

PhD értekezés tézisei

**Nem-adrenerg, nem-kolinerg neurotranszmitterek az
enterális idegrendszerben**

ifj. Dr. Lénárd László

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Neurofarmakológia Program**

Témavezető: dr. Barthó Loránd egyetemi tanár

Programvezető: dr. Szolcsányi János akadémikus

Pécs, 2000

I. BEVEZETÉS

I.1. Az enterális idegrendszer

Az enterális idegrendszert a század eleje óta J.N. Langley és mások munkássága alapján – a szimpatikus és paraszimpatikus rendszerek mellett – az autonóm idegrendszer harmadik tagjaként tartjuk számon. Ezt a különválasztást indokolja többek között (a) a nagyszámú (több tíz-, ill. százmilliós, gerincvelő-nagyságrendű) enterális idegsejt, ezen neuronok morfológiai sokszínűsége, hálózatos elrendeződésük; (b) sok azonosított és még több valószínű neurotranszmitter és neuromodulátor; (c) intrinszik enterális reflexek kimutatása a gyomor-béltraktusban. Az enterális idegrendszer a központi idegrendszertől függetlenül képes integrálni a motoros válaszokat a beérkező afferens (ozmo-, termo-, mechano- és kemoreceptorok közvetítette) információknak megfelelően intrinszik afferens idegsejtek közvetítésével, és az enterális idegrendszerre jellemző sajátos, rendszeresen ismétlődő, sztereotíp mozgásválaszokat hoz létre, mint a szegmentáló, vagy a perisztaltikus bélmozgások (ld. Furness és Costa, 1987, *The Enteric Nervous System*. Churchill Livingstone).

Az enterális idegrendszer a központi idegrendszertől (extrinszik afferens és efferens neuronoktól) függetlenül is képes működni, de a központi idegrendszernek fontos szerepe van a bélműködések nagyobb távolságokat is átfogó koordinálásában, ill. modulálásában. A *paraszimpatikus* kolinerg neuronok (a n. vagus, ill. a sacralis gerincvelői idegek közvetítésével) izgató hatásokat közvetítenek az enterális myentericus neuronok felé. Szemben az emésztőtraktus felső részével, ill. a distalis vastagbéllel és az ano-rectalis területekkel, a vékonybél myentericus idegsejtjeinek csak igen kis hányadát idegzik be kolinerg vagusrostok. A vékonybél ill. a proximális vastagbél tehát kevésbé áll külső idegi kontroll alatt, az intrinszik enterális neuronok szabályozásával autonóm módon működik. A bélrendszert elérő *szimpatikus* adrenerg neuronok rostokkal látják el a szekretomotoros neuronokat, a submucosa véreireit, a sphinctereket és a preszinaptikus kolinerg idegvégződéseket. A szimpatikus gátló hatás a gyomor-bélrendszer teljes hosszában érvényesülhet. A bél saját reflexei azonban teljes extrinszik denerválás után is kiválthatók.

A bélrendszer afferens beidegzése. A bélrendszer extrinszik afferens idegei az emésztőcsatorna felső részén a vagusban, lejjebb a splanchnicus idegekben futnak. A splanchnicus idegek végződése a bélfalban, sejtteste a gerincvelő hátsógyöki ganglionjaiban található. Ezen afferensek a visceralis fájdalomban játszanak szerepet. Ezen ún. extrinszik afferens neuronok, különösen a capsaicin-érzékeny neuronok részt

vehetnek a bélizomzat mozgásainak szabályozásában élettani, ill. kórélettani körülmények közt. A capsaicin-érzékeny idegek sajátos efferens funkciót mutatnak; idegvégződéseikből bioaktív anyagok szabadulnak fel, melyek a motilitást és a véráramlást befolyásolják, ill. a nyálkahártya-protekciónban vesznek részt.

I.2. Az enterális idegrendszer transzmitteranyagai

A bélrendszer működésében igen fontos szerepe van az acetilkolinnak: neurotransmitter a vegetatív idegrendszer szimpatikus és paraszimpatikus praeganglionaris idegeiben, ill. a paraszimpatikus postganglionaris idegekben. Továbbá a bélidegrendszer myentericus motoneuronjainak túlnyomó része, a felszálló interneuronok nagy része, ill. a plexus submucosus számos idegsejtje szintén kolinerg. Az acetilkolin fontos szerepet játszik a perisztaltikus és a felszálló enterális reflexben.

Nem-adrenerg, nem-kolinerg (NANC) transzmitterek. Már a múlt század végén kimutatták, hogy egyes paraszimpatikus idegek ingerlésével szemben atropin hatástalan. Ezen eredmények is felvetették, hogy az acetilkolin (és a noradrenalin) mellett más transzmitterek is fontos szerepet játszhatnak a perifériás idegrendszer működésében. A gastrointestinalis rendszer farmakológiai vizsgálatai során Burnstock és munkatársai a 60-as évek elején kimutatták, hogy elektromos téringerlés hatására tengerimalac taenia caecin gátló junctionális potenciál (IJP) és elemnyedés jön létre kolinerg és adrenerg antagonisták jelenlétében. A feltételezett ingerületátvivő anyagokat nem-adrenerg, nem-kolinerg (NANC) transzmittereknek nevezték el (ld. Boeckstaens és Pelckmans, 1997, Comp. Biochem. Physiol. 118A: 925). A bizonyított és feltételezett neurotranszmittereket mutatja az 1. táblázat (Goyal és Hirano, 1996, N Engl J Med 334: 1106 alapján, módosítva).

A neurotransmitter-azonosítás kritériumai

Hogy egy anyagot neurotransmitternek tekintsünk, számos ismérvnek kell megfelelnie: 1. az anyag, ill. annak sejtben belüli szintézise kimutatható legyen a neuronban; 2. depolarizációs inger hatására az idegvégződésekből szabaduljon fel a feltételezett transzmitter; 3. az ingerlés hatására felszabaduló endogén anyag hatása hasonló legyen az exogén anyagbeadás hatásához (a hatásazonosság elve); 4. specifikus antagonista gátolja az ingerlés hatására felszabaduló anyag és az exogén alkalmazás hatását is (az antagonizálhatóság azonossága); 5. kimutathatók legyenek a transzmitter molekula lebontási és/vagy visszavételi (reuptake) mechanizmusai. Számos NANC transzmitter esetében néhány, ritkábban az összes feltétel teljesül.

1. táblázat

I. Nem-peptid transzmitterek	II. Peptid transzmitterek
1. Aminok	Kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) ³
Acetilcholin ¹	Kolecisztokinin (CCK) ⁵
Noradrenalin ²	Galanin
Szerotonin (5-HT)	Gastrin-releasing peptide
	Neuromedin-U
2. Aminosavak	Neurotensin
Gamma-amino-vajsav (GABA)	Opioid-peptid ⁵
	Pituitaer adenylat cyclase aktiváló polipeptid (PACAP) ⁵
3. Purinok	Somatostatin ⁴
Adenozin-trifoszfát (ATP) ^{2,5}	Tachykininek (P-anyag, neurokinin-A) ⁴
	Thyreotropin-releasing hormone
4. Gázok	Vasoactive intestinal contractor
Nitrogénmonoxid (NO) ⁵	Vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP) ⁵
Szénmonoxid (CO)	Y-neuropeptid ²
	YY-peptid

1 Paraszimpatikus efferensekben, intrinszik efferensekben (motoneuronok), ill. interneuronokban

2 Szimpatikus efferensekben

3 Főleg capsaicin-érzékeny primer afferens neuronokban (ld. Szolcsányi és mtsai, 1994, In: *Peripheral Neurons in Nociception...* ed. Besson, J.M. et al., John Libbey, Paris, p. 109)

4 Intrinszik és capsaicin-érzékeny neuronokban

5 Intrinszik (és capsaicin-érzékeny?) neuronokban, egyes vegetatív efferensekben

Megjegyzések az ingerületátvivők azonosításával kapcsolatban: (a) Ezen anyagok neurotransmitter szerepére vonatkozó adatok főként hisztokémiai, immunhisztokémiai és radioimmunoassay (RIA) vizsgálatokból származnak, melyekben a feltételezett transzmittereket neuronok idegvégződéseiben lokalizálták. Nem mindegyikükről sikerült kimutatni, hogy ingerekre felszabadulhatnak az idegvégződésekből. (b) Csak az anyagok egy részének van specifikus receptor antagonistája (és az "antagonisták" egy részét nem jellemezték kellőképpen). (c) Az enterális idegrendszerben a legtöbb neuron nem csupán egy transzmittert tartalmaz; az idegek

aktivációja során több anyag együtt szabadul fel (co-release) és fejt ki hatásait a célsejteken (kotránsmiszió) (ld. Lundberg, 1996, Pharmac Rev 48: 113). (d) Egy transzmitter-anyag akár ugyanazon szövetben is eltérő – izgató, ill. gátló – hatásokat mediálhat, pl. a NANC "gátló transzmitterek" többségéről (VIP, PACAP, NO, ATP) kiderült, hogy izgató hatásokat is közvetítenek a motorikára. Ennek mechanizmusa legtöbbször az, hogy az anyagok a myentericus neuronokból acetilkolint vagy tachykinineket szabadítanak föl, de pl. az NO vagy az ATP képes direkt módon mind összehúzódot, mind elemyedést létrehozni az izomzaton. (e) Bebizonyosodott a NANC-gátlás vizsgálata során, hogy egy adott preparátumon belül is sokszor nem egyetlen, hanem kettő, vagy akár három gátló transzmitter együtt felelős a végső gátló hatásért. Számos faj gastrointestinalis simaizomszerveiben kimutatták, hogy a NANC gátlást több gátló transzmitter együtt közvetíti. Hasonló hatásokat más-más állatfajban más-más anyagok mediálhatnak.

II. KÍSÉRLETES MUNKA

II.1. Közvetlen előzmények és célkitűzések

Jelen kísérleteink célja egyes nem-adrenerg, nem-kolinerg (NANC) gátló transzmitterek (NO, ATP, PACAP) szerepének tisztázása, ill. a kapszaicin hatásmechanizmusának tanulmányozása gastrointestinalis simaizom-készítményeken.

Munkánkat négy fő témakör köré csoportosítottuk:

1. A körkörös izomzat funkcionális gátló beidegzése. Tengerimalac vékonybél körkörös izomzatán előzetes kísérleteinkben az idegvezetést gátló tetrodotoxin (TTX) tónusos összehúzódot okozott. Továbbá ismert, hogy a morfin a gyomor-bélrendszerben a körkörös izomzat tónusát fokozza, a záróizmokat összehúzza. (Ez a hatás – legalábbis részben – valószínűleg felelős a morfin-kezelések során fellépő, a bélmotorikát gátló mellékhatásért.) A nitrogénmonoxid (NO) szintézisét gátló L-arginin analóg, az N^G-nitro-L-arginin (L-NOARG) segítségével vizsgáltuk azt a hipotézisünket, hogy a morfin (és a TTX) által okozott összehúzódot a plexus myentericus tónusosan aktív, NO-t felszabadító neuronjainak gátlása révén jön létre. Atropinnal nem kezelt készítményeken vizsgáltuk az NO-donor nitroprusszid-nátrium hatását a cirkuláris izomzaton, továbbá azt, hogy az NO izgató vagy gátló hatása (ld. Barthó és Lefebvre,

1995, Arch Int Pharmacodyn 329: 53) részt vesz-e a körkörös izomzatnak kolecisztozin-oktapeptidre adott, ideg-mediált motoros válaszában közvetítésében és/vagy terminálásában.

2. A caecum hosszanti izomzatának gátló neurotranszmitterei. Tengerimalac taenia caeci-n ideg ingerlés jellegzetes NANC relaxációt okoz. Még nem tisztázott kellőképpen, hogy ezen relaxációt az ismert gátló NANC transzmitterek közül (NO, ATP, VIP, PACAP) melyek közvetítik. Az ATP szerepe mellett és ellen is található adatok az irodalomban, az NO-t pedig lényegtelennek, vagy tartalék, "redundáns transzmitternek" tartják (idéztek: ld. Barthó és mtsai, 1998, Nau.-Schmied. Arch Pharmacol 358: 496). Számos adat támogatja a PACAP lehetséges részvételét a NANC relaxációban a taenia caeci-n, de a farmakológiai bizonyítékok nem egyértelműek. Leírták továbbá, hogy taenia caeci-n a NANC relaxációt *apamin* csökkenti, ami fölvetette purinerg transzmitter (ATP?) szerepét a válaszban, mivel az ATP gátló hatásaiban az apamin-érzékeny K⁺ csatornák szerepet játszanak. Újabbban azonban kiderült, hogy a PACAP-okozta relaxáció is apamin-érzékeny, és lehetséges, hogy még további gátló transzmitterek is használják az apamin-érzékeny K⁺ csatornákat.

Jelen kísérleteinkben az NO-szintáz gátló L-NOARG, a viszonylag új P₂ purinoceptor antagonistá PPADS, ill. a sokak által specifikus PACAP receptor antagonistának tartott (ld. II.3. pont) PACAP(6-38) segítségével megvizsgáltuk az NO, az ATP és a PACAP lehetséges részvételét a NANC relaxációban tengerimalac caecum taenián, ill. ezen transzmitterek egymáshoz való viszonyát a válasz közvetítésében.

3. Az ATP, mint a kolinerg áttevődés modulátora. Tisztázni kívántuk az ATP lehetséges részvételét a vékonybél ideg ingerlésre adott kolinerg összehúzódotában. Az extracelluláris ATP (elsősorban neurotranszmitterként) főleg a P₂ purinoceptorokon (P_{2X}, P_{2Y}), az AMP és az adenzin (irodalmi adatok alapján elsősorban neuromodulátorok) főként P₁ purinoceptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. Az ATP neurotranszmitter funkciója mellett ko-transzmitterként is működik, ill. lehetséges neuromodulátor szerepe is. A P_{2X} purinoceptor agonista α,β -metilén ATP aktiválja a myentericus idegsejteket (ld. Barthó és mtsai, 1999, Eur J Pharmacol 375: 203). A P₂ purinoceptor antagonistá PPADS hatásainak vizsgálata kapcsán megfigyeltük, hogy az anyag az elektromos ingerlés okozta kolinerg kontrakciót csökkenti. Jelen kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy a PPADS okozta gátlás az anyag specifikus, purinoceptor antagonistá hatásából ered-e, vagy simaizom-kontraktilitást csökkentő nem-specifikus gátló hatás, ill. általános transzmitter-felszabadulás csökkentő hatás-e.

4. A nyelőcső kapszaicin-érzékeny beidegzésének transzmitter-háttere. A kapszaicin-érzékeny primer afferens neuronok számos neuropeptid és más, nem-peptid természetű feltételezett neurotranszmitter-anyagot tartalmaznak, például a tachykininekhez tartozó P-anyagot és neurokinin-A-t. Ezen neurotranszmitterek részt vesznek a primer afferensek "lokális efferens" működésében, vagyis a biológiailag aktív anyagok a primer afferensek idegvégződéseiből felszabadulva ugyanazon szövetben efferens válaszokat váltanak ki (ld. Szolcsányi és mtsai, 1994, m.f.). A tachykininek jelen tudásunk szerint három farmakológiai receptor-típuson: a tachykinin NK_1 , NK_2 és NK_3 receptorokon hatnak. Az NK_3 receptorok a bélhuzamban főként a myentericus neuronokon található és farmakológiai, neurokémiai, ill. elektrofiziológiai eredmények szerint ingerlésük ideg-mediált hatásokat vált ki (pl. acetilkolin felszabadulása). Vannak adatok, melyek az NK_1 és NK_2 receptorok jelenlétét is bizonyítják a myentericus neuronokon. Ezen adatok alapján elméletileg mind a három tachykinin receptor szerepet játszhat a kapszaicin-érzékeny idegek izgató hatásában a myentericus idegsejteken.

Tengerimalac nyelőcsőben kimutattak P-anyagot tartalmazó neuronokat, ill. a nervus vagusból eredő kapszaicin-érzékeny funkcionális beidegzést. Tachykinin agonisták segítségével kapott eredmények valószínűsítik mind a három tachykinin receptor (NK_1 , NK_2 és NK_3) jelenlétét a nyelőcsőben. Saját kísérleteinkben kapszaicin idegek közvetítette hosszanti izom összehúzódást okozott a nyelőcsővön. Mivel P-anyag és neurokinin-A szintén indirekt, tetrodotoxin-érzékeny összehúzódást hozott létre ezen szövetben, lehetségesnek tűnik, hogy a kapszaicin okozta motoros válaszban a szenzoros idegekből felszabaduló tachykininek szerepet játszanak.

Jelen vizsgálataink célja specifikus tachykinin NK_1 , NK_2 és NK_3 receptor antagonisták, ill. kombinációik segítségével a tachykininek lehetséges részvételének kimutatása volt a kapszaicin izgató hatásában tengerimalac nyelőcsővön.

II.2. Módszerek

Preparálás. Kísérleteinket 400-600 g súlyú tengerimalacokon végeztük. Az állatokat tarkóütéssel leöltük és elvéreztettük. A felhasználni kívánt bélszakaszt (ileum, taenia caeci) vagy nyelőcsövet kimetszettük és kb. 1,5 (ileum körkörös izom) vagy 3 cm hosszú preparátumokat készítettünk. Ezen szakaszokat függőlegesen (ileum, taenia, nyelőcső) vagy vízszintesen (ileum körkörös-izom készítmény), 37 °C-os, oxigenizált tápoldatot (Krebs-, ill. Tyrode-oldat) tartalmazó szervfürdőkben függesztettük fel. A körkörös izomzat mozgásait a bélszegmentum közepén a bélfodorhoz rögzített fonal

segítségével követtük.

Regisztrálás. A simaizom-készítmények mozgásválaszait Hugo Sachs karos jelátalakító és híd segítségével izotóniásan (nyelőcső esetében erőmérő transducerekkel izometriásan), kompenzográf, ill. számítógépes program felhasználásával regisztráltuk. (Egy kísérletsorozatban a taenia caeci-n is izometriás követést alkalmaztunk; ld. II.3.2 pont). A kapott összehúzódások és elemyedések nagyságát KCl (8×10^{-2} M) vagy acetilkolin (10^{-5} M) segítségével kiváltott maximális kontrakció, ill. az izoprenalinnal (2×10^{-6} M) létrehozott maximális relaxáció százalékában adtuk meg. Körkörös izomzat esetén mind a tónusos, mind a gyors, ismétlődő fázisos összehúzódásokat a maximális kontrakcióhoz hasonlítottuk, a fázisos aktivitást az egész válaszra nézve szummáltuk.

Elektromos téringelés. Az elektromos téringelést (taenia: 80V feszültség, 0,1ms impulzusszélesség, 1 és 10Hz frekvencia, 20s sorozathossz; ileum: 60V, 0,1ms, 5Hz, 5s és 80V, 0,1ms, 5Hz, 20s) nagy teljesítményű ingerlővel, a szervfürdők alsó és felső részén elhelyezett platina elektróda-pár segítségével hoztuk létre. Az ingerlés hatásait az idegvezetést gátló TTX (5×10^{-7} M) minden készítménytípuson kivédte, tehát az elektromos téringelés a preparátumok idegeit hozta ingerületbe.

Statisztikai értékelés. A szignifikáns eltérések megállapítására két kapcsolódó minta esetén Wilcoxon-féle előjeles rangpróbát, két független mintánál Mann-Whitney U-tesztet, több kapcsolódó mintánál Quade-tesztet, több független minta esetében pedig Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk. A különbségeket $p < 0,05$ probabilitás esetén tekintettük szignifikánsnak.

II.3. Eredmények és megbeszélésük

1. Tónusos "nitregg" gátlás kimutatása vékonybél körkörös izomzaton

Tengerimalac ileum körkörös izomzatán atropin jelenlétében a morfin (10^{-6} M), a tetrodotoxin (10^{-6} M) és az L-NOARG (10^{-4} M) tónusos, lassú kontrakciót okozott. A morfin által kiváltott válasz (a maximum $6,8 \pm 1,6\%$ -a, $n=9$) a másik két szer hatásához képest (TTX: $13,6 \pm 1,7\%$, $n=9$; L-NOARG: $11,9 \pm 1,8\%$, $n=15$) szignifikánsan kisebb volt. TTX jelenlétében a morfin nem váltott ki összehúzódást. L-NOARG jelenlétében mind a morfin, mind a TTX hatástalannak bizonyult. L-NOARG szintén alig hozott létre kontrakciós választ TTX előkezelést követően. Az opioid antagonistá naloxon (10^{-6} M) megszüntette a morfin által okozott összehúzódást, ugyanakkor nem

befolyásolta a TTX vagy az L-NOARG által kiváltott kontrakciót. A naloxon önmagában nem okozott semmilyen választ, ami arra utal, hogy a körkörös izomzaton (ill. az azt ellátó idegeken) nem érvényesül tónusos opioid kontroll. Az L-NOARG okozta tónusos kontrakciót L-arginin (10^{-3} M) megszüntette, D-arginin (10^{-3} M) viszont nem. L-arginin nem befolyásolta a TTX által létrehozott összehúzódást, ill. a bazális tónust sem. Az NO donor nátrium-nitroprusszid (10^{-7} - 10^{-4} M) körkörösizom-elmernyedést okozott atropin jelenlétében.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a morfin, a TTX és az L-NOARG tónusosan működő, NANC gátló neuronok hatását függeszti fel a simaizomzatra. Mivel az NO-szintáz bénító L-NOARG után adva a morfin és az idegvezetést gátló TTX is hatástalan volt, a tónusos gátlást valószínűleg a "nitreg" gátló idegekből felszabaduló NO hozza létre és a fenti szerek "a gátlás gátlása" révén hoznak létre izgató választ.

Atropinnal nem kezelt készítményeken az NO-donor nátrium-nitroprusszid (10^{-4} M) átmeneti relaxációt követően kolinerg utókontrakciót váltott ki. Ez egybevág korábbi adatainkkal, melyek szerint az NO többféle mechanizmussal izgató választ is létrehozhat a bélhuzamban (ld. Barthó és Lefebvre, 1995, m.f.). Kolecisztokinin-oktapeptid (CCK-8; 10^{-9} M) tónusos-fázisos kolinerg kontrakciók együttesét váltja ki a körkörös izmon; a válasz 1-3 percen belül véget ér. L-NOARG (10^{-4} M) előkezelés sem a CCK-8 okozta tónusos vagy a fázisos összehúzódásokat, sem azok időtartamát nem módosította szignifikánsan, így valószínű, hogy a "nitreg" neuronok nem modulálják a CCK-8 hatását, nincs szerepük sem annak létrehozásában, sem terminálásában.

Hosszanti izom preparátumokon sem a morfin, sem a TTX vagy az L-NOARG nem okozott összehúzódást atropin jelenlétében, tehát a fent leírt tónusos gátlás a hosszanti izomzaton nem mutatható ki.

2. Nitrogénmonoxid, ATP és PACAP szerepe a caecum mozgásaiban

Elektromos téringelés (1 vagy 10 Hz), a szervfürdőhöz adott ATP (10^{-6} - 10^{-4} M), nátrium-nitroprusszid (10^{-8} és 10^{-5} M), PACAP (1-27 és 1-38) és VIP (1 - 3×10^{-8} M) reprodukálható, szub-maximális elmernyedést okozott tengerimalac taenia caeci-n. Mind az L-NOARG, mind a P_2 purinoceptor antagonistá PPADS jelentősen csökkentette az idegingerléssel kiváltott elmernyedést mindkét vizsgált ingerlési frekvencián. A két anyag okozta gátlás kb. azonos volt (kb. 40-40%), és a két hatás összeadódott (kombinált alkalmazás esetén a NANC válasz gátlása csaknem teljes volt). Az L-NOARG gátló hatása részben visszafordítható volt L-argininnel, ami specifikus "nitreg" mechanizmus részvételét bizonyítja. PPADS szignifikánsan gátolta az ATP

(10^{-6} - 10^{-5} M) relaxáló hatását, de nem befolyásolta az NO-donor nátrium-nitroprusszid okozta elmernyedést. Az L-NOARG nem befolyásolta az ATP-okozta relaxációt.

Az NO-szintézisgátlók hatástalanságáról szóló adatok izometriás regisztrálással születtek. Saját izometriás kísérleteinkben az első alkalmazott gátlószer (L-NOARG vagy PPADS) kisebb (10-20%-os) redukciót okozott a NANC elmernyedésben, mint a hozzáadott második szer (kb. 50%-os csökkenés). Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy izometriás regisztrálás esetén a két anyag hatásának egymáshoz való viszonya függ az alkalmazás sorrendjétől. A simaizomzat esetében az élettanihoz közelebb állónak tartjuk az izotóniás regisztrálást mint az izometriást, ezért a lejjebb leírt kísérletekben is az izotóniás eljárást alkalmaztuk.

A PACAP(6-38) (3×10^{-6} M) kivédte a PACAP mindkét molekuláris formája (PACAP1-27, 1-38) okozta szub-maximális elmernyedést taenia caecin, azonban hasonlóképpen kivédte a VIP relaxáló hatását is. Az adrenerg β -receptorizgató isoprenalin relaxáló hatását a PACAP(6-38) nem befolyásolta. A legújabb nomenklátúra szerint (Harmar és mtsai, 1998, Pharmac. Rev. 50: 265) a VIP és a PACAP három különböző receptortípuson hat, melyeket $VPAC_1$, $VPAC_2$ (mind a VIP-re, mind a PACAP-ra érzékenyek), ill. PAC_1 (PACAP-ra sokkal inkább érzékeny, mint VIP-re) receptoroknak neveznek. Ezek közül a PAC_1 és a $VPAC_2$ receptorokhoz kötődik a PACAP(6-38). Eredményeink szerint tehát a VIP és a PACAP hatását $VPAC_2$ receptorok egyedül, vagy $VPAC_2$ és PAC_1 receptorok közvetítik. Az is lehetséges azonban, hogy egyéb, még nem jellemzett receptorok is jelen vannak.

Kísérleteinkben megpróbáltuk tisztázni, hogy PACAP-szerű peptid szerepet játszik-e a NANC relaxációban a taenia caecin az NO és az ATP mellett, ill. vizsgáltuk lehetséges kapcsolatát ezen két utóbbi transzmitterrel a válasz mediálásában. Mivel a PACAP(6-38) segítségével nem tudtuk elkülöníteni a PACAP, ill. a VIP relaxáló hatását, következtetéseink VIP/PACAP-szerű peptid transzmitterre vonatkoznak. A PACAP(6-38) csak enyhén csökkentette az idegingerléssel kiváltott NANC relaxációt (20%-os redukció). Ez azt mutatja, hogy a VIP/PACAP-szerű peptid csak viszonylag kis szerepet játszik a válaszban.

További kísérletekben vizsgáltuk a VIP/PACAP kapcsolatát más NANC neurotranszmitterekkel (NO, ATP) az elektromos ingerlés-okozta elmernyedés mediációjában. A NANC relaxáció VIP/PACAP-közvetített komponense átfedést mutatott a purinerg összetevővel, mivel a PACAP(6-38) teljesen hatástalannak bizonyult PPADS jelenlétében (vagy PPADS és L-NOARG együttes jelenlétében). L-NOARG-előkezelés önmagában nem befolyásolta a PACAP(6-38) gátló hatását. A purinerg transzmitter

(ATP) és VIP/PACAP közötti interakció mechanizmusát nem ismerjük pontosan. Az ATP, a VIP, az NO és a PACAP direkt, tetrodotoxin-rezisztens elemnyedést okoz taenia caecin. Ugyanakkor az ATP, a VIP és a PACAP képes myentericus neuronokat izgatni, így akár ATP, akár VIP/PACAP felszabadulhat preszinaptikusan, és ingerületbe hozhat ATP-t és/vagy PACAP-ot liberáló gátló motoneuronokat.

3. Endogén P_2 purinoceptor agonista moduláló hatásának kimutatása a vékonybél kolinerg válaszára

Tengerimalac-vékonybélben a P_{2x} purinoceptor izgató α, β -metilén ATP (10^{-5} M) kb. fél-maximális, kolinerg idegek által közvetített hosszanti izom-összehúzódást hoz létre. PPADS (3×10^{-5} M) gyakorlatilag kivédte az α, β -metilén ATP hatását. A szintén P_2 purinoceptor antagonistá suramin (10^{-4} M) kb. felére csökkentette az α, β -metilén ATP hatását. Mind a PPADS, mind a suramin kb. 30-30%-kal redukálta az elektromos ingerlés okozta szub-maximális kolinerg kontrakciót, viszont az exogén acetilkolin okozta összehúzódást nem befolyásolta. Nagyobb mértékű gátlást már nem eredményezett az elektromos ingerlés hatásában, ha a PPADS dózist megkétszereztük (6×10^{-5} M). A PPADS és a suramin gátló hatása nem adódott össze; további gátlást nem okozott, ha a PPADS után suramint adtunk vagy megfordítva. Atropin jelenlétében az elektromos téringerlés (5 Hz, 20 s) okozta, tachykinin-mediált NANC összehúzódást PPADS (3×10^{-5} M) nem befolyásolta.

A fenti eredmények azt bizonyítják, hogy a PPADS hatásos és specifikus P_2 purinoceptor antagonistá a vizsgált preparátumon. A PPADS nem rendelkezik atropin-szerű, tachykinin antagonistá, simaizom-deprimáló, vagy a transzmitter-felszabadulást általában gátló hatásokkal. A PPADS, ill. a suramin kolinerg kontrakciót csökkentő hatása valószínűleg prejunkcionális szinten jut érvényre (az acetilkolin-felszabadulás gátlása). Az, hogy a PPADS és a suramin nem additív módon csökkenti a választ, szintén ellene szól annak, hogy ezek a szerek nem-specifikus módon gátolnák a kolinerg neuronokat. Mindezek alapján valószínű, hogy az idegingerlésre felszabaduló ATP-szerű endogén purinoceptor izgató az acetilkolin-felszabadulás pozitív modulátora.

4. Tachykinin receptorok szerepe a kapszaicin "lokális efferens" motoros válaszában tengerimalac nyelőcsőben

Ismert, hogy a kapszaicin-érzékeny idegek aktiválása izgató vagy izgató-gátló motoros választ hoz létre bél-preparátumokon (idézetek: Id. Barthó és mtsai, 1999, Neurosci.

90: 221). Kapszaicin (10^{-6} M) kétfázisú kontrakciót okozott tengerimalac nyelőcsővön (csúcsok: 38, ill. 20 %, n=9). Második kapszaicin beadás (10^{-6} M, 60 perccel az első kimosása után) nem okozott összehúzódást. A kapszaicin kontrakciós hatását tetrodotoxin (5×10^{-7} M) teljesen kivédte. Atropin (10^{-6} M) erősen csökkentette a kapszaicin-okozta választ.

A tachykinin NK_1 , NK_2 és NK_3 receptorok részvételét a kapszaicin összehúzó hatásában a receptor antagonistá GR 82334 (3×10^{-6} M), MEN 11420 (10^{-6} M) és SR 142801 (10^{-7} M) segítségével vizsgáltuk. Külön-külön alkalmazva egyik antagonistá sem okozott szignifikáns gátlást a kapszaicin kontraháló hatásában. Bármelyik két tachykinin receptor antagonistá kombinált beadásánál a válasz szignifikánsan csökkent, mindhárom antagonistá jelenlétében igen erősen gátlódott (a redukció kb. 80%-os volt az első fázisnál és kb. 55%-os a másodiknál).

Külön kísérletekben vizsgáltuk, hogy a tachykinin receptor antagonisták rendelkeznek-e nem-specifikus hatással is. Nyelőcső preparátumokon a hármastachykinin receptor antagonistá kombináció (GR 82334 + MEN 11420 + SR 142801) nem okozott változást a kolinerg agonista carbachol (5×10^{-7} - 10^{-6} M) kiváltotta összehúzódásban, ill. a hisztamin (5×10^{-6} - 10^{-5} M) okozta kontrakcióban.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy a tachykininek részt vesznek a kapszaicin izgató hatásában tengerimalac nyelőcsővön, és hogy a hatást tachykinin NK_1 , NK_2 és NK_3 receptorok szupra-additív módon közvetítik. A kapszaicin hatásában résztvevő endogén tachykinin(ek) természete pontosan nem határozható meg. Mind a P-anyag, mind a neurokinin-A szerepet játszhat a válaszban; az idegsejteken mind a három tachykinin receptortípus megtalálható, és a P-anyag, ill. neurokinin-A nem-szelektív módon izgatja a receptorokat (bár a P-anyag valamelyest preferálja az NK_1 , a neurokinin-A pedig az NK_2 receptorokat). Az atropin erős gátló hatása azt mutatja, hogy a fő végső mediátor a kapszaicin izgató hatásában az acetilkolin, mely a myentericus neuronokból szabadul fel. Tehát a válasz valószínű mechanizmusa az, hogy a kapszaicin-érzékeny primer idegvégződésekből felszabaduló P-anyag és neurokinin-A (esetleg más anyagokkal együtt) aktiválja a myentericus neuronokat.

II.4. Összefoglalás

A neurotranszmitter-azonosítás elfogadott kritériumai közül "a hatás azonosságát", de elsősorban "az antagonizmus azonosságát" használtuk arra, hogy identifikáljuk a nyelőcső-gyomor-bélhuzamban a különböző ingerekre fölszabaduló és mozgás-válaszokat közvetítő ingerületátvivő anyagokat. A vizsgálat tárgyát képező idegek a

gastrointestinalis traktus belső (intrinszik) idegei vagy külső (extrinszik), kapszaicin-érzékeny neuronjai voltak, a gyanúba vett ingerületátvivők pedig "nem-adrenerg, nem-kolinerg" (NANC) transzmitteranyagok, még akkor is, ha egyes válaszoknál a végső (neuro-muscularis) közvetítő az acetilkolin.

Eredményeink bizonyítékot szolgáltatnak a következőkre:

1. A nitrogén-monoxid tónusos gátlást tart fenn tengerimalac ileum körkörös izomzatán és ez közvetíti a morfin izomtónust fokozó hatását.
2. Tengerimalac taenia caeci-n az NO jelentős mértékben részt vesz az elektromos téringerlés okozta NANC relaxációban. A válaszban az ATP is szerepet játszik, és hatása az NO-éval additív. Az antagonistá PACAP(6-38) egyaránt gátolja a PACAP és a VIP elemesztő hatását; VIP/PACAP-szerű anyag részt vesz a preprátumon a NANC elemesztésben, bár szerepe kisebb mértékű, mint az NO-é vagy az ATP-é, és átfedést mutat a purinerg válasszal.
3. Tengerimalac ileumon endogén P₂ purinoceptor agonista (valószínűleg az ATP) pozitív irányban modulálja az acetilkolin felszabadulását az idegsejtekből.
4. Tengerimalac nyelőcsővön a kapszaicin-okozta kontrakcióban tachykininek szerepet játszanak; a hatásban mind a három tachykinin receptor altípus részt vesz, szupra-additív módon.

Az értekezésben foglalt eredmények alapvetési jellegűek, és a gyomor-bélhuzam mozgásai létrejöttének jobb megértését szolgálják. Hosszú távon ezek az eredmények is hozzájárulhatnak bizonyos motilitászavarok, ill. a zsigeri fájdalom mechanizmusának felderítéséhez, a diagnosztikához és terápiához.

III. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ PUBLIKÁCIÓK

Közlemények folyóiratban:

Barthó L, Lénárd L Jr, Maggi C A (1997): Evidence for the involvement of P₂ purinoceptors in the cholinergic contraction of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* **121**: 1507-1508

Holzer P, Lippe I Th, Lotfi Tabrizi A, Lénárd L Jr, Barthó L (1997): Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea-pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **280**: 154-161

Barthó L, Lénárd L Jr, Szigeti R (1998): Nitric oxide and ATP co-mediate the NANC relaxant response in the guinea-pig taenia caeci. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **358**: 496-499

Barthó L, Lénárd L Jr, Patacchini R, Halmai V, Wilhelm M, Holzer P, Maggi C A (1999): Tachykinin receptors are involved in the "local efferent" motor response to capsaicin in the guinea-pig small intestine and oesophagus. *Neuroscience* **90**: 221-228

Lénárd L Jr, Halmai V, Barthó L (1999): Morphine contracts the guinea-pig ileal circular muscle by interfering with a nitric oxide-mediated tonic inhibition. *Digestion* **60**: 562-566

Lénárd L Jr, Lázár Zs, Benkó R, Szigeti R, Báthori Zs, Tóth GK, 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

Előadások, posztterek:

Barthó L, Kóczán G, Lefebvre RA, Holzer P, Maggi CA, Lotfi Tabrizi A, Lénárd L Jr: Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and nitric oxide (NO): are they inhibitory neurotransmitters in the gut? EPHAR First European Congress of Pharmacology, Milan, Italy, 1995. (Abstract: Pharmac Res 31, Suppl, 304, 1995)

Barthó L, Kóczán Gy, Halmai V, ifj. Lénárd L, Lotfi Tabrizi A, Lefebvre RA, Holzer P: Nitrogénmonoxid (NO) hatása a vékonybél simaizmaira, a plexus myentericusra, ill. a perisztaltikus reflexre. MÉT vándorgyűlés, Budapest, 1995.

Barthó L, Kóczán G, Lefebvre RA, Holzer P, Maggi CA, Lotfi Tabrizi A, Lénárd L Jr: Motor effects of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and nitric oxide (NO) in

rodent intestinal preparations: multiple sites of action. Annual Meeting of the Austrian Neuroscience Association, Graz, 1995.

ifj. Lénárd L, Halmai V, Barthó L: Tónusos "nitreg" gátlás kimutatása tengerimalac-ileum körkörös izomzatán. MÉT vándorgyűlés, Pécs, 1997.

ifj. Lénárd L, Barthó L: A nitrogénmonoxid (NO) és az ATP együtt közvetítik a coecum simaizomzatának nem-adrenerg, nem-cholinerg (NANC) gátlását. MITT vándorgyűlés, Debrecen, 1998. (Abstract: Neurobiol 6: 223, 1998)

Barthó L, Lénárd L Jr, Szigeti R: ATP, nitric oxide and PACAP as co-mediators of the relaxation in the guinea-pig taenia caeci. Joint meeting of the Italian, Hungarian and Polish Pharmacological Societies, Pisa, 1998.

ifj. Lénárd L, Barthó L, Benkó R, Báthori Zs, Tóth GK, Penke B: PACAP-antagonista gátolja a nem-adrenerg, nem-cholinerg elernyedést a coecumban. MITT vándorgyűlés, Harkány, 1999. (Abstract: Neurobiol 7: 349, 1999)

Barthó L, Patacchini R, ifj. Lénárd L, Wilhelm M: Tachykinin-közvetítette válaszok tengerimalac-nyelősövön és ductus choledochuson. MITT vándorgyűlés, Harkány, 1999. (Abstract: Neurobiol 7: 282, 1999)

Barthó L, Lénárd L Jr, Benkó R, Tóth GK, Penke B: PACAP antagonist inhibits non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) relaxation in the guinea-pig taenia caeci. Annual Meeting of the European Neuropeptide Club, Ferrara, Italy, 1999. (Abstract: Regul Pept 80:146, 1999)

Barthó L, Lénárd L Jr, Szigeti R, Benkó R, Báthori Zs, Tóth GK, Penke B: Nitric oxide, ATP and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) mediate the relaxant response of the guinea-pig taenia caeci. Second European Congress of Pharmacology, Budapest, 1999. (Abstract: Fundam Clin Pharmac 13/Suppl. 1, 1999, 77s)

Lénárd L Jr, Halmai V, Barthó L: Morphine contracts the guinea-pig ileal circular muscle by interfering with an NO-mediated tonic inhibition. Second European Congress of Pharmacology, Budapest, 1999. (Abstract: Fundam Clin Pharmac 13/Suppl. 1, 1999, 207s)

A témával kapcsolatos egyéb közleményeink:

Barthó L, Horváth G, Lénárd L Jr (1999): Lack of anticholinergic effect of L-NAME in the small intestine. Eur J Pharmac 370: 279-282

Barthó L, Lénárd L Jr, Lázár Zs, Maggi CA (1999): Connections between P₂ purinoceptors and capsaicin-sensitive afferents in the intestine and other tissues. Eur J Pharmac 375: 203-210

Patacchini R, Barthó L, De Giorgio R, Lénárd L Jr, Stanghellini V, Barbara G, Lecci

A, Maggi CA (1999): Involvement of endogenous tachykinins and CGRP in the motor responses produced by capsaicin in the guinea-pig common bile duct. Naunyn-Schmiedeb Arch Pharmac 360: 344-353

Barthó L, Lázár Zs, Lénárd L Jr, Benkó R, Tóth GK, 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 Pharmac 392: 183-188

IV. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton mondok köszönetet **dr. Szolcsányi János** egyetemi tanárnak, intézet igazgatónak, a Neurofarmakológia doktori program vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben a tudományos kutatómunkát.

Őszinte köszönetemet fejezem ki **dr. Barthó Loránd** egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, magas szintű szakmai irányításáért, a kísérletek végzésében, tervezésében és az eredmények interpretálásában nyújtott önzetlen segítségéért, szakmai tanácsaiért.

Köszönettel tartozom munkatársaimnak, **Lázár Zsófiának**, **dr. Szigeti Rékának**, **dr. Gabrielné Wilhelm Mártának**, **dr. Halmai Vilmosnak**, **dr. Ali Lotfi Tabrizinak** és **Benkó Rita** tudományos diákköri hallgatónak a kísérletek végzésében és értékelésében nyújtott baráti segítségükért.

Köszönetemet fejezem ki **Pári Józsefnek** a kísérletek előkészítésében végzett munkájáért és **Zöldhegyi Józsefnek** az eredmények ábrázolásában való segítségéért.

Köszönettel tartozom a **Magyar Soros Alapítványnak**, az értekezés kidolgozásához nyújtott segítségért.