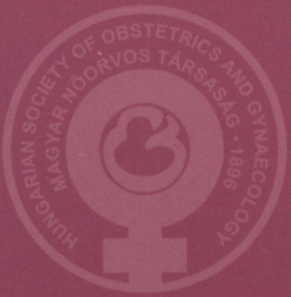


58326
5E1MAY



MAGYAR NŐORVOSOK LAPJA

JOURNAL OF HUNGARIAN OBSTETRICIANS AND GYNAECOLOGISTS

2015 NOV



Szerzőink figyelmébe

A Magyar Nőorvosok Lapja hiteles forrásként jeleníti meg a szülészeti-nőgyógyászati hivatás teljes spektrumát, beleértve a határtudományokat is (perinatológia, orvosi genetika, nőgyógyászati onkológia, reprodukciós endokrinológia, aszisztált reprodukció, urogynaecologia, menopauzális medicina, gyermeknőgyógyászat, szülészeti-nőgyógyászati pszichoszomatika, család- és nővédelem, stb.). A folyóirat lektori eljárást követően közöl eredeti tudományos beszámolókat mind a kísérletes, mind a klinikai kutatások területéről. Ezen kívül a lap publikál szakmai összefoglalókat, tanulságos esettanulmányokat, szakmai irányelveket, leveleket a Szerkesztőhöz, könyvismertetőket, szakmai eseményekről szóló beszámolókat, illetve a Magyar Nőorvos Társaság híreit.

A KÉZIRATOK BEKÜLDÉSÉNEK ÁLTALÁNOS IRÁNYELVEI:

A kézirat benyújtásának feltétele, hogy

1. a dolgozatot korábban még nem publikálták (kivéve előadás-kivonat vagy PhD-tézis formájában), illetve a kézirat a szerkesztőségi feldolgozás alatt más laphoz nem került párhuzamosan benyújtásra;
 2. a kéziratot valamennyi szerző jóváhagyta, és annak elkészítésében a nemzetközi publikációs alapelveknek megfelelően érdemi részt vállalt;
 3. a dolgozat nem sérti a Helsínki Deklaráció előírásait;
 4. a humán vizsgálatok az illetékes etikai bizottság jóváhagyásával történtek;
 5. a laboratóriumi állatkísérletek a vonatkozó szabályzatok szerint történtek;
 6. a kézirat megfelel az Orvostudományi Folyóiratok Szerkesztőbizottságának Nemzetközi Bizottsága (ICMJE) szerinti legutolsó ajánlásnak (www.icmje.org).
- A kézirat elkészítése során kérjük, törekedjen a pontos, tömör megfogalmazásra. A közlemény céljai legyenek egyértelműen meghatározva, a levont következtetéseket és véleményeket tudományosan kellően megalapozott eredmények támasztják alá.

A Magyar Nőorvosok Lapja egységes nyelvezetének érdekében a megjelenő munkák helyesírásánál az Orvosi helyesírási szótár (Akadémiai Kiadó, Budapest, 1992) által ajánlott írásmódot tartjuk irányadónak. A köznyelvben meghonosított idegen szavak írhatók magyar helyesírás szerint, e tekintetben a közlemény írásmódja egységes kell, hogy legyen.

KÉZIRATOK ELKÜLDÉSE:

A kéziratok teljes anyagát ábrákkal, táblázatokkal együtt, oldalszámozva, kísérőlevéllel, csatolmányként kérjük elektronikus úton elküldeni a következő e-mail címre: mnl.obgyn@med.u-szeged.hu

Első lépésben a beküldött közleményeket a folyóirat szerkesztősége tekinti át. Amennyiben a közleményt a szerkesztőbizottság megfelelőnek ítéli, a kézirat lektorokhoz kerül véleményezésre. Az eljárás során a közlemény minden szerzője elektronikus úton értesítést kap, illetve a szerzőknek nyilatkozniuk kell a publikálni kívánt munkában való tényleges közreműködésről. A kézirat elfogadása, elutasítása, vagy javítás szükségessége esetén a szerzők elektronikus úton tájékoztatást kapnak.

A Magyar Nőorvosok Lapjában a lektorált és elfogadott kéziratok közlése ingyenes.

A KÉZIRATTAL KAPCSOLATOS FORMAI KÖVETELMÉNYEK:

A kézirat szöveges részét Microsoft Word (.doc, .docx), vagy kompatibilis (.rtf) formátumban, Times New Roman 12pt betűmérettel, dupla sorközrel, széles margóval (3–3 cm) szükséges benyújtani. A táblázatok formátuma Microsoft Word (.doc, .docx), vagy Microsoft Excel (.xls, .xlsx) legyen. A táblázatokat és az ábrákat fekete-fehér szerkesztésben, egymástól elkülönítve, külön oldalakon kérjük benyújtani. Kérjük, hogy az esetleges képeket, fotókat szeparáltan, TIFF, JPEG (.tiff, .jpg) minőségben bocsássák rendelkezésünkre.

A kézirat szöveges részétől különálló kísérőlevél tartalmazza a publikáció címét, a szerzők nevét, elérhetőségét (levelezési cím, e-mail cím), illetve a kapcsolattartó szerző megnevezése is szükséges. Kérjük, hogy a kézirathoz csatolják az első szerző fényképét is.

A kéziratnak a következőket kell tartalmaznia: 1. Címoldal; 2. Összefoglalás, kulcsszavak; 3. Szöveg; 4. Köszönetnyilvánítás; 5. Érdekeltségek, támogatások; 6. Irodalomjegyzék 7. Angol nyelvű cím és összefoglalás, angol kulcsszavak; 8. Táblázatok; 9. Ábrák, fotók 10. Ábraalírások és magyarázatok jegyzéke.

A kézirat lapjait folyamatosan, közepén, felül, arab számokkal számozzák. A címlap legyen az első oldal.

1. **Címoldal:** A címlapon sorrendben a következők szerepeljenek:

2. a kézirat címe magyar nyelven, amely rövidítést nem tartalmazhat. Alcím esetén azt a következő sorban kell kezdeni.
 - a kézirat rövid címe (3–5 szó).
 - a szerzők neve. Kérjük valamennyi szerző teljes nevét kiírni (pl.: Kovács Péter Ákos dr.).
 - a szerzők munkahelyének pontos, hivatalos megnevezése a helységnevel, valamint az intézmény vezetőjének nevével együtt. Eltérő intézmények esetén, azok szerzőhöz való rendelése felső index használatával történjen (pl.: Kovács Péter Ákos dr.¹, majd: ²Semmelweis Egyetem, I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest). Egyéb közlendő (hallgatói minőség, kapcsolódás, stb.) jelölése felső indexbe írt csillaggal és annak magyarázata lábjegyzet használatával történjen (pl.: Szabó Lilla^{2*}, majd: ³Szegedi

Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, lábjegyzetbe: ⁴orvostan-hallgató).

