

Zárójelentés – Szakmai beszámoló 2007

OTKA T-37440 (2002-2006)

Témavezető: Dr. Környei József László

Opiooid peptidek sejtproliferációt gátló hatásmechanizmusának további vizsgálata uterusban

Eredmények

Az alábbiakban az alpontok számozását a Szerződés Munkatervében foglaltak szerint tüntettük fel, bár időben, a különböző problémák következtében, nem a Szerződés Munkatervében foglalt sorrend szerint végeztük el a munkákat.

1./ Az endogén opiooid peptidek ösztadiol által indukált-, epidermális növekedési faktor által indukált-, és/vagy a bazális, nem stimulált uterus sejt szaporodást gátló hatásának mechanizmusa hogyan változik patkányban az egyedfejlődés alatt.

Az alábbiakban részletezett legfontosabb eredményeinket nemzetközi szakfolyóiratban közzeltük: J.L. Környei, Z. Vértes, K.A. Kovács, P.M. Gócze, M. Vértes: Developmental changes in the inhibition of cultured rat uterine cell proliferation by opiooid peptides. **Cell Prolif.** **2003**, **36: 151-163**. Ezt megelőzően hazai és nemzetközi kongresszusokon ennél több, részletesebb adatot tudtunk bemutatni illetve megjelentetni: 1./ Környei J.L., Vértes Z., Kovács K.A., Gócze P.M., Lengyel F., Vértes M.: Életkorfüggő opiooid peptid hatás patkány uterus sejtekben. A Magyar Élettani Társaság LXVII. Vándorgyűlése, 2003, Pécs, Összefoglalók 104. old.; 2./ J.L.Környei, Z. Vértes, K.A. Kovács, P.M. Gócze, F. Lengyel, M. Vértes: Ontogeny of opiooid peptide action in rat uterine cells. 36th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Cincinnati, Ohio, USA, **Biology of Reproduction** **68: Suppl. 1.: p.217., 2003**

Az ösztadiol uterus sejtek proliferációját szabályozó szerepe mind élettani mind klinikai szempontból nagy jelentőséggel bír. Az irodalomból ismert, hogy az ösztrogén mitogén hatásának a mediálásában különböző parakrin faktorok vesznek részt, többek között az epidermális növekedési faktor. A mitogén hatásokat ellensúlyozó parakrin negatív regulátorként az opiooid peptidek szerepét laboratóriumunk vetette fel, és azóta egyre több adat támasztja alá.

Ivarérett, ovariectomizált patkány uterusban az opiooid peptidek mind in vivo, mind in vitro sejt kultúrában gátolják az ösztadiol által kiváltott DNS-szintézist illetve sejtproliferációt. Az uterusban az ösztadiol szintén a nukleáris receptorán keresztül epidermális növekedési faktor szekréciót indukál, mely parakrin úton fejt ki mitogén hatását. Felnőtt patkányok uterus sejtenyészeteiben az opiooid peptidek gátolják az EGF stimulálta sejtproliferációt is. Laboratóriumunk adatai szerint in vivo körülmények között fejlődés alatt lévő patkányban [D-Met²-Pro⁵]-enkefalinamid (ENK) kezelés az uterus EGF tartalmát és az EGF receptor számot is csökkentette.

A patkány egyedfejlődése során markáns endokrin változások vezérlik az uterus fejlődését. Laboratóriumunk adatai szerint in vivo körülmények között az opiooid peptidek a fejlődés alatt gátolják a nem stimulált uterusban folyó sejt szaporodást.

Jelen kísérleteinkben különböző életkorú patkányok uterusából származó, kevert sejtes primer sejt kultúrákban. *in vitro* vizsgáltuk meg [D-Met²-Pro⁵]-enkefalinamid (ENK) és egyéb opioid peptidok nem stimulált-, valamint az ösztradiol- (OE), és epidermális növekedési faktor (EGF) által stimulált uterus sejtproliferációra kifejtett gátló hatásának a patkány egyedfejlődés alatti változásait.

Módszerek:

Módszerünkben a 60 napos felnőtt nőtény patkányokat ovariectomizáltuk, majd ösztradiollal előkezeltük. A patkányok uterusait steril úton eltávolítottuk, darabolás után limitált tripszin-kollagenáz emésztéssel diszpergáltuk, majd tripánkék vitál festést követően cm²-ként 10.000 élő sejttel ültettük el, és Dulbecco's Modified Eagle's Medium tápoldatban tenyésztettük 10 % főtális bovin szérum jelenlétében. A tápoldatot kétnaponta frissre cseréltük. Az életkorok szerint eltérő, optimális sejt diszpergálási módszereket kidolgoztuk. A fiatal állatok uterusait ovariectomia és ösztrogén előkezelés nélkül rövidebb idejű, kevesebb enzimet használó emésztésekkel diszpergáltuk. A sejttenyészetek 7-10 nap alatt érték el a konfluens stádiumot. Az átlagos populáció megkettőződési idő (APDT) fokozatosan nőtt az állatok életkorával (0,7-2,5 nap), de 42 napos korban egy erőteljes proliferáció gyorsulás figyelhető meg a sejt kultúrákban. A kezelések a 3 napos letapadási periódust követően folyamatosan jelen voltak a tápoldatban. A sejt denzitás meghatározást a szubkonfluens fázisban végeztük. A sejtsűrűség meghatározását tripánkék festést követően sejtszámolással, Burton féle DNS meghatározással, valamint MTT sejtproliferációs assay-vel végeztük.

A kísérleteket legalább háromszor ismételtük hasonló eredménnyel, ezeken belül a kísérleti pontok 6 mérési adat átlagát képviselik a standard error-ral együtt. Kísérleti adataink eltéréseit variancia analízist követő Student-Newman-Keul's Multiple Range Test-ek segítségével elemeztük. A kontrolltól és egymástól való eltérést P<0.01 valószínűségi szintnél tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények:

A sejttenyészetek két napos letapadás után gyors szaporodásnak indultak és 8-10 nap alatt konfluens fázist értek el. Az ösztradiol (OE) által stimulált sejtproliferációt D-met²-pro⁵-enkefalinamid (ENK) minden vizsgált időpontban a kontrol szintjére csökkentette. Az epidermális növekedési faktor (EGF) és az enkefalinamid kezelés sejtsűrűsége gyakorolt hatását az idő függvényében vizsgálva, az EGF kezelés hatására erőteljes sejtsűrűség növekedést tapasztaltunk. Ezen stimuláló hatást az enkefalinamid az 5-11 nap között a kontrol szintjére csökkentette, később a hatás csökkent illetve megszűnt. A sejttenyészetek sűrűségének meghatározása szubkonfluens fázisban, a maximális hatás periódusában; a 7.-9. nap között történt. A kevert sejtes uterus sejttenyészetekben a myofibroblast és az epitheloid megjelenésű sejtek körülbelül azonos arányban voltak jelen. Az élő sejtek aránya a kísérleteink során 95% fölött volt.

További kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogyan alakul az ENK gátló hatása az OE ill. EGF különböző koncentrációinak megfelelően. Az ösztradiol sejtproliferációt fokozó hatása 0,1 nM koncentrációnál jelentkezett, a maximumát 1 és 2 nM körül érte el. Magasabb koncentrációknál a stimuláló hatása csökkent, és 10 nM vagy magasabb értékeknél már meg is szűnt. Az EGF a kontrollhoz képest a sejtsűrűséget koncentrációtól függő módon megnövelte, a hatás maximumát 1 nmol-nál észleltük. Az enkefalinamiddal történt gátlás minden OE ill. EGF koncentráció mellett hatásosnak bizonyult.

Kísérleteinkben az enkefalinamid sejtproliferációt gátló hatásának koncentráció függését is megvizsgáltuk. Az EGF a kontrol sejtsűrűséget 100 %-kal megnövelte. A sejtszám az egyidejű enkefalinamid kezelés hatására koncentráció függő módon a kontrol szintre csökkent le. Ezen gátló hatás felének eléréséhez 0.3 - 1.2 nM-os enkefalinamid koncentráció elegendőnek

bizonyult, ami szintén a fiziológias tartományba esik. A maximális gátló hatás már 30 nM koncentrációnál megvalósult.

A további kísérleteinkben az ENK sejtproliferációt gátló hatását megvizsgáltuk a nem stimulált, az ösztrogén által és az EGF által stimulált különböző korú állatokból származó sejt kultúrákban. Kezelésként ösztradiolt 2.2 nM, EGF 1nM, ENK 100nM, NAL 100nM koncentrációban alkalmaztunk.

EGF minden életkorú patkány uterusából származó sejt kultúrában megnövelte a sejtsűrűséget. Az ösztradiol válaszkészség 21 napos korban jelent meg.

Életkor szerint az enkefalinamid-hatás kétfázisúnak mutatkozott;

7 napos állatoknál ENK kezelés mind a nem stimulált, mind az EGF által stimulált kultúrákban azonos mértékben csökkentette a sejtsűrűséget. A 7 napos patkány uterus sejt kultúrákban ENK a nem stimulált sejtproliferációt gátolta, az ópiát receptor antagonistá naloxon ezen gátlást felfüggesztette, míg naloxon önmagában nem befolyásolta a sejtszaporodást, jelezve, hogy tónusos opioid gátlás valószínűleg nincs. Ösztradiol nem volt hatással a sejtsűrűségre, ENK jelenléte itt is csökkentette a sejtszaporodást, melyet naloxon ugyanúgy kivédett. Az epidermális növekedési faktor jelentősen megnövelte a sejtszámot. ENK az előzőekhez hasonló mértékben gátolt, melyet naloxon ugyanúgy felfüggesztett.

14 napos életkorban az ENK gátló hatása nem volt megfigyelhető. A 14 napos patkány uterus sejt kultúrákban ENK jelenléte sem a nem stimulált, sem a stimulált sejtszaporodást nem befolyásolta. Ebben az egyedfejlődési stádiumban ösztradiol még nem volt hatással a sejtproliferációra, EGF azonban erőteljesen növelte a sejtszaporodást, melyet ENK jelenléte nem befolyásolt.

21 napos korban jelent meg a sejtek ösztradiol-válaszkészsége, itt ösztradiol hatására már szignifikánsan fokozódott a sejtproliferáció. ENK hatásosan gátolta mind az OE- mind az EGF-stimulált sejtszaporodást, azonban a nem stimulált sejtszaporodásra már nem volt hatással. Naloxon az ENK gátló hatását mind ösztradiol, mind EGF esetében antagonizálta.

A 28-napos sejt kultúrákban OE és EGF közel azonos mértékben növelte meg a sejtsűrűséget, ENK mindkét esetben teljes mértékben legátolta a stimulációt. A nemstimulált proliferációra itt sem volt már hatással.

A 60-napos patkány uterus kevert sejtes tenyészetekben OE 40%-kal, EGF 100%-kal növelte meg a sejtsűrűséget.

21 naptól kezdődően (a vizsgált 21, 28, 35, 42 és 60 napos életkorokban) az OE és EGF által stimulált sejtszaporodást gátolta teljesen az ENK. A nem stimulált sejtproliferációra az ENK ezen életkorokban már nem volt hatással.

A kevert sejtes kultúrákban a fenti hatások mind az epiteloid, mind a myo-fibroblast jellegű sejteken azonos mértékben voltak megfigyelhetők.

A hüvely nyitott vagy zárt állapotának megfelelően a 35 napos korban nem találtunk különbséget, illetve a 42 és 60 napos korban a vegyes ciklusú és az ovariektómiát követően OE-kezelt 60 napos állatok uterusából létesített sejt kultúrákban a kezelések hatásai azonos jellegűek voltak.

A sejtsűrűség sejt számolással történt meghatározásával azonos jellegű és mértékű hatásokat figyeltünk meg az MTT sejtproliferációs teszt alkalmazásával és a sejt kultúrák DNS tartalmának esetenként történő meghatározásával is.

Adataink alapján kísérleti modellként a legmarkánsabb és eltérő hatásokat mutató, igen gyorsan szaporodó sejtekből álló 7 napos és 42 napos, illetve negatív kontrollként a 14 napos patkányok uterusából származó sejt kultúrák alkalmazása célszerű a továbbiakban.

A következőkben szelektív opioid peptidokkal vizsgáltuk az ENK hatás mediálásában szereplő egyes ópiát receptor altípusokat. Kísérleteinkben [D-Met²-Pro⁵]-enkefalinamid (ENK) mellett további opioid peptidok sejtproliferációt gátló hatását is megvizsgáltuk a nem stimulált,

az ösztadiol (OE) által, és az epidermális növekedési faktor (EGF) által stimulált, különböző életkorú patkányok uterusából származó, kevert sejtes primer sejt kultúrákban.

7 napos állatoknál a nem szelektív enkefalinamid ENK és [Met⁵]-enkefalin (az "opioid growth factor receptor" endogen ligandja) kezelés mind a nem stimulált, mind az EGF által stimulált kultúrákban azonos mértékben csökkentette a sejtsűrűséget. Ugyanakkor 30 nM μ -szelektív agonista DAMGO, delta specifikus DPDPE, kappa agonista Dynorhin-A, [Leu⁵]-enkefalin, béta-endorfin, és morfineptin hatástalannak bizonyult.

14 napos életkorban az opioid peptidek gátló hatása nem volt megfigyelhető.

21 naptól kezdődően (a vizsgált 21, 28, 35, 42, 60 napos életkorokban) már az OE és EGF által stimulált sejtszaporodást gátolta az ENK és DAMGO, míg 30 nM DPDPE, Dynorhin-A, [Met⁵]-enkefalin, [Leu⁵]-enkefalin, béta-endorfin, és morfineptin jelenlétében sejtsűrűség változás nem volt kimutatható.

Tenyésztett felnőtt patkány uterus sejteken tehát az enkefalinamid proliferációt gátló hatása már döntően a μ receptorok által mediált. Ezen változás a működőképes ösztrogén és progeszteron receptorok egyedfejlődés alatti megjelenéséhez kötött.

Összefoglalva:

EGF az összes korcsoportban megnövelte a sejtsűrűséget.

Az ösztadiol a 7-és 14-napos korban nem befolyásolta a sejtproliferációt, stimuláló hatása 21-napos korban jelent meg, és 28- 35- 42 és 60-napos korban vált kifejezetté.

