

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet



A RhoA és Rho-kinázok vizsgálata patkány myometriumban és cervixben

Ph.D tézis összefoglaló

Domokos Dóra

Szeged

2019

Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Kar

Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Gyógyszerhatástan, biofarmácia, klinikai gyógyszerészet program

Programvezető: Dr. Zupkó István MTA doktor

Témavezetők

Dr. Gáspár Róbert Ph.D és Dr. Falkay György MTA doktor †

Domokos Dóra

A RhoA és Rho-kinázok vizsgálata patkány uterusban és cervixben

Szigorlati Bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Bártfai György MTA doktor

Tagok: Dr. Borsodi Anna MTA doktor, Dr. Földesi Imre Ph.D.

Bíráló bizottság:

Elnök: Dr. Dombi György, kandidátus

Opponensek: Dr. Benyhe Sándor MTA doktor, Dr. Halmos Gábor Ph.D.

Tagok: Dr. Hunyadi Attila Ph.D., Dr. Regdon Géza Ph.D.

Szeged

2019

Bevezetés

A vemhesség során az uterus és a cervix szerkezeti és fiziológiai változásokon megy át, melyek elengedhetetlenek a méh nyugalmi állapotban tartásához, valamint az erőteljes ritmikus kontrakció kialakításához az ellés során. A vemhes méh összehúzódását és a cervix dilatációját kiváltó pontos mechanizmusok nem teljesen ismertek. Ezen folyamatok megismerése molekuláris és celluláris szinten elengedhetetlen az új targetek feltárása és hatékony tokolitikumok fejlesztése céljából.

A simaizom összehúzódás és elernyedés kialakulásában fontos szerepet játszik a miozin könnyűlánc enzimatiszus foszforilációja és defoszforilációja. Az utóbbi években azonosítottak egy Ca^{2+} független útvonalat, melyben fontos szerepet játszanak a RhoA és a Rho-kinázok. A RhoA fehérje számos olyan celluláris folyamatban vesz részt, mint a sejtadhézió, motilitás, migráció és citokinézis. Az elmúlt években több molekulát azonosítottak, melyek a RhoA effektorai, azonban a Rho-kinázt (ROCK) írták le legelőször, amely egy szerin/treonin protein kináz. A ROCK két izoformáját azonosították, ROCK I vagy ROCK β és ROCK II vagy ROCK α . A GTP kötő RhoA aktiválja a Rho-kinázokat, amely a miozin foszfátáz miozin kötő alegységének a foszforilációját, ezáltal pedig az enzim gátlását okozza. Továbbá, a Rho-kinázok képesek foszforilálni közvetlenül a miozin könnyűláncot is. Ezen mechanizmusok hozzájárulnak a foszforilált myosin mennyiségének a növekedéséhez, ami simaizom kontrakciót eredményez. Ezek alapján a RhoA/Rho-kináz jelátviteli út potenciális célpont lehet számos betegség terápiás intervenciójában.

Célkitűzések

Kevés és ellentmondásos eredmények jelentek meg a RhoA és a Rho-kinázok expressziós szintjének a változásáról és nincs adat a hatásukról a cervix működésre, ezért

1. kutatásunk egyik célkitűzése a RhoA és Rho-kinázok mRNS és fehérje expressziójának a meghatározása a vemhesség során, ellés közben, postpartum és nem vemhes patkány uterusban és cervixben,
2. további célul tűztük ki a RhoA és Rho-kinázok uterus kontraktilitásra és a cervix rezisztenciára kifejtett hatásának a vizsgálatát izolált szervrendszerben *in vitro*, terminusban levő valamint nem vemhes patkány uterusban és cervixben RhoA inhibitor szimvasztatin, valamint Rho-kináz inhibitorok Y-27632, fasudil alkalmazásával,
3. valamint célunk volt újonnan szintetizált isoquinolin vázas molekulák relaxáló hatásának vizsgálata a nem vemhes és vemhes patkány uterus működésére *in vitro*, valamint Rho-kináz activity assay alkalmazásával a Rho-kináz aktivitást befolyásoló hatásuk tesztelése.

Anyagok és módszerek

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

Pároztatás

Ivarérett nőtény (180-200 g) és hím (240-260 g) Sprague-Dawley patkányokat pároztattunk hajnalban. Néhány óra múlva a nőtény állatok esetében hüvelykenetet vettünk és mikroszkóp alatt vizsgáltuk. Ha hímivarsejteket találtunk, az állatot elkülönítettük és a vizsgálat napját tekintettük a vemhesség első napjának.

Szövetminták

A vemhesség különböző napján (5, 15, 18, 20 és 22. napon), postpartum (ellés után 1, 3 és 5 nappal), ellés közben (3. utód megszületését követően), illetve nem vemhes (ösztuszban lévő) patkányokat termináltuk, az uterusukat és cervixüket kimetszettük. A mintákból az RNS-t Tri Reagens alkalmazásával izoláltuk. A totál RNS-ből 1 µg-ot használtunk fel minden mintából az amplifikációhoz (SensiFAST Probe HiROX One-Step Kit) ABI StepOne Real-

Time PCR készülékben. Az eredményeket az RQ (relative quantity) értékek összehasonlításával kaptuk meg. A fehérje expresszió méréshez a szöveteket RIPA lízis pufferben homogenizáltuk. Az elektroforézishez zsebenként 50 µg fehérjét vittünk fel 4-12 %-os NuPAGE Bis-Tris géltre. A blottolást nitrocellulóz membránra iBlot Gel Transfer alkalmazásával végeztük. Az antitest kötődést WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immundetection Kit segítségével detektáltuk. Az immunreaktív sávok denzitásának a meghatározása Kodak 1D Images analysis szoftverrel történt.

