

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet



A női szexuálhormonok hatásának vizsgálata az α_1 - és α_2 -adrenerg receptor altípusok működésére vemhes patkány miometriumban

Ph.D. tézis összefoglaló

Bóta Judit

Szeged

2017

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Ph.D. program: Gyógyszerhatástan, Biofarmácia és Klinikai gyógyszerészet

Programvezető: Dr. Zupkó István Ph.D.

Intézet: Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Témavezető: Dr. Gáspár Róbert Ph.D.

Bóta Judit

A női szexuálhormonok hatásának vizsgálata az α_1 - és α_2 -adrenerg receptor altípusok működésére vemhes patkány miometriumban

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Zupkó István Ph.D.

Tagok: Dr. Benyhe Sándor MTA doktor

Dr. Földesi Imre Ph.D.

Bíráló bizottság:

Elnök: Dr. Dombi György kandidátus

Opponensek:

Tubolyné Dr. Horváth Gyöngyi MTA doktor

Dr. Tábi Tamás Ph.D.

Tag:

Dr. Gáspár-Surányi Andrea Ph.D.

Titkár:

Dr. Szatmári István Ph.D.

Bevezetés

Az adrenerg rendszer és a női szexuál hormonok fontos szerepet töltenek be a méhizomzat kontrakciójának szabályozásában. Ismert, hogy a miometriális β_2 -adrenerg receptorok (AR) stimulációja növeli az intracelluláris cAMP szintjét és uterus relaxációt okoznak, ezért alkalmazhatóak tokolízis céljára a klinikai gyakorlatban. Mind az α - és β -AR-ok G fehérjéhez kapcsolt receptorok családjába tartoznak.

Az α_1 -AR családnak három altípusa van (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}). Mindhárom altípus stimulációja Gq/11 jelátviteli útvonal aktivációját eredményezi, ami a foszfolipáz C aktivációján keresztül inozitol-trifoszfátot és a diacilglicerolt hoz létre. Mindez növeli az intracelluláris calcium szintet, ami simaizom kontrakcióhoz vezet. Habár mindhárom α_1 -altípus ugyanazt a G-fehérje jelátviteli útvonalat aktiválja, különböző szövetekben különféle szerepet tölthetnek be.

Az α_2 -AR családnak is 3 altípusa van (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}). Korábbi kutatásaink kimutatták, hogy a miometriális α_{2A} - és α_{2C} -AR-ok stimulációja cAMP szint emelkedéshez vezet, ami hozzájárul a gyengébb kontrakciókhoz, mely a noradrenalin (NA) hatásához képest relaxációnak tekinthető. Az α_{2B} -AR-ok stimulációja csökkenti a cAMP szintet, növeli a kontrakciókat.

Azt is igazoltuk, hogy az *in vivo* progeszteron (P4) előkezelés növeli a β_2 -agonista terbutalin miometrium relaxáló hatását *in vitro* és növeli a β_2 -AR szintézist vemhesség során. A β_2 -AR agonisták hatása csökken a terhesség végén a csökkenő plazma P4 szint miatt, ami jelentős csökkenést eredményez az aktivált G-fehérjéhez kapcsolódó β_2 -AR-ok számában és csökkenti a G-fehérje mennyiségét. A P4 túlsúly növeli az aktivált G-fehérjék számát a terhesség során és növeli a β_2 -agonisták miometrium relaxáló hatását.

Célkitűzések

Habár a női nemi hormonok jelentős hatással vannak az AR-okra, mégis kevés információnk van arról, hogy milyen hatással vannak az α -AR altípusok funkciójára és miometriumban történő expressziójára. Munkánk fő célja az α -AR altípusok szerepének vizsgálata volt késői vemhes patkány uteruszban női szexuálhormon kezelést követően. Célkitűzéseink a következők voltak:

1. α_1 -AR és α_2 -AR altípusok szerepének vizsgálata izolált szervi vizsgálatokkal altípus szelektív specifikus antagonisták jelenlétében ösztrogén (E2) és P4 előkezelés után in vivo
2. A miometriális α_1 -AR és α_2 -AR altípusok mRNS és fehérje expressziójának vizsgálata női szexuálhormon előkezelés után RT-PCR és Western blot technika segítségével 22 napos vemhes patkányban.
3. Az α_1 -AR és α_2 -AR-ok másodlagos hírvivő rendszerének változásainak vizsgálata E2 és P4 előkezelés után.

Anyagok és módszerek

Állatkísérletek

Az állatkísérleteket a Csongrád Megyei Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóság engedélyével végeztük (engedélyszám: IV./198/2013.).

Az állatok pároztatása

Nőstény (180-200 g) és hím (240-260 g) Sprague-Dawley patkányokat speciális ketrechen pároztattunk a hajnali órákban. A nőstény állatokból hüvelykenetet vettünk és mikroszkóp alatt vizsgáltuk. Pozitív esetekben a nőstény patkányokat elkülönítettük és a vizsgálat napját tekintettük a vemhesség 1. napjának.

In vivo szexuálhormon kezelés

Vemhes patkányok előkezelése E2-vel a vemhesség 18. napján kezdődött. Az állatok 4 napig 5 μ g/kg E2 injekciót kaptak szubkután. P4 előkezelést a vemhesség 15-21. napjain 0.5mg/0.1ml dózisban kaptak a vemhes állatok szubkután injekcióban. E2 és P4 olíva olajban volt oldva. A vemhesség 22. napján uterusz mintákat gyűjtöttünk, majd kontraktilitási és molekuláris vizsgálatokat végeztünk.

RT-PCR vizsgálatok

RT-PCR vizsgálatokat 22 napos vemhes patkány uterusz szövet preparátumokon végeztük (n=6-8 minden kísérletben). Teljes RNS-t Chomczynski and Sacchi (1987) extrakciós módszerével izoláltuk. PCR termékek reverz transzkripcióját és amplifikációját TaqMan RNA-to-CTTM Step One Kit és ABI StepOne Real-Time cycler használatával végeztük. β -aktin amplifikációja szolgált belső kontrollként. Minden mintával három párhuzamos mérést végeztünk. A próbák fluoreszcens intenzitását a PCR ciklus szám függvényében ábrázoltuk. Az amplifikációs ciklus megjelentése után a fluoreszcens jel első jelentős növekedését úgy definiáltuk, mint a küszöb ciklus (CT)

Westen blot analízis

20 μ g fehérjét vittünk fel 4 %-12% NuPAGE Bis-Tris géltre és XCell SureLock Mini-Cell Units készüléken elektroforézisnek vetettük alá. A gélen lévő szétválasztott fehérjét nitrocellulóz membránra transzformáltuk át iBlot Gel Transfer alkalmazásával. Az antitest kötődését Western Breeze® Chromogenic immunodetection kit segítségével detektáltuk. Az adott α -AR fehérje kötést molekulatömeg markerek azonosításával végeztük. A képek elemzése EDAS290 képalkotó rendszerrel, az immunreaktív sávok optikai denzitásának meghatározása Kodak 1D Images szoftverrel történt.

Izolált szervi vizsgálatok

Az uteruszt eltávolítottuk 22 napos vemhes patkányokból (250-350 g) (n=8-12 minden kísérletben). 0,5 cm-es gyűrűket metszettünk, a preparátumokat karbogénnel átáramoltatott de Jongh oldatot tartalmazó, 37 °C-os szervfürdőbe helyeztük. Az előfeszítés mértékét 1,5 g-ra állítottuk, ami az inkubációs idő végére 0,5 g-ra csökkent.