3. **Összefoglalás:** Ebben a szakaszban a szöveget 4 bekezdésre kell elkülöníteni: „Célkitűzés”, „Anyag és Módszer”, „Eredmények”, „Következtetések”. Áttekintő jellegű közlemények esetén ez a szakasz folyamatos, tagolás nélküli legyen. Az összefoglalás maximális hossza 350 szó lehet. Az összefoglalás követően 3–5 kulcsszó felsorolása szükséges. A kulcsszavak lehetőleg az Index Medicus terminológiájához alkalmazkodjanak.
4. **Szöveg:** A kézirat szövegrésze tartalmazza a következő részeket: „Bevezetés”, „Anyag és módszer”, „Eredmények”, „Megbeszélés”. A szövegezés legyen folyamatos, de alcímekkel és bekezdésekkel tagolható.
5. A szövegrész terjedelme lehetőleg ne haladja meg a 3200 szót. Kazuisztikus közlemények esetében pedig a terjedelem lehetőleg ne legyen több 1500 szónál. Az irodalmi hivatkozásokat az előfordulás sorrendjében, arab számmal, szögletes zárójelben [] kell feltüntetni. A rövidítéseket az első használatkor fel kell tüntetni. A dolgozatban alapvetően SI mértékegységek használata elfogadott, azonban vényomásmértekek Hgmm egységben adhatóak meg.
6. **Köszönetnyilvánítás:** A megbeszélés részt követően, de az irodalomjegyzék előtt kerüljön.
7. **Érdekeltségek, támogatások:** Kérjük, hogy a szerzők sorolják fel minden tényleges, illetve lehetséges érdekeltiségüket (pénzügyi, személyes vagy egyéb), amely hatással lehetett a cikk megírására. Amennyiben a szerzők nem rendelkeznek érdekeltiségekkel, akkor is szükséges a következő mondat feltüntetése: „A szerző(k)nek nincsenek érdekeltiségei(k)”. Ebben a részben szükséges feltüntetni, ha a kutatás anyagi támogatásban részesült cégek vagy pályázatok útján.
8. **Irodalomjegyzék:** Az irodalomjegyzékben minden megjelent vagy megjelenésre elfogadott hivatkozást felsorolunk, a még nem elfogadott közleményeket és a személyes közléseket azonban nem. Az irodalomjegyzék összeállítása az idézés sorrendjében történjen, a szövegben előforduló sorszámot szögletes zárójelbe helyezve. Eredeti közlemények esetében maximum 40, összefoglaló közlemények esetén maximum 60, kazuisztikus közlemények esetében nem több, mint 15 irodalmi hivatkozás lehetséges. Referencia közlemények esetében 6 szerzőig minden szerző neve legyen feltüntetve. Amennyiben a referencia közlemény 6 szerzőnél többel rendelkezik, akkor a hivatkozás módja 3 szerző neve és „et al.”, magyar közlemények esetén „és mtsai.”.
9. **Hivatkozás folyóirat közleményekre:** A szerzők vezetékneve kiírva, keresztneveinek kezdőbetűje, közlemény címe, folyóirat nemzetközileg elfogadott rövidítése, publikáció éve, kötet, első és utolsó oldal.
Például:
[9] Kiss AA, Pap E, Falus A, Pállinger É. Mikrovezikulumok immunológiai szerepe az anya-magzat kommunikációban. *Magy Nőorv L* 2008;71(6):269–76.
[10] Seri I, Tulassay T, Kiszal J et al. Effect of low-dose dopamine infusion on prolactin and thyrotropin secretion in preterm infants with hyaline membrane disease. *Biol Neonate*. 1985;47(6):317–22.
- **Hivatkozás könyvekre:** a szerzők, vagy szerkesztők vezetékneve, keresztneveinek kezdőbetűje, ha szerkesztő, akkor utána zárójelben ed. (ed.), a könyv címe, a kiadás helye, a kiadó neve, a kiadás éve.
Például:
[11] Zoltán I (ed.). *Nőgyógyászat*. Budapest, Medicina Könyvkiadó, 1975.
- **Hivatkozás könyvrészletre:** a könyvrészlet szerzőinek vezetékneve, keresztneveinek kezdőbetűje, In: a könyvet szerkesztők vezetékneve, keresztneveinek kezdőbetűje, zárójelben ed. (ed.), a könyv címe, a kiadás helye, a kiadás éve, a fejezet első és utolsó oldala.
Például:
[12] Olive DL, Haney AE. Endometriosis. In: De Cherny AH (ed.). *Reproductive failure*. New York, Churchill Livingstone Inc., 1986, pp. 153–201.
10. **Angol nyelvű cím és összefoglalás, angol kulcsszavak:** A szerzők és a cím külön sorban, majd a magyar nyelvű összefoglalás és a kulcsszavak angol megfelelője szükséges.
11. **Táblázatok:** A táblázatokra a szövegben sorszámmal kell hivatkozni (1. táblázat, 2. táblázat, stb.). A táblázat felett bal oldalon a táblázat sorszáma, majd címe szerepeljen. A táblázat alá rövid magyarázó szöveg szükséges, amely nem része a táblázatnak, és amely alapján a táblázat önmagában is értelmezhető. Ide kérjük a táblázatban előforduló rövidítések magyarázatát is. A táblázatok vonatkozásában segítségként minták találhatóak a Magyar Nőorvos Társaság honlapján (www.mnt.hu), az MNL menüpon alatt.
12. **Ábrák és fotók:** Az ábrákra és a fotókra a szövegben sorszámmal kell hivatkozni (1. ábra, 2. ábra, stb.). Az ábra alatt bal oldalon az ábra sorszáma, majd címe szerepeljen. Az ábrákhoz tartozó további magyarázatot külön oldalon felsorolva (Ábraalírások és magyarázatok jegyzéke) kérjük feltüntetni. Az ábrák és fotók nem tartalmazhatnak vitetett képeket, prezentációkra jellemző díszítéseket.
13. **Ábraalírások és magyarázatok jegyzéke:** Itt szerepeljen az ábrák sorszáma, címe, rövid magyarázó szöveg, mely alapján az ábra önmagában is értelmezhető. Itt kérjük feltüntetni az ábrán előforduló rövidítések magyarázatát, illetve a több tagból álló ábrák részecskéit megnevezését is.

TARTALOMJEGYZÉK

KONGRESSZUSI REFERÁTUM

226. Non-invazív vizsgálati lehetőségek az in vitro fertilizációs kezelés hatásfokának növelésére
Bódis József dr., Várnagy Ákos dr.

ÖSSZEFOGLALÓ KÖZLEMÉNYEK

232. Szepszis szülés után
Rudas László dr.
239. A meddőség másik oldala: változások az andrológiai diagnosztikában
Pásztor Norbert dr., Szöllősi János dr., Pál Attila dr.

EREDETI KÖZLEMÉNYEK

245. Normál trophoblast és choriocarcinoma sejtvonalak gyógyszerérzékenysége vizsgálat
Singh Margit dr., Orbán Lajos dr., Németh Gábor dr.,
250. Ras homologous A / Rho-associated coiled-coil containing protein kinase rendszer a terhes patkány uterusban: új target potenciális tocolyticumok fejlesztésére
Domokos Dóra, Ducza Eszter dr., Falkay György dr.

ESETISMERTETÉSEK

258. Tumormarker negatív recidív ovárium carcinoma műtéttel kezelhető esete
Molnár Szabolcs dr., Póka Róbert dr.
264. Egy asszony 15. császármetszése
Váradi Eszter dr., Póka Róbert dr.
269. Agenesia portionis vaginalis cervicis uteri műtéti megoldása
Jánvári Nóra dr., Sápy Tamás dr., Póka Róbert dr.
272. Senning műtéten átesett nők várandóssága: 3 eset ismertetése
Horváth Rita dr., Bálint O. Hajnalka dr., Szenczi Orsolya dr., Temesvári András dr., Rigó János Jr. dr.