Enkefalinamid 7-napos korban mind a nem stimulált bazális, mind a stimulált proliferációt azonos mértékben csökkentette.

Enkefalinamid a 14-napos sejt kultúrákban nem befolyásolta a sejtsűrűséget.

Enkefalinamid a 21-, 28-, 35-, 42- és 60-napos korban gátolta a stimulált sejtszaporodást, míg a nem stimuláltra már nem volt hatással.

Az ópiát antagonistá naloxon az összes korcsoportban kivédte az ENK gátló hatásait.

A megfigyelt hatások a fiziológiás nM-os koncentráció tartományban voltak.

Felnőtt patkány uterusban az ópiát hatás döntően a μ receptor (MOR) bevonásával valósul meg.

Eredményeink arra utalnak, hogy az opioid peptidek uterusban folyó sejtszaporodást gátló hatása az életkortól függ. A patkány egyedfejlődés során uterusban az opioid peptidek sejtproliferációt gátló hatása két különböző jellegű és hatásmechanizmusú fázisra osztható, melyeket egy érzéketlen periódus választ el egymástól. Adataink alapján feltételezhetjük, hogy a szexuál szteroid, az opioid peptid és a növekedési faktor rendszerek közti sejtszintű kölcsönhatásoknak fontos szerepe lehet a patkány uterus fejlődésének szabályozásában.

2./ Felnőtt patkányokból származó uterus sejttenyészetekben módszertani erőfeszítéseket kívánunk tenni az opioid peptidek sejtproliferációt gátló szerepének elkülönített sejt típusok szerinti vizsgálata irányában.

Patkány uterusban a döntően (1) endometrium epitél, (2) endometrium stroma és (3) myometrium simaizom + stroma frakciók elkülönítésére alkalmas sejt diszpergálási módszerek kidolgozása megtörtént.

Kísérleteinkben az alkalmazott kezelések azonos hatásokat váltottak ki a különböző sejt típusok tenyészeiben, ezért a továbbiakban nem foglalkoztunk a kérdéssel, a kevert sejtes primer sejt kultúrákat használtuk in vitro modellként.

4./ A sejtproliferáció mérési módszereink fejlesztése ³H-timidin beépülés és/vagy proliferáció markerek mérése irányában.

Mérési módszereink fejlesztése céljából, az anyagi lehetőségeinknek megfelelően, az élő biomassza mennyiségét fotometriás úton mérő MTT sejtproliferációs teszt beállítását végeztük el a már rendelkezésünkre álló eszközökre adaptálva. A sejt kultúrák teljes DNS tartalmának meghatározását Burton módszerrel végeztük.

3./ A progeszteron receptor esetleges szerepe az opioid peptideknek az uterus sejtek proliferációját gátló hatásában felnőtt korú és fejlődő állatokból nyert sejt kultúrákon.

Adataink eddigi közlési formája:

1./ Környei J.L., Zelkó A., Lengyel F., Vértes Z., Kovács K.A., Vértes M.: Ópioid peptidek és progeszteron kölcsönhatása patkány uterus sejtek proliferációjának szabályozásában. A Magyar Élettani Társaság LXVIII. Vándorgyűlése, 2004, Debrecen, Összefoglalók 42. old.

Munkacsoportunk előző közleményei alapján ismeretes az opioid peptideknek az uterust érő mitogén hatásokat ellensúlyozó parakrin negatív szabályozó szerepe.

Patkány uterusban az ópioid peptidek gátolják az ösztadiol által kiváltott DNS-szintézist illetve sejtproliferációt. Uterusban az ösztadiol és az epidermális növekedési faktor szoros együttműködésben vezérli a sejtosztódást, és az opioid peptidek gátolják az EGF-stimulálta sejtproliferációt is.

Mivel az opioid peptidek és a progeszteron egyaránt gátolják az uterusban zajló sejtproliferációt, jelen kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy hatásmechanizmusukban eltérő vagy közös elemeket használnak-e? Ezért megvizsgáltuk, hogy az opioid peptidek hatásában szerepel-e a progeszteron receptor rendszer, illetve a progeszteron által kifejtett gátló hatás kapcsolatban áll-e az opioid peptidek hatásmechanizmusának elemeivel.

Módszerek:

Az alkalmazott módszerek azonosak voltak az 1. pontban fent részletezettekkel.

Eredmények:

Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy az antiprogeszteron mifepriston (RU486) felfüggeszti-e a [D-Met²-Pro⁵]-enkefalinamid (ENK) sejtproliferációt gátló hatását, illetve, az ópiát antagonistá naloxon kivédi-e a progeszteron antiösztrogén, gátló jellegű hatását a nem stimulált, az ösztadiol (OE) által, és az epidermális növekedési faktor (EGF) által stimulált, különböző életkorú patkányok uterusából származó, kevert sejt sejt kultúrákban.

Felnőtt patkány uterus sejt kultúrákban megvizsgáltuk, hogy a progeszteron receptor rendszer közreműködik-e az opioid peptidek által kifejtett proliferáció-gátlásban. A kontrol értékhez képest az ösztadiol szignifikánsan megnövelte a sejtszámot, ezen serkentő hatását az enkefalinamid gátolta. A progeszteron receptor antagonistá RU486 az opioid peptid gátló hatását felfüggesztette. Meglepetésként az ösztadiol-indukálta sejtproliferációt az RU tovább fokozta, sőt az antiprogeszteron RU486 önmagában is erős mitogén hatásúnak bizonyult.

A következő kísérletsorozatban megvizsgáltuk magának a progeszteronnak a hatását is. Az enkefalin által kifejtett sejtosztódást gátló hatást a progeszteron tovább mélyítette. Progeszteron önmagában is csökkentette a sejtproliferációt, de a legalacsonyabb sejtszámot ösztadiol és progeszteron együttes jelenlétében mértük.

A továbbiakban megvizsgáltuk azt is, hogy a progeszteron gátló hatásában szerepelnek-e az opioid peptidek hatásmechanizmusának elemei. A specifikus ópiát receptor antagonistá naloxon jelenléte felfüggesztette a progeszteron sejtosztódást gátló hatását mind a

nem stimulált, mind az ösztadiol által stimulált tenyészetekben. Ugyanakkor naloxon önmagában nem befolyásolta sem a bazális, sem a stimulált sejtproliferációt.

Az uterusban az ösztadiollal szorosan együttműködő epidermális növekedési faktor erősen megnöveli a tenyésztő flakák DNS tartalmát. Enkefalinamid az EGF által stimulált sejtproliferációt is gátolja. A progeszteron receptor antagonistá RU486 az opioid peptid ezen gátló hatását is kivédte. RU önmagában is hatásos serkentő tényezőnek bizonyult, sőt még az EGF által stimulált intenzív sejtszaporodást is képes volt még tovább fokozni.

Progeszteron az EGF serkentő hatását is képes gátolni és az előzőekhez hasonlóan az ópiát antagonistá naloxon felfüggesztette a progeszteron sejtproliferációt gátló hatását mind a nem stimulált, mind az EGF által stimulált tenyészetekben. Naloxon önmagában itt sem változtatta meg a sejtsűrűségeket.