Az inkubálás leteltével NA β -AR-on mediálódó hatásának kiküszöbölése végett 10^{-6} M propranolollal (Sigma-Aldrich, Magyarország) kezeltük a szöveteket, az α_1 -AR antagonisták hatásának vizsgálata során az α_2 -AR-on létrejövő hatásokat yohimbinnel (10^{-6} M), míg az α_2 -AR antagonisták hatásának vizsgálata során pedig az α_1 -AR antagonista, doxazosinnal (10^{-7} M) gátoltuk a NA α_1 -AR-on mediálódó hatását. Ezután beadtuk a megfelelő α_1 - vagy α_2 -AR altípus antagonistákat, majd NA növekvő koncentrációinak segítségével (10^{-8} - $10^{-4,5}$ M) kumulatív dózis-hatás görbét vettünk fel. Az egyes beadott dózisok között 5 perc telt el. A felhasznált antagonisták a következők voltak: az altípus szelektív α_1 -AR antagonisták közül az α_{1A} -AR szelektív WB4101 (10^{-7} M) és az α_{1D} -AR szelektív BMY 7378 (10^{-7} M), az altípus szelektív α_2 -AR antagonisták közül pedig az α_{2A} -AR szelektív BRL 44408, az $\alpha_{2B/C}$ -AR szelektív ARC 239 (Tocris, UK) és az α_{2C} -AR szelektív spiroxatrin. Az adott antagonista hatására a görbe alatti terület (AUC) változásából következtettünk a kontroll AUC-hez

viszonyítva. A kontrakciók mérését SG-02 izometriás mérőfejjel végeztük (Experimetria Ltd., U.K.). A görbék regisztrálását és feldolgozását ISOSYS Data Acquisition Sytem (Experimetria Ltd., U.K.) segítségével végeztük.

A koncentráció válasz görbékét rögzítettük és a görbe alatti területeket vizsgáltuk. Az eredmények statisztikai elemzését Prism 4.01. (Graphpad Software Inc. San Diego, California, USA) segítségével végeztük. E_{max} és EC_{50} értékeket az AUC értékeiből számoltuk. Statisztikai elemzést ANOVA Dunnett teszttel vagy párosítatlan t-próbával végeztük.

Miometriális cAMP szint mérése

Az uterusz szövetmintákat de Jongh oldatot tartalmazó izolált szervi fürdőben (10ml) de Jongh oldatban inkubáltuk 37 °C-on. 3-izobutil-1-metil-xantin (IBMX) (10^{-3} M), doxazozin (10^{-7} M), propranolol (10^{-5} M), és a szövetek 20 percig voltak inkubálva a vizsgált altípus szelektív α_2 -AR antagonistákkal (10^{-7} M), majd NA-t (3×10^{-6} M) adtunk 10 percig. NA inkubációs periódus végén, forskolint (10^{-5} M) adtunk a rendszerhez további 10 percig. A miometrium cAMP akkumulációját cAMP enzim Immunoassay Kit (Cayman Chemical, USA) alkalmazásával mértük.

[³⁵S]GTP γ S kötés vizsgálatok

WB 4101, BMY 7378, BRL 44408, ARC 239 és spiroxatrin α -AR antagonistákat 0,1 μ M-os koncentrációban alkalmaztuk. NA-t növekvő koncentrációban adtuk a rendszerhez (10^{-9} - 10^{-5} M). A β -AR-ok blokkolására propranololt, az α_1 -AR antagonistákéra doxazozint, míg az α_2 -AR hatásainak kivédésére yohimbint alkalmaztunk 10 μ M-os koncentrációban. G_i fehérjék blokkolására pertusszisiz toxint (PTX) alkalmaztunk 500 ng/ml-es koncentrációban. A radioaktivitás mérését UltimaGoldTM F szcintillációs koktél és Packard Tricarb 2300TR folyadékszscintillációs számláló alkalmazásával végeztük.

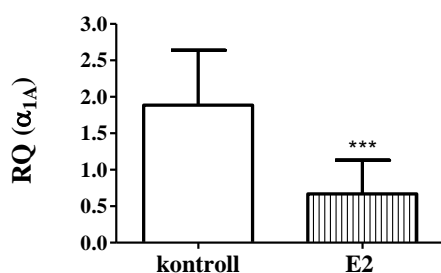
Eredmények

Az ösztrogén és progeszteron előkezelés hatása az α_1 -adrenerg receptor altípusok működésére miometriumban

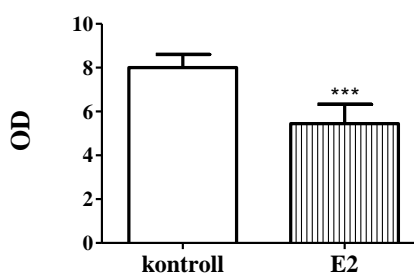
Az α_{1D} - és α_{1A} -adrenerg receptorok miometriális mRNS és fehérje expressziója

Az α_{1D} -AR-ok esetében sem az E2 sem a P4 előkezelés nem változtatta meg a receptorok mRNS szintjét. E2 előkezelés után az α_{1A} -AR altípus mRNS jelentősen csökkent (**1.a ábra**), míg P4 kezelés hatására nem történt változás. A Western blot analízis során kapott fehérje expressziós szintek megerősítik a PCR vizsgálatok során kapott eredményeket (**1.b ábra**).

(a)



(b)

