

# DOKTORI (PhD) DISSZERTÁCIÓ

*NEUROFARMAKOLÓGIA PROGRAM*

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,  
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Programvezető: Dr. Szolcsányi János  
egyetemi tanár  
akadémikus

Témavezető: Dr. Barthó Loránd  
egyetemi tanár

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

írta:

ifj. dr. Lénárd László

2000

## TARTALOMJEGYZÉK

I. Bevezetés.....	3
Az enterális idegrendszer	
I.1. A bélrendszer saját idegei.....	3
I.2. Külső idegi szabályozás.....	5
I.3. Az enterális idegrendszer transzmitter anyagai.....	7
I.3.1. Acetilcolin.....	7
I.3.2. Nem-adrenerg, nem-kolinerg (NANC) transzmitterek.....	8
I.3.2.1. Izgató NANC transzmitterek.....	10
I.3.2.2. Gátló NANC transzmitterek.....	11
II. Nitrogénmonoxid (NO).....	12
III. Adenozin trifoszfát (ATP).....	21
IV. Vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP).....	24
V. Pituitaer adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP).....	29
VI. Tachykininek.....	31
VII. Kísérletes munka.....	35
A jelen munka célkitűzései	
VII.1. Tónusos "nitreng" gátlás kimutatása vékonybél körkörös izomzaton .....	36
VII.2. Nitrogénmonoxid, ATP és PACAP szerepe a coecum mozgásaiban.....	45
VII.3. Endogén P <sub>2</sub> purinoceptor agonista moduláló hatásának kimutatása a vékonybél kolinerg válaszaira.....	62
VII.4. Tachykinin receptorok szerepe a kapszaicin "lokális efferens" motoros válaszában tengerimalac nyelőcsőben.....	65
VIII. Összefoglalás.....	72
IX. Irodalomjegyzék.....	73
X. A disszertáció alapját képező publikációk.....	84
XI. Köszönetnyilvánítás.....	87

## I. Bevezetés

### Az enterális idegrendszer

A gyomor-bélrendszer legfontosabb funkcióit - a tápanyagok továbbítását, emésztését, felszívódását - többrétű, összetett szabályozás vezérli: endokrin, parakrin és idegi szabályzó mechanizmusok. Az idegi szabályozásban részben a bélrendszer külső (extrinzik), részben a bél saját (intrinzik) idegei vesznek részt. A gastrointestinum különböző szakaszain eltérő hangsúllyal szerepel az említett három vezérlő rendszer: a tápcsatorna kezdeti (nyelőcső, gyomor) és végső szakaszain (rectum, analis sphincter) - ahol gyors és részben akaratlagos szabályzásokra van szükség, fontosabb a (központi) idegrendszer szerepe (Costa és Brookes, 1994), míg pl. a pancreas és a máj működésében inkább az endokrin szabályozás dominál. A vékonybél és a proximális vastagbél működését pedig leginkább a bélfal saját neuronjai kontrollálják (ld. Wood, 1994).

A gyomor-bélrendszer funkcióiban igen fontos szerepe van a tápcsatorna motilitásának, a záróizmok működésének, ill az összerendezett perisztaltikus mozgásnak. A disszertációban a továbbiakban az emésztőtraktus motoros funkcióival foglalkozom.

### I.1. A bélrendszer saját idegei

A század elején J.N. Langley ismerte fel, hogy a bélrendszer ganglionjai, a milliós nagyságrendű enterális idegsejt nem egyszerű átkapcsolópontok halmaza, hanem a központi idegrendszertől független, integratív működésre képes idegi rendszer alkotói. Feltevését alátámasztották in vitro kísérletei, melyekben összerendezett, propulziós motilitást mutatott ki izolált bélszakaszokban. Langley és később mások megfigyelései alapján az enterális idegrendszert a szimpatikus és paraszimpatikus rendszerek mellett az autonóm idegrendszer harmadik tagjaként tartjuk számon (ld. Dockray, 1987; Costa és Brookes, 1994; Wood, 1994; Goyal és Hirano, 1996). Ezt a különválasztást indokolja többek között (a) a nagyszámú (több tíz, ill. százmilliós) enterális idegsejt, ezen neuronok morfológiai sokszínűsége, ill. a sejtek hálózatos elrendeződése; (b) sok azonosított és még több valószínű neurotransmitter és modulátor; (c) intrinzik reflexek kimutatása a gyomor-béltraktusban.

