

A doktori iskola vezetője és programvezető: dr. Szolcsányi János

Témavezető: dr. Barthó Loránd

**NEM-ADRENERG, NEM-KOLINERG (NANC)
INGERÜLETÁTVIVŐ ANYAGOK
FARMAKOLÓGIÁJA ENTERÁLIS ÉS ÉRZŐ
IDEGEKBEN**

DOKTORI (PhD) – ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

LÁZÁR ZSÓFIA

Pécsi Tudományegyetem

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet,

Gyógyszerhatástani Intézet

2002

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

AZ ENTERÁLIS IDEGRENSZER

Az enterális idegrendszert a gyomor-bélrendszer saját intrinszik idegei és idegdúcai alkotják. Az idegrendszer kvázi autonóm részeként írják le, amely szabályozza a motoros működéseket, a helyi véráramlást (vazomotor reflexek), a mucosalis transzportot és szekréciót (szekretomotor reflexek), valamint modulálja az immun- és endokrin funkciókat. Már Langley (1921) a vegetatív idegrendszer elkülönült részének tartotta. Önálló egységként történő tárgyalását számos jellegzetessége indokolja. 1. A központi idegrendszertől függetlenül képes reflexek létrehozására. 2. Nagyon nagyszámú és sokféle neuront tartalmaz (nagyságrendileg 10^7 - 10^8) a gerincvelő neuronállományához hasonlítható). 3. Sok bizonyított és még több feltételezett neurotranszmitter van jelen az enterális idegrendszerben.

Az emlősök enterális idegrendszerének sejttestjei ganglionokba rendeződnek és nyúlványaikkal ellátják a bélhuzam gyakorlatilag összes rétegét, így kialakítva a bélrendszer két fő idegi plexusát, a plexus myentericust (Auerbach plexus) és a plexus submucosust (Meissner plexus). A plexus myentericus a hosszanti és körkörös izomréteg között helyezkedik el. A plexus submucosus a körkörös izomréteg és a muscularis mucosae között található.

Az idegsejteken kívül az enterális idegrendszer tartalmaz gliasejteket, valamint nem idegi interstitialis ún. Cajal-féle sejteket. Ezek a sejtek a valószínű forrásai a lassú hullámú pacemaker aktivitásnak, a bél ritmikus összehúzódásának létrehozásában vesznek részt.

AZ ENTERÁLIS NEURONOK CSOPORTOSÍTÁSA

1. Neurotranszmitterek szerinti felosztás

A faji különbségek miatt nehéz a kémiai osztályozás. Az enterális idegrendszerben a legtöbb neuron több transzmittert tartalmaz, melyek egyszerre szabadulhatnak fel (ko-release), és közvetíthetnek válaszokat (ko-transzmisszió) az idegsejtek aktivációja során. Az acetil-kolinon kívül számos ún. nem-adrenerg, nem-kolinerg (NANC) transzmitter (nitrogén-monoxid (NO), adenzin-trifoszfát (ATP), szerotonin (5-HT), neuropeptidok: tachykininek (P-anyag, neurokinin A), vazóaktív intestinalis polipeptid (VIP), pituitaer adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP), neuropeptid-Y, kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP), kolekisztokinin (CCK), endothelinek stb.) szerepe is felmerült a

bélidegrendszerben. Az 1960-as években írtak le először NANC idegi válaszokat a gastrointestinalis traktusban. NANC idegi válaszról beszélünk, ha a reakció a muszkarin receptor blokkoló atropin és adrenerg neuronblokkolók együttes jelenlétében is kialakul. NANC idegeket kimutattak a gyomor-bélrendszeren kívül légutakban, erek falában, kismencedei zsigerekben.

Ahhoz, hogy egy anyagot neurotranszmitternek tekinthessünk, számos kritériumnak kell megfelelnie. Ezek a következők: 1. az adott anyag jelenléte az idegsejtben, 2. bioszintézisének kimutatása a neuronban, 3. ideg ingerléskor szabaduljon fel a feltételezett transzmitter az idegvégződésekből, 4. az exogén úton beadott anyag hatása utánozza az ideg ingerléskor felszabaduló endogén anyag hatását ("a hatás azonosságának elve"), 5. „az antagonizálhatóság azonossága” (az ingerléskor létrejövő és az exogén anyag okozta választ egyaránt gátolja a specifikus antagonista), 6. a transzmitter-inaktiváció mechanizmusa kimutatható legyen.

Nagyon kevés enterális neurotranszmitter jelölt tesz eleget valamennyi kritériumnak. Az elérhető adatok főként immunhisztokémiai és radioimmunassay vizsgálatokból származnak, melyek az adott anyag jelenlétére utalnak; a fiziológiás szerepük azonban sok esetben tisztázatlan. Ennek oka többnyire specifikus receptor antagonisták hiánya.

2. Elektrofiziológiai tulajdonságok szerinti felosztás

Két fő sejtípust különböztetnek meg: 1-es (vagy S) és 2-es (vagy AH) típust.

3. Morfológiai osztályozás

Dogiel (1899) írta le az enterális neuronok 3 alapvető morfológiai típusát: Dogiel I., II., III. Később további típusokat is leírtak, melyeknél az I. és II. típusú sejtek tulajdonságai kombinálódnak.

4. Funkcionális csoportosítás szerint megkülönböztetünk szenzoros, inter- és motoneuronokat az enterális idegsejtek között.