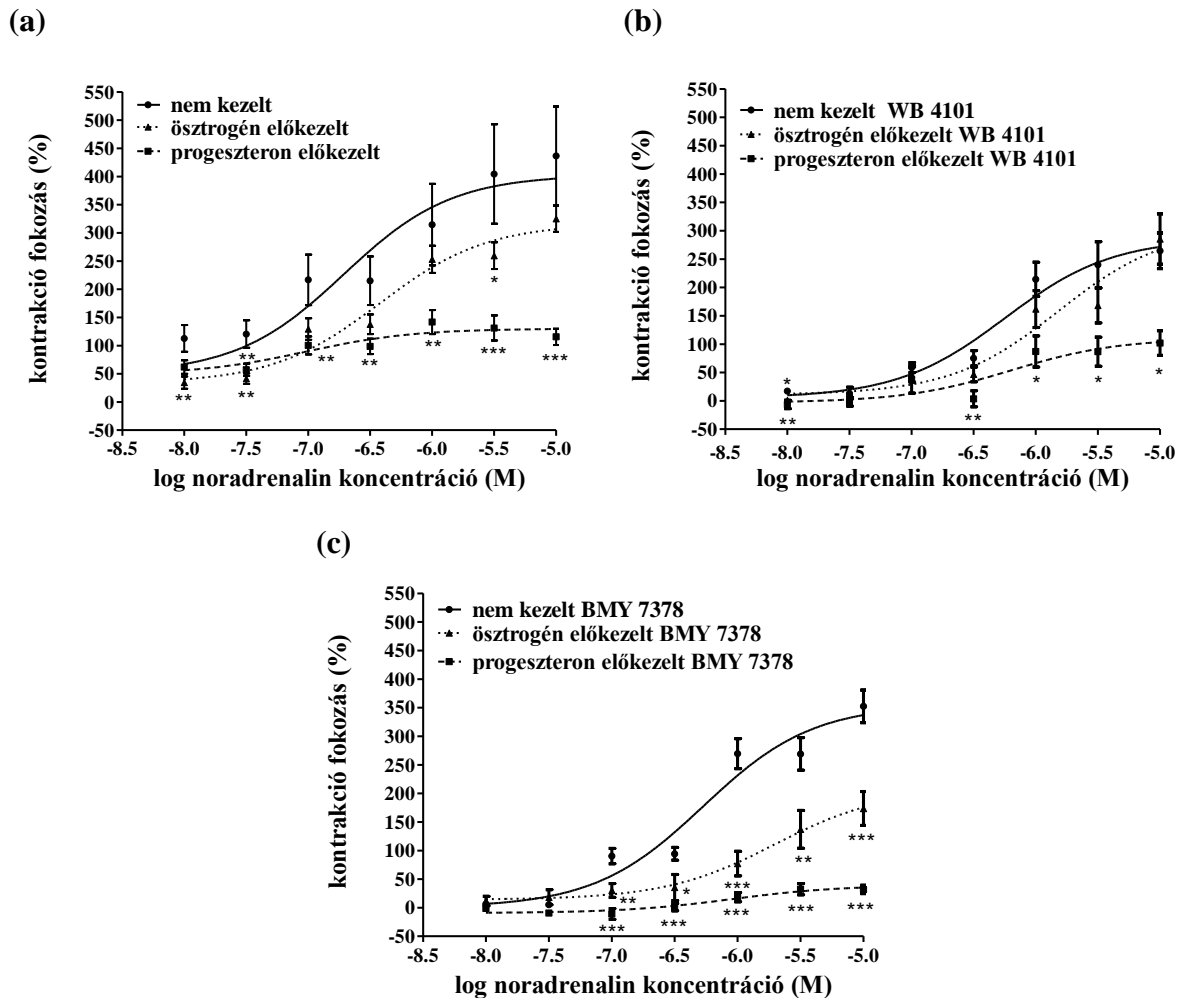


1. ábra. Az α_{1A} -AR-ok miometriális mRNS és fehérje expressziójának változásai E2 előkezelés után (**a, b**) 22 napos vemhes patkány uterusban. *** $p < 0,001$ (RQ: relatív mennyiség)

Az α_1 -adrenerg receptor altípus antagonisták hatásai 22 napos vemhes miometrium kontrakciókra

22 napos vemhes miometriumban NA növelte koncentráció függően (10^{-8} - 10^{-5} M) a miometrium kontrakciókat. E2 előkezelés után a NA koncentráció-válasz görbe jobbra tolódott és enyhén csökkentette a NA miometrium kontraháló hatását. P4 előkezelés után a NA maximális kontrakciót okozó hatása jelentősen csökkent (**2.a ábra**). α_{1A} -AR antagonistá (WB 4101) vagy α_{1D} -AR antagonistá (BMY7378) jelenlétében a NA koncentráció-hatás görbe jobbra tolódott. E2 előkezelés után, WB 4101 jelenlétében a NA koncentráció-hatás görbéje még inkább jobbra tolódott, míg a maximális kontrakciót okozó hatás nem változott. P4 előkezelés harmadára csökkentette NA maximális kontrakciót okozó hatását α_{1A} -AR antagonistá jelenlétében (**2.b ábra**).

BMY 7378 jelenlétében NA koncentráció-hatás görbe jobbra tolódott a kontroll görbéhez képest. E2 előkezelés hatására NA maximális hatása csökkent, ez a csökkenés P4 előkezelés hatására jelentősebb volt. Az E2 előkezelés az EC_{50} értékeket jobbra tolta. (**2.c ábra**).

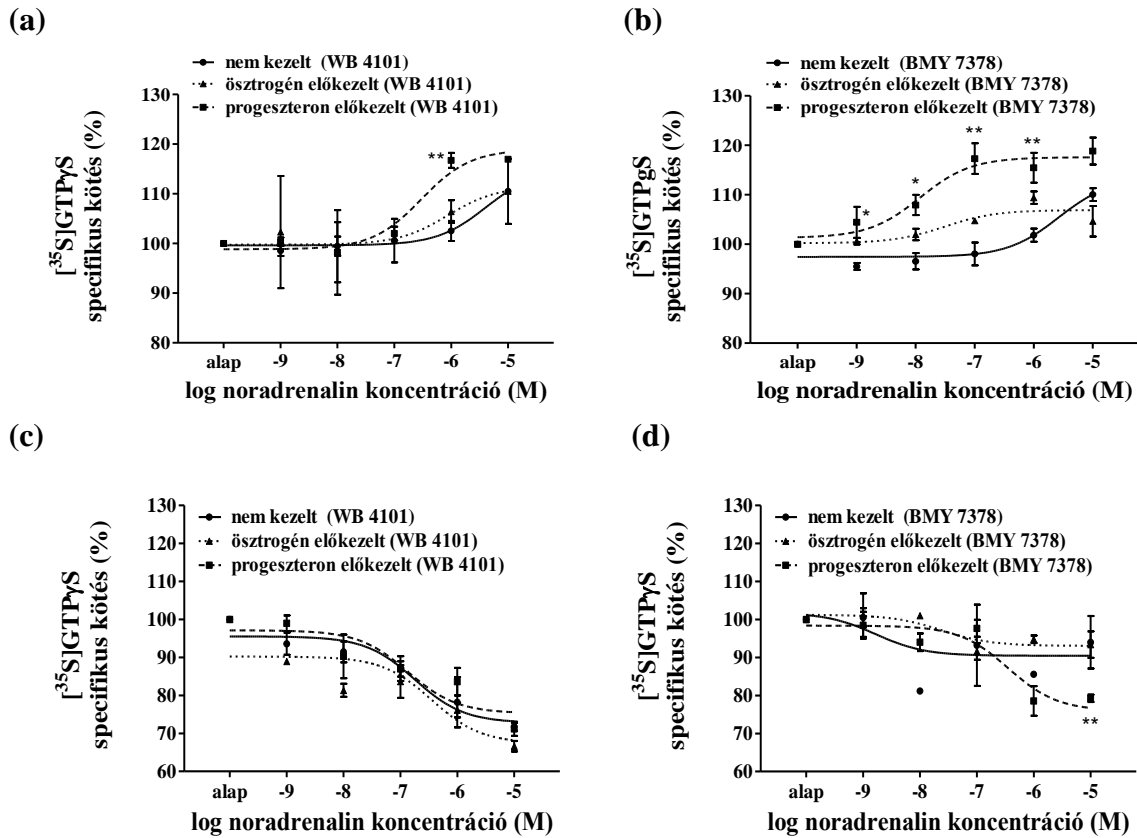


2. ábra. Az α_{1A} -AR antagonist WB 4101 és α_{1D} -AR antagonist BMY 7378 hatása a NA által kiváltott kontrakciókra 22 napos vemhes patkány miometriumban E2 és P4 előkezelés után. A vizsgálatokat β -AR antagonistá propranolol (10^{-5} M) és α_2 -AR antagonistá yohimbinn (10^{-6} M) jelenlétében végeztük, illetve α_1 -antagonisták jelenléte nélkül (a) vagy WB 4101 (b) vagy BMY 7378 jelenlétében (c) izolált szervi fürdőben. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Az altípus szelektív α_1 -adrenerg receptor antagonisták hatása a miometriális $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötés szintjére

WB 4101 jelenlétében NA enyhén növelte a $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötetést (3.a ábra). P4 előkezelés növelte a $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötés mértékét a nem kezelt értékekhez képest. BMY 7378 jelenlétében NA enyhén stimulálta a $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötetést, míg P4 előkezelés hatására NA jelentős növekedést okozott a $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötésben (3.b ábra).

PTX segítségével gátoltuk a G_i fehérjéket. WB 4101 jelenlétében, NA csökkentette a $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötetést E2 valamint P4 előkezelés után is (3.c ábra). BMY 7378 jelenlétében NA csak P4 előkezelés után csökkentette a $[^{35}S]GTP\gamma S$ kötetést (3.d ábra).