BESZÁMOLÓK - HÍREK

275. Beszámolók

TABLE OF CONTENTS

INVITED LECTURE

226. Increasing the success rate of in vitro fertilization using non-invasive methods
József Bódis, MD, Ákos Várnagy, MD

REVIEW ARTICLES

232. Sepsis after delivery
László Rudas, MD
239. The other side of infertility: recent changes in andrology evaluation
Norbert Pásztor, MD, János Szöllősi, MD, Attila Pál, MD

ORIGINAL ARTICLES

245. Examination of drug sensitivity in normal trophoblast and choriocarcinoma cell lines
Margit Singh, MD, Lajos Orbán, MD, Gábor Németh, MD
250. Ras homologous A / Rho-associated coiled-coil containing protein kinase in the pregnant rat uterus: new target for the development of potential tocolytic agents
Dóra Domokos, Eszter Ducza, MD, György Falkay, MD

CASE REPORTS

258. Secondary cytoreductive surgery in recurrent epithelial ovarian cancer with negative tumor markers
Szabolcs Molnár, MD, Róbert Póka, MD
264. A woman's fifteenth cesarean section
Eszter Váradi, MD, Róbert Póka, MD
269. Surgical correction of cervical vaginal agenesis
Nóra Jánvári, MD, Tamás Sápy, MD, Róbert Póka, MD
272. Pregnancy after Senning operation: three case studies
Rita Horváth, MD, Hajnalka O. Bálint, MD, Orsolya Szenczi, MD, András Temesvári, MD, János Rigó Jr., MD

REVIEWS AND NEWS

275. Reviews

IMPRESSZUM



ISSN 0025-021X

Felelős szerkesztő | Managing Editor: **Bódis József**Főszerkesztő | Chief Editor: **Bártfai György**Főszerkesztő helyettesek | Assistant Chief Editors:
Gerő György, Török MiklósSzerkesztőség | Editors: **Ács Nándor, Koppán Miklós, Lampé Rudolf, Molvarec Attila, Pál Attila, Pál Zoltán, Póka Róbert, Rigó János, Sobel Gábor**A lapot kiadja a **Magyar Nőorvos Társaság**.

Felelős kiadó a társaság elnöke.

(A Társaság honlapja: www.mnt.hu)A lapot szerkeszti a **Szerkesztőbizottság**.Szerkesztő Bizottság posta címe:
MH EK Szülészeti és Nőgyógyászati Osztály
1062 Budapest, Podmaniczky u. 111.Szerkesztő Bizottság elérhetősége:
Tel.: 06/1/475-2568Szerkesztő Bizottság e-mail címe:
mnl.obgyn@med.u-szeged.huSzerkesztőségi munkatárs: **Chibáné Wágner Györgyi**
e-mail cím: chibagyorgyi@gmail.com

A Magyar Nőorvos Társaság tagsági díja – mely egyben a lap előfizetési díja – egy évre 6000 Ft. Nyugdíjasoknak és rezidenseknek, valamint szülésznek és védőnőknek 3000 Ft. (A szomszédos országokban élő magyar kollégák számára 70 Euro, míg a távolabbi országokban élő magyar származású kollégák számára 200 Euro, postaköltséggel együtt.)

(Bank: OTP Bank Rt., Dél-Pesti Régió,
1095 Bp., Tinódi u. 9–11.
Számlassz.: 11709002-20002987)

Közületeknek (könyvtárak, kórházak stb.) és nem társasági tagoknak a lap előfizetési díja egész évre 14800 Ft + áfa.

A lap kéthavonta jelenik meg, 1250 példányban.

A nyomdai kivitelezés és a terjesztés lebonyolítása a Tibuktu Kiadó és Produkciós Szolgáltató Bt. 1139 Budapest, Rőppentyű u. 73/D.
Mobil: +36 30 398 1002
e-mail: mnl@printpoint.hu gondozásában történik. ügyvezető: Czéh Attila.

Nyomás: Grafit Pencil Nyomda Kft.
1046 Budapest, Klauzál utca 9.

(Kérjük, hogy az esetleges címváltozásokat a fenti elérhetőségeinken jelezzék.)



A címlapon:

Az utolsó hagyományos japán korszak az un. Edo kor (1603-1867) a Tokugawa kormányzat, a sógunátus kora, melyre a külföldiek előli bezárkózás volt jellemző. Művészetében fontos szerepe volt a festészetnek, majd a tömeges előállítás lehetővé tevő fametszeteknek. Az un. Ukiyo-e (a labegő világ képei) különleges igénybevételt bíró papírra készültek, először fekete fehér, később színes változatban. Minden színre külön fa dűcöt alkalmaztak, többnyire cseresznyefából. Témái életképek és tájképek, előszerepével a női szépség, a kabuki színház és a szumó világ hírességei, sokszor erotikus töltésű ábrázolások voltak. A korszakot lezáró polgárháború hatására az ország megnyílt a külföldiek előtt, a fametszetek ismertté váltak, igen nagy hatással sok európai festő, köztük Degas, Monet, van Gogh, Rippl-Rónai művészetére is. Magyarországon gróf Vay Péter tett szert óriási gyűjteményre, melyből 1910-ben, majd 2009-ben nyílt kiállítás Budapesten. A borítón szereplő művet Utagawa Yoshitorának tulajdonítják, munkássága (1850-1880) a korszak végét képviseli. A kb. 1880-ban készült fametszet a terhesség három harmadát együtt, jobbról-balra haladva ábrázolja, közülük a borítón az előrehaladott terhesség látható.

Ras homologous A / Rho-associated coiled-coil containing protein kinase rendszer a terhes patkány uterusban: új target potenciális tocolyticumok fejlesztésére



Domokos Dóra, Ducza Eszter dr., Falkay György dr.

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
(igazgató: Gáspár Róbert dr.)

ÖSSZEFOGLALÁS

Célkitűzés: Az RhoA és a Rho-kinázok (ROCK) számos sejten belüli folyamat szabályozásában vesznek részt, többek között a simaizom kontrakcióban a miozin könnyűlánc és a miozin foszfatáz foszforilálásán keresztül. Vizsgálataink célja az RhoA és ROCK messenger RNS és protein expresszió ontogenetikai változásának meghatározása terhes patkány uterusban, valamint az RhoA és ROCK inhibitorok uterus relaxáló hatásainak vizsgálata új potenciális tocolyticumok jövőbeni fejlesztése szempontjából.

Anyag és Módszer: Real-Time PCR és Western blot analízissel meghatároztuk az RhoA, a ROCK I és a ROCK II mRNS és fehérje expresszióját nem terhes és 5, 9, 13, 15, 18, 20, 22 napos terhes, szülés közbeni és postpartum patkány uterusban. Valamint in vitro izolált szervi kísérleteket végeztünk, mely során RhoA inhibitoroként simvastatin alkalmaztunk nem terhes illetve 5, 18, 20 napos terhes, szülés közbeni és postpartum myometriumon. A ROCK gátlásának a vizsgálatát nem terhes, 20 napos terhes, szülés közbeni és postpartum uteruson végeztük Y-27632 alkalmazásával.