Rho-kináz aktivitás mérés

A Rho-kináz aktivitás mértékét immunassay módszerrel határoztuk meg a gyártó előírásainak megfelelően. A plate rekombináns miozin foszfátáz alegységével volt bevonva. Az abszorbancia mérést SpectroStarNano plate olvasó készülékkel 450 nm-en végeztük. Az abszorbancia jel tükrözi a ROCK aktivitás relatív mértékét.

In vitro kontraktilitási vizsgálatok

A vemhesség 22. napján, ellés közben (3 utód után) és ellés után 1 nappal, valamint a nem vemhes (ösztruszban lévő) patkányokat termináltuk, az uterusból gyűrűket metszettünk és azonnal szervfürdőbe helyeztük. Az uterus gyűrűkhöz 10^{-8} M oxytocint adtunk, hogy ritmikus kontrakciót váltsunk ki. Majd 10^{-10} - 10^{-5} M koncentrációban RhoA és Rho-kináz inhibitorokat adtunk kumulatív módon. A kontrakciókat az ISOSYS SPEL Advanced szoftverrel regisztráltuk. A kiértékelést a GraphPad Prism 5.0 program segítségével végeztük. A statisztikai kiértékelést one-way ANOVA Tukey teszt és unpaired t-tesztel végeztük.

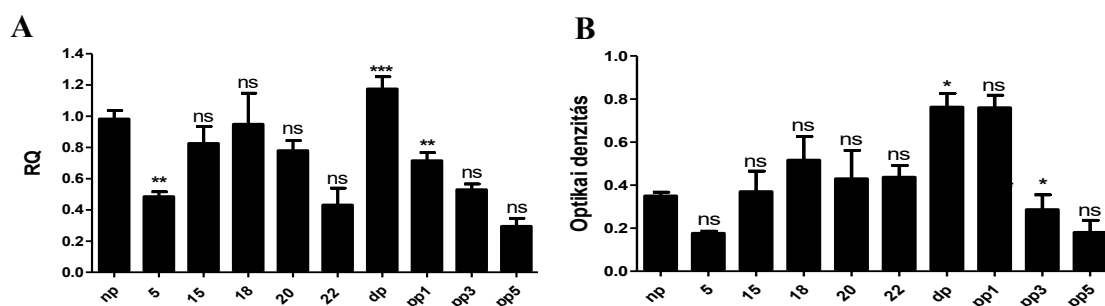
In vitro cervix rezisztencia vizsgálatok

A vemhesség 20. és 22. napján, valamint a nem vemhes (ösztruszban lévő) patkányokból izoláltuk a cervixüket és szervfürdőbe helyeztük. A cervix rezisztencia mérésekor a szövet fokozatos nyújtásra adott relaxációs választ vizsgáltuk RhoA és Rho-kináz inhibitorok jelenlétében és inhibitorok nélkül. A cervix gyűrűket fokozatosan nyújtottuk, melyeket 5 perc relaxációs idő követett. Minden 5 perc után 1 g-mal emeltük a feszülést 12 g-ig. A nyújtási teszt értékelésekor a kezdeti nyújtás értékének függvényében ábrázoltuk az 5 perc elteltével tapasztalható feszülés mértékét. A pontokra lineáris regresszióval egyenest illesztettünk és az egyenesek meredekségével jellemeztük a cervix rezisztenciáját. A kiértékelést a GraphPad Prism 5.0 program segítségével végeztük. A statisztikai kiértékelés one-way ANOVA Dunett teszt alkalmazásával történt.

Eredmények

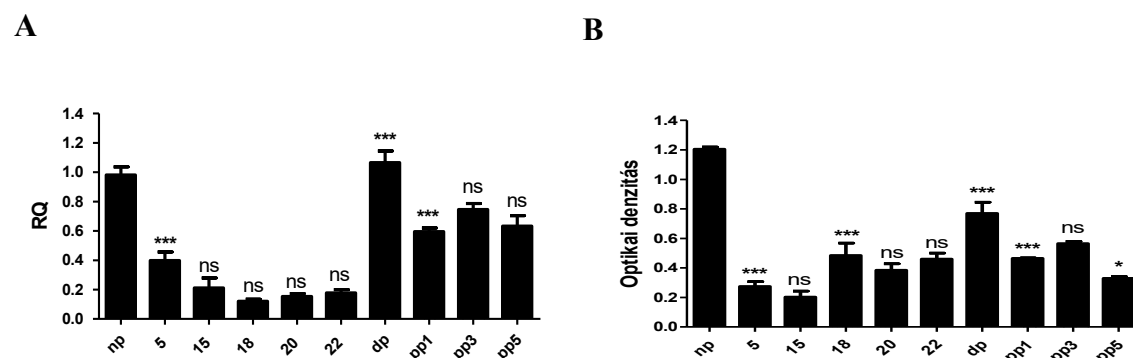
A RhoA és Rho-kinázok mRNS és fehérje expressziója a patkány myometriumban

A RhoA mRNS szintje jelentősen csökkent a vemhesség 5. napján, majd enyhén emelkedett a 18. napig, ezután fokozatos, de nem szignifikáns csökkenést detektáltunk a 22. napig. Ellés közben markáns emelkedést tapasztaltunk, majd ellés után egy nappal lecsökkent a mRNS szint és változatlan maradt az ellés utáni napokban (**1. A ábra**). A fehérje expresszió nem változott szignifikánsan a vemhesség során, azonban egy jelentős emelkedést mértünk ellés közben. (**1. B ábra**).