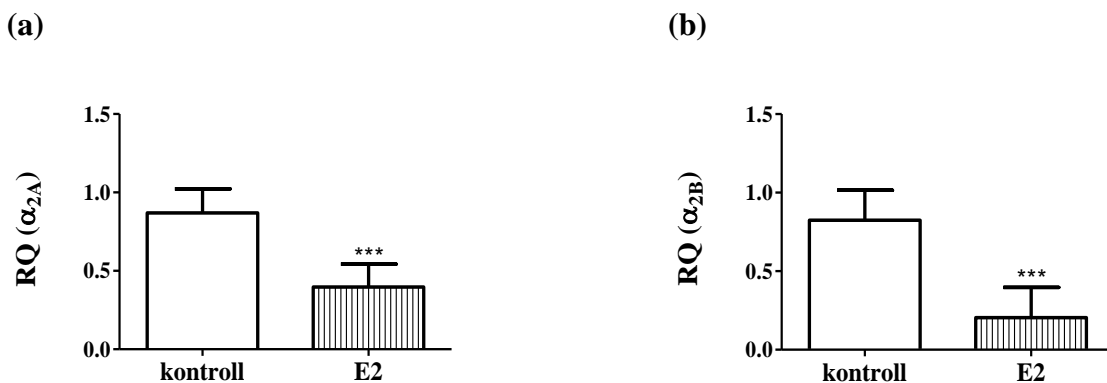


3. ábra. NA különböző koncentrációi által okozott változások a $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötésben WB 4101 (a, c) vagy BMY 7378 jelenlétében (b, d) E2 vagy P4 előkezelés után PTX hiányában (a, b) vagy jelenlétében (c, d). A β -AR-okat és az α_2 -AR-okat propranolollal és yohimbinnel gátoltuk. Az „alap” a $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötés mértéke hatóanyagok nélkül. *p<0,05; **p<0,01.

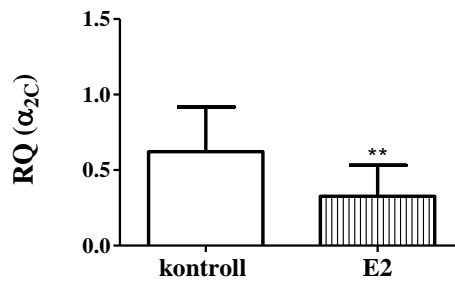
Az ösztrogén előkezelés hatása az α_2 -adrenerg receptor altípusok működésére miometriumban

Az α_2 -adrenerg receptorok miometriális mRNS és fehérje expressziója

Mindhárom α_2 -AR altípus mRNS expressziója (Fig. 4a,b,c) jelentősen csökkent E2 előkezelés után a nem kezelt uteruszhoz képest. A Western blot mérések során is azt tapasztaltuk, hogy jelentősen csökkent az α_2 -AR altípusok fehérje expressziója, mely korrelál a PCR vizsgálatok során kapott mérési eredményekkel.



(c)



4. ábra Az α_{2A} - (a), α_{2B} - (b) és α_{2C} -AR-ok (c) miometriális mRNS expressziójának változásai E2 előkezelés után 22 napos vemhes patkány uteruszban. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (RQ: relatív mennyiség)

Az α_{2} -adrenerg receptor altípus antagonisták hatásai 22 napos vemhes miometrium kontrakciókra

22 napos vemhes miometriumban, a NA 10^{-8} - $10^{-4.5}$ M koncentrációs tartományban növelte a miometrium kontrakciókat (**5.a ábra**). E2 előkezelés után NA hatása csökkent (**5.b ábra**).

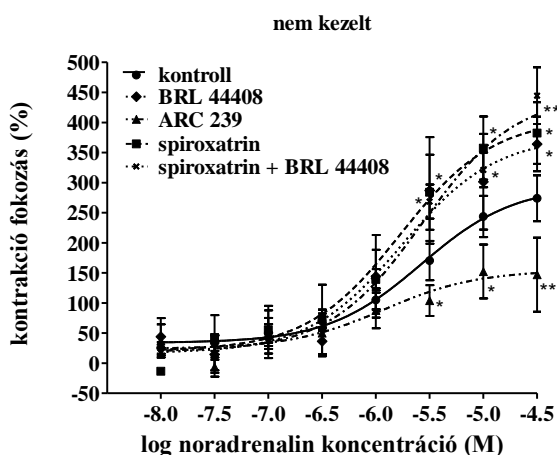
Az α_{2A} -AR antagonistá, BRL 44408 jelenlétében az E2 előkezelés növelte a NA által kiváltott kontrakciókat az E2 kezelt kontrollhoz képest (**5.b ábra**). Azonban az E2 előkezelés csökkentette NA hatását a BRL 44408 kezelt kontrollhoz képest.

Az $\alpha_{2B/C}$ -AR antagonistá, ARC 239 jelenlétében, E2 előkezelés csökkentette a miometrium kontrakciókat az E2 kezelt (**5.b ábra**), valamint az ARC 239 kezelt kontrollhoz képest.

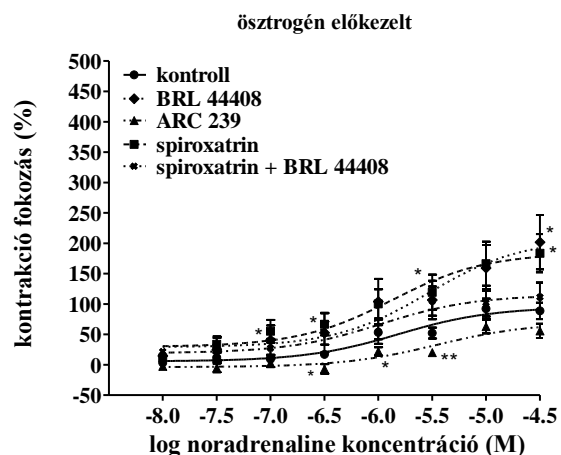
Spiroxatrin jelenlétében az E2 növelte NA hatását az E2 kezelt kontrollhoz képest (**5.b ábra**), de csökkentette a spiroxatrin kezelt kontrollhoz képest.

BRL 44408 és spiroxatrin jelenlétében az E2 nem módosította a NA maximális miometrium kontrakciót okozó hatását összehasonlítva az E2 kezelt kontrollal (**5.b ábra**), de csökkentette a BRL 44408+spiroxatrin kezelt kontrollhoz képest.

(a)



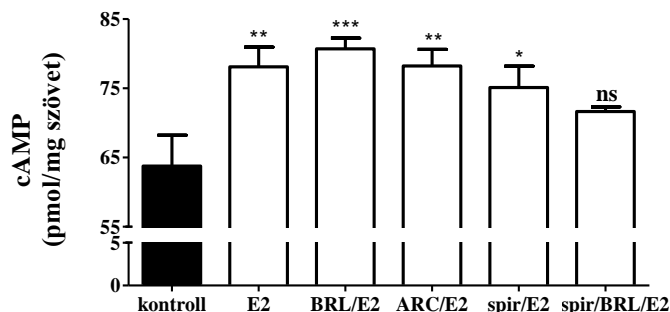
(b)



5. ábra Az α_{2A} -AR antagonistá BRL 44408, az $\alpha_{2B/C}$ -AR antagonistá ARC 239, és az α_{2C} -AR antagonistá spiroxatrin hatása NA által kiváltott kontrakciókra 22 napos vemhes patkány miometriumban (a) E2 előkezelés után (b). A vizsgálatokat β -AR antagonistá propranolol (10^{-5} M) és α_1 -AR antagonistá doxazozin (10^{-7} M) jelenlétében végeztük. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Az α_2 -adrenerg receptor antagonisták hatása a miometriális cAMP szintre ösztrogén előkezelés után

E2 előkezelés növelte a miometriális cAMP szintet (**6. ábra**) NA jelenlétében. E2 előkezelés növelte a cAMP szintet NA, BRL 44408, ARC 239 és spiroxatrin jelenlétében.