Eredmények: Az RhoA messenger RNS és fehérje expressziója a terhesség elején szignifikánsan lecsökkent és nem változott jelentősen a terhesség 22. napjáig. Szülés közben a szintje drámaian megemelkedett, majd postpartum lecsökkent. A ROCK I expressziója a terhesség 5. napján, a ROCK II pedig a terhesség 9. napján szignifikánsan lecsökkent és nem változott a terminusig. Szülés közben erőteljes emelkedést mutatott, majd postpartum jelentősen csökkent.

Az in vitro vizsgálatok azt mutatták, hogy a simvastatin uterus relaxáló hatása rosszabb a terhesség 5. napján, illetve postpartum, amikor az RhoA expresszió alacsony. Az Y-27632 uterus relaxáló hatása szülés közben a legkifejezettebb, amikor a ROCK mRNS expressziója és fehérje szintézise a legmarkánsabb.

Következtetések: Az RhoA és a ROCK expressziójának, valamint fehérje szintézisének terhesség alatti változásait (ontogenezis) in vitro farmakológiai gátló szerekkel (simvastatin, Y-27632) is megerősítettük. Kimutattuk, hogy az RhoA és a ROCK expressziója a szülés alatt a legkifejezettebb, amikor az inhibitorok relaxáló hatása a legerőteljesebb. Mindezek alapján, új RhoA és Rho-kináz gátlók potenciális tocolyticumok lehetnek a jövőben.

KULCSSZAVAK

patkány uterus, RhoA és ROCK expresszió, terhesség

Dóra Domokos, Eszter Ducza, MD, György Falkay, MD

Ras homologous A / Rho-associated coiled-coil containing protein kinase in the pregnant rat uterus: new target for the development of potential tocolytic agents

ABSTRACT

Aim: RhoA/ ROCK takes part in several cellular function, including smooth muscle contraction via phosphorylation of myosin light chain and myosin phosphatase. The aims of the present study were to investigate the changes of RhoA and ROCKs mRNA expression and protein synthesis during pregnancy and postpartum in rat. The myometrial relaxant effects of RhoA and ROCK inhibitors (simvastatin, Y-27632) were also investigated.

Materials and Methods: Real-Time PCR and Western blot analysis were used for determination of mRNA and protein expression of RhoA, ROCK I and ROCK II in non-pregnant and 5,9,13,15,18,20,22 days of pregnancy, during parturition and postpartum in rat uterus.

The tocolytic effects of RhoA and ROCK inhibitors simvastatin and Y-27632 were investigated in an in vitro tissue bath system.

Results: The mRNA and protein expression of RhoA significantly decreased at early stage of pregnancy then remained constant till end of pregnancy. The level of RhoA markedly increased during parturition and less expression was observed during postpartum period. The ROCK I and ROCK II mRNA expression significantly decreased on day 5 and day 9 of pregnancy respectively and then remained at low level till parturition. Similarly to RhoA, the ROCKs expression dramatically increased during parturition and decreased postpartum. The pharmacological reactivity of RhoA and ROCK inhibitors was significantly more pronounced in the tissue samples, where the expression of target proteins was higher.

Conclusions: From our results it can be concluded that the RhoA/ROCK expression is not stationary, it dynamically changes during pregnancy. These findings were supported by pharmacological investigations.

The main message of our results is that RhoA and ROCK expression markedly increased during parturition and can be inhibited effectively, when the motor activity of the pregnant uterus is the strongest. We were led to the conclusion that the inhibition of RhoA/ROCK by new selective inhibitors may result in new potential tocolytic agents in the future.

KEYWORDS

rat uterus, expression of RhoA/ROCK, pregnancy

BEVEZETÉS

A koraszülés, vagyis a 37. gesztációs hét előtt bekövetkező szülés, a neonatális mortalitás és morbiditás vezető okának tekinthető. 2005-ben 12,9 millió koraszülést regisztráltak a világon [1], 2010-ben ez a szám már 14,9 millióra emelkedett [2]. A korai fájástevékenység és a koraszülés terápiájában alkalmazott tocolyticumok (β_2 -adrenerg receptor agonisták, Ca-csatorna blokkolók, oxytocin antagonisták, progesztogének, NO donorok) – melyek leginkább a 34. hét előtt bekövetkező, spontán koraszülések esetén kerülnek alkalmazásra – nem csökkentik a koraszülés gyakoriságát, sőt a koraszülés mind a fejlett, mind a fejlődő országokban emelkedő tendenciát mutat [3]. A klinikai gyakorlatban alkalmazott tocolyticumok közül csupán az oxytocin antagonisták fejlesztésénél volt cél a koraszülés hatékonyabb terápiája.

Az összes többi tocolyticus szer csak új indikációs területet jelent az adott gyógyszercsoport számára, pl. a β_2 -mimetikumokat az asthma terápiájára fejlesztették, majd az indikációs területet terjesztették ki a koraszülés kezelésére. Túl a gyógyszerfejlesztés finansiális problémakörén, hatásosabb tocolyticumok fejlesztésének a nehézsége abban rejlik, hogy a terhes uterus kontraktilitását szabályozó élettani mechanizmusokról nagyon szegényesek az ismereteink. Az experimentális farmakológia és a klinikai kutatás számára változatlanul sürgető feladat új targetek feltárása és hatékonyabb tocolyticumok fejlesztése.

A simaizom működésében fontos szerepet játszanak a vékony (aktin) és a vastag (miozin) filamentumok, az összehúzódásért a közöttük kialakuló keresztidák (aktomiozin komplex) és azok szinkronizált elmozdulása a felelős [4]. Az aktomiozin komplex – ezáltal a kont-

rakció – kialakulásának a feltétele a miozin könnyűlánc (myosin light chain, MLC) enzimatisz foszforilációja, melyet a miozin könnyűlánc kináz (myosin light chain kinase, MLCK) katalizál [5]. A relaxáció pedig a miozin foszfatáz (myosin phosphatase, MLCP) defoszforilációs aktivitásának az eredménye [6]. Az RhoA (ras homologous GTP binding protein member A) és ROCK (RhoA-activated protein kinase) Ca-független jelátviteli útvonal, az MLC foszforilált állapotban maradását indukálja azáltal, hogy inaktíválja a MLCP-t, valamint direkt foszforilálja a MLC-t, ami simaizom kontrakciót eredményez [7]. Ezek alapján az RhoA, valamint a ROCK aktivitásának a gátlása az uterus relaxációját eredményezheti.

A Rho-kináz két izoformáját azonosították, ROCK I és ROCK II. ROCK I mRNS expressziót mutattak ki az agyban és az izomszövetben és ROCK II-t azonosítottak az agyban, az izomban, a szívben, a tüdőben és a placentában [8].

Az irodalomban nincs konzekvens vizsgálat az RhoA és a ROCK messenger RNS és fehérje expresszió változásának (ontogenezis) a vizsgálatára terhes patkány uterusban, valamint ellentmondások vannak az eddig publikált eredmények között, különös tekintettel az RhoA és a ROCK mRNS expressziójának változására terminusban. Ezért jelen vizsgálatainkkal célul tűztük ki, hogy meghatározzuk az RhoA és a ROCK messenger RNS és fehérje expresszió változását terhes patkány uterusban. Továbbá megvizsgáltuk az irodalomból ismert RhoA inhibitor simvastatin [9], valamint ROCK inhibitor Y-27632 [10] hatását a terhes uterus kontraktilitására in vitro izolált szervi rendszeren. Az inhibitorok alkalmazásával választ kaphatunk arra, hogy az RhoA, illetve ROCK gátlása potenciálisan alkalmas lehet-e a korai fájástevékenység terápiajára.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Az állatkísérleteket a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatetikai Bizottságának és a Csongrád Megyei Mezőgazdasági, Szakigazgatási Hivatal Élelmiszerlánc Biztonsági és Állategészségügyi Igazgatóságának az engedélyével végeztük. (Engedélyszám: IV/198/2013).