Ismeretes, hogy a progeszteron receptorok ösztadiol jelenlétében fokozottabb mértékben fejeződnek ki. Ösztadiol serkenti a sejtproliferációt, melyre EGF az ösztadiolnál fokozottabb mértékben képes. Együttes adásuk esetén ösztadiol már nem növeli tovább a sejtsűrűségeket, viszont ösztadiol jelenlétében a progeszteron gátló hatása maximális mértékűvé vált. Az ópiát antagonistá naloxon a progeszteronnak még e maximális gátló hatását is teljes mértékben felfüggesztette.

Mivel adataink szerint naloxon felfüggeszti a progeszteron sejtproliferációt gátló hatását, kísérleteinkben megvizsgáltuk azt is, hogy a naloxon vajon befolyásolja-e az antiprogeszteron RU486 hatását is? Kísérleti eredményeink szerint a naloxon felfüggeszti az antiprogeszteron RU486 mitogén hatását is mind nem stimulált, mind OE- illetve EGF által stimulált sejtenyészetekben.

Előző adataink szerint az opioid peptidnek az uterus sejtek proliferációját gátló hatása életkorok szerint eltérő jellegű, ezért jelen kísérleteinkben megvizsgáltuk éretlen, 7 napos patkányokból származó uterus sejtenyészeteket is az MTT teszt segítségével. Erre az életkorra jellemzően ösztadiol hatástalannak bizonyult és az élő biomassza mennyiségét progeszteron vagy antiprogeszteron jelenléte sem befolyásolta. Éretlen állatokra jellemzően az enkefalinamid a nem stimulált sejtszaporodást hatásosan gátolta, és ezen gátló hatását jelen esetben az RU486 nem volt képes felfüggeszteni. EGF ebben az életkorban is hatásos mitogén tényező. A stimulált sejtszaporodást is hasonló mértékben gátolja az ENK, mint a nem stimuláltat. Progeszteron vagy antiprogeszteron jelenléte a stimulált proliferációt sem képes befolyásolni.

Összefoglalva:

Felnőtt patkányok uterus sejtenyészeteiben RU486 felfüggesztette az ENK-nak az OE-stimulált, és EGF-stimulált proliferációra gyakorolt gátló hatását.

RU486 önmagában is erősen serkentette a sejtszaporodást, sőt az EGF által serkentett sejtszaporodást is még tovább fokozta.

Progeszteron egyaránt gátolta az uterus sejtek nem stimulált, OE által és EGF által serkentett proliferációját. Ezen gátló hatás OE jelenlétében volt a legkifejezettebb.

A progeszteron sejtproliferációt gátló hatását és az RU486 stimuláló hatását az ópiát antagonistá naloxon egyaránt kivédte.

A vizsgált hatások a fiziológiás nM-os tartományban voltak megfigyelhetők.

7 napos, éretlen állatok uterusából származó sejtek nem stimulált, EGF által stimulált vagy enkefalinnal gátolt szaporodását sem RU486, sem progeszteron jelenléte nem befolyásolta.

Adataink szerint az opioid peptid és progeszteron receptor rendszerek között kétirányú kölcsönös kapcsolat működik a felnőtt patkány uterus sejtek szaporodásának gátló jellegű szabályozásában. Fiatal, éretlen patkányok uterus sejteiben ezen molekuláris kapcsolat még nem mutatható ki.

6./ Humán uterus szövetekből származó sejtvonalakon az endogén opioid peptidek sejt szaporodást gátló mechanizmusának vizsgálata.

6./A Myometrium szövetekből származó sejt vonalak:

Megjelent közlemények:

1./ J.L. Környei, Z. Vértes, F. Lengyel, K.A. Kovács, P.M. Gócze, M. Vértes: Opiate-progesterone interaction in the regulation of the proliferation of human myometrial and endometrial cells. 69th Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Budapest, Hungary, **Acta Physiologica Hungarica 92: 274-275, 2005**

2./ Környei J.L., Vértes Z., Lengyel F., Kovács K.A., Gócze P.M., Vértes M.: Ópiát-progeszteron kölcsönhatás a humán myometrium és endometrium sejtek osztódásának szabályozásában. A Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, 2005, Budapest, Összefoglalók 124. old.

Munkacsoportunk korábbi eredményeiből és az irodalomból ismeretes, hogy patkány uterusban az ópioid peptidek gátolják az ösztadiol által kiváltott DNS szintézist, illetve sejtproliferációt. Az uterusban az ösztadiol és az epidermális növekedési faktor szoros együttműködésben vezérli a sejtosztódást és az ópioid peptidek gátolják az EGF stimulálta sejtproliferációt is.

Laboratóriumunk adatai alapján patkány uterusban az ópioid peptidek és a progeszteron negatív mitogén hatása egymással kölcsönhatásban áll. Jelen kísérleteinkben humán myometriumban vizsgáltuk meg, hogy az ópioid peptidek hatásában szerepel-e a progeszteron receptor rendszer, illetve a progeszteron által kifejtett gátló hatás kapcsolatban áll-e az ópioid peptidek hatásmechanizmusának elemeivel.

Módszerek:

Vizsgálatainkat a PTE-ÁOK Etikai Bizottsága engedélyével, és a betegek írásbeli hozzájárulásával végeztük. A hysterectomia műtétekből származó myometrium szövetmintákat steril körülmények között daraboltuk, majd limitált kollagenáz és DNáz emésztéssel diszpergáltuk. Az emésztési fázis inkubációs idejét meghatározva, 16 órás emésztéssel 3-6-9 hónapig is vizsgálható, tiszta simaizom tenyészeteket, illetve 3 órás inkubációval egyszer használatos kevert sejtes primer kultúrákat nyertünk. Ezután tripánkék kizárásos festést követően 1000 élő sejt/cm² sűrűséggel ültettük el a sejteket és gazdagított Waymouth tápoldatban 10 %-os szérumban jelenlétében tenyésztettük. A sejtsűrűség meghatározását tripánkék festést követő sejtszámolással, vagy Burton-féle DNS meghatározással, illetve MTT sejtproliferációs assay-vel végeztük.

Kísérleti eredményeinket varianciaanalízist követő Student Newman-Keuls Multiple Range Teszttel elemeztük. P<0.01 szintnél tekintettük az eltéréseket szignifikánsnak.

Eredmények:

Humán uterusból származó, nem stimulált, ösztadiol (OE) által, és epidermális növekedési faktor (EGF) által stimulált myometrium simaizomsejt tenyészeteken elvégzett kísérleteinkben szintén megvizsgáltuk, hogy az antiprogeszteron RU486 kivédi-e a [D-Met²-Pro⁵]-enkefalinamid (ENK) sejtproliferációt gátló hatását.

Az ENK mind az EGF által stimulált sejtproliferációt, mind az ösztrogén okozta sejtszám csökkenést és méretnövekedést blokkolta. Az ópioid peptid stimulált proliferációt gátló hatását az RU486 felfüggesztette. Az RU486-nak önmagában is erőteljes sejt szaporodást serkentő hatása volt, sőt az EGF által stimulált sejtproliferációt is még tovább fokozta.

A következő kísérletsorozatban megvizsgáltuk magának a progeszteronnak a hatását is. A receptor antagonist RU486-tal ellentétesen hatva a progeszteron önmagában szignifikánsan csökkentette a proliferációt. A progeszteron ezen gátló tulajdonsága mind EGF jelenlétében, mind az ENK-al gátolt EGF-, illetve ösztrogén-hatás esetében megvalósult. A legerélyesebb gátló hatást ösztrogén és progeszteron együttes jelenlétében tapasztaltuk.

A továbbiakban megvizsgáltuk azt is, hogy a progeszteron gátló hatásában szerepelnek-e az ópioid peptidek hatásmechanizmusának elemei? Ennek vizsgálatára az ópiát receptor antagonist naloxont (NAL) használtuk. A naloxon felfüggesztette a progeszteron sejtosztódást gátló hatását mind a nem stimulált, mind az EGF által stimulált, mind az ösztrogén befolyása alatt álló tenyészetekben. A naloxon teljes mértékben kivédte a progeszteron maximális gátló hatását az EGF stimulálta kultúrákban is.

A hatásmechanizmus vizsgálata irányában tett első lépésként a naloxon hatásának időfüggését vizsgáltuk meg. A progeszteron ösztrogén jelenlétében kifejtett maximális gátló hatását a naloxon két órával előbb adva már részben felfüggeszti és egy órával előbb illetve egyidejűleg alkalmazva ez a hatás maximális mértékben megvalósul. A naloxon önmagában a már ismert módon semmilyen hatást nem gyakorolt a sejtenyészetekre. A naloxon a progeszteron kezelést követően alkalmazva hatástalan, így már nem képes a progeszteron sejtproliferációt gátló hatását befolyásolni.

A kölcsönhatás másik irányát vizsgálva az antiprogeszteron lehetséges támadáspontjainak leszűkítése érdekében az RU486 hatásának időfüggését szintén megvizsgáltuk. OE és EGF által maximálisan stimulált sejt kultúrában az ENK gátló hatását az RU486 az alkalmazás időpontjától függetlenül blokkolta. Adataink alapján a naloxon és az RU486 hatásának időfüggése jellegzetes eltérést mutatott, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a kölcsönhatás a két irányban eltérő támadáspontokon keresztül valósul meg.

Ismert az RU486 antiprogeszteron hatása mellett, annak antiglikokortikoid jellege is. Ezért kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy rendszerünkben az RU486 melyik hatása dominál. A dexamethason szintén sejtproliferációt gátló hatásúnak bizonyult, ezen gátlást az RU486 a várt módon felfüggesztette. Az ópiát antagonist naloxon, ahogy az előzőekben láttuk, a progeszteron gátló hatását ellensúlyozta, viszont a dexamethason gátló hatására semmiféle befolyást nem gyakorolt. Az RU486 önmagában is serkentette a sejtproliferációt. Ezzel szemben öregedő (3 hónapos) sejtvonalban az ösztrogén és progeszteron receptor rendszerek már nem voltak működőképesek, és így az RU486-nak sem volt proliferációt serkentő hatása. A dexamethason itt is jelenlevő gátló hatását az RU486 a fiatal sejtvonalhoz hasonló módon blokkolta. A dexamethason gátló hatását az ópiát receptor antagonist naloxon nem befolyásolta. Ezen különbségekből arra következtetünk, hogy az általunk vizsgált rendszerben az RU486 antiprogeszteron jellege dominál.

Összefoglalva:

Az ENK gátolta az ösztradiol és EGF myometrium sejtekre gyakorolt hatását.

Az ENK gátló hatását naloxon felfüggesztette, ugyanakkor a NAL önmagában sem a bazális, sem a stimulált sejtosztódást nem befolyásolta.

Az RU486 az alkalmazás időpontjától függetlenül felfüggesztette az ENK proliferációt gátló hatását.

A progeszteron sejtproliferációt gátló hatását az egyidejűleg, illetve 1 és 2 órával megelőzően alkalmazott naloxon kivédte.

RU486 önmagában is igen erőlyesen serkentette a myometrium sejtek szaporodását.

Az RU486 proliferációt serkentő hatásában döntően az antiprogeszteron- és nem az antiglikokortikoid jelleg játszik szerepet.

Adataink alapján az opioid peptidek sejtsztódást gátló mechanizmusa és az opioid peptid és progeszteron receptor jelző rendszerek közötti kétirányú kölcsönhatás működőképes a humán myometrium sejtekben is. Az opioid peptidek és a progeszteron sejtproliferációt gátló hatása közti kétirányú kapcsolat valószínűleg eltérő támadáspontokon keresztül valósul meg.

6./B A humán myometrium sejteken elvégzett kísérleteinket kiterjesztettük a kóros, jóindulatú daganatos szövetekre, így uterus leiomyomára is.

6./B.1.

Adataink publikálásának eddigi formái:

1./ J.L. Környei, K.A. Kovács, Z. Vértes, P.M. Gőcze, F. Lengyel, M. Vértes: Altered opiate-progesterone interaction in the regulation of proliferation of human leiomyoma cells. 70th Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Szeged, Hungary, **Acta Physiologica Hungarica 93: 196-197, 2006**

2./ Környei J.L., Kovács K.A., Vértes Z., Gőcze P.M., Lengyel F., Vértes M.: Ópiát-progeszteron kölcsönhatás eltérések a humán uterus leiomyoma sejtek proliferációjának szabályozásában. A Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, 2006, Szeged, Összefoglalók 76. old.

Humán uterus leiomyomából származó simaizomsejt tenyészetekben szintén megvizsgáltuk, hogy az antiprogeszteron RU486 kivédi-e a [D-Met²-Pro⁵]-enkefalinamid (ENK) sejtproliferációt gátló hatását. Kísérleteinkben nem stimulált, ösztradiol (OE) által és epidermális növekedési faktor (EGF) által stimulált kultúrákat elemeztünk.

A leiomyoma sejt kultúrák mindig gyorsabban növekedtek, kisebb APDT értékeket mutattak, mint az azonos uterusból származó myometrium simaizom sejt vonalak.

[D-Met²-Pro⁵]-enkefalinamid (ENK) gátolta az ösztradiol (OE) és epidermális növekedési faktor (EGF) által stimulált sejtproliferációt. ENK a leiomyoma sejtek nem-stimulált, bazális szaporodását is gátolta, és az ENK és DAMGO mellett itt [Met⁵]-enkephalin is hatásosnak bizonyult a 7 napos patkány uterusból leírtakhoz hasonlóan. Az ENK sejtsztódást gátló hatását az ópiát receptor antagonistá naloxon (NAL) felfüggesztette. NAL önmagában sem a bazális, sem a stimulált sejtsztódást nem befolyásolta.

Humán uterus leiomyoma simaizomsejt tenyészetekben RU486 felfüggesztette az ENK-nak az EGF-stimulált proliferációra és az OE által indukált sejtszám és méret változásra gyakorolt gátló hatását.

A myometriumban találtakkal szemben, RU486 önmagában alkalmazva leiomyomában nem serkentette a sejtszaporodást, és ennek megfelelően az EGF-stimulált ill. OE-val serkentett sejt kultúrák denzitását sem tudta tovább növelni. Az enkefalinamidnak a stimulált sejtszaporodást gátló hatását azonban az RU486 a myomában is kivédte.

Progeszteron egyaránt gátolta az uterus sejtek nem stimulált, OE és EGF által serkentett proliferációját. Ezen gátló hatás myometrium sejtekben OE jelenlétében volt a legerősebb, míg leiomyomában ösztradiolra nem változott.