6. ábra. Az altípus szelektív α_2 -AR antagonisták (BRL 44408, ARC 239, spiroxatrin) hatása a miometriális cAMP szintre (pmol/mg szövet \pm S.D.) IBMX (10^{-3} M) és forskolin (10^{-5} M) jelenlétében 22 napos vemhes patkány uteruszban E2 előkezelés után. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

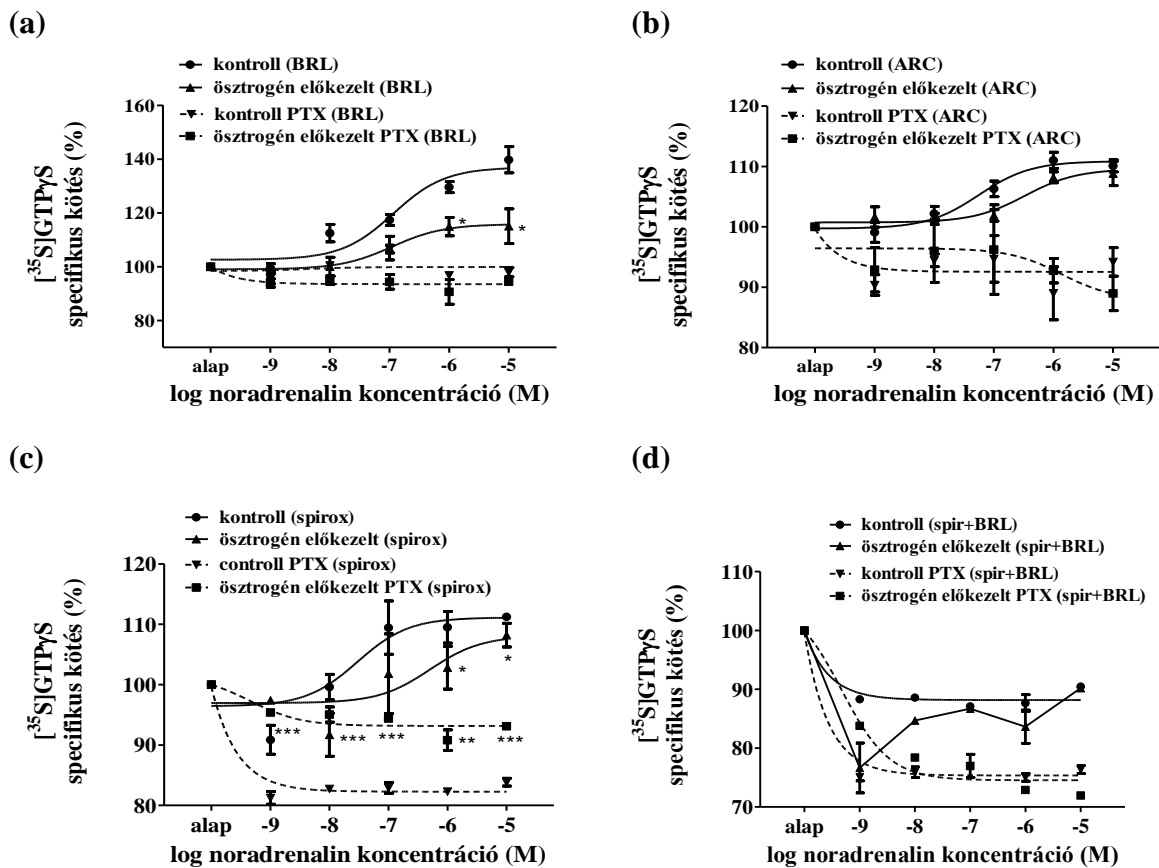
Az altípus szelektív α_2 -adrenerg receptor antagonisták hatása a miometriális [35 S]GTP γ S kötésre pertusszis toxin jelenlétében nem kezelt és ösztrogén kezelt uterusz szöveten

BRL 44408 jelenlétében a NA növelte az [35 S]GTP γ S kötetést, ami és jelentősen csökkent E2 előkezelés után. PTX jelenlétében a NA [35 S]GTP γ S kötés stimuláló hatása megszűnt és az E2 előkezelés nem befolyásolta ezt a hatást (**7.a ábra**).

ARC 239 jelenlétében a NA mérésékelten növelte a [35 S]GTP γ S kötetést az E2 előkezeléshez hasonlóan. PTX jelenlétében NA enyhén csökkentette a [35 S]GTP γ S kötetést, ami nem változott E2 kezelés hatására. (**7.b ábra**).

Spiroxatrin jelenlétében a NA növelte a [35 S]GTP γ S kötetést, amit enyhén csökkentett az E2 előkezelés. Azonban PTX jelenlétében a NA 1×10^{-9} M koncentrációtól a [35 S]GTP γ S kötetést az alap szint alá csökkentette. PTX jelenlétében az E2 előkezelés megszüntette a NA [35 S]GTP γ S kötetést gátló hatását- (**7.c ábra**).

Spiroxatrin+BRL 44408 kombináció jelenlétében NA gátolta a [35 S]GTP γ S kötetést, és az E2 további gátlást okozott a NA [35 S]GTP γ S kötésében valamint eltörölte a NA dózis függő hatását. PTX jelenlétében a spiroxatrin+BRL 44408 kombináció dózis függően gátolta a NA indukált [35 S]GTP γ S kötetést hasonlóan az E2 előkezeléshez (**7.d ábra**).

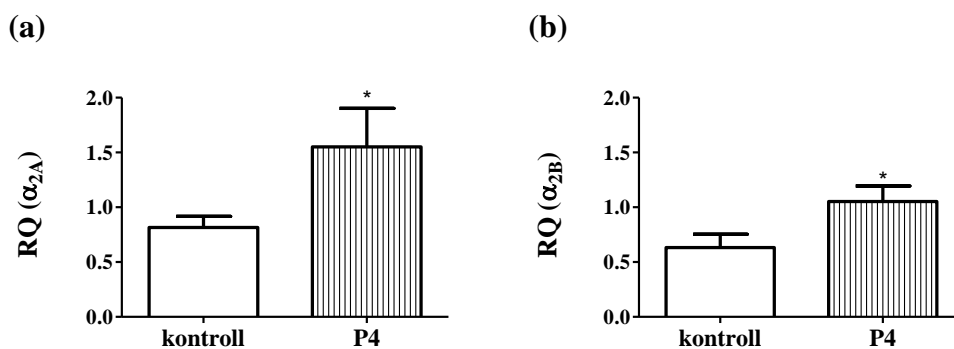


7. ábra A NA különböző koncentrációi által okozott változások $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ kötésben altípus szelektív α_{2A} -AR antagonistá BRL 44408 (a), $\alpha_{2B/C}$ -AR antagonistá ARC 239 (b), α_{2C} -AR antagonistá spiroxatrin (c) és BRL 44408+spiroxatrin kombináció (d) jelenlétében E2 előkezelés után. Minden esetben a β - és az α_1 -AR-okat propranolol és doxazozin alkalmazásával gátoltuk. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