Állatok pároztatása

Ivarérett hím (240-260g) és nőstény (180-200g) Sprague-Dawley patkányokat pároztattunk speciális ketrecben. A pároztatás kezdetétől számítva 4-5 órán belül a nőstény patkányoktól vett hüvelykeneteket mikroszkóp alatt megvizsgáltuk, hímivarsejteket kerestünk. Azokat a nőstényeket, amelyeknél az eredmény pozitív lett, elkülönítettük, és 1. napos vemhes állatoknak tekintettük.

Szövetgyűjtés

A Real-Time PCR és a Western blot analízishez nem terhes, valamint 5, 9, 13, 15, 18, 20, 22 napos terhes, szülés közbeni és posztpartum (szülés után 1 nappal) myometrium mintákat távolítottunk el. A szöveteket fiziológiás sóoldatban mostuk, ezután ribonukleáz inhibitor tartalmazó oldatba (RNAlater) helyeztük egy éjszakára 4 °C -on. Ezt követően folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és további felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

Real-Time PCR analízis

A folyékony nitrogénbe fagyasztott mintákat mechanikusan porítottuk majd ezekből RNS-t izoláltunk. Az RNS kvantitatív meghatározására fotometriás technikát alkalmaztunk. A kísérlet során a következő primereket használtuk: ROCK I (Rn00579490_m1), ROCK II (Rn00564633_m1), RhoA (Rn04219609_m1) és endogén kontroll β -aktin (Rn00667869_m1), valamint a SensiFAST Probe Hi-ROX One-Step Kitet használtuk (Bioline, Csertex Ltd., Hungary). A Real-Time PCR méréseket ABI StepOne Real-time cycler készüléken végeztük.

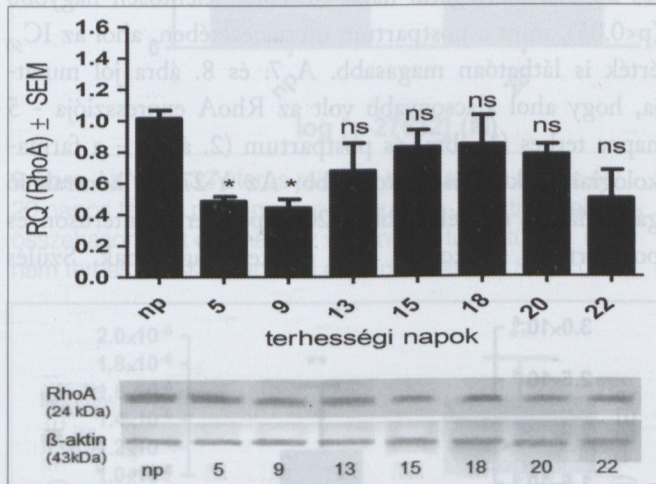
Western blot analízis

A mintákat a Sartorius Mikro Dismembrator U (Sartorius Goettingen, Németország) készülékkel porítottuk, majd RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer) lízis puffert, PMSF-t (phenylmethylsulfonyl fluoride), nátrium ortovanadát és proteáz inhibitor tartalmazó elegyben homogenizáltuk. Az elektroforézis 50 μ g fehérje felhasználásával 4-12 %-os NuPAGE Bis-Trisgélén történt, majd nitrocellulóz membránra transferáltuk. Ezután RhoA, ROCK I, ROCK II és β -aktin poliklonális antitestekkel 1 órán keresztül inkubáltuk a mintákat. Az immunreaktív helyeket WesternBreeze Chromogenic Western blot Immundetection Kit alkalmazásával tettük láthatóvá. Az optikai denzitás meghatározását Kodak 1D Images Software segítségével végeztük.

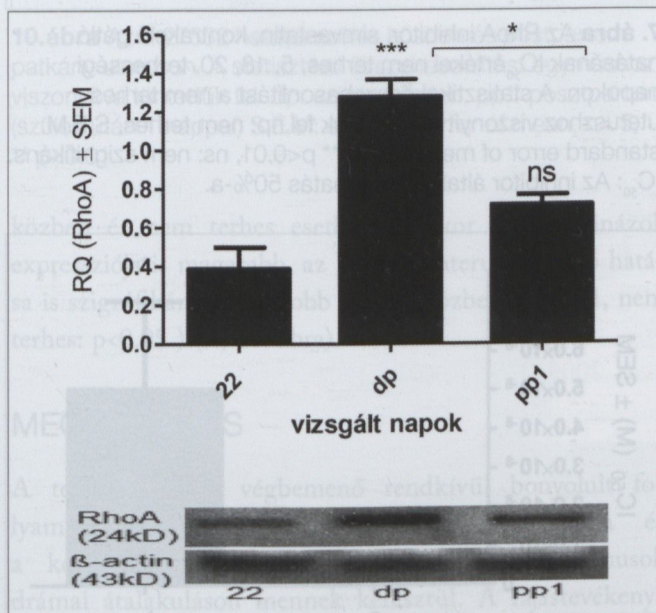
In vitro vizsgálatok

Az uterus motoraktivitásának a vizsgálatához nem terhes (ösztrusz ciklusban levő) valamint 5, 18, 20 napos terhes, szülés közbeni és postpartum (szülés után 1 nappal) uterus szöveteket alkalmaztunk. A patkányokat CO₂-al leöltük, majd a myometriumból 5 mm hosszúságú gyűrűket metszettünk ki. A mintákat karbogénnel (95 % O₂ + 5 % CO₂) átáramoltatott szervfürdőbe helyeztük, amely 37 °C-os 10 ml de Jongh oldatot tartalmazott. 1 óra inkubálást követően oxytocinnal kontrakciókat váltottunk ki. RhoA inhibitor simvastatint, valamint a ROCK inhibitor Y-27632-t (10⁻⁸-10⁻⁴ M) alkalmaztunk kumulatív

módon (kumulatív: növekvő koncentrációban, a szervfűrdőből való kimosás nélkül adagoltuk a vizsgálni kívánt inhibitor). A kontrakciókat egy traszducer elektromos jellel alakította át, amit az ISOSYS S.E.L Advanced szoftverrel regisztráltunk. A kiértékelést a GraphPad Prism 5.0 program segítségével végeztük. A statisztikai kiértékelés one-way ANOVA és t-teszt alkalmazásával történt.