*a*, A századforduló körül neurohisztológusok mutattak ki az enterális ganglionokban nagyszámú morfológiailag különböző idegsejtet. A.S. Dogiel írta le az enterális neuronok három alapvető morfológiai típusát (Dogiel I., II., és III. típusú sejtek), azonban ezen

csoportokon belül is az idegsejtek további nagymértékű méretbeli és morfológiai variabilitást mutatnak (ld. Wood, 1994).

Az enterális neuronok sejttestjei ganglionokba rendeződve találhatók, a sejtek idegnyúlányaikkal, sokrétű kapcsolatok kialakításával hozzák létre a bélrendszer két fő idegi plexusát. A plexus myentericus (Auerbach-plexus) a hosszanti és a körkörös izomréteg között helyezkedik el a bél teljes hosszában. Elsődlegesen a két izomréteg motoros beidegzésében és a mucosa szekretomotoros beidegzésében vesz részt, de kapcsolatai vannak submucosus ganglionokkal, a pancreas és az epehólyag enterális ganglionjaival, továbbá szimpatikus ganglionokkal is. A plexus submucosus (Meissner-plexus) a körkörös izomréteg és a muscularis mucosae között található, leginkább kifejtett a vékonybélben, ahol fontos szerepe van a szekréció szabályozásában. A plexus submucosus beidegzi a szekréciós epitheliumon kívül a muscularis mucosae, a bél endokrin sejtjeit és a submucosus ereket. Hasonló idegfonatok találhatóak az epehólyag falában, az epevezetékben és a pancreasban is. Ezen elsődleges idegfonatok nyúlványai másodlagos plexusokat alkotnak, melyeknek további elágazódásaiból harmadlagos plexusok alakulnak, így ez a hálózatos rendszer alkalmassá válik gyakorlatilag a bél összes rétegének beidegzésére.

Az enterális neuronok funkcionális és kémiai változatossága alapján egyre több hasonlóságot mutattak ki a központi idegrendszer és az enterális idegrendszer működése között (Gershon és mtsai, 1994). Egyesek szerint több tíz millió, mások szerint kb. kétszáz millió (gerincvelő nagyságrendű) neuron található a bélrendszerben. Ma már az enterális idegrendszert a központi idegrendszer kihelyezett részeként is szokták emlegetni (Goyal és Hirano, 1996), ami a központtal a vegetatív afferens, valamint a szimpatikus és paraszimpatikus afferens és efferens neuronokon keresztül kommunikál.

*b*, A legkorábban felfedezett két transzmitter anyagon kívül (acetilkolin, noradrenalin) számos új peptid és nem-peptid típusú neurotranszmittert (ún. nem-adrenerg, nem-kolinerg, NANC transzmitterek) azonosítottak a bélben (ld. következő fejezetek).

*c*, Bayliss és Starling (1899) ma már klasszikus kísérletükben mutattak ki gátló és serkentő enterális reflexeket kutya vékonybélben, demonstrálva gátló és serkentő motoneuronok jelenlétét a bélfalban, ill. saját intrinszik reflexek létezését a bélben (extrinszik denervációt követően a bélfal lokális feszülésére reflexes izommozgást regisztráltak a bélben). Később számos állatfajban kimutattak polarizált enterális reflexeket (ld. Furness és Costa, 1987). Izolált bél szegmentumaiban lokális distensio orális irányú serkentő és anális irányú gátló reflexeket vált ki a körkörös izomban, később ezen felszálló serkentő és leszálló

gátló reflexeken kívül szintén kimutattak leszálló serkentő reflexeket is (Id. Costa és Brookes, 1994). Ezen reflexek feltételezik enterális érzőidegsejtek, interneuronok és motoros idegsejtek jelenlétét és összehangolt együttes működését.

