontraktilitására. A Magyar Élettani Társaság (MÉT) és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság (MFT) II. Közös tudományos konferenciája; Szeged, 2010. június 16-18.
2. **Beáta H Deák**, Anna Klukovits, Eszter Ducza, Zsolt Kormányos, Attila Pál, George Falkay, Róbert Gáspár. The signalling pathways of nociceptin and nocistatin in the pregnant human and rat uterine contractility. *Pharmaceutical Sciences for the Future of Medicines Conference*; Prague, Czech Republic, 13-17 June, 2011.
3. **Beáta H Deák**, Anna Klukovits, Eszter Ducza, Zsolt Kormányos, Attila Pál, George Falkay, Róbert Gáspár. The signalling pathways of nociceptin and nocistatin in the pregnant human and rat uterine contractility. *Molekulától a gyógyszerig*; Szeged, 2012. május 24-25.

## NYILATKOZAT

Alulírott, Dr. Klukovits Anna egyetemi adjunktus nyilatkozom, hogy a „**Nociceptin inhibits uterine contractions in term-pregnant rats by signaling through multiple pathways**” című (szerzők: Klukovits A, Tekes K, Gündüz Cinar O, Benyhe S, Borsodi A, Deák BH, Hajagos-Tóth J, Verli J, Falkay G, Gáspár R; megjelenés helye és ideje: Biol Reprod. 2010 Jul;83(1):36-41.) első szerzős közleményemet Deák Beáta PhD hallgató a doktori fokozatának megszerzéséhez szabadon felhasználhatja.

Deák Beáta a közlemény kiemelkedő fontosságú szerzője, aki a kísérletes munkában aktívan részt vett; az izolált szervi vizsgálatokat és a cAMP méréseket irányítás mellett önállóan végezte. Emellett közreműködött az SZBK-ban végzett receptor vizsgálatok kivitelezésében.

Szeged, 2012. február 23.



Dr. Klukovits Anna

SZTE Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet