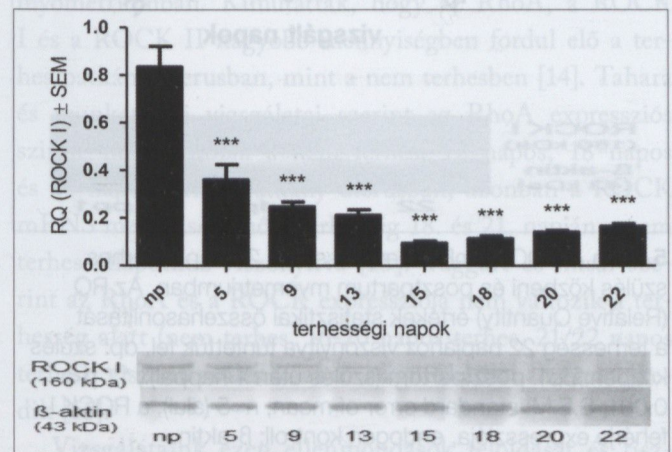
1. ábra Az RhoA mRNS expressziója a terhesség során. Az RQ (Relative Quantity) értékek statisztikai összehasonlítását a nem terhes mintához viszonyítva adtuk meg. np: nem terhes, ns: nem szignifikáns, * $p < 0.05$, S.E.M: standard error of mean, $n=5$ (alul), az RhoA fehérje expressziója a terhességi napok függvényében, endogen kontroll: β -aktin.



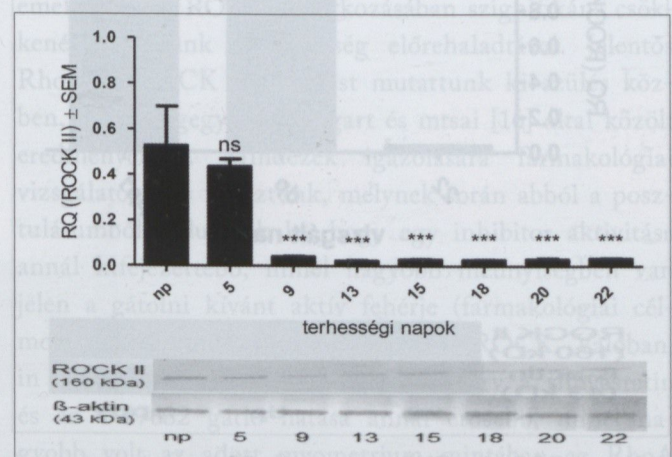
2. ábra Az RhoA mRNS expressziója 22 napos terhes, szülés közbeni és posztpartum patkány uterusban. Az RQ (Relative Quantity) értékek statisztikai összehasonlítását a 22 napos terhes minta értékeihez viszonyítva tüntettük fel. dp: szülés közben, pp1: posztpartum (szülés után 1 nappal), ns: nem szignifikáns, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, S.E.M: standard error of mean, $n=5$ (alul), az RhoA fehérje expressziója, endogen kontroll: β -aktin.

EREDMÉNYEK

A Real-Time PCR és a Western blot analízis eredményei azt mutatják, hogy az RhoA expressziós szintje szignifikánsan lecsökkent a terhesség 5. és 9. napján, majd nem szignifikáns emelkedő tendenciát mutatott a 18. napig, ezután enyhén csökkent (1. ábra). Szülés közben viszont az mRNS és fehérje szint drámai emelkedését figyeltük meg ($p < 0.001$) a terhesség 22. napjához viszonyítva, ami postpartum jelentősen mérséklődött (2. ábra). A ROCK I expressziója a terhesség 5. napján (3. ábra), a ROCK II mRNS szintje pedig a terhesség 9. napján (4. ábra) erőteljesen lecsökkent és a terhesség végéig alacsony szinten ma-

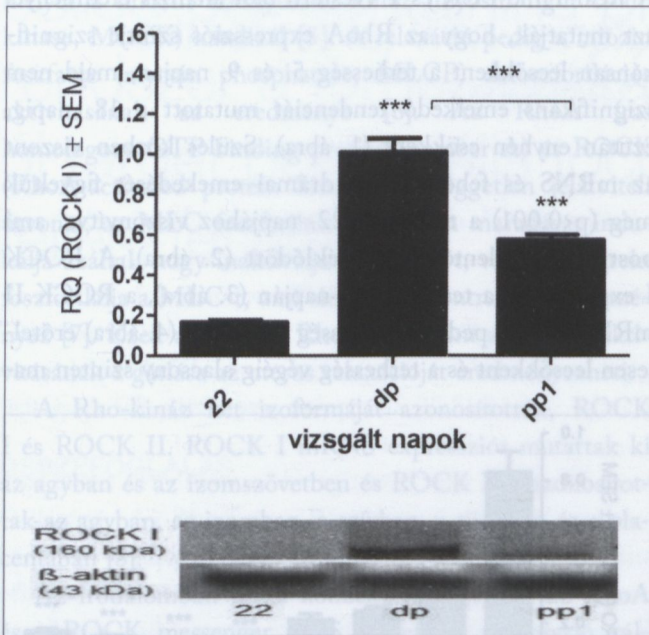


3. ábra A ROCK I mRNS expressziójának a változása a terhességi napok függvényében. Az RQ (Relative Quantity) értékek statisztikai összehasonlítását a nem terhes uterus értékeihez viszonyítva adtuk meg. np: nem terhes, ns: nem szignifikáns, *** $p < 0.001$, S.E.M: standard error of mean, $n=5$ (alul), a ROCK I fehérje expressziója, endogen kontroll: β -aktin

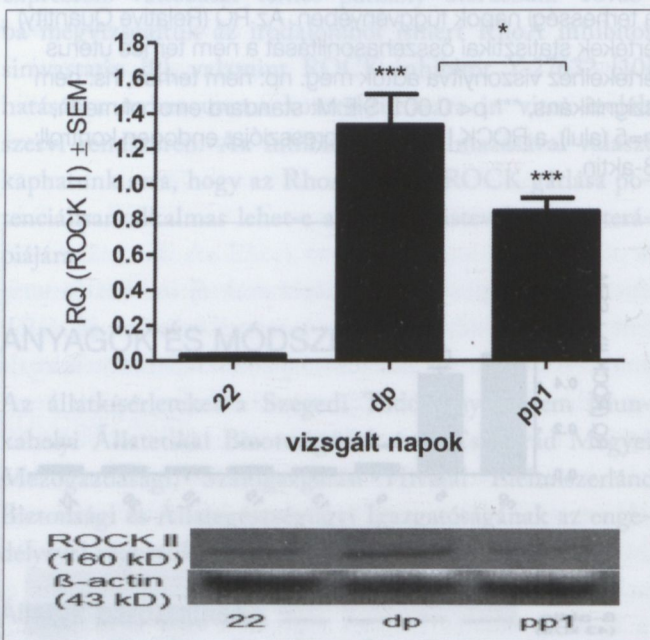


4. ábra A ROCK II mRNS expressziója a terhesség során. Az RQ (Relative Quantity) értékek statisztikai összehasonlítását a nem terhes myometrium értékeihez viszonyítva adtuk meg. np: nem terhes, ns: nem szignifikáns, *** $p < 0.001$, S.E.M: standard error of mean, $n=5$ (alul), a ROCK II fehérje expressziója a terhességi napok függvényében, endogen kontroll: β -aktin.

radt. A szülés közbeni mintákban azonban az expressziós szint mindkét kináz esetében drasztikusan megemelkedett



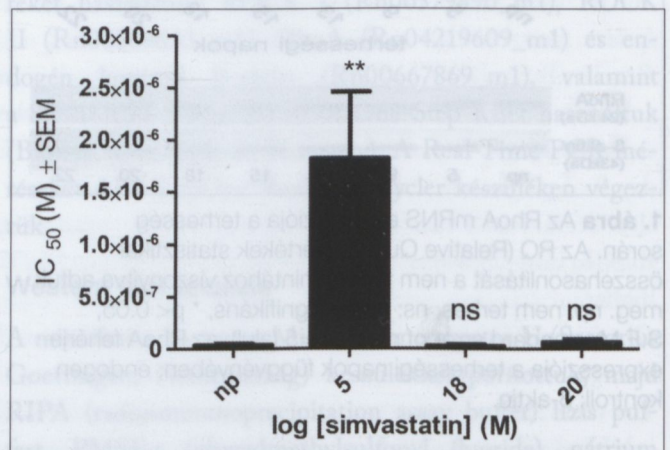
5.ábra A ROCK I mRNA expressziója 22 napos terhes, szülés közbeni és posztpartum myometriumban. Az RQ (Relative Quantity) értékek statisztikai összehasonlítását a terhesség 22 napjához viszonyítva tüntettük fel. dp: szülés közben, pp1: posztpartum (szülés után 1 nappal), *** $p < 0.001$, S.E.M: standard error of mean, $n=5$ (alul), a ROCK I fehérje expressziója, endogen kontroll: β -aktin.



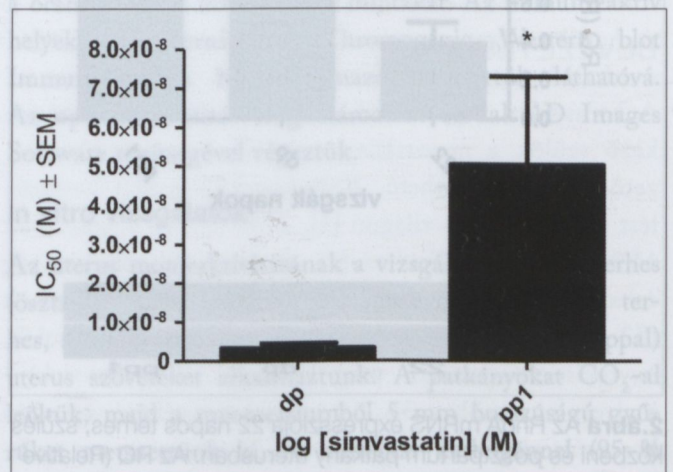
6.ábra A ROCK II mRNA expressziója 22 napos terhes, szülés közbeni és posztpartum patkány uterusban. Az RQ (Relative Quantity) értékek statisztikai összehasonlítását a 22 napos terhes myometrium értékeihez viszonyítva tüntettük fel. dp: szülés közben, pp1: posztpartum (szülés után 1 nappal), *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$, S.E.M: standard error of mean, $n=5$ (alul), a ROCK II fehérje expressziója, endogen kontroll: β -aktin.

($p < 0.001$) a 22. naphoz viszonyítva, majd postpartum lecsökkent (5., 6. ábra).

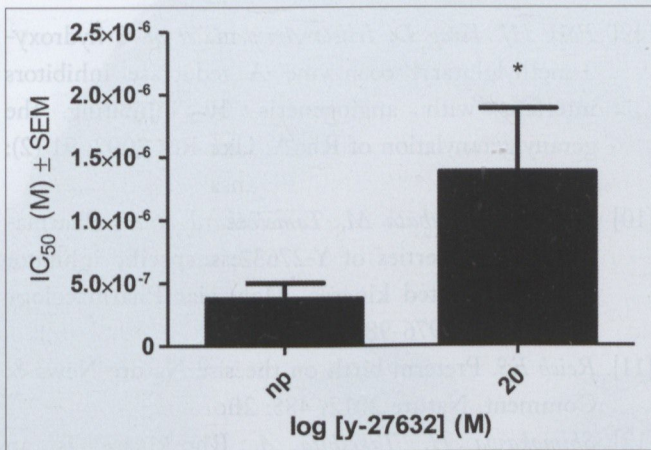
Az in vitro vizsgálatok során az RhoA inhibitoraként alkalmazott simvastatin uterus-relaxáló hatása kifejezettebb (az IC_{50} értékek szignifikánsan alacsonyabbak) a nem terhes, 18 és 20 napos terhes myometriumban (7. ábra) összehasonlítva az 5 napos terhesséssel ($p < 0.01$). A szülés közben mért gátló hatás (8. ábra) jelentősen nagyobb ($p < 0.05$), mint a postpartum uterus esetében, ahol az IC_{50} érték is láthatóan magasabb. A 7. és 8. ábra jól mutatja, hogy ahol alacsonyabb volt az RhoA expressziója - 5 napos terhes (1. ábra) és postpartum (2. ábra) - a farmakológiai reaktivitás is rosszabb. Az Y-27632 kontrakció gátló hatása mérsékeltebb a 20 napos terhes uterusban és postpartum, amikor az IC_{50} értékek nagyobbak. Szülés



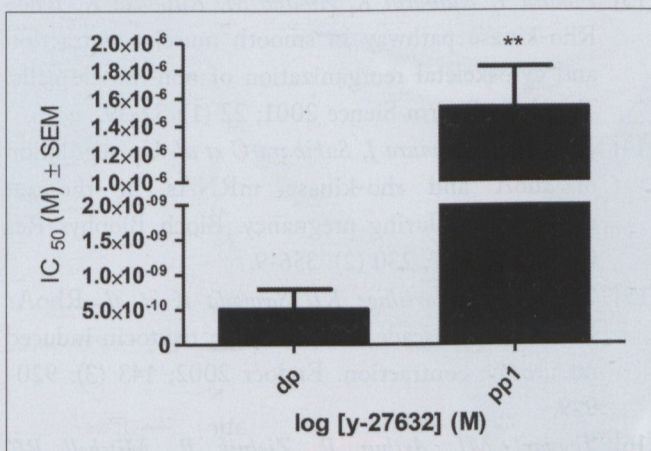
7. ábra Az RhoA inhibitor, simvastatin, kontrakció gátló hatásának IC_{50} értékei nem terhes, 5, 18, 20. terhességi napokon. A statisztikai összehasonlítását a nem terhes uterusához viszonyítva tüntettük fel. np: nem terhes, S.E.M: standard error of mean, $n=5$, ** $p < 0.01$, ns: nem szignifikáns. IC_{50} : Az inhibitor által kiváltott hatás 50%-a.



8. ábra Az RhoA inhibitor, simvastatin, uterus relaxáló hatása patkány myometriumban. A statisztikai összehasonlítását egymáshoz viszonyítva adtuk meg. dp: szülés közben, pp1: posztpartum (szülés után 1 nappal), S.E.M: standard error of mean, $n=5$, * $p < 0.05$.



9.ábra Az Y-27632 uterus relaxáló hatása nem terhes és 20 napos terhes patkány myometriumban. A statisztikai összehasonlítást egymáshoz viszonyítva tüntettük fel. np: nem terhes, S.E.M: standard error of mean, n= 5, *p<0.05.



10.ábra Az Y-27632 hatása szülés közben és postpartum patkány uterusban. A statisztikai összehasonlítást egymáshoz viszonyítva tüntettük fel. dp: szülés közben, pp1: posztpartum (szülés után 1 nappal) S.E.M: standard error of mean, n= 5, ** p<0.01.

közben és nem terhes esetben, amikor a Rho-kinázok expressziója is magasabb, az Y-27632 uterus relaxáló hatása is szignifikánsan nagyobb (szülés közben : p<0.01, nem terhes: p<0.05) (9., 10. ábra).