A specifikus ópiát antagonistá naloxon kivédte a progeszteronnak a nem stimulált ill. az EGF és OE által stimulált sejtproliferációt gátló hatását. Ugyanakkor a naloxon kivédte az RU486-nak az ópiátok általi gátlást felfüggesztő hatását is.

A myometrium sejtneél tapasztaltakkal szemben az ENK a tenyésztett leiomyoma sejtek nem stimulált, bazális szaporodását is gátolta. Ezen mechanizmus a korábban 7 napos, éretlen patkányok uterus sejtjeiben leírtakkal mutatott hasonlóságot.

6./B.2.

További kísérleteinkben, a membrán ópiát receptorok és a nukleáris ösztrogén illetve progeszteron receptorok, valamint a sejtproliferáció szabályozásában szereplő transzkripciós faktorok kapcsolódási mechanizmusának feltárása irányában tett lépéseink egyikeként a membrán ösztrogén receptorok jelátviteli útjában szereplő transzkripciós faktorok vizsgálatát is elkezdtük.

A szövetblokkokból, amelyek egy részéből készítettük a sejtvonalainkat, sikeresen nyertünk lizátumokat, és munkacsoportunk vezetőjének, Prof. Dr. Vértes Marietta kutatási témájának keretében ill. ahhoz csatlakozóan immunoblot módszerrel vizsgáltuk a membrán ösztrogén receptorok hatásmechanizmusában fontos szerepet betöltő egyes fehérjéket. Ezáltal a membrán ópiát receptorok és a nukleáris ösztrogén illetve progeszteron receptorok lehetséges kapcsolódási pontja(i)nak vizsgálatához is közelebb juthattunk.

Humán uterus myometriumban és leiomyomában a menstruációs ciklus alatt, valamint postmenopausában elemeztük az ösztradiol (OE) nem-genomikus hatásai közül a PI3K-től függő jelátviteli utat. Ligand aktivált ösztrogén receptor (ER) hatására a PI3K foszforilálja az Akt serine/threonine protein kináz fehérjét, mely elősegíti a sejtek szaporodását és gátolja az apoptózist.

Módszerek:

Az immunoblot vizsgálatok céljára a sejteket ill. szöveteket lizáltuk, majd a fehérje mintákat 10% SDS poliakrilamid gél elektroforézissel szeparáltuk és nitrocellulóz membránba vittük át. A poliklonális nyúl antitestek kötődését követően, előhívásra az ECL rendszert használtuk. Aktint alkalmaztunk felvitel kontrolként.

Eredmények:

Akt/PKB és Bcl2 , Bax proteinek vizsgálata leiomyomában

Megjelent közlemények:

1/ K.A. Kovács, F. Lengyel, J.L. Környei, Z. Vértes, I.I. Szabó, B. Sümegi, M. Vértes: Differential expression of Akt/protein kinase B, Bcl-2 and Bax proteins in human leiomyoma and myometrium. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** **2003, 87: 233-240**

2/ Kovács K.A., Lengyel F., Környei J.L., Szabó I.: Akt/protein kináz B vizsgálata humán uterus myometriumban és myomában. A Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának V. Kongresszusa, 2003, Nagykanizsa-Zalakaros, Összefoglalók 34-35. old.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy az Akt/PKB expresszió és aktiváció mindkét vizsgált szövetben jelentősen fokozódott a proliferatív fázisban. A fokozódás mértéke a myomás szövetekben nagyobb volt, mint az ugyanazon uterusból származó kontrol myometrium szövetekben. Az aktivált Akt (pSer473) expresszió a myomás szövetekben, a menstruációs ciklus alatt igen jelentősen fokozódott. Az ösztradiol receptor (ER) alfa, progeszteron receptor és Bcl-2 protein expressziója az Akt expressziójával párhuzamosan változott. Postmenopauzában az Akt expresszió és aktiváció, valamint az ösztradiol receptor (ER) alfa, progeszteron receptor és Bcl-2 protein expressziója alacsonyabb volt, mint a menstruációs ciklus alatt. Ezzel szemben az anti-apoptotikus hatású Bax protein expressziója magas volt a leiomyoma szövetekben.

PTEN foszfatáz és Akt/PKB aktiváció vizsgálata leiomyomában

Megjelent közlemények:

1./ K.A. Kovács, F. Lengyel, Z. Vértés, J.L. Környei, P.M. Gócze, B. Sümegi, I. Szabó, M. Vértés: Phosphorylation of PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) protein is enhanced in human fibromatous uteri. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 2007, **103: 196-199**

A PTEN foszfatáz, a PTEN tumor szupresszor gén terméke a sejtekben foszforilált és nem-foszforilált formában van jelen, és központi szerepet játszik a PI3K/Akt jelátvitel szabályozásában, ami az ösztadiol nem-genomikus hatásának részét képezi.

A PTEN foszfatáz expresszió humán uterus myometriumban és leiomyomában kimutatható. A total PTEN mértéke változást nem mutatott, azonban a foszfo-PTEN szintje a myomában magasabb volt a menstruációs ciklus során. A PTEN foszforiláció a myometriumban a szekréciós fázis alatt alacsonyabb volt, mint a proliferációs fázisban. A foszfo-Akt szint a menstruációs ciklus során magasabb volt myomában, mint myometriumban. A PTEN foszforiláció közvetlen összefüggésben volt az Akt aktivációval, ami közvetlen kapcsolatot jelenthet a PTEN inaktiváció és Akt aktiváció között. A vizsgált fehérjék fenti expresszió-változásai a menopauzás uterusokban nem mutathatók ki.

Az opioid peptidekkel való kapcsolódás vizsgálatát in vivo szöveti szinten értelemszerűen csak patkányban végzett kezelésekkel tudtuk vizsgálni. Intrauterinálisan adott ösztadiol, illetve OE-t tartalmazó méhviasz implantáció hatására az Akt aktivitása (a Ser476 oldalláncának foszforilációja) jelentősen fokozódott.

Megjelent kölemények:

1/ Lengyel F, Környei J.L., Vértés Z., Kovács K.A., Sümegi B., Vértés M.: Akt/PI3K jelátvitel in vivo vizsgálata patkány uterusban. A Magyar Élettani Társaság LXVII. Vándorgyűlése, 2003, Pécs, Összefoglalók 111. old.

2/ Lengyel F., Vértés Z., Kovács K.A., Környei J.L., Sümegi B., Vértés M.: Akt/protein kináz B és PTEN foszfatáz patkány uterusban. A Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése, 2006, Szeged, Összefoglalók 218. old.

3./ F. Lengyel, Z. Vértés, J.L. Környei, K.A. Kovács, B. Sümegi, M. Vértés: Akt/protein kinase B and phosphatase PTEN in rat uterus. 70th Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Szeged, Hungary, **Acta Physiologica Hungarica 92: 206-207, 2006**

Összefoglalva:

Adataink alapján humán uterus leiomyoma sejtekben is kétirányú kölcsönös kapcsolat áll fenn az opioid peptid és progeszteron receptor jelző rendszerek között, azonban az opiát rendszer működése a jóindulatú daganat sejtekben a korai, éretlen formáknak megfelelő eltérést mutat.

Az opioid peptidek in vivo gátolják patkány uterusban az Akt foszforilációt, ezen kapcsolat valószínűsíthető a humán uterus szövetekben is.

Adataink szerint a foszfatidil-inozitol 3-kináz/Akt jelátviteli út aktiválása a PTEN fehérje megváltozott foszforilációjával együtt szerepet játszhat a leiomyoma pathomechnizmusában.

6./C Kísérleteinket kiterjesztettük gyökeresen más endokrin környezetből, terhes humán uterusból származó méhizom sejtekre is.

Módszer:

Az alkalmazott módszerek azonosak voltak a 6./A pontban leírtakkal, azonban itt csak kevert sejtes primer kultúrákat használtunk az eredeti, a terhességnek megfelelő, vagy még jól közelítő állapot megőrzése érdekében.

Eredmények:

A nem stimulált, ösztradiol (OE) által, és epidermális növekedési faktor (EGF) által stimulált myometrium sejtenyészeteken elvégzett kísérleteinkben szintén megvizsgáltuk, hogy az antiprogesteron RU486 kivédi-e a [D-Met²-Pro⁵]-enkefalinamid (ENK) sejtproliferációt gátló hatását, illetve az ópiát antagonistá naloxon befolyásolja-e a progesteron sejtosztódást gátló hatását.

Humán terhes myometrium kevert sejtes és tiszta simaizomsejt tenyészeiben RU486 felfüggesztette az ENK-nak az OE által indukált sejtszám és méret változásra gyakorolt gátló hatását, de nem befolyásolta az ENK-nak az EGF-stimulált proliferációra kifejtett gátlását. A nem terhes myometrium simaizomsejteken ill. patkány uterus sejteken tapasztaltakhoz képest az EGF stimuláció kevésbé volt hatásos a terhes uterusból nyert myometrium sejtekben.

Ugyanakkor RU486 önmagában erősen serkentette a sejtszaporodást.

A progesteronnak a nem stimulált és az EGF által serkentett proliferációt gátló hatása OE jelenlétében volt a legkifejezettebb. Az ópiát receptor antagonistá naloxon teljes mértékben felfüggesztette a progesteron sejtszaporodást gátló hatását.

Adataink alapján humán terhes myometrium sejtekben is kétirányú kölcsönhatás áll fenn az opioid peptid és progesteron receptor jelző rendszerek között. E kapcsolat azonban EGF vonatkozásában eltérést mutat a nem terhes myometrium sejtekben megfigyeltektől.

6./D Humán uterusból származó endometrium epitél, kevert sejtes és stroma sejtenyészetekben is elindítottuk az opioid peptid és progesteron receptor rendszerek kapcsolatának vizsgálatát.

Megjelent közlemények:

1./ J.L. Környei, Z. Vértes, F. Lengyel, K.A. Kovács, P.M. Gőcze, M. Vértes: Opiate-progesterone interaction in the regulation of the proliferation of human myometrial and endometrial cells. 69th Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Budapest, Hungary, **Acta Physiologica Hungarica 92: 274-275, 2005**

2./ Környei J.L., Vértes Z., Lengyel F., Kovács K.A., Gőcze P.M., Vértes M.: Ópiát-progesteron kölcsönhatás a humán myometrium és endometrium sejtek osztódásának szabályozásában. A Magyar Élettani Társaság LXIX. Vándorgyűlése, 2005, Budapest, Összefoglalók 124. old.

Módszer:

Alkalmazott módszerünk az 1./ pontban részletezetteknek megfelelően, a fiatal patkányoknál használttal volt azonos (rövid tripszin/DNáz emésztés) az endometrium szövetek puhasága, lazasága és kis mérete miatt.

Eredmények:

Az ösztadiol- (OE) és epidermális növekedési faktor (EGF) által stimulált sejtproliferációt az ENK gátolta. Ezen gátló hatását az ópiát receptor antagonistá naloxon felfüggesztette.

RU486 önmagában is serkentette a sejt szaporodást, valamint az EGF-stimulált sejt kultúrák denzitását is még tovább növelte.

Adataink alapján humán endometrium sejtekben is működik az endogén opioid peptid sejt szaporodást gátló hatásmechanizmusa, és az antiprogesteron RU486 szintén mitogén hatású.

5./ Az enkefalinnak az ösztrogén receptor alfa és béta szintekre gyakorolt hatása in vitro, felnőtt patkány uterus kevert sejt kultúrákban és esetleges változásai az egyedfejlődés stádiumai alatt.

7./ Opioid peptid hatás tenyésztett patkány uterus sejtekben az AP-1 transzkripció faktor komplex fos és jun proteinjeinek expressziójára.

8./ Enkefalin és ciklin D1 kölcsönhatások elemzése felnőtt és fejlődő állatokból származó patkány uterus sejt kultúrákban.

A következőkben részletezett kényeszerű költség átütemezési, forrás-összevonási okokból az immunoblot kísérleteket gazdaságosan csak akkor indíthattuk el (a megfelelő antitesteket beszereztük), amikor az összes kísérleti sejt vonalból és kezeléssel elkészültünk a lizátumok összegyűjtésével.

A hatásmechanizmus további lépéseinek felderítését célzó immunoblot kísérletekhez használandó lizátumok, fehérje frakciók elkészítésének nagyrésze megtörtént. Az ezekhez szükséges sejtenyésztések és kezeléseik kivitelezését követően a különböző életkorú patkány uterus, valamint humán myometrium és leiomyoma sejt vonalából származó protein mintákat jelenleg lefagyasztva tároljuk. Az immunoblot kísérletek folyamatban vannak.

A Szerződés 5. és 7., 8. pontjában foglaltak szerinti munka használható eredményeket sajnos nem hozott. A patkány uterus szubkonfluens sejt kultúrákból nyert lizátumok nem tartalmaztak a kimutatáshoz elegendő mennyiségű receptor fehérjét. Megoldást jelenthet a jövőben a túlélő miniatűr szövetblokkok ill. vékony szeletek tenyésztése a kezelése jelenlétében mind patkány uterus, mind humán szövetek vonatkozásában. Kezdeti próbálkozásaink alapján ismert, hogy a tápoldatot vékony rétegben folyamatos mozgásban kell tartani. Célunk a steril tápoldatot tartalmazó edények billegtetése a zárt CO₂ inkubátoron belül 37°C-on 100% páratartalom mellett. Ilyen körülmények között is garantáltan működő gépet a piacon beszerezni nem tudtunk, ezért jelenleg saját fejlesztésű megoldásokkal próbálkozunk a tanszéki műhely munkatársaival.

A humán myometrium és leiomyoma simaizom sejt vonalából származó kezelési lizátumok immunoblot vizsgálatai szerint az ösztrogén receptor alfa protein kimutatható volt, de nem mutatott lényeges különbségeket a kezeléseknél megfelelően.

Általános következtetések

A jelen kutatási periódusban a támogatott témában a következő új adatokkal járultunk hozzá a tudományterület ismeretanyagához:

Az opioid peptid patkány uterus sejt osztódását gátló hatásában két eltérő fázis különíthető el az egyedfejlődés alatt, melyeket egy érzéketlen periódus választ el egymástól.