A GYOMOR-BÉLHUZAM INTRINSZIK REFLEXEI – A PERISZTALTIKUS REFLEX

A perisztaltikus mozgást Bayliss és Starling (1899) írta le először kutya vékonybélben. Később Trendelenburg (1917) in vitro tengerimalac vékonybélben idézett elő perisztaltikus mozgást a lumenbe történő folyadékinfundálással. A perisztaltikus reflexet,

melynek során körkörösizom spazmus halad végig aboralis irányban a bélszakaszon, 3 különböző típusú inger egymástól függetlenül válthatja ki: 1. diffúz intraluminalis nyomásinger (distensio), 2. a mucosa mechanikai torzulása, 3. bizonyos kémiai anyagok jelenléte a lumenben. In vivo valamennyi stimulus egyszerre van jelen. A reflexben részt vevő idegi utak: felszálló izgató, leszálló gátló és leszálló izgató. A lumenbe való folyadékinfundálás során a folyadék sugárirányban feszíti a bélfalat, kezdetben aktiválva egy akkomodációs reflexet, mely során a körkörösizom relaxál, a hosszanti izom kontrahál. Ezek a folyamatok képezik a perisztaltika „preparatív fázisát”. Amikor a teljes bélszakasz feszülése elér egy küszöbszintet, kiváltódik az „ürítő fázis”: a körkörösizom a béldarab orális végén kontrahál, és ez a kontrakciós hullám anális irányba végigfut a szegmentumon, kipurolva a béltartalom jelentős részét.

A GYOMOR-BÉLHUZAM EXTRINZIK BEIDEGZÉSE

A tápcsatorna működésének idegi szabályozásában külső (extrinzik) idegek is részt vesznek, melyek háromfélék: paraszimpatikus, szimpatikus és afferens.

A *paraszimpatikus* beidegzés a vagus és a sacralis gerincvelői idegek révén valósul meg. A paraszimpatikus praeganglionaris kolinerg neuronok izgató hatást közvetítenek az enterális idegsejtek felé, fokozzák a motilitást és a szekréciót.

A gastrointestinalis traktus *szimpatikus* beidegzését a praevertebralis ganglionokból kapja. A simaizom adrenerg beidegzése gyér. A szimpatikus rostok gátló hatásokat közvetítenek a gyomor-bélhuzamban, a simaizomzat mellett az idegi plexusok szintjén is.

Az extrinzik *afferens* idegek a gyomor-bélrendszer felső szakaszaiban a nervus vagusban futnak (sejttestjeik a ggl. nodosumban található), lejjebb a hátsó gyöki ganglionok érző rostjai idegzik be a tápcsatorna falát. Ezek az idegek zsigerekből kiinduló reflexek afferens szárát képezik, a visceralis fájdalmat közvetítik. Mechanikai, kémiai és hőingerekre is érzékenyek. A gerincvelői afferensek egy speciális csoportját képezik a kapszaicin-érzékeny neuronok, melyek jellegzetessége, hogy afferens funkciójuk mellett „lokális efferens”, illetve szisztémás neurohumorális funkciót is ellátnak.

ELŐZMÉNYEK ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A jelen munka célkitűzése a kapszaicin-érzékeny afferensek, valamint az enterális intrinszik neuronok ingerületátvivő anyagainak azonosítása, élettani jelentőségük és farmakológiájuk tisztázása. A transzmitterek azonosítását „a hatás azonossága” (az ingerléskor felszabaduló endogén anyag hatásához hasonló hatást váltson ki az exogén anyag), ill. „az antagonizálhatóság azonossága” (az ingerléskor létrejövő és az exogén anyag-okozta választ egyaránt gátolja a specifikus antagonista) kritériumok alapján végeztük.

1. A KAPSZAICIN IZGATÓ ÉS GÁTLÓ HATÁSA VÉKONYBÉLEN

A szenzoros izgató kapszaicin kétfajta motoros választ vált ki tengerimalac ileum hosszanti izmán: alaptónusú preparátumon tetrodotoxin- és atropin-érzékeny kontrakciót, előkontrahált, atropinnal kezelt preparátumon mérsékelt relaxációt hoz létre. A kontrakció mechanizmusát tekintve ismert, hogy a kapszaicin a bélfal primer afferens neuronjainak végződéseit izgatja, ezekből különböző biológiailag aktív anyagokat szabadít fel, melyek aktiválják a plexus myentericus kolinerg neuronjait. A végső transzmitter az acetil-kolin, kisebb mértékben a P-anyag.

Bizonyíték van az endogén tachykininek szerepére a neuronális aktivációban. P-anyag tachyphylaxia, valamint a tachykinin NK_1 és NK_3 receptorok együttes bénítása specifikus receptorantagonistákkal szignifikánsan csökkentette a kapszaicin-okozta összehúzódást. Továbbra is vannak azonban nyitott kérdések ezen a területen, többek között az, hogy a kapszaicin-okozta izgató válasz tachykinin receptor antagonistákra rezisztens részéért mely transzmitterek felelősek.

A kapszaicin előkontrahált ileumot elernyesztő hatását CGRP-tachyphylaxia, és a $CGRP_1$ receptor antagonistá hCGRP(8-37) gátolja. Mivel a kapszaicin relaxáló hatása tetrodotoxinra rezisztens, a CGRP (esetleg más elernyedést okozó mediátorok) az érző idegekből felszabadulva valószínűleg közvetlenül a simaizmon hatnak.

Vizsgálat alá vettük azokat az anyagokat, melyek jelenlétét és/vagy felszabadulását kimutatták a primer afferensekből és amelyek valamilyen módon utánozzák a kapszaicin intestinalis hatásait, tehát amelyeknél fennáll a lehetőség, hogy részt vesznek a kapszaicin motoros válaszaiban.

ATP felszabadulását a primer afferens neuronokból Holton már 1959-ben közölte.

Később tengerimalac ileum plexus myentericusában P_2 purinoceptor-közvetítette gyors depolarizációt írtak le.

Számos adat utal arra, hogy VIP és PACAP, ill. NO szabadulhat fel kapszaicin-érzékeny idegekből. A VIP és a PACAP a legtöbb gastrointestinalis preparátumot relaxálja, de képesek izgatni a plexus myentericus neuronjait is. Ugyanez a helyzet az NO-val is.

Felmerültolecisztokinin (CCK)-szerű anyag szerepe is a kapszaicin-kiváltotta kontrakcióban, ugyanis a CCK tengerimalac ileumon ideg-közvetítette kolinerg izgató választ hoz létre és kimutatták jelenlétét érző neuronokban.

Vizsgálatainkat kiterjesztettük az endothelin-1 (ET-1) és a kortikotropin releasing faktor (CRF) peptidekre. Az endothelin-1 és rokon vegyületei az endothelin-2 és endothelin-3, valamint a sarafotoxinok specifikus receptorokon (ET_A és ET_B) hatnak. Az endothelinek tengerimalac izolált ileumon bifázisos választ hoznak létre (relaxáció, majd kontrakció). A válasz mindkét része tetrodotoxinra rezisztens. Az endothelinek fokozhatják a nyugalmi acetyl-kolin felszabadulást, valószínűleg a kolinerg myentericus neuronok sejttestjén elhelyezkedő ET_B receptorokon keresztül. ET-1 jelenlétét kimutatták a gerincvelőben, a hátsó gyöki ganglionokban és a primer afferens neuronokban számos fajban, köztük az emberben is. Bizonyíték van arra nézve, hogy az endothelinek részt vehetnek a kapszaicin izolált, működő patkányszívre gyakorolt hatásaiban.

A 41 aminosavból felépülő CRF extrahypothalamicus szövetekben, köztük a gastrointestinalis traktusban is megtalálható. A CRF G-proteinhez kapcsolt specifikus receptorokon ($CRF-R_1$, $CRF-R_2$) hat. Tengerimalac ileum hosszanti izom-plexus myentericus preparátumán a CRF atropinra érzékeny kontrakciót vált ki. CRF jelenlétét kimutatták kapszaicin-érzékeny neuronokban patkányban.

Mindezek alapján feltételezhetjük, hogy az érző idegi eredetű ATP, PACAP/VIP, NO, CCK és/vagy CRF részt vesz a myentericus neuronok izgatásában a kapszaicin-kiváltotta összehúzódás során, valamint felmerülhet az endothelin szerepe a kapszaicin mindkét típusú (gátló és izgató) hatásában tengerimalac ileumon.

Vizsgálatainkban célul tűztük ki, hogy tisztázzuk az ATP, PACAP/VIP, NO, CCK, ET-1 és CRF esetleges részvételét a kapszaicin motoros válaszaiban tengerimalac ileumon specifikus receptor antagonisták: a P_2 purinoceptor antagonistá suramin és PPADS, a PACAP/VIP receptor antagonistá PACAP(6-38), a CCK receptor antagonistá lorglumid, az ET_A receptor antagonistá BQ123, az ET_B receptor antagonistá BQ788 segítségével, valamint a nitrogén-monoxid szintáz (NOS)-gátló N^G -nitro-L-arginin (L-NOARG) és CRF-tachyphylaxia alkalmazásával. Vizsgáltuk ezen felül a kapszaicin-érzékeny neuronok

részvételét az ET-1 és a CRF hatásaiban ileumon.

2. VIP LEHETSÉGES SZEREPE A PERISZTALTIKUS REFLEXBEN

A vazóaktív intestinalis polipeptid (VIP) 28 aminosavból álló neuropeptid, valószínűleg az enterális idegrendszer egyik fontos transzmittere. A VIP a legtöbb gastrointestinalis simaizom-preparátumon relaxációt hoz létre közvetlenül a simaizomsejteken hatva. Tengerimalac ileumon további hatása, hogy képes izgatni a plexus myentericus neuronjait, belőlük acetil-kolint és P-anyagot felszabadítva kontrakciót hoz létre. Míg patkány colonban a VIP-et a propulziós mozgást szabályozó enterális idegi pályák gátló transzmitterének tartják, addig tengerimalac bélben még nem ismert, hogy van-e összefüggés a VIP myentericus neuronokat izgató hatása és a perisztaltikus motoros reguláció között. Ezen összefüggés lehetőségét vizsgáltuk a PACAP egy fragmentum, a PACAP(6-38) segítségével.

A PACAP(6-38) 3 μ M-os koncentrációban nem befolyásolta a distensio-kiváltotta propulzív mozgást, ill. az exogén PACAP properisztaltikus hatását sem védte ki. A jelen munkában megvizsgáltuk, hogy a PACAP(6-38) gátolja-e az exogén VIP bélperisztaltikára kifejtett stimuláló hatását, és kivédi-e a VIP gátló hatását a körkörös izmon; amiből az endogén VIP-nek a körkörösizom motilitás szabályozásában betöltött lehetséges szerepére következtethetünk a perisztaltikus mozgás alatt.

3. TENGERIMALAC COLON HOSSZANTI IZOMZATÁNAK NANC MOZGÁSVÁLASZAI

Az irodalomban számos adatot találunk a tengerimalac taenia caeci, distalis, ill. proximalis colon körkörösizomjának beidegzéséről és működéséről. Azonban a tengerimalac proximalis colon hosszanti izomzatának funkcionális NANC beidegzése még nem teljesen tisztázott.

A tengerimalac proximalis colon hosszanti izomzatára vonatkozóan úgy tűnik, hogy az ideg-mediált, szerotonin-indukálta, valamint az elektromos idegingerléssel kiváltott relaxáció is gátolható a NOS bénításával. Az ATP és a VIP is elernyeszti a vastagbél hosszanti izmát; az ATP és a szerotonin relaxáló hatása apamin-érzékeny, a VIP-é nem az. Ezek alapján feltételezték, hogy a VIP nem vesz részt a szerotonin által kiváltott relaxációban.

Tengerimalac colon NANC izgató válaszait elsősorban tachykininek közvetítik. A tachykininek közül az emlősök enterális idegrendszerében P-anyag és neurokinin A (NKA)

található (neurokinin B nem), nagyjából az intrinszik neuronokban. Depolarizáló inger hatására a tengerimalac proximális colonból NKA és P-anyag egyenlő mennyiségben szabadul fel. Funkcionális és autoradiográfias munkák igazolták tachykinin NK₁ receptorok jelenlétét tengerimalac colon hosszanti izmon. Irodalmi adatok szerint a proximális colon hosszanti izmának elektromos téringerléssel kiváltott kontrakcióit a nem-specifikus tachykinin receptor antagonistá spantid szignifikánsan csökkenti; a P-anyag által okozott közvetlen összehúzódást egy specifikus NK₁ receptor antagonistá gátolja.

Megvizsgáltuk a purinerg, nitrerg, valamint a kapszaicin-érzékeny idegek lehetséges részvételét a tengerimalac proximális vastagbélnek elektromos téringerlés által kiváltott NANC hosszanti elernyedésében a következő anyagok alkalmazásával: a nitrogén-monoxid szintáz gátló L-NOARG, a P₂ purinoceptor antagonistá PPADS, az alacsony konduktanciájú K⁺-csatorna blokkoló apamin, valamint a szenzoros neuron gátló kapszaicin. Néhány kísérletsorozatban vizsgáltuk az antagonistá PACAP fragmentum, a PACAP(6-38) hatását is. Ezenkívül célul tűztük ki a tachykininek, ill. az egyes tachykinin receptorok (NK₁, NK₂, NK₃) szerepének tisztázását a proximális colon NANC hosszanti összehúzódásában specifikus tachykinin receptor antagonisták segítségével.

ALKALMAZOTT MÓDSZEREK

Izolált szervi kísérleteinkben a különböző gastrointestinalis simaizompreparátumokat 37 °C-os, oxigenizált (5% CO₂, 95% O₂) Krebs vagy Tyrode oldatban függesztettük fel.

Teljesbél készítmények: tengerimalac ileum és proximális colon kb. 2 cm-es darabjait 5 ml-es szervfürdőkben függesztettük fel 7 mN (az ileum esetén), ill. 10 mN (a vastagbél-preparátumnál) feszülés mellett. A hosszanti izom-mozgásokat izotóniás jelátalakító és híderősítő segítségével kompenzográfyon regisztráltuk.

Tengerimalac ileum körkörös izom "strip": a vékonybélből 2 mm szélességű gyűrűt vágunk ki, majd azt a mesenterialis oldalán szétnyitottuk és a két végét rögzítettük.

Körkörösizom aktivitás regisztrálása: teljes vastagságú ileum körkörösizom-strip preparátumokon indomethacinnal (3 µM) szabályos, spontán mozgástevékenységet

váltottunk ki. A fázikus motoros aktivitás mennyiségi értékelését Barthó és mtsai (1991) által leírtak szerint végeztük: a fázikus kontrakciók amplitúdóit a megfigyelés minden egyes percében külön-külön összegeztük, majd a kísérlet végén KCl-dal (80 mM) kiváltott maximális kontrakció hányadaként fejeztük ki.

Perisztaltikus reflex vizsgálata: 10 cm hosszú tengerimalac ileum szegmentumokat 30 ml-es szervfürdőben vízszintesen rögzítettünk. A propulzív perisztaltika kiváltása: 0,5 ml/perc sebességgel előmelegített Tyrode oldatot infundáltunk folyamatosan a béllumenbe az orális oldalon és az intraluminalis nyomást a szegmentum aboralis végén nyomásmérő jelátalakító segítségével regisztráltuk. A béllumenen átáramló folyadékot függőlegesen elhelyezett, U alakú kivezetőcsőbe vezettük, melynek vége 4,1 cm-rel (egyenértékű 400 Pa hidrosztatikai nyomással) a fürdőben lévő folyadékszint felett volt. A folyadék infundálása során az intraluminalis nyomás lassan nőtt egy bizonyos értékig, ahol kiváltódott a perisztaltikus hullám. Az aboralis irányba haladó perisztaltikus kontrakciós hullám az intraluminalis nyomás tüskeszerű emelkedését és a szegmentum kiürülését eredményezte, abban az esetben, ha a perisztaltikus hullám maximális nyomása meghaladta a 400 Pa-t (azaz csaknem minden hullám esetében). Azt a nyomásértéket - az ún. perisztaltikus nyomásküszöböt - melynél kialakult a propulzív mozgás, használtuk a különböző anyagok perisztaltikára kifejtett hatásainak mennyiségi meghatározására.

Kapszaicin válaszok és az ET-1-okozta kontrakció vizsgálata tengerimalac ileumon: a fellépő jelentős tachyphylaxia miatt minden preparátumon csak egyszer alkalmaztuk a fent említett anyagokat.

Elernyesztő hatások vizsgálata hisztaminnal szubmaximálisan előkontrahált preparátumokon történt.

Elektromos „tér”ingerlést a szervfürdőben a preparátum alatt és felett elhelyezett platina elektródpár segítségével hoztunk létre. A két elektród közti távolság 4 cm volt. Az ingerlést nagy teljesítményű ingerlővel végeztük. Valamennyi ingerlésnél 80 V feszültséget és 0,1 ms impulzusszélességet alkalmaztunk.

Statisztikai módszerek: A kontrakciós válaszokat hisztaminnal (10 μ M) vagy acetil-kolinnal (10 μ M) kiváltott maximális hosszanti összehúzódás, a relaxációs válaszokat az

izoprenalinnal (8 μM) létrehozott maximális elernyedés %-ában fejeztük ki. Két összefüggő minta esetén Wilcoxon féle előjeles rangpróbát, több összefüggő mintánál Quade tesztet, vagy egyutas varianciaanalízist, ill Dunett tesztet alkalmaztunk. Két független minta esetén Mann-Whitney tesztet, több független minta esetén a Student-féle t-tesztet, ill. a Kruskal Wallis tesztet használtuk.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

1. ATP, VIP/PACAP, CCK, NO, ET-1 ÉS CRF SZEREPÉNEK TISZTÁZÁSA A KAPSZAICIN TENGERIMALAC VÉKONYBÉLEN KIFEJTETT HATÁSAIBAN

ATP, VIP/PACAP, CCK és NO esetleges részvétele a kapszaicin-okozta kontrakcióban

A kapszaicin (2 μM) félmaximális hosszanti összehúzódást okozott ileumon, amit a tachykinin NK_1 (GR82334; 3 μM) és NK_3 (SR142801; 100 nM) receptor antagonisták együttes adása szignifikánsan csökkentett. A P_2 purinoceptor antagonisták – a suramin (100 μM) és a PPADS (30 μM) – nem befolyásolták a kapszaicin-kiváltotta kontrakciót tachykinin antagonistákkal nem kezelt készítményeken. Azonban a két tachykinin receptor antagonistá jelenlétében bármelyik P_2 purinoceptor antagonistá hozzáadása a fürdőhöz szignifikánsan kisebb kapszaicin választ eredményezett, mint amikor csak a tachykinin antagonisták voltak jelen.

A PPADS 30 és 300 μM -os koncentrációban sem befolyásolta a kolecisztokinin oktapeptid (2-3 nM) által kiváltott szubmaximális kolinerg kontrakciót függetlenül a tachykinin receptor antagonisták jelenlététől a szervfürdőben. A szintén kolinerg kontrakciót okozó senktide (NK_3 receptor izgató) (2-3 nM) hatása, valamint a hisztaminnal (100-200 nM) kiváltott fél-maximális kontrakció is változatlan maradt PPADS (30 μM) jelenlétében.

A PACAP/VIP antagonistá PACAP(6-38) 3 μM -os koncentrációban szignifikánsan gátolta a PACAP(1-38) (10 nM) kontrakciós hatását, bár a csökkenés mindössze 35% volt. A VIP (10 nM) izgató hatását a PACAP(6-38) teljesen kivédte. A PACAP(6-38) (3 μM) nem befolyásolta a kapszaicin-okozta motoros választ sem önmagában, sem tachykinin receptor antagonistákkal együtt adva. Hasonlóképpen az NO-szintáz gátló L-NOARG (100 μM) és a CCK antagonistá lorglumid (200 nM) sem változtatta meg szignifikánsan a kapszaicin választ.

Az ET-1 és antagonistái hatásainak vizsgálata

Az ET-1 tengerimalac ileumon bifázisos választ hozott létre. Az atropinnal (1 μM) kezelt, hisztaminnal előkontrahált preparátumon az ET-1 (0,5 nM-10 nM) reprodukálható elernyedést okozott. Az elernyedést az ET_A receptor antagonistá BQ123 3 μM -os koncentrációban 56%-kal csökkentette, míg 10 μM -os koncentrációban teljesen kivédte. Az ET_B receptor antagonistá BQ788 (3 μM) szintén kivédte a relaxációt. A tetrodotoxin (1 μM) és a kapszaicin-érzékeny neuronok funkcionális károsítása nem befolyásolta az ET-1 relaxációs hatását. Az ET-1-okozta kontrakciót nem befolyásolta atropin (1 μM), methysergid (100 nM), chloropyramin (100 nM), SR140333 (100 nM). A tetrodotoxin és a kapszaicin tachyphylaxia nem volt hatással a válaszra. Mindkét endothelin receptor antagonistá (BQ123 (3 μM), BQ788 (3 μM)) szignifikánsan csökkentette a kontrakciót. A BQ123 majdnem teljes gátlást okozott.

Atropinnal kezelt, hisztaminnal előkontrahált ileumon tetrodotoxin jelenlétében a kapszaicin (2 μM) mérsékelt relaxációt okozott. Hasonló nagyságú elernyedés jött létre BQ788 (3 μM), BQ788 (3 μM) plusz BQ123 (3 μM) vagy apamin (0,3 μM) jelenlétében.

A kapszaicin (2 μM)-okozta kontrakciót BQ123 (3 μM) nem befolyásolta. Míg a tachykinin receptor antagonisták (GR82334 (3 μM) plusz SR142801 (100 nM)) gátolták a kapszaicin-választ, BQ123 (3 μM) nem okozott további csökkenést. BQ123 (3 μM) és BQ788 (3 μM) együttes adása sem gátolta a kapszaicin izgató hatását tengerimalac ileumon.

A CRF hatásainak vizsgálata

A CRF nem okozott relaxációt atropinnal kezelt, hisztaminnal előkontrahált preparátumokon, ill. hatástalan volt abban az esetben is, mikor a tachykinin NK₁ receptor antagonistá SR140333 (200 nM) is jelen volt a fürdőben, az esetleges tachykininerg izgató hatás kiküszöbölésére.

A CRF koncentráció-függő kontrakciót okozott tengerimalac ileumon 3-100 nM-os koncentráció-tartományban. A tetrodotoxin (1 μM) vagy az atropin (1 μM) és az SR140333 (200 nM) keveréke megszüntette a CRF hatását. Sem az extrinszik afferens neuronok kapszaicin-kiváltotta funkcionális bénítása, sem az SR140333 önmagában nem volt hatással a CRF-kontrakcióra. Atropin jelenlétében a CRF-válaszok amplitúdója nem változott, habár a csúskontrakció kifejlődéséhez szükséges idő nőtt.

A CRF tachyphylaxia (100-200 nM CRF 20 percre) a CRF válasz eltűnését okozta (további 30 nM CRF hozzáadása a fürdőhöz hatástalan volt), azonban nem csökkentette a

kapszaicin-kiváltotta ileum kontrakciót önmagában és a tachykinin receptor antagonisták jelenlétében sem.

Következtetések

Tengerimalac vékonybélben kimutattuk az ATP mediáló szerepét a kapszaicin-okozta izgató válasz nem-tachykininerg komponensében. Mivel a P₂ purinoceptor antagonisták a kapszaicin-indukálta kontrakciónak csak a tachykinin antagonistákra rezisztens összetevőjét csökkentették, feltételezzük, hogy a purinoceptor-közvetítette kolinerg választ a tachykinin-mediálta rész elfedi, illetve köztük nem-additív viszony van.

Nem találtunk bizonyítékot arra, hogy NO, PACAP/VIP-szerű peptid, CCK-szerű peptid, endothelin-szerű peptid vagy CRF szerepet játszana a kapszaicin-okozta ideg-izom aktivációban, ill. hogy ET-1 részt venne a kapszaicin gátló hatásában vékonybélben. Kimutattuk, hogy az ET-1 ileumon izgató és gátló hatást is kivált, valószínűleg ET_A és ET_B receptorokon keresztül. A CRF egyedüli hatása az ideg-közvetítette kontrakció. A kapszaicin-érzékeny idegek aktivációja valószínűleg nem játszik fontos szerepet az ET-1 és a CRF tengerimalac ileumon kifejtett válaszaiban.

Az eredmények egyben azt is bizonyítják, hogy a PACAP(6-38) hatásos VIP antagonistá a plexus myentericus idegsejtjein.

2. A PACAP(6-38) VIP/PACAP ANTAGONISTA HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA TENGERIMALAC ILEUM KÖRKÖRÖS IZOMZATÁN ÉS A PERISZTALTIKUS REFLEXEN

A VIP (100 nM) és a PACAP (30 nM) facilitálta a perisztaltikus mozgást, azaz csökkentette a perisztaltikus nyomásküszöböt és növelte a perisztaltikus hullámok frekvenciáját. A VIP kevésbé hatékony a perisztaltika stimulálásában, mint a PACAP, és hatása rövidebb ideig is tart.

A PACAP(6-38) (3 µM) vagy az oldószere nem volt hatással a perisztaltikus nyomásküszöbre. A PACAP(6-38) befolyását a VIP és a PACAP perisztaltikus motoros hatására oldószeres kontroll kísérletek segítségével vizsgáltuk. Az agonisták előtt adva a PACAP(6-38) (3 µM) kivédte a VIP (100 nM) properisztaltikus hatását, de a PACAP-ét nem. Amikor az agonista hatásának teljes kifejlődése után adtuk a PACAP(6-38)-at a fürdőbe, az a VIP perisztaltikus mozgásra kifejtett izgató hatását gyorsan visszafordította, de a PACAP hatását nem tudta megállítani.

A körkörösizom-csík preparátumokban indomethacin kezelés után 1-3 órával

ritmikus spontán aktivitás alakul ki, valószínűleg tónusos prosztoglandin-befolyás megszűntetése révén. Tetrodotoxin (1 μM) nem gátolta ezeket a mozgásokat. A VIP és a PACAP(1-38) hatását tetrodotoxin jelenlétében teszteltük, hogy a neuronális befolyásokat kikapcsoljuk. A VIP a körkörösizom kontrakciók gátlását eredményezte 3 nM-os küszöbkoncentrációval a legtöbb preparátumon. Minden egyes preparátumnál azt a VIP koncentrációt választottuk (5-30 nM között), ami ismételhető és szubmaximális gátlást okozott. Az antagonista PACAP(6-38) (3 μM) szignifikánsan csökkentette a VIP (5-30 nM) gátló hatását, a PACAP(1-38) hasonló gátló hatását azonban nem befolyásolta.

Következtetések

A plexus myentericus neuronjain a PACAP(6-38) VIP receptor antagonistának tekinthető. Az eredményekből arra következtethetünk, hogy az endogén VIP neuronális izgató hatása nem játszik fontos szerepet a perisztaltikus mozgás enterális szabályozásában, mivel a PACAP(6-38) nem befolyásolta magát a perisztaltikus reflexet. Figyelembe véve az előzőek mellett a PACAP(6-38) VIP-antagonista hatását az ileum körkörös izomzatán, az endogén VIP direkt simaizom-gátló hatása sem tűnik döntő jelentőségűnek a perisztaltikában ezen kísérleti modellben.

3. TENGERIMALAC COLON HOSSZANTI IZOMZATA NANC MOZGÁSVÁLASZAINAK (RELAXÁCIÓ ÉS KONTRAKCIÓ) VIZSGÁLATA

Tengerimalac proximalis colonon az elektromos téringerlés relaxációt és azt követő kontrakciót okozott alaptónusú és hisztaminnal (100 nM) szubmaximálisan előkontrahált preparátumon egyaránt. A relaxációs választ előkontrahált készítményeken vizsgáltuk: mindkét alkalmazott ingerlési frekvencián (1 és 10 Hz, 20 s) ismételhető és tetrodotoxinra érzékeny választ kaptunk.

Az L-NOARG (100 μM) szignifikánsan csökkentette az elektromos ingerlés hatására létrejött relaxációt; 1 Hz-es ingerlésnél kb. 55%-kal, 10 Hz-es ingerlésnél 30%-kal. Az L-NOARG gátló hatását az L-arginin (1 mM) részlegesen visszafordította. A PPADS (50 μM) L-NOARG jelenlétében és hiányában is csak mérsékelten gátolta az idegingerlés-okozta relaxációs választ, míg az alacsony konduktanciájú K^+ -csatorna blokkoló apamin (100 nM) L-NOARG jelenlétében erősen gátló hatású volt. A PACAP antagonista PACAP(6-38) (3 μM) nem befolyásolta az elektromos téringerlés relaxáló hatását. A kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok gátlása in vitro kapszaicin kezeléssel (10 μM 15 percre, amit 40 perces

mosási periódus követett) kis mértékben ugyan, de szignifikánsan növelte a NANC relaxációt 10 Hz-es ingerlésnél, de 1 Hz-es ingerlésnél nem volt hatása.

Exogén PACAP(1-27)-tel (10 nM) kiváltott szubmaximális relaxációt a PACAP(6-38) (3 μ M) teljesen kivédte. A VIP (30-100 nM) relaxációs hatását 3 μ M PACAP(6-38) szignifikánsan csökkentette. Az exogén ATP (1 és 10 μ M) a vastagbél hosszanti izomzat elernyedését váltotta ki, amit a PPADS (50 μ M) szignifikánsan gátolt. A PPADS az 1 μ M ATP- okozta relaxációt 70%-kal csökkentette, a 10 μ M ATP-nél 43%-os gátlás alakult ki. (Azon kísérletekben, ahol nagyobb koncentrációjú ATP-t alkalmaztunk, a Krebs oldat 100 μ M teofillint tartalmazott a P_1 receptorok blokkolására.)

A proximalis colon NANC hosszanti összehúzódásait alaptónusú preparátumokon vizsgáltuk L-NOARG és apamin jelenlétében. Ezen anyagok hatására az elektromos téringerlésre kialakuló két fázisú válasz (relaxációt követő utókontrakció) 1 fázisúvá alakult, a relaxáció eltűnt és az ingerlés hatására primer kontrakció jött létre. Az 1 és 10 Hz-es ingerlés is reprodukálható primer összehúzódást eredményezett. Tetrodotoxin (1 μ M) kivédte a NANC kontrakciót mindkét ingerlési frekvencián.

A tachykinin NK_1 receptor antagonistá FK888 (2 μ M) szignifikánsan csökkentette a választ mindkét ingerlési frekvencián. A tachykinin NK_2 receptor antagonistá MEN11420 (1 μ M) azonban csak a 10 Hz-es ingerlésre létrejövő kontrakciót gátolta. E két antagonistá együttes alkalmazása körülbelül akkora gátlást okozott, mint az FK888 önmagában. A tachykinin NK_3 receptor antagonistá SR142801 (100 nM) nem volt hatással a NANC összehúzódásokra önmagában, ill. MEN11420 jelenlétében sem. FK888 hatásának kifejlődése után adva azonban az SR142801 a kontrakció további szignifikáns csökkenését eredményezte 10 Hz ingerlési frekvenciánál.

Tájékoztató vizsgálatok azt mutatják, hogy a P_2 purinoceptor antagonistá PPADS (50 μ M), a ganglionblokkoló hexamethonium (100 μ M) és a kolecisztokinin receptor antagonistá lorglumid (1 μ M) nincs befolyással az elektromos téringerléssel kiváltott kontrakcióra egyik ingerlési frekvencián sem.

Atropinnal és guanethidinnel kezelt, hisztaminnal szubmaximálisan előkontrahált preparátumokon az FK888 (2 μ M) és a MEN11420 (1 μ M) sem befolyásolta az 1 Hz 20 s-es téringerlésre kialakuló relaxációt. A létrejött utókontrakciót az FK888 szignifikánsan csökkentette, a MEN11420 nem volt rá hatással. 10 Hz 20 s-es ingerlés esetén az utókontrakció FK888 jelenlétében szignifikánsan csökkent, a relaxáció pedig szignifikánsan nőtt; a MEN11420 az ingerlésre adott válasz egyik fázisát sem befolyásolta.

A P-anyag (5-30 nM) összehúzódot váltott ki a tengerimalac proximalis colonon. A választ az FK888 teljesen kivédte, a MEN11420 nem befolyásolta. Az NKA (30-100 nM)-okozta kontrakciót az FK888 körülbelül 50%-kal csökkentette, a MEN11420 önmagában nem volt hatással a válaszra, a két antagonistát együtt adva teljes gátlás jött létre.

A hisztamin (100 nM)-okozta szubmaximális kontrakciót nem befolyásolta az FK888, vagy a MEN11420 önmagában, ill. az FK888, MEN11420 és SR142801 együttes adása sem.

Következtetések

Tengerimalac proximalis colon hosszanti izmának NANC relaxációjában egy PPADS-érzékeny purinerg mechanizmus és nitrogén-monoxid vesz részt. A válasz ezen két összetevője között additív kapcsolat van. PACAP/VIP-szerű peptid nem játszik szerepet a válaszban. A colon NANC relaxációjának egy része rezisztens az L-NOARG és a PPADS együttes hatására. Ez a frakció is lehet purinerg, de közvetítheti egy eddig még nem azonosított, másik apamin-érzékeny transzmitter is.

A proximalis colon NANC kontrakciójában tachykininek (főleg P-anyag) jelentős szerepet játszanak főleg NK₁ receptorok közvetítésével.

A LEGFONTOSABB ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. Kimutattuk az ATP részvételét a tengerimalac ileum kapszaicin-okozta kontrakciójának tachykinin antagonistákra rezisztens összetevőjében. Valószínűleg a tachykininerg és a purinoceptor közvetítette kolinerg válasz között nem additív viszony áll fenn.
2. Nem találtunk bizonyítékot VIP/PACAP-szerű peptid, NO, CCK-, endothelin-szerű peptid vagy CRF szerepére a kapszaicin által kiváltott ileum kontrakcióban, illetve ET-1 részvételére a kapszaicin gátló hatásában.
3. Kimutattuk, hogy a kapszaicin-érzékeny primer afferens neuronok nem játszanak fontos szerepet az ET-1 és a CRF tengerimalac ileumon kifejtett hatásaiban.
4. Bizonyítottuk, hogy a PACAP(6-38) peptid fragmens hatékony VIP antagonistá tengerimalac ileumon; mind a hosszanti, mind a körkörös izmon, továbbá a perisztaltikus reflex komplexebb folyamatában gátolta a VIP hatását (izgató, ill. gátló hatást).
5. Valószínűsítettük, hogy VIP nem játszik szerepet a tengerimalac ileum perisztaltikus mozgásában.
6. Bizonyítottuk, hogy proximalis colon NANC relaxációját NO és ATP hozza létre, de PACAP/VIP-szerű peptid nem vesz részt a válaszban.
7. A tengerimalac proximalis colon hosszanti NANC összehúzóását tachykininek (főleg P-ananyag) közvetítik NK₁ receptoron hatva.

Kísérleteink alapkutatás jellegűek, hosszú távon azonban hozzájárulhatnak a gyomor-béltraktus motilitászavarai új diagnosztikus és terápiás eljárásainak kifejlesztéséhez, valamint szélesebb értelemben a purinerg és peptiderg neurotranszmisszió és interakciók jobb megismeréséhez. A kapszaicin-érzékeny afferensek mediátoranyagaival kapcsolatos vizsgálatok jelentősége pedig abban áll, hogy a periférián belőlük szabadabbá váló aktív anyagok ezen neuronok központi idegrendszeri végződéseiből felszabadulva (Dale elv) szerepet játszhatnak a fájdalomérzésben. Tehát a folyamat jobb megismerése új típusú fájdalomcsillapítók kifejlesztéséhez járulhat hozzá.

PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

- Barthó L, Lénárd LJr, **Lázár Zs**, Maggi CA (1999) Connections between P₂ purinoceptors and capsaicin-sensitive afferents in the intestine and other tissues. Eur J Pharmacol 375: 203-210.
- Barthó L, **Lázár Zs**, Lénárd LJr, Benkó R, Tóth G, Penke B, Szolcsányi J, Maggi CA (2000) Evidence for the involvement of ATP, but not of VIP/PACAP or nitric oxide, in the excitatory effect of capsaicin in the small intestine. Eur J Pharmacol 392: 183-188.
- Rózsai B, **Lázár Zs**, Benkó R, Barthó L (2001) Inhibition of the NANC relaxation of the guinea-pig proximal colon longitudinal muscle by the purinoceptor antagonist PPADS, inhibition of nitric oxide synthase, but not by a PACAP/VIP antagonist. Pharmacol Res 43: 83-87.
- **Lázár Zs**, Shahbazian A, Benkó R, Tóth G, Penke B, Barthó L, Holzer P (2001) PACAP(6-38) inhibits the effects of vasoactive intestinal polypeptide, but not PACAP, on the small intestinal circular muscle. Eur J Pharmacol 431: 259-264.
- **Lázár Zs**, Benkó R, Bölcskei K, Rumbus Z, Hoffer Zs, Holzer P, Maggi CA, Barthó L (2002) Mechanisms of action of endothelin and corticotropin releasing factor in the guinea-pig ileum, with special reference to their relation with capsaicin-sensitive neurons. (submitted)

EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

- Lénárd LJr, **Lázár Zs**, Benkó R, Szigeti R, Báthori Zs, Tóth G, Penke B, Barthó L (2000) Inhibitory effect of PACAP(6-38) on relaxations induced by PACAP, VIP and non-adrenergic, non-cholinergic nerve stimulation in the guinea-pig taenia caeci. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 361: 492-497.
- Barna J, Csoknya M, **Lázár Zs**, Barthó L, Hámori J, Elekes K (2001) Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the

earthworm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida) J Neurocytol 30: 313-325.

ELŐADÁSOK ÉS POSZTEREK LISTÁJA

- Barthó L, **Lázár Zs**, ifj Lénárd L, Tóth G, Penke B, Szolcsányi J., Maggi CA: ATP részt vesz a capsaicin okozta ideg-izom aktivációban vékonybélben, VIP/PACAP, ill. nitrogén-monoxid viszont nem. IBRO/MITT vándorgyűlés, Budapest, 2000. jan. 19-22. [**Abstract:** Neurobiology, in press, 2000]
- **Lázár Zs**, Lénárd LJr, Benkó R, Tóth G, Penke B, Szolcsányi J, Maggi CA, Barthó L: Evidence for the involvement of P₂ purinoceptors in the excitatory effect of capsaicin in the small intestine. The 6th European Congress of Pharmaceutical Sciences, September 16-19, 2000, Budapest, Hungary. [**Abstract:** Eur J Pharmaceutical Sci 11/Suppl. 1, 2000, S113]
- Barthó L, **Lázár Zs**, Lénárd LJr, Benkó R, Tóth G, Penke B, Szolcsányi J, Maggi CA: P₂ purinoceptors, but not vasoactive intestinal polypeptide/pituitary adenylate cyclase activating polypeptide or nitric oxide, play a role in the excitatory effect of capsaicin on myenteric neurons. Hung Physiol Soc/Br Physiol Soc Meeting, Budapest, 27-29 May, 2000 [**Abstract:** J Physiol Lond 526 P, 167 P]
- **Lázár Zs**, Benkó R, Barthó L: Nem-nitreg, nem-VIP-erg gátló válasz légcsőben. Magyar Idegtudományi Társaság (MITT) VIII. Konferenciája, Szeged, 2001. Január 24-27.
- Barna J, Csoknya M, **Lázár Zs**, Barthó L, Hámori J, Elekes K: A földigiliszta bélidegrendszerének neurokémiája és néhány transzmitter hatása. Magyar Idegtudományi Társaság (MITT) VIII. Konferenciája, Szeged, 2001. Január 24-27.
- Dénes V, **Lázár Zs**, Barthó L, Gábrriel R: A szerotoninerg rendszer anatómiája és farmakológiája a nyúl plexus myentericusában. Magyar Idegtudományi Társaság (MITT) VIII. Konferenciája, Szeged, 2001. Január 24-27.

- Barthó L, Benkó R, **Lázár Zs**, Illényi L, Horváth ÖP: A kapszaicin mozgató hatása humán vastagbélen. A Magyar Élettani Társaság (MÉT) kongresszusa, Szeged, 2001. június 6-8.
- Barthó L, Benkó R, **Lázár Zs**, Illényi L, Horváth ÖP: Motor effects of capsaicin in the human colon. 7th Meeting of the Austrian Neuroscience Association, Seggau, Styria, Austria, 2-5 September, 2001.
- **Lázár Zs**, Shahbazian A, Benkó R, Tóth G, Penke B, Barthó L, Holzer P: PACAP(6-38) inhibits the effects of VIP, but not PACAP, on the small intestinal circular muscle. 7th Meeting of the Austrian Neuroscience Association, Seggau, Styria, Austria, 2-5 September, 2001.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni szívből jövő köszönetemet mindazoknak, akik hozzájárultak ezen doktori értekezés létrejöttéhez.

Dr. Szolcsányi János akadémikusnak, programvezetőnek, aki lehetővé tette számomra a Neurofarmakológia doktori programban való kutatómunkát.

Dr. Barthó Loránd egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, aki bevezetett a neurofarmakológia világába és szakmai tanácsaival mindvégig irányította és segítette munkámat.

Dr. Benkó Ritának, dr. Németh Józsefnek és Pári Józsefnének a mindennapos kísérletekhez nyújtott segítségükért.

Brambauer Zsoltnak, Gáspár Attilának és férjemnek, *ifj. Pályi Istvánnak* a dolgozat szerkesztésében való közreműködésükért.

Azoknak, akik elindítottak a PhD felé vezető úton: édesapámnak, *dr. Lázár Gyulának*, aki mindig hasznos tanácsokkal látott el, mikor problémáimmal hozzá fordultam; *dr. Nagyidai Nándor* gyógyszerész úrnak.

Családomnak megértésükért, türelmükért.