MEGBESZÉLÉS

A terhesség alatt végbemenő rendkívül bonyolult folyamatok eredményeként az uterus struktúrája és a kontraktilitását szabályozó szignál mechanizmusok drámai átalakuláson mennek keresztül. A fájástevékenység beindulásakor a myometrium kontraktilitása fokozódik, melyet számos jelátviteli út szabályoz (pl. oxytocin, prosztaglandinok, adrenerg rendszer, K és Ca csatornák). Ezen mechanizmusokra épülő tocolyticumok bár hatékonyan gátolják a terhes uterus kontraktilitását, a klinikai statisztikai adatok szerint a koraszülés gyakorisága nem javul [11]. Mindezek alapján az experimentális farmakoló-

gia változatlan kihívása új mechanizmusokon alapuló, hatékonyabb, új potenciális tocolyticumok fejlesztése. Ilyen alternatíva lehet az RhoA/ROCK rendszer gátlása.

Az RhoA/Rho-kináz jelátviteli út számtalan sejten belüli folyamat szabályozásában vesz részt, többek között a sejtproliferációban, sejtmigrációban és a simaizom kontrakcióban [12]. A GTP kapcsolt RhoA által aktivált ROCK az aktomiozin komplex kialakulását indukálja, ezáltal kontrakció jön létre [13]. Az irodalomban közölt RhoA és ROCK expresszió, illetve saját vizsgálataink között számos ellentmondás van. Niiro és mtsai már 1997-ben vizsgálták az RhoA és a ROCK mRNS expresszióját nem terhes és 20-22 napos terhes patkány myometriumban. Kimutatták, hogy az RhoA, a ROCK I és a ROCK II nagyobb mennyiségben fordul elő a terhes patkány uterusban, mint a nem terhesben [14]. Tahara és munkatársai vizsgálatai szerint az RhoA expresszió szintje nem változik a nem terhes, 12 napos, 18 napos és 21 napos terhes patkány uterusban, azonban a ROCK mRNS mennyisége nő a terhesség 18. és 21. napján a nem terhes állapothoz viszonyítva [15]. Taggart és mtsai szerint az RhoA és a ROCK expressziója nem változik a terhesség alatt (nem terhes, 16-20 napos terhes, 21/22 napos terhes), viszont szülés közben szignifikánsan megemelkedik [16].

Vizsgálataink ezen ellentmondások feloldását és tisztázását is célozták. Ennek érdekében a terhesség alatt 7 időpontban, valamint szülés közben és postpartum is meghatároztuk az RhoA és a Rho-kinázok mRNS expresszióját és fehérje szintézisét. Niiro és mtsai [14], valamint Tahara és mtsai [15] eredményeivel ellentétben az RhoA szintje koraterhességben csökken, majd emelkedik. A ROCK vonatkozásában szignifikáns csökkenést találtunk a terhesség előrehaladtával. Jelentős RhoA és ROCK emelkedést mutattunk ki szülés közben, mely megegyezik Taggart és mtsai [16] által közölt eredményekkel. Mindezek igazolására farmakológiai vizsgálatokat is végeztünk, melynek során abból a posztulátumból indultunk ki, hogy egy inhibitor aktivitása annál kifejezettebb, minél nagyobb mennyiségben van jelen a gátolni kívánt aktív fehérje (farmakológiai célmolekula), esetünkben az RhoA és a ROCK. Valóban, in vitro kísérleteink azt mutatták, hogy a simvastatin és az Y-27632 gátló hatása annál erősebb, minél nagyobb volt az adott myometrium mintában az RhoA és a ROCK expressziója. Szoros összefüggést találtunk a farmakológiai reaktivitás, valamint az RhoA és a ROCK expressziója között. Ez igazolja a Real-Time PCR és Western blot technikákkal mért RhoA és ROCK mRNS expresszió dinamikájának a valóságát. Moran és mtsai [17] valamint Lartey és mtsai [18]

az RhoA és ROCK jelenlétét humán uterusban is kimutatták. Így feltételezhető, hogy az RhoA és a ROCK gátlása humán uterusban is relaxációt eredményez.

Ismert, hogy a koraszülés pathomechanizmusa nem egységes. Ma legalább kettő (spontán és indukált) formáját különböztetjük meg. Ezekben az RhoA és ROCK szerepét még nem vizsgáltuk. Az erre alkalmas állatkísérletes modellekben az RhoA és a ROCK szerepének a vizsgálata, valamint gátlásának hatásossága a jövő feladata lesz.

Összefoglalva, eredményeink legfontosabb új megállapítása, hogy szülés közben az RhoA és a ROCK expresszió ugrásszerűen megemelkedik a myometriumban és szelektív inhibitorokkal hatásosan gátolható, mely alapul szolgálhat új originális, szelektív RhoA és ROCK gátlók szintézisére, mely új mechanizmussal ható, feltehetően a korábinál hatásosabb tocolyticumok fejlesztését eredményezheti a jövőben.

Érdekeltségi nyilatkozat

A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Beck S, Wojdyla D, Say L et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ* 2010; 88: 31–38.
- [2] Blencowe H, Cousens S, Chou D et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health* 2013; 10. Suppl 1:S2.
- [3] Hamilton BE, Martin JA, Ventura SJ. Births: preliminary data for 2005. *Nat Vit Stat Rep*, 2006; 11: 1-7.
- [4] Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 2003; 27:4: 201-206.
- [5] Kamm KE, Stull JT. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25: 593-620.
- [6] Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994; 372: 231-236.
- [7] Kimura K, Ito M, Amano M et al. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 1996; 273 (5272), 245-248.
- [8] Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T et al. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *Febs Letters* 1996; 392 (2): 189-193
- [9] Park HJ, Kong D, Iruela-Arispe L et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circ Res* 2002; 91 (2): 143-150.
- [10] Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I et al. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Molecular Pharmacology* 2000; 57 (5): 976-983.
- [11] Reich ES. Preterm birth on the rise *Nature News & Comment*. *Nature* 2012; 485: 20.
- [12] Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Art Thromb and Vascular Biology* 2005; 25: 1767-1775.
- [13] Fukata Y, Kaibuchi K, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends in Pharm Sience* 2001; 22 (1): 32-39.
- [14] Niuro N, Nishimura J, Sakibara C et al. Up-regulation of rhoA and rho-kinase mRNAs in the rat myometrium during pregnancy. *Bioch Biophys Res Commun* 1997; 230 (2): 356-9.
- [15] Tahara M, Morishige KI, Sawada K et al. RhoA/Rho-kinase cascade is involved in oxytocin-induced rat uterine contraction. *Endocr* 2002; 143 (3): 920-929.
- [16] Taggart MJ, Arthur P, Zielnik B, Mitchell BF. Molecular pathways regulating contractility in rat uterus through late gestation and parturition. *Am J Obstet Gynecol* 2012; 207 (1): 76-15.
- [17] Moran CJ, Friel AM, Smith TJ et al. Expression and modulation of Rho-kinase in human pregnant myometrium. *Mol Hum Reprod* 2002; 8 (2); 196-200.
- [18] Lartey J, Bernal AL. Rho protein regulation of contraction in the human uterus. *Reproduction* 2009; 138 (3); 407-424.

Levelezési cím

Falkay György dr., egyetemi tanár
Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet
6720 Szeged, Eötvös utca 6.
e-mail: falkay@pharm.u-szeged.hu