Az opioid peptid és progeszteron receptor rendszerek között kétirányú kölcsönös kapcsolat működik a felnőtt patkány uterus sejtek szaporodásának gátló jellegű szabályozásában. Fiatal, éretlen patkányok uterus sejtjeiben e molekuláris kapcsolat még nem mutatható ki.

A humán myometrium és endometrium sejtek szaporodásának gátló jellegű szabályozásában szintén kétirányú kölcsönhatás áll fenn az opioid peptid és progeszteron receptor jelző rendszerek között. A naloxon- és az RU486-hatás időfüggésének eltérései alapján e kétirányú kapcsolat eltérő támadáspontokon keresztül valósulhat meg.

Az opioid peptidok sejtosztódást gátló mechanizmusa és az ópiát-progeszteron kölcsönhatás működőképes a humán leiomyoma sejtekben is. Azonban [D-Met²-Pro⁵]-enkefalinamid (ENK) a leiomyoma sejtek nem-stimulált szaporodását is gátolta, és az ENK és DAMGO mellett itt [Met⁵]-enkefalin is hatásosnak bizonyult a 7 napos patkány uterusban leírtakhoz hasonlóan. A myometrium sejtekben találtakkal ellentétben, RU486 önmagában nem serkentette a leiomyoma sejtek a szaporodását, azonban az ENK gátló hatását itt is kivédte. Az eltérések a sejtosztódás szabályozásának részleges dedifferenciációját mutathatják, ami a pathomechanizmusban is szerepet játszhat.

A rendelkezésünkre állt pénzeszközökkel és módszerekkel a kutatásra fordítható időben eddig jutottunk. A hatásmechanizmusok pontos lépéseinek feltárásához még további munka szükséges. A rangos folyóiratokban történő publikáláshoz modern, célravezetőbb módszerekkel történő kiegészítésekre, pontosításokra van szükség, melyet további kutatási pályázatok részeként tartunk lehetségesnek. („descriptive, phenomenological versus conclusive studies”)

A kutatás témájában eddig megjelent közlemények összegzése

Folyóiratcikk	külföldi, idegen nyelvű folyóiratban	3 db	IF = 7,41
Absztrakt	külföldi, idegen nyelvű folyóiratban	1 db	IF = 3,64
Absztrakt	hazai kiadású, idegen nyelvű folyóiratban	3 db	
Konferencia kiadvány,	magyar nyelvű	7 db	
			Össz.: 14 db

Felmerült nehézségek és akadályok, amelyek befolyásolták a Szerződésben foglaltak megvalósítását:

1./ A kísérletek elvégzésére felhasználható kutatási támogatásérték fokozatos és 2005-től már kb. 50%-os csökkentése komoly nehézségeket okozott. Emiatt a Munkatervben szereplő ütemezéshez képest későbbre kellett átütemeznünk, és össze kellett vonnunk bizonyos munkákat. (2003-tól a -25% ÁFA, 2004-től a -14,3% elvonás, 2005-től a -11% visszatartás, közben folyamatos infláció, és a rezsi és kezelési költségek az eredeti teljes összegek százaléki szerint kerültek levonásra). A 2004 évben elért lehető legnagyobb megtakarítást a 2005 évi megmaradó támogatással összevonva (a szükséges antitestek, elektroforézis és előhívó vegyszerek beszerzésével) az immunoblot technikákat igénylő munkák nagy részét még megvalósíthatónak véltük.

2./ A 2005 május elején történt baleseti sérülésem miatt az OTKA Élettudományi Kollégium Elnöke – a Zsúri elnök véleményét figyelembe véve – hozzájárult a T 37440 számú kutatás határidejének 2006. December 31-ig történő módosításához (Ko-21415/2005). A manuális munkából történt kiesésem előtti 4 és a munkaképességem visszanyerését követő 2 hónap alatt - az ez évtől jelentősen megnövekedett oktatási feladatokon túl megmaradt időben – a 2004 évi munkáról szóló részjelentésben foglaltaknak megfelelően, a különböző sejt-kultúra mintákból a kísérletes kezeléseket követő fehérje izolálásokat végeztük, illetve folytattuk tovább. Az immunoblot vizsgálatok elindítása ill. elvégzése most van folyamatban.

3./ A 2005. év elejétől kezdődően a kutatásban résztvevők közül Dr. Környei József László témavezetőnek és Dr. Vértes Zsuzsannának az oktatási feladatok előre nem látható módon hirtelen, és igen jelentősen megnövekedtek. A Pécsi Tudományegyetemre a csőd közeli helyzet miatt kirendelt kormánybiztos jelenlétében az egyetlen megoldást a bevételek azonnali növelése jelentette. A kényszerhelyzetben a német nyelvű orvosképzés beindításához még az alapfokú német tudással rendelkezőket, így minket is igénybe kellett venni. A német nyelvű előadások megtartásához szükséges szint gyors elérése igen jelentős energia befektetést igényelt. Ezen kívül az angol évfolyam jelentősen megnövelt létszáma már egész éves gyakorlat- és szemináriumvezetést és a fakultatív tantárgyaink angol nyelvű előadását is igényelte tőlünk. Igen nagy leterhelést jelentett a hallgatói létszám összességében háromszorosára növekedése miatt szükségessé vált, három nyelven azonos írásbeli tesztvizsgákra való áttérés előkészítése és lebonyolítása.

A 2. és 3. pontokban foglaltak időszakokban jelentkező terhelésként léptek fel, azonban együttesen kb. 1-1,5 év teljes kiesést jelentettek a kutatómunkából.

Eltérések indoklása

Személyi:

Dr. Oszter Angéla tanársegéd a Ph. D. fokozat megszerzését követően a gyógyszeriparba távozott. A pályázatban szereplő segédközvetők közül két fő biológus, Harka Csabáné és Moyzes Katalin nyugdíjazás miatt vált ki a munkacsoportból és Lengyel Ferenc biológus Ph. D. hallgatóként csatlakozott a munkacsoporthoz. Az egyetemi létszámleépítések miatt összességében 1 fő segédközvetőt veszítettünk.

Pénzügyi:

Sajnálatos módon a külföldi kongresszusi kiutazás költségeinél eredeti tervezési hibát követtem el, mert nem terveztem külön sorban napidíj összeget. Kérésemre ezen 2003 évi -47 eFt tételnek a meglévő maradvány összegekből történő fedezését az OTKA Bizottság engedélyezte.

A kutatási időszak alatti fokozatos és folyamatos támogatáscsökkentés szükségessé tette a keretek és maradványok átcsoportosítását. A kongresszusi utazások kényszerű felfüggesztése a kezdeti lendület (2003) után még időben megtörtént, sőt 2006-ban már az összes kereten még meglévő maradványt is, OTKA engedéllyel, vegyszerbeszerzésre kellett fordítanunk.

Beszerzett eszközök:

A pótlásra betervezett régi eszközök még mindig nem romlottak el, viszont 2004-ben, egy mindennapos használatban levő öt éves személyi számítógép CD meghajtója ment tönkre, így ezt kellett pótolni. 2006 végén a tápoldatok tárolásához használt igen régi Grönland típusú 4°C-s hűtőnk véglegesen javíthatatlanná vált, így ezt kellett igen gyorsan pótolnunk egy új háztartási hűtőgép beszerzésével.