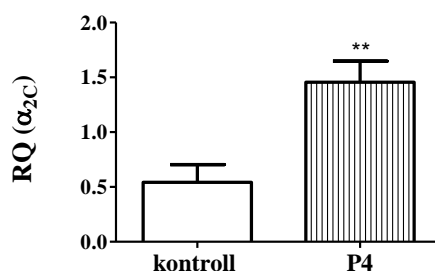
A progeszteron előkezelés hatása az α_2 -adrenerg receptor altípusok működésére miometriumban

Az α_2 -adrenerg receptorok miometriális mRNS és fehérje expresszióját progeszteron előkezelés után

Mindegyik α_2 -AR altípus mRNS expressziója (8.a,b,c ábra) jelentősen növekedett P4 előkezelés után a nem kezelt uteruszéhoz képest. Jelentősen növekedett az α_2 -AR altípusok fehérje expressziója is a P4 előkezelés után, ami korrelál a PCR vizsgálatok eredményeivel



(c)



8. ábra Az α_{2A} - (a), α_{2B} - (b) és α_{2C} -AR-ok (c) miometriális mRNS expressziójának változásai P4 előkezelés után 22 napos vemhes patkány uteruszban. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (RQ: relatív mennyiség)

Az α_2 -adrenerg receptor altípus antagonisták hatásai 22 napos vemhes miometrium kontrakciókra progeszteron előkezelés után

22 napos vemhes miometriumon a NA 10^{-8} - $10^{-4.5}$ M koncentrációban növelte a kontrakciókat (**9.a ábra**). P4 előkezelés után a NA miometrium kontrakciót okozó hatása csökkent (**9.b ábra**).

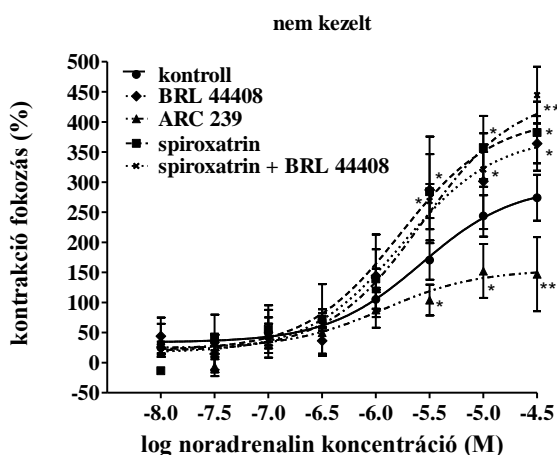
A BRL 44408 jelenlétében a P4 előkezelés csökkentette a NA által kiváltott kontrakciókat a P4 kezelt kontrollhoz képest (**9.b ábra**). BRL 44408 növelte a NA indukálta kontrakciókat, ez jelentősen csökkent P4 előkezelés után (**9.a,b ábra**).

Az ARC 239 jelenlétében a P4 előkezelés nem módosította a NA miometrium kontrakciót okozó hatását. A koncentráció-hatás görbe nagyon lapos, a különbség a maximum és a minimum között kevesebb volt, mint 20% (**9.b ábra**). Az ARC 239 csökkentette a NA indukálta kontrakciókat, melyek tovább csökkentek P4 előkezelés hatására. (**9.a,b ábra**).

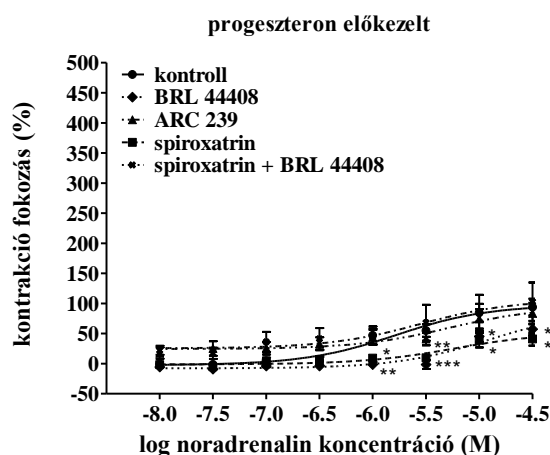
A P4 előkezelés csökkentette NA maximális kontrakciót okozó hatását spiroxatrin jelenlétében. (**9.b ábra**). Spiroxatrin növelte a NA-indukálta kontrakciókat, melyek jelentősen csökkentek P4 előkezelés hatására. (**9.a,b ábra**).

A spiroxatrin + BRL 44408 esetén a P4 előkezelés nem módosította a NA maximális miometrium kontrakciót okozó hatását a P4 kezelt kontrollhoz képest (**9.b ábra**). A két vegyület kombinációja növelte NA indukálta kontrakciókat, amelyek P4 előkezelés hatására csökkentek. (**9.a,b ábra**).

(a)



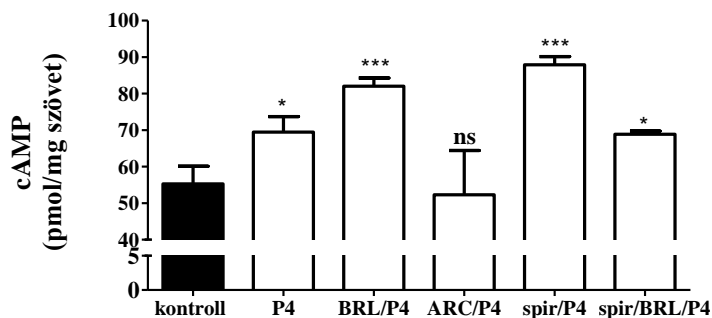
(b)



9. ábra Az α_{2A} -AR antagonistá BRL 44408, az $\alpha_{2B/C}$ -AR antagonistá ARC 239, és az α_{2C} -AR antagonistá spiroxatrin hatása NA által kiváltott kontrakciókra 22 napos vemhes patkány miometriumban (a) P4 előkezelés után (b). A vizsgálatokat β -AR antagonistá propranolol (10^{-5} M) és α_1 -AR antagonistá doxazozin (10^{-7} M) jelenlétében végeztük. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Az α_2 -adrenerg receptor antagonistá hatása a miometriális cAMP szintre progeszteron előkezelés után

P4 előkezelés növelte a miometriális cAMP szintet NA jelenlétében (10. ábra), ugyanúgy növelte a cAMP szintet BRL 44408, spiroxatrin és spiroxatrin + BRL 44408 antagonisták jelenlétében is. Azonban az ARC 239 nem befolyásolta miometriális cAMP szintet P4 előkezelés hatására.



10. ábra Az altípus szelektív α_2 -AR antagonisták (BRL 44408, ARC 239, spiroxatrin) hatása a miometriális cAMP szintre (pmol/mg szövet \pm S.D.) IBMX (10^{-3} M) és forskolin (10^{-5} M) jelenlétében 22 napos vemhes patkány uteruszban P4 előkezelés után. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Az altípus szelektív α_2 -adrenerg receptor antagonisták hatása a miometriális [35 S]GTP γ S kötés szintjére pertusszisz toxin jelenlétében nem kezelt vagy progeszteron kezelt uterusz szöveten

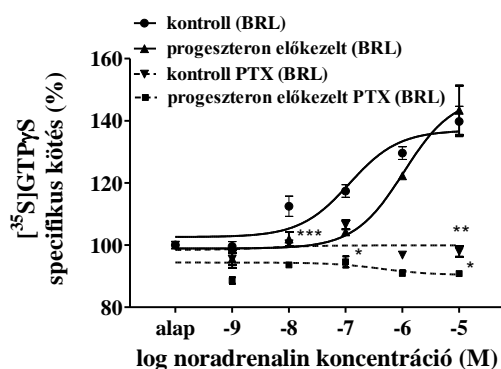
BRL 44408 jelenlétében NA növelte a [35 S]GTP γ S kötést, amely enyhén csökkent P4 előkezelés hatására. PTX jelenlétében a [35 S]GTP γ S kötés stimuláló hatása megszűnt és ez tovább csökkent P4 előkezelés hatására. (11.a ábra).

ARC 239 jelenlétében NA mérsékelten növelte a [³⁵S]GTPγS kötést és ez tovább nőtt P4 előkezelés hatására. PTX jelenlétében NA [³⁵S]GTPγS kötés stimuláló hatása megszűnt, amit a P4 előkezelés nem befolyásolt (**11.b ábra**).

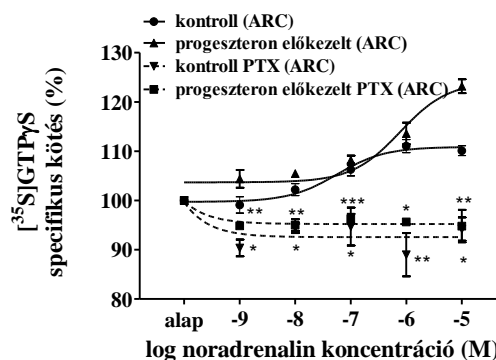
Spiroxatrin jelenlétében NA enyhén növelte az [³⁵S]GTPγS kötést és ez tovább nőtt P4 előkezelés hatására. Azonban PTX jelenlétében, NA 1 x 10⁻⁹ M koncentrációtól csökkentette a [³⁵S]GTPγS kötést az alap szint alá csökkentette. PTX jelenlétében P4 előkezelés gátolta a NA [³⁵S]GTPγS kötés-gátló hatását (**11.c ábra**).

Spiroxatrin + BRL 44408 jelenlétében NA gátolta a [³⁵S]GTPγS kötést, de ez jelentősen növekedett P4 előkezelés után. PTX jelenlétében a spiroxatrin + BRL 44408 kombináció a NA dózis-függő gátlását váltotta ki a [³⁵S]GTPγS kötésben P4 előkezelés hatására. (**11.d ábra**).

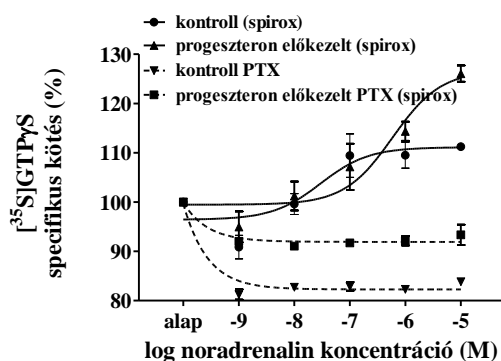
(a)



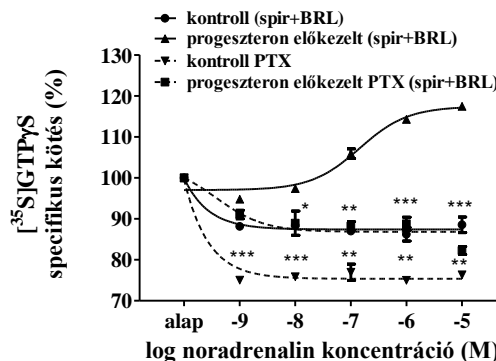
(b)



(c)



(d)



11. ábra A NA különböző koncentrációi által okozott változások a [³⁵S]GTPγS kötésben altípus szelektív α_{2A}-AR antagonistá BRL 44408 (a), α_{2B/C}-AR antagonistá ARC 239 (b), α_{2C}-AR antagonistá spiroxatrin (c) és BRL 44408+spiroxatrin kombináció (d) jelenlétében P4 előkezelés után. Minden esetben a β-AR és az α₁-AR-okat gátoltuk propranolol és doxazozin alkalmazásával. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Diszkusszió

Szexuál hormonok és adrenerg rendszer fontos szerepet tölt be a miometrium kontrakciók szabályozásában az emberi gesztációs folyamat során. Azonban mindezidáig nem történtek olyan kísérletek, melyek az E2 és a P4 befolyását vizsgálták volna az α_1 -és α_2 -AR-ok működésére vemhes patkány myometriumban. Ezért munkánk fő célja az volt, hogy vizsgáljuk az E2 és P4 hatását az α_1 -és α_2 -AR-ok működésére és expressziójára késői vemhes patkány miometriumban, *in vitro*.

Az α_1 -adrenerg receptorok és a női szexuál hormonok

Az α_{1B} -AR-okat késői vemhes patkány uterusban nem tudták kimutatni, ezért az α_{1A} - és α_{1D} -AR-ok szerepét vizsgáltuk a miometrium kontrakciókban. E2 előkezelés enyhén csökkentette NA hatását az α_1 -AR-okon keresztül, jelezve a receptorok gyengébb érzékenységét NA-ra. A P4 előkezelés csökkentette a NA maximális kontrakciót létrehozó hatását. Az α_1 -AR blokkolók jelenlétében a NA hatása csökkent megerősítve a korábbi kutatási eredményeket, hogy mind α_{1A} - és α_{1D} -AR-ok részt vesznek a miometrium kontrakciók kiváltásában.

Sem az E2, sem a P4 előkezelés nem változtatta meg az α_{1D} -AR-ok mRNS és fehérje expresszióját. Az E2 előkezelés nem okozott változást, míg a P4 előkezelés csökkentette a NA maximális miometrium kontrakciót okozó hatását és az EC_{50} értéket az α_{1D} -AR-okon keresztül. Mivel az α_1 -AR-ok főként $G_{q/11}$ fehérjéhez kapcsolódnak, ezért [35 S]GTP γ S kötés vizsgálatokat végeztünk. WB 4101 jelenlétében NA mérsékelten növelte a [35 S]GTP γ S kötést, ezt csak a P4 előkezelés tudta tovább növelni az α_{1D} -AR-okon keresztül, amely hozzájárulhat a NA csökkent miometrium kontrakciót okozó hatásához. A G_i -gátló PTX és a WB 4101 jelenlétében a NA [35 S]GTP γ S kötést stimuláló hatása gátlásba fordult át, ami felerősödött P4 jelenlétében. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy P4 túlsúly esetén az α_{1D} -AR-ok, legalább részben G_i fehérjéhez kapcsolódnak, ami NA indukálta miometrium kontrakciók csökkenéséhez vezet ezeken a receptorokon keresztül.

Az α_{1D} -AR blokkoló BMY 7378 jelenlétében NA csak az α_{1A} -AR-okat stimulálta. A fehérje expresszió csak E2 előkezelés után csökkent, mely magyarázhatja a NA csökkent miometrium kontrakciót okozó hatását E2 előkezelés után. A NA miometrium kontrakciót okozó hatása csökkent, jelezve az alacsonyabb kontraktilitási választ az α_{1D} -AR-ok hiányában. Összességében a P4 előkezelés csökkentette a NA miometrium kontrakciót okozó hatását. Az [35 S]GTP γ S kötést a NA enyhén stimulálta, míg P4 jelenlétében ez a stimuláló hatása megnövekedett. A PTX a stimuláló hatást átfordította gátlásba P4 jelenlétében, ami azt jelenti, hogy G_i kapcsoltság a meghatározó tényező az α_{1A} -AR-ok működésében P4 előkezelés után.

Ez magyarázatot ad arra, hogy a NA miért nem okoz miometrium kontrakciót P4 előkezelés hatására.

Az α_2 -adrenerg receptorok és az ösztrogén

Az E2 előkezelés csökkentette a miometriális α_2 -AR-ok mRNS és fehérje expresszióját és csökkentette a NA által kiváltott miometrium kontrakciókat az α_2 -AR-okon keresztül. Az izolált szervi vizsgálatok és a miometriális cAMP szint változások szerint E2 előkezelés csökkentette a NA által kiváltott kontrakciókat az α_2 -AR-okon keresztül, habár ez nem módosította az α_{2A} -AR-okon keresztül a miometriális relaxáló hatást. Azonban E2 előkezelés megszüntette a miometrium kontrakció növelő hatást az α_{2B} -AR-okon keresztül. Mivel szelektív α_{2B} -AR antagonisták jelenleg nem léteznek, így csak feltételezni tudjuk, hogy az E2 nem módosítja a miometriális relaxáló hatást az α_{2C} -AR-okon keresztül.

Az α_2 -AR-ok nem csak G_i fehérjék α -alegységéhez tudnak kapcsolódni, hanem bizonyos körülmények között a G_s fehérjékhez is. Kimutatták, hogy az E2 csökkenti az α_2 -AR-ok G -fehérjéhez való kapcsolódását. PTX jelenlétében az E2 nem módosította az α_{2A} -AR-ok [35 S]GTP γ S kötésre gyakorolt hatását, de visszafordította a NA hatást az α_{2A} - és α_{2B} -AR-okon (spiroxatrin jelenlétében). Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy az E2 módosítja az α_{2B} -AR-ok kapcsolódását, de nem változtatja az α_{2A} -AR G -fehérje kötését. Hogy feltételezésünket bizonyítsuk, megmértük az α_{2B} -AR-ok [35 S]GTP γ S kötését spiroxatrin + BRL 44408 jelenlétében. Az E2 csökkentette az aktivált G -fehérje mennyiségét, mely valószínűleg az E2 indukálta α_{2B} -AR-ok G -fehérjétől való szétkapcsolódásának következménye.

Az α_2 -adrenerg receptorok és a progeszteron

A P4 előkezelés növelte az α_2 -AR altípusok mRNS és fehérje expresszióját, de csökkentette a NA által kiváltott miometriális kontrakciókat.

P4 előkezelés blokkolta NA kiváltotta miometriális kontrakciókat az α_2 -AR-okon keresztül, habár ez gyakorlatilag az α_{2A} -AR-okon a hatás megszűnését jelentette. Emellett az α_{2B} -AR-ok miometrium kontrakciót növelő hatását is gátolta. Szelektív $\alpha_{2A/B}$ -AR gátló hiányában, csak feltételezni tudjuk, hogy a P4 a miometrium relaxáló hatást az α_{2C} -AR-ok működésén és megnövekedett számán keresztül tartja fenn.

Az α_2 -AR-ok G_i/G_s aktiváló tulajdonsága patkányokban a gesztáció során változik, ami eltéréseket eredményez az adenilát-cikláz aktivitás szabályozásában a vemhesség során. A P4 nem módosította az α_{2A} -AR-ok [35 S]GTP γ S kötését. Azonban α_{2A} - és α_{2B} -AR-ok esetén (spiroxatrin jelenlétében), a P4 PTX jelenlétében visszafordította a NA [35 S]GTP γ S kötésre gyakorolt hatását és növelte a stimuláló hatását. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a P4 módosítja az α_{2B} -AR-ok kapcsolódását, de nem módosítja az α_{2A} -AR-ok G fehérje kötését. A

[³⁵S]GTP γ S kötés változása bizonyítja ezt a feltételezést spiroxatrin + BRL 44408 jelenlétében is. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy P4 túlsúly esetén az α_{2B} -AR-ok, legalább részben, G_s fehérjéhez kapcsolódnak.

Konklúzió

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az α_1 - és α_2 -AR altípusok működését eltérőképpen befolyásolják a női nemi hormonok.

Munkánk során nem volt lehetőségünk human miometriumon is vizsgálatokat végezni, de előfordulhat, hogy az α_1 - és α_2 -AR altípusok működése különböző humán és patkány miometriumban. Azonban ezek az eredmények is segíthetik a terhesség során végbemenő változások fiziológiájának jobb megértését. Feltételezzük, hogy az egyes altípus szelektív agonisták vagy antagonisták alkalmasak lehetnek a rendellenes miometrium kontraktilitás kezelésére. A különböző α -AR altípus antagonisták alkalmazásával a teljes koraszülési folyamat valószínűleg nem állítható meg, ugyanakkor a szelektív α_1 - és α_2 -AR altípus antagonisták P4-nal való kombinációja klinikai jelentőséggel bírhat.

Függelék

Az értekezés alapját képező közlemények

I Bóta J, Hajagos-Tóth J, Ducza E, Samavati R, Borsodi A, Benyhe S, Gáspár R. The effects of female sexual hormones on the expression and function of α_{1A} - and α_{1D} -adrenoceptor subtypes in the late-pregnant rat myometrium.

European Journal of Pharmacology 769: pp. 177-184. (2015) [IF: 2.730]

II Hajagos-Tóth J, Bóta J, Ducza E, Csányi A, Tiszai Z, Borsodi A, Samavati R, Benyhe S, Gáspár R. The effects of estrogen on the α_2 -adrenergic receptor subtypes in rat uterine function in late pregnancy in vitro.

Croatian Medical Journal 57:(2) pp. 100-109. (2016) [IF: 1.483]

III Hajagos-Tóth J, Bóta J, Ducza E, Samavati R, Borsodi A, Benyhe S, Gáspár R. The effects of progesterone on the α_2 -adrenergic receptor subtypes in late-pregnant uterine contractions in vitro.

Reproductive Biology and Endocrinology 14(1) pp. 33. (2016) [IF: 2.147]

Előadások az értekezés témában:

I Bóta J.

Progeszteron kezelés hatása az alfa-adrenerg receptorok működésére vemhes patkány uterusban

Scientific Students' Associations Conference (TDK), Szeged, Hungary, 2013 (Előadás)

II Hajagos-Tóth J, Bóta J, Ducza E, Samavati R, Benyhe S, Gáspár R.

The effect of progesterone on the expression and function of the different α_2 -adrenergic receptor subtypes in late pregnant rat myometrium

FEPS, Kaunas, Lithuania 2015 (Előadás)

III Hajagos-Tóth J, **Bóta J**, Ducza E, Samavati R, Benyhe S, Borsodi A, Gáspár R.
The effect of oestrogen on the expression and function of the different α_2 -adrenergic
receptor subtypes in late pregnant rat myometrium
RECOOP TriNet Meeting, Prague, Czech Republic 2015 (Előadás)

IV Hajagos-Tóth J, **Bóta J**, Ducza E, Csányi A, Tiszai Z, Samavati R, Borsodi A,
Benyhe S, Gáspár R.
The effects of estrogen on the α_2 -adrenergic receptor subtypes in rat uterine function
in late pregnancy in vitro
Bridges in Life Sciences 11th Annual Scientific Conference, Prague, Czech Republic 2016
(Előadás)

V **Bóta J**, Hajagos-Tóth J, Ducza E, Gáspár R.
Progeszteron kezelés hatása az α -adrenerg receptor altípusok működésére vemhes
patkány uteruszban
XV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, Hungary, 2014. (Poszter)

VI **Bóta J**, Hajagos-Tóth J, Ducza E, Samavati R, Benyhe S, Borsodi A, Gáspár R. Alteration
in the expression and function of α_1 -adrenergic receptor subtypes in late
pregnant rat uterus by progesterone and oestrogen pretreatment
FEPS, Kaunas, Lithuania 2016 (Poszter)