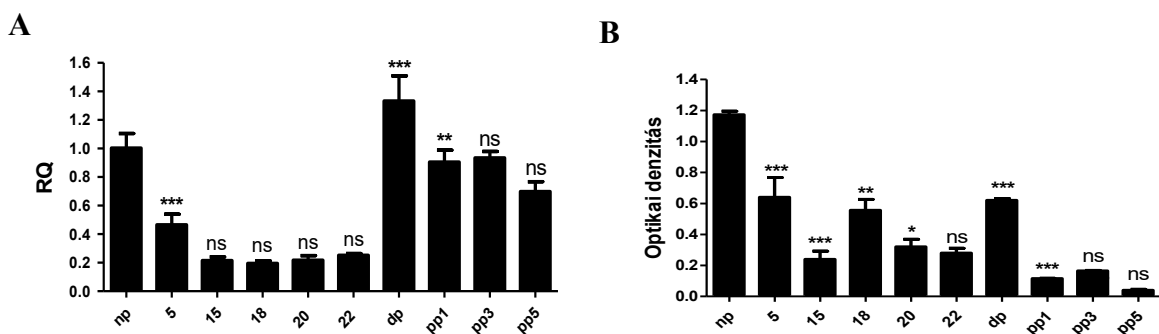


1. ábra: A RhoA mRNS (A) és fehérje expressziója (B) nem vemhes uterusban (np), a vemhesség során, ellés közben (dp) és postpartum (pp1, 3, 5 and 7). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nem szignifikáns

Alacsony mRNS szintet mértünk ROCK I és a ROCK II esetében a vemhesség 22. napjáig. Ellés közben ~5-szörösére emelkedett az expressziós szintjük, majd enyhén csökkent az ellés utáni első nap és nem változott a többi napon postpartum (**2. és 3. A ábra**). A ROCK I és a ROCK II fehérje expressziós szintje magas a nem vemhes myometriumban, azonban a vemhesség 5. napján lecsökkent és a vemhesség 18. napján megemelkedett. Ezt követően a ROCK I fehérje expressziója nem változott az ellésig, amikor is jelentősen megemelkedett a szintje. (**2. B ábra**). A ROCK II szintje újra lecsökkent a 20. napon és nem változott a vemhesség 22. napjáig. Ellés közben erőteljesen megemelkedett a fehérje szintje (**3. B ábra**).



2. ábra A ROCK I mRNS (A) és fehérje expressziója (B) nem vemhes uterusban (np), a vemhesség során, ellés közben (dp) és postpartum (pp1, 3, 5 and 7). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; ns: nem szignifikáns.



3. ábra A ROCK II mRNS (A) és fehérje expressziója (B) nem vemhes uterusban (np), a vemhesség során, ellés közben (dp) és postpartum (pp1, 3, 5 and 7). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.001$; ns: nem szignifikáns**

A RhoA inhibitor -szimvasztatin- és a Rho-kináz inhibitorok –Y-27632, fasudil és RKI1447- hatása a vemhes és nem vemhes patkány uterus kontraktilitására *in vitro*

Szimvasztatin (10^{-10} - 10^{-5} M) dózisfüggően gátolta az oxytocin indukálta kontrakciót. Leggyengébb uterus relaxáló hatást és a legmagasabb IC_{50} értéket a ellés utáni első napon detektáltuk, a legerősebb kontrakció gátló hatást és a legalacsonyabb IC_{50} értéket pedig a vemhesség 22. napján mértünk. (1. táblázat).

	np	d22	dp	pp1
IC₅₀ ± SEM	4.6e-008 ± 9.3e-007	7.0e-009 ± 2.4e-009 ^{ns}	7.6e-008 ± 1.8e-008 ^{ns}	2.8e-006 ± 1.4e-007*
Gátlás% ± SEM	58.3 ± 4.7	90.1 ± 1.1 ^{***}	71.7 ± 2.2 ^{***}	19.7 ± 5.5 ^{***}

1. Táblázat A RhoA inhibitor szimvasztatin maximális gátló hatása és az IC_{50} értékei. np: nem vemhes, dp: ellés közben, pp: postpartum; ns: nem szignifikáns; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. S.E.M: standard error.

A Rho-kináz inhibitorok -fasudil, Y-27632 and RKI 1447- (10^{-10} - 10^{-5} M) dózisfüggően gátolták az oxytocin indukálta kontrakciót. A fasudil legerősebb relaxáló hatása a nem vemhes uteruson volt. Az IC_{50} értékek között nem volt szignifikáns eltérés (2. táblázat).

	np	day 22	dp	pp1
IC₅₀ ± SEM	7.7e-008 ± 1.6e-008	2.0e-007 ± 4.0e-008 ^{ns}	1.7e-007 ± 2.4e-008 ^{ns}	1.0e-006 ± 1.4e-007 ^{ns}
Gátlás% ± SEM	80.7 ± 2.3	58.8 ± 3.4 ^{**}	57.2 ± 4.9 ^{ns}	71.9 ± 5.2*

2. táblázat A fasudil maximális gátló hatása és az IC_{50} értékei. np: nem vemhes, dp: ellés közben, pp: postpartum; ns: nem szignifikáns; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. S.E.M: standard error.

Az Y-27632 és RKI 1447 az ellés közbeni és a nem vemhes uteruson volt a legmarkánsabb a relaxáló hatásuk. Az Y-27632 és RKI 1441 IC_{50} értéke a postpartum uteruson volt a legnagyobb. (3. és 4. táblázat).

	np	day 22	dp	pp1
IC₅₀ ± SEM	2.7e-007 ± 3.6e-007	4.9e-006 ± 4.3e-007 ^{ns}	1.3e-006 ± 3.7e-007 ^{ns}	5.3e-006 ± 2.0e-007 ^{ns}
Gátlás% ± SEM	82.3 ± 3.5	51.9 ± 8.3 ^{**}	78.8 ± 2.5 ^{**}	61.7 ± 8.6 ^{ns}

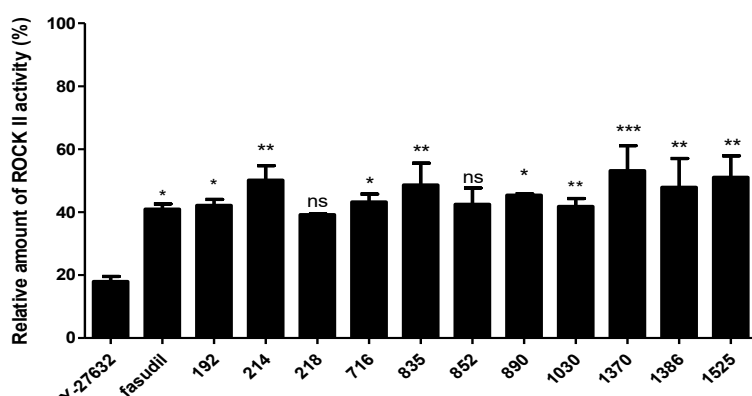
3. táblázat Az Y-27632 maximális gátló hatása és az IC₅₀ értékei. A statisztikai összehasonlítást az előző nap értékeihez viszonyítva tüntettük fel. np: nem vemhes, dp: ellés közben, pp: postpartum; ns: nem szignifikáns; ** $p < 0.01$. S.E.M: standard error. ANOVA, Tukey's teszt.

	np	day 22	dp	pp1
IC₅₀ ± SEM	7.6e-008 ± 2.1e-008	2.5e-008 ± 3.0e-009 ^{ns}	2.1 e-008 ± 2.4e-008 ^{ns}	1.7e-007± 3.8e-007 ^{**}
Gátlás% ± SEM	76.9 ± 2.8	51.0 ± 2.8 ^{***}	70.8 ± 2.7 ^{**}	40.7 ± 3.9 ^{***}

4. táblázat Az RKI 1447 maximális gátló hatása és az IC₅₀ értékei. A statisztikai összehasonlítást az előző nap értékeihez viszonyítva tüntettük fel. np: nem vemhes, dp: ellés közben, pp: postpartum; ns: nem szignifikáns; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. S.E.M: standard error. ANOVA, Tukey's teszt.

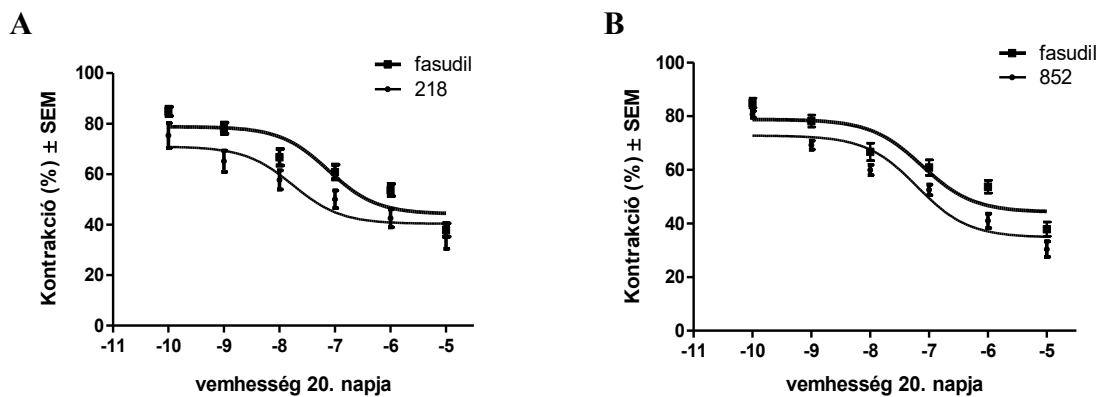
Újonnan szintetizált izokinolin vázas molekulák hatásának a vizsgálata az uterus kontrakcióra *in vitro*

13 vízoldékony és 12 nem- vízoldékony molekula hatását vizsgáltuk nem vemhes patkány uterusban. A 25 molekulából 11 darabnak, valamint a papaverinnek és a drotaverinnek szignifikánsan alacsonyabb volt az IC₅₀ értéke, összehasonlítva az Y-27632 és fasudil értékeivel. A szignifikáns IC₅₀ értékek alapján kiválasztott izokinolin vázas molekulák hatását vizsgáltuk a ROCK II aktivitására. A 218 és 852 molekuláknak hasonló mértékű volt a gátló hatása, mint az Y-27632 inhibitor hatása (4. ábra).

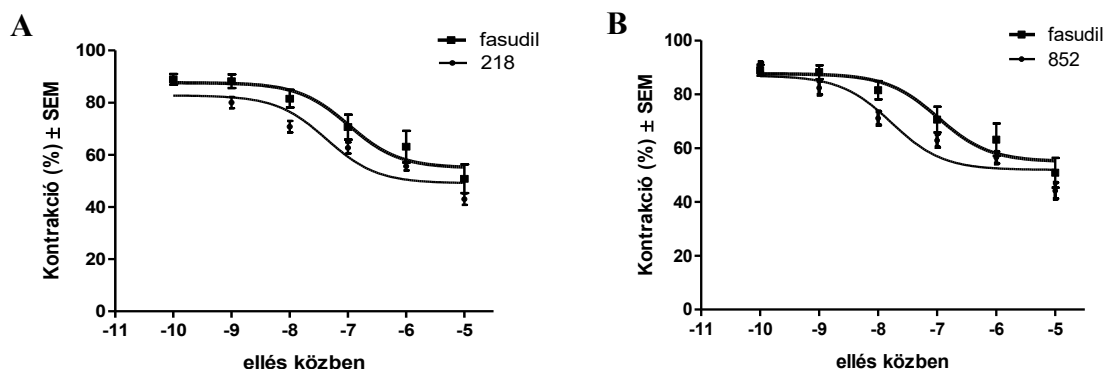


4. ábra Az izokinolin vázas molekulák hatása a ROCK II aktivitásra. A statisztikai összehasonlítást az Y-27632 értékeihez viszonyítva. ns: nem szignifikáns; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

A 218 (5. A ábra) és a 852 (5. B ábra) IC₅₀ értékei jelentősen alacsonyabbak a 20 napos vemhes uterusban - amikor a Rho-kinázok expressziós szintje alacsony- illetve jelentősebb a gátló hatásuk ellés közben (6. A és B ábra) - amikor a Rho-kinázok szintje magas - a fasudil értékeihez viszonyítva.



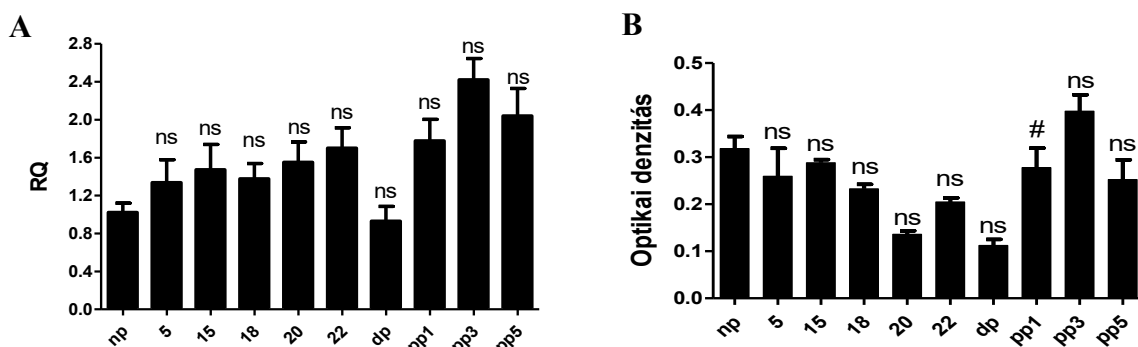
5. ábra 218 (A) és a 852 (B) molekulák gátló hatásai 20 napos vemhes patkány uterusán. S.E.M standart error.



6. ábra 218 (A) és a 852 (B) molekulák gátló hatásai ellés közbeni patkány uterusán. S.E.M standart error.

A RhoA, ROCK I és ROCK II expressziós szintje patkány cervixben

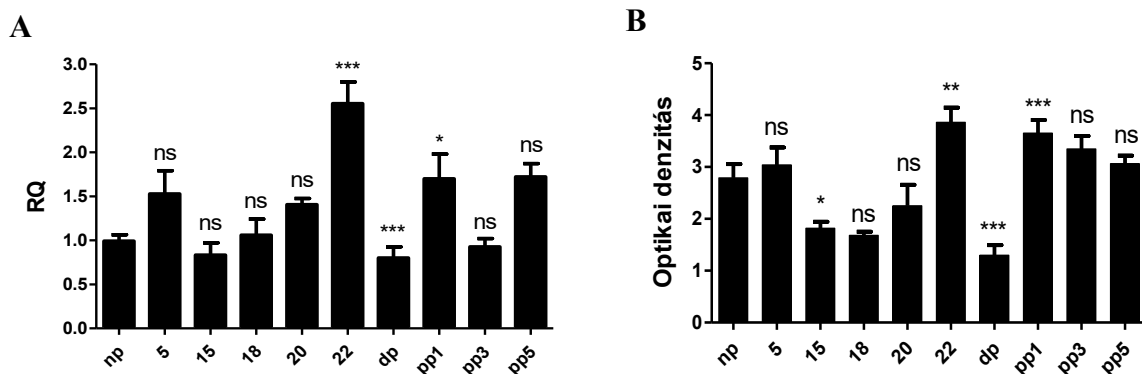
A RhoA mRNS szintje nem változott szignifikánsan a vemhesség során és postpartum (7. A ábra). A fehérje expresszió az ellés utáni első nap emelkedett meg jelentősen (7. B ábra).



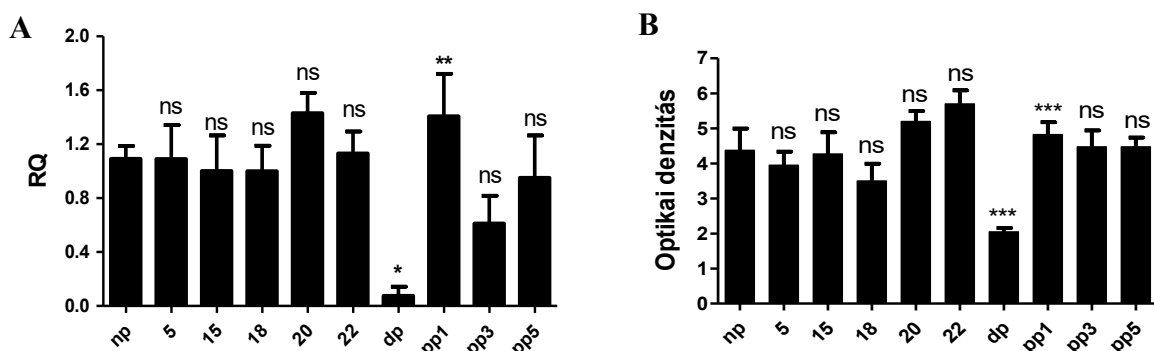
7. ábra A RhoA mRNS (A) és fehérje expressziója (B) nem vemhes patkány cervixben cervix (np), a vemhesség során, ellés közben (dp) és postpartum 1, 3 és 5. nap (pp1, pp3, pp5). ns: nem szignifikáns; *: $p < 0.05$.

A ROCK I és ROCK II mRNS szintje nem változott jelentősen a vemhesség során (8. A és 9 A ábra). A ROCK I expressziója csak a vemhesség 22. napján emelkedett meg jelentősen. Ellés közben markáns csökkenést mértünk a ROCK I és a ROCK II esetében egyaránt. Ellés után 1 nappal megemelkedett a szintjük, majd újra enyhe csökkenést találtunk a többi postpartum napon. A ROCK I fehérje szintje a vemhesség 15. napján lecsökkent és

változatlan maradt a vemhesség végéig. A vemhesség 22. napján egy jelentős emelkedést mértünk, amit markáns csökkenés követett ellés közben. A ellés utáni napokban magas fehérje expressziót detektáltunk (8. B ábra). A ROCK II fehérjeszint változása követi a mRNS szint alakulását (9. B ábra).



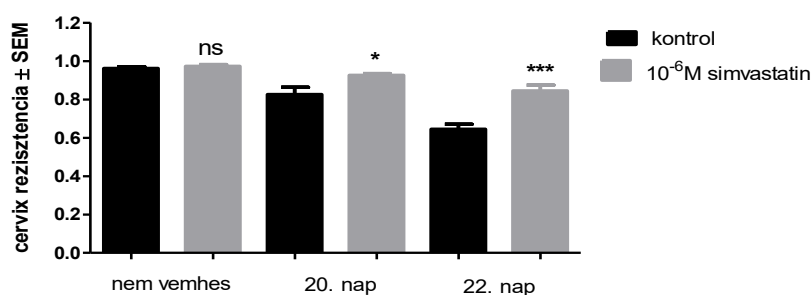
8. ábra. A ROCK I mRNS (A) és fehérje expressziója (B) nem vemhes patkány cervixben (np), a vemhesség során, ellés közben (dp) és postpartum 1, 3 és 5. nap (pp1, pp3, pp5). ns: nem szignifikáns; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.



9. ábra A ROCK II mRNS (A) és fehérje expressziója (B) nem vemhes patkány cervixben (np), a vemhesség során, ellés közben (dp) és postpartum 1, 3 és 5. nap (pp1, pp3, pp5). ns: nem szignifikáns; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

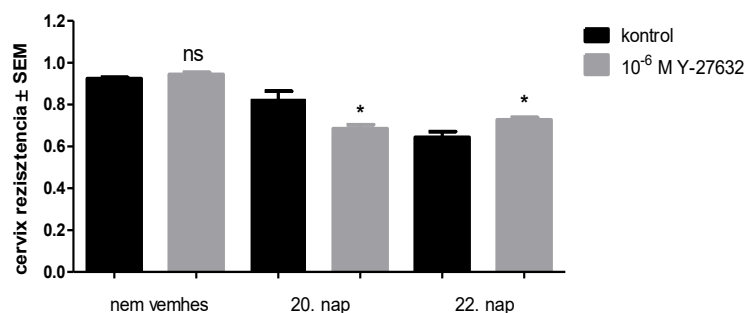
A szimvasztatin, Y-27632 és fasudil hatásának a vizsgálata a cervix rezisztenciára

Sem a RhoA inhibitor – szimvasztatin - sem a Rho-kináz inhibitorok - Y-27632, fasudil – nem voltak hatással a nem vemhes cervix rezisztenciára 10^{-6} M koncentrációban. A szimvasztatin növelte a 20 és 22 napos vemhes cervix rezisztenciáját a kontrol cervix minták értékeihez viszonyítva (10. ábra).



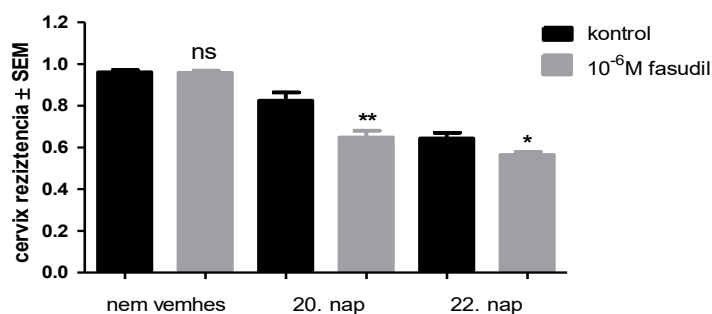
10. ábra. A szimvasztatin hatása a nem vemhes, 20 és 22 napos vemhes cervix rezisztenciára. ns: nem szignifikáns; * $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$. S.E.M. standard error.

Az Y-27632 csökkentette a cervix rezisztenciáját a vemhesség 20. napján, de szignifikánsan emelte a vemhesség 22. napján összehasonlítva a nem kezelt mintákkal (**11. ábra**).



11. ábra Az Y-27632 hatása a nem vemhes, 20 és 22 napos vemhes cervix rezisztenciára. ns: nem szignifikáns; * $p < 0.05$. S.E.M. standard error.

A fasudil jelentősen mérsékelte a cervix rezisztenciát a (**12. ábra**).



12. ábra A fasudil hatása a nem vemhes, 20 és 22 napos vemhes cervix rezisztenciára. ns: nem szignifikáns; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. S.E.M. standard error.

Diszkusszió

Ismert, hogy a RhoA és a Rho-kinázok fontos szerepet játszanak a simaizom kontrakció kialakulásában. A RhoA, valamint a ROCK aktivitásának a gátlása az uterus relaxációját eredményezheti, emiatt potenciális targetek lehetnek koraszülés terápiájában.

A Real time PCR vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a RhoA és Rho-kinázok mRNS szintje lecsökkent a vemhesség 5. napján, ami az implantáció időszaka. Kimutatták, hogy csökken a méhösszehúzódnak a blasztociszta transzfer idején. A ROCK enzimek expressziójának a csökkenése a patkány uterusban hozzájárulhat az összehúzódnak intenzitásának a csökkentéséhez, ezáltal elősegíti az implantációt. A RhoA és a Rho-kinázok mRNS és fehérje expressziójának a változása nem mindig párhuzamos a vemhesség során. A RhoA fehérje szintje nem változott a vemhesség 5. napjától a 22. napig, miközben a ROCK fehérjék mennyiségében történt némi jelentősebb változás, ami arra utal, hogy az aktív RhoA a Rho-kinázok aktiválása nélkül is részt vesz a celluláris folyamatokban. Az alacsonyabb ROCK expresszió hozzájárulhat a vemhes uterus nyugalmi állapotban tartásához. A magas RhoA és ROCK szint az ellés idején pedig szerepet játszhat az összehúzódnak növelésében és az ellés beindításában. A RhoA mRNS és fehérje szintje jelentősen lecsökkent ellés közben a cervixben, ami egybeesik azzal, hogy az inaktív RhoA blokkolja a kollagén I szintézist és részt vesz a simaizom relaxációban. Sőt, a ROCK I és ROCK II szintje is jelentősen lecsökkent ellés közben, ami arra utal, hogy szerepet játszanak a cervix érésében és az uterus működésben a vemhesség végén. Ellés után egy nappal mind a RhoA, mind a Rho-kinázok szintje visszaállt a nem vemhes cervixben mért szintre, ami az sugallja, hogy a magasabb fehérje expresszió hozzájárulhat a cervix újjáépüléséhez.

RhoA inhibitorként szimvasztatint alkalmaztunk. A sztatinok rendelkeznek egy koleszterin független „pleiotropic” hatással, képesek gátolni az izoprenoidok szintézisét, melyek elengedhetetlenek a RhoA aktiválódásához. A szimvasztatin relaxálta az oxytocin indukálta uterus kontrakciót, de ez a hatás nem teljesen korrelál a RhoA fehérje szinttel. A RhoA szint magas ellés közben és ellés után 1 nappal, azonban a szimvasztatin relaxáló hatása és IC₅₀ értéke eltérő volt a két napon. Az oxytocin indukálta kontrakció intenzitása is különbözött ellés közben és az ellés utáni első napon, ami hozzájárulhat a szimvasztatin eltérő hatásához. A szimvasztatin fokozta a cervix rezisztenciát a vemhesség 20. és 22. napján, amikor a RhoA fehérje expresszió alacsony volt. A fokozott cervix rezisztencia összefügghet a sztatinok pleiotropikus hatásával, ami abból áll, hogy gátolják a mátrix metalloproteinázok szekrécióját.

Ismert, hogy a RhoA blokkolja az MMP-2 és MT1-MMP expresszióját és az MMP-2 aktiválódását. A szimvasztatinnak lehet egy RhoA független hatása a cervixben, ami növeli a rezisztenciát. A Rho-kináz inhibitor fasudil hatása nem korrelált a Rho-kinázok expressziós szintjének a változásával, amire magyarázatul szolgálhat az, hogy a fasudil specifitása nem korlátozott a Rho-kinázra. A specifikusabb Rho-kináz inhibitorok, mint az Y-27632 és RKI 1447, hatása nagyobb összefüggést mutat a Rho-kinázok expressziójának a változásával. Erőteljes relaxáló hatást mutattak az ellés közbeni és a nem vemhes uterusban, amikor az ROCK I és ROCK II szintje a legmagasabb. A maximális gátló hatásuk pedig az ellés előtti és az ellés utáni napon volt a legkisebb, amikor a kináz enzimek mennyisége alacsony volt. A fasudil képes gátolni a kollagén szekréciót és növelni a kollagenáz aktivitást a májsejtekben. Az Y-27632 blokkolja a feszültség-függő káliumcsatornákat, csökkenti vaszkuláris simaizomban az izomtónust. Sőt, rendelkezik egy kollagén szintézis gátló hatással is. Ezen tulajdonságok indokolhatják a cervix rezisztencia csökkentő hatásukat a vemhesség 20. napján. A vemhesség 22. napján nem voltak hatással a cervixre, ami összefügghet azzal, hogy a cervix a vemhesség végén felpuhul és rövidül, miközben csökken a kollagén tartalma.

Ismert, hogy az izokinolin vázas molekulák képesek relaxálni a simaizom szövetet pl. a drotaverin lecsökkenti a szülés időtartamát a cervix működésére hatva; a papaverin pedig csökkenti az izomtónust. Az általunk vizsgált izokinolin vázas molekulák közül két molekulának (218 és 852) volt hasonló ROCK II aktivitást gátló hatása, mint az ismert Rho-kináz inhibitornak, az Y-27632-nek. Azonos szintű relaxáló hatást mértünk a két izokinolin molekula és a referenciaként (fasudil) használt inhibitor esetében a 20 napos vemhes és ellés közbeni uterusban.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az alacsonyabb ROCK expresszió az uterusban és a magas szint a cervixben hozzájárulhat a vemhes uterus nyugalmi és a cervix zárt állapotban tartásához. A magas RhoA és ROCK szint az uterusban és az alacsony szintjük a cervixben a szülés idején pedig szerepet játszhat az összehúzódások fokozódásában, a cervix dilatációjában és szülés beindításában. Az izokinolin vázas molekulák pedig ígéretes gyógyszerjelöltek az új és hatásos Rho-kináz gátlók fejlesztése tekintetében.

Az értekezés alapját képező közlemények

1 Domokos D., Ducza E., Falkay G. Ras homologous A / Rho-associated coiled-coil containing protein kinase rendszer a vemhes patkány uterusban: új target potenciális tocolyticumok fejlesztésére. *MAGYAR NŐORVOSOK LAPJA*, 2015; 78:(5) pp. 250-256.

2 Domokos, D., Ducza, E., Falkay, G. and Gáspár, R. (2017). Alteration in expressions of RhoA and Rho-kinases during pregnancy in rats: their roles in uterine contractions and onset of labour. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(3), 439-451. **IF: 2,478**

3 Domokos, D., Fülöp, F., Falkay, G. and Gáspár, R. (2018). Effects of newly synthesized isoquinoline derivatives on rat uterine contractility and ROCK II activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(3), 466-469. **IF: 2,442**

4 Domokos, D., Ducza, E. and Gáspár, R. (2019). RhoA and Rho-kinase inhibitors modulate cervical resistance: The possible role of RhoA/Rho-kinase signalling pathway in cervical ripening and contractility. *European Journal of Pharmacology*, 843, 27-33. **IF: 3,04**

Előadások az értekezés témájában

Domokos Dóra, Ducza Eszter, Lovász Norbert, Falkay György. A RhoA és Rho-kinázok változásának és farmakológiai reaktivitásának vizsgálata vemhes patkány uteruson. *Gyógyszerészet* 58:(5) pp. 296-308. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus Budapest XV. Budapest, Magyarország: 2014.04.10-12.

Domokos D, Ducza E, Falkay G. A RhoA / Rho - kinázok expressziójának és farmakológiai reaktivitásának vizsgálata vemhes patkány uteruson. III. Interdiszciplináris Doktorandusz Konferencia 2014.04.15-17.

Domokos D, Fülöp F, Falkay G. Inhibitory effect of original synthesized isoquinoline derivatives for the rat uterus contraction. Bridges in Life Sciences 10th Annual Scientific Conference, Wroclaw, Poland; 2015. 04.16-19.

Domokos D, Ducza E, Gaspar R. RhoA inhibitor and Rho-kinase inhibitors modulate the cervical resistance: RhoA/ Rhokinase signal pathway may play a role in the cervical remodeling and smooth muscle contractility. 8th RECOOP Annual Project Review Meeting, Zagreb, Croatia, 2017. 10.19-21.

Domokos D, Ducza E, Gaspar R. Uterine expressions and pharmacological influences of RhoA and Rho-kinases during pregnancy in rats. Joint meeting of the Federation of European Physiological Societies and the Austrian Physiological Society, Vienna, Austria, 2017.09.13-15.