Több mint 30 féle típusú neuront mutattak ki a bélben, funkció szerinti osztályozásuk alapján megkülönböztetnek serkentő és gátló körkörös izom motoneuronokat, hosszanti izom motoneuronokat, intrinszik érzőidegsejteket, felszálló és leszálló interneuronokat, ill. szekretomotoros és vazomotoros neuronokat (Costa és Brookes, 1994). Az intrinszik érző neuronokat a Dogiel II., ill. az elektrofiziológiailag jellemzett AH idegsejtekkel azonosították (Furness és Mtsai, 1998).

Az enterális motoneuronok a bél simaizomsejtjeit idegzik be, így a bélmozgások szabályozásában vesznek részt. A szekretomotoros neuronok a mucosa epithel sejtjeit látják el és a bélhám szekréción és abszorpción működését befolyásolják, míg a vazomotoros idegsejtek a véráramlást szabályozzák a vascularis simaizmok innervációján keresztül.

Az enterális idegrendszer a központi idegrendszertől függetlenül integrálja a motoros válaszokat a beérkező afferens (ozmo-, termo-, mechano- és kemo-receptorok közvetítette) információknak megfelelően, és az enterális idegrendszerre jellemző, sajátos, rendszeresen ismétlődő, sztereotip mozgásválaszokat hoz létre, mint a szegmentáló, vagy a perisztaltikus bélmozgás.

## I.2. Külső idegi szabályozás

Habár az enterális idegrendszer a központi idegrendszertől függetlenül is képes működni, utóbbinak fontos szerepe van a bélműködések nagyobb távolságokat is átfogó koordinálásában. A bélidegrendszer a központi idegrendszer autonóm idegi központjaival szoros kapcsolatban áll. A központi idegrendszer autonóm központjai más agyi struktúrákkal és a bélidegrendszer közreműködésével olyan összetett válaszokat képes koordinálni, mint a rágás, nyelés, hányás, vagy székelés. A szimpatikus idegek gátolják a gastrointestinum motilitását és csökkentik a véráramlást, a paraszimpatikus idegek általánosan fokozzák a motilitást és a gyomor-bélrendszer szekréción tevékenységét.

Paraszimpatikus motoros, ill. szekretomotoros rostok a gastrointestinum felső részét a nervus vagus, a distalis vastagbelet és a rectumot a sacralis gerincvelői idegek közvetítésével látják el. A paraszimpatikus preganglionális kolinerg neuronok izgató hatásokat közvetítenek az enterális myentericus neuronok felé. E külső kolinerg beidegzés igen gazdag az emésztőtraktus felső részén, ill. a distalis vastagbél és az ano-rectalis területeken.

Ugyanakkor a vékonybél myentericus idegsejtjeinek csak igen kis hányadát idegzik be kolinerg vagus rostok. A vékonybél ill. a proximális vastagbél tehát kevésbé áll külső idegi szabályozás alatt, az intrinszik enterális neuronok szabályozása mellett autonóm módon működik. A paraszimpatikus rendszerben bizonyítékok vannak az acetilkolin mellett a vazóaktív intestinalis polipeptid (VIP) ko-transzmitter szerepére is.

A bélrendszert elérő szimpatikus adrenerg neuronok sejttestjei a praevertebralis ganglionokban találhatóak. Rostokkal látják el a szekretomotoros neuronokat, a submucosa vérereit, a sphincter izmokat és a preszinaptikus kolinerg idegvégződéseket. A szimpatikus gátló hatás a gyomor-bélrendszer teljes hosszában érvényesülhet, valószínűleg jelentős szerepe van a paralitikus ileus létrejöttében is. Szimpatikus rostok a bél izgató transzmittereinek (acetilkolin, P-anyag) felszabadulását preszinaptikusan képesek gátolni  $\alpha_2$ -adrenoceptorokon keresztül (Vizi, 1979; Barthó és mtsai, 1983; Barthó és Holzer, 1985). Az ismert szimpatikus neurotranszmitter, a noradrenalin mellett ko-transzmitterként a neuropeptid Y (NPY) játszik szerepet.

#### A bélrendszer extrinszik afferens beidegzése:

A bélrendszer afferens idegei az emésztőcsatorna felső részén a vagusban, lejjebb a splanchnicus idegekben futnak. A vagusban futó primer afferens rostok a bél mechanikai feszülésére érzékenyek, a mucosa bizonyos afferens vagalis rostjai pedig kémiai ingerekre reagálnak, ill. a béltartalom glükóz, aminosav és hosszúláncú zsírsav koncentrációira. A splanchnicus idegek végződése a bél falban, sejttestjei a gerincvelő hátsógyöki ganglionjaiban találhatóak. Ezen afferensek a visceralis fájdalomban játszanak szerepet. Mechanikai, hő- és kémiai ingerekre is érzékenyek (ld. Sengupta és Gebhart, 1994; Wood, 1994; Goyal és Hirano, 1996). Azonban annak ellenére, hogy ezen ún. extrinszik afferens neuronok axon-reflexek közvetítésével részt vehetnek a bélizomzat reflexeiben, bizonyos, hogy léteznek ún. intrinszik afferens neuronok (melyeknek sejttestjei a bélizomban találhatóak), mivel az extrinszik idegek degenerációját követően is kiválthatók distensio reflexek a vékonybélben (ld. Kunze és Furness, 1999).

A gerincvelő bizonyos afferensei, melyek kapszaicinre (az erős paprika csípős anyaga) érzékenyek, sajátos efferens funkciót mutatnak, idegvégződéseikből bioaktív anyagok szabadulnak fel, melyek a motilitást és a véráramlást befolyásolják, ill. a nyálkahártya-protekciónban vesznek részt (Barthó és Szolcsányi, 1978; Szolcsányi és Barthó, 1978; Holzer, 1988, 1991; Gustaw és mtsai, 1995; Geppetti és Holzer, 1996).

Szenzoros transzmitterként a legtöbb adat a tachykininek (P-anyag, neurokinin-A), a szomatosztatin és a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) szerepe mellett szól, de felmerül a VIP és a PACAP, ill. a nitrogénmonoxid, az ATP és a glutamát lehetséges szerepe is (Barthó és mtsai, 1982a; Barthó és Holzer, 1985; Holzer, 1988; Szolcsányi és mtsai, 1998; Hannibal és mtsai, 1998; Barthó és mtsai, 1999a).

### I.3. Az enterális idegrendszer transzmitter anyagai

#### I.3.1. Acetilcolin

Az acetilcolin ingerületátvivő anyag a vegetatív idegrendszer szimpatikus és paraszimpatikus praeganglionaris idegeiben, ill. a paraszimpatikus postganglionaris idegekben. Továbbá a bélidegrendszer myentericus motoneuronjainak túlnyomó része és a felszálló interneuronok nagy része, ill. a plexus submucosus számos idegsejtje szintén kolinerg (Furness és mtsai, 1983). Nikotin-típusú kolinoreceptorok találhatók a ganglionsejteken ( $N_2$ -altípus), ahol izgatásuk gyors izgató potenciált (e.p.s.p.) vált ki. A muszkarin-típusú kolinerg receptoroknak több altípusa játszhat szerepet a gastrointestinalis traktusban:  $M_1$  receptorok a plexus myentericus ganglionsejtjein facilitálják a ganglionalis transzmissziót (lassú izgató potenciált okozva),  $M_2$  receptorok találhatók prejunctionálisan kolinerg és adrenerg idegeken; negatív kolinerg feedback révén ezen idegek transzmitter-felszabadulása gátlódik.  $M_3$ -as típusú receptorok (hasonlóan a légző- és az urogenitalis-rendszerhez) a gastrointestinalis traktusban is a simaizmok kontrakcióit közvetítik (a hosszanti és a körkörös izomzatot is összehúzzák), ill. exokrin glandularis sejtek szekrécióját fokozzák (ld. Burks, 1994).

A kolinerg neuronok hisztokémiai kimutatására a kolin acetiltranszferáz immunfestés használatos.

Az acetilcolin fontos szerepet játszik a perisztaltikus és a felszálló enterális reflexben, mivel mind a muszkarin receptor antagonista atropin, mind a nikotin-receptor bénító hexamethonium gátolja ezen reflexeket, együttes jelenlétükben pedig nem válthatók ki e reflexek. Ugyanakkor az acetilcolin szerepe, úgy tűnik, nem kizárólagos: atropin-rezisztens és hexamethonium-rezisztens összetevője is van e reflexeknek, melyeket valószínűleg endogén tachykininek mediálnak, mintegy "átvéve" az acetilcolin szerepét (ld. Barthó és Holzer, 1985; Barthó és mtsai, 1987, 1989). Az acetilcolin a bélben mind a neuro-neuronális (nikotin és muszkarin receptorokon keresztül), mind a neuro-muscularis (csak muszkarin

típusú receptorok közvetítésével) transzmisszióban is részt vesz (Tonini és Costa, 1990).

### I.3.2. Nem-adrenerg, nem-kolinerg (NANC) transzmitterek

Már több mint egy évszázada leírták, hogy nyálmirigyek paraszimpatikus ideg ingerlésekor a muszkarin receptor blokkoló atropin alkalmazása nem védi ki a teljes választ. Atropin szintén csak kis mértékben gátolja a paraszimpatikus ingerlés okozta értágulatot különböző szervekben, bár az exogén acetilkolin hasonló hatását teljesen kivédi (Lundberg, 1981). Hasonlóan, szimpatikus aktiváció hatását nem védik ki teljes egészében adrenerg gátlószerek, különböző ér-preparátumokon további vasoconstrictio tapasztalható (Folkow és Uvnäs, 1948). Ezen eredmények felvetették, hogy az acetilkolin és a noradrenalin mellett más transzmitter anyagok is fontos szerepet játszhatnak a perifériás idegrendszer működésében.

A gastrointestinalis rendszer farmakológiai vizsgálatai során kimutatták, hogy elektromos téringerlés hatására tengerimalac taenia colin gátló junkciós potenciál (IJP) keletkezik kolinerg és adrenerg antagonisták jelenlétében (Burnstock és mtsai, 1963). A feltételezett ingerületátvivő anyagokat nem-adrenerg, nem-kolinerg (non-adrenergic, non-cholinergic, NANC) transzmittereknek nevezték el. Később elektronmikroszkópos tanulmányok mutatták ki, hogy bizonyos idegvégződések strukturális tulajdonságaikban különböznek a klasszikus (kolinerg, adrenerg) idegvégződésektől. Számos, ultrastrukturájukban eltérő idegvégződést írtak le, így sok lehetséges transzmitter anyag szerepe merült fel. Kiderült, hogy a NANC idegek fontos részei az autonóm idegrendszernek: kimutatták a gyomor-bélrendszeren kívül a légutakban, erek falában, a kismencedei zsigerekben és a hímvesszőben is NANC beidegést. A bizonyított és feltételezett neurotranszmittereket mutatja az 1. táblázat (Goyal és Hirano, 1996).



1. táblázat

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

### Felmerülő problémák a NANC transzmitterek vizsgálatai során:

Ezen anyagok neurotransmitter szerepére vonatkozó adatok főként hisztokémiai, immunhisztokémiai és radioimmunoassay (RIA) vizsgálatokból származnak, melyekben a feltételezett transzmittereket neuronok idegvégződéseiben lokalizálták. Arra vonatkozóan, hogy ezen anyagok közül melyeknek lehet transzmitterként fiziológiai szerepe, még többnyire hiányosak ismereteink. Sok anyagról még nem sikerült kimutatni például, hogy fiziológiai ingerekre felszabadulhatnak az idegvégződésekből. Bonyolítja a helyzetet, hogy számos feltételezett transzmitterről nem könnyű megállapítani, hogy valóban neurotransmitterként hat-e, hiszen endokrin ill. parakrin sejtekből is felszabadulhatnak. Továbbá csak igen kevés anyag esetében áll rendelkezésre specifikus receptor antagonisták.

Peptid transzmitterek esetében, melyek gyakran különböző peptid-családok tagjai (rokon szerkezetű peptidek csoportjai), a specifikusnak tartott receptor antagonisták sokszor nem tud differenciálni a különböző rokon peptidek receptorai között, mivel e peptidek

gyakran a rokon molekulák receptorainak is antagonistáiként vagy éppen agonistáiként viselkednek. Használatos peptid transzmitterek hatásainak vizsgálatainál az immunneutralizáció módszere specifikus antitestek segítségével; a módszer hátránya a nagy molekulák -az antitestek- limitált penetrációs képessége a szövetekben. Vannak próbálkozások a különböző transzmitter anyagok génjeinek (vagy az azt szintetizáló enzimek génjeinek) eltávolítására (ún. knockout-állatok), azonban sokszor az ilyen egyedek nem életképesek, ill. az egyedfejlődés során különböző kompenzációs mechanizmusok léphetnek fel.

Továbbá az enterális idegrendszerben a legtöbb neuron nem csupán egy transzmittert tartalmaz, aktivációjuk során ezen anyagok együtt szabadulnak fel (co-release) és fejtik ki hatásaikat a célsejteken (plurichemical transmission - ld. Furness és mtsai, 1995).

#### A neurotranszmitter-azonosítás "kritériumai":

Hogy egy anyagot neurotranszmitternek tekintsünk, számos kritériumnak kell megfelelnie: 1. az anyag, ill. annak sejten 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 (hatás azonosság elve), 4. specifikus antagonista gátolja az ingerlés hatására felszabaduló anyag és az exogén alkalmazás hatását is, 5. kimutathatók legyenek a transzmitter molekula lebontási és/vagy visszavételi (reuptake) mechanizmusai. Egyes kutatók szerint a legfontosabb kritériumok a neuronális jelenlét (1), az idegekből való felszabadulás (2), ill. a hatás azonossága (3) (Orrego, 1979), a farmakológusok azonban ugyanilyen vagy nagyobb jelentőségűnek tekintik "az antagonizálhatóság azonossága" feltételét is (4). Számos NANC transzmitter esetében néhány, ritkábban az összes feltétel teljesül.

#### I.3.2.1. Izgató NANC transzmitterek a gyomor-bélhuzamban

##### *Szerotonin* (5-hidroxi-triptamin, 5-HT):

Túlnyomórészt a mucosában található, de előfordul a plexus myentericus neuronjaiban is. Stimulálja a nyákelválasztást és a bél-szekréciót, izgató és gátló hatásai is vannak a motorikára, ill. a mesenterialis véráramlást is befolyásolja. Neurotranszmitterként és hormonnként is szerepet játszik a gastrointestinalis traktusban. A szerotoninerg neuronok

valószínűleg interneuronok, kimutatták immuncitokémiával, hogy sejttestjeik a plexus myentericusban vannak, axonjaik pedig analis irányban kapcsolódnak más myentericus neuronokhoz, ill. a plexus submucosus sejtjeihez (Pettersen és mtsai, 1979). Funkcionális kísérletekben kimutatták, hogy a szerotonin direkt és indirekt izgató és gátló hatásokkal is rendelkezik a bél simaizomzatán, izgató kolinerg, izgató nem-kolinerg és gátló NANC idegeket is stimulál (Costa és Furness, 1979; Dhasmana és mtsai, 1993). Úgy tűnik, négy 5-HT receptor típus (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>) játszik szerepet a szerotonin különböző hatásainak mediálásában a bélben.

#### *Tachykininek:*

A P-anyag és neurokinin-A tartozik e csoportba (a szintén tachykinin neurokinin-B a bélrendszerben nem fordul elő). Direkt simaizomösszehúzódást okoznak, indirekt módon izgató és gátló hatásokat is közvetíthetnek. Három receptor típuson fejtik ki hatásaikat: tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> és NK<sub>3</sub> receptorokon. Az endogén tachykinineknek szerepük van az atropin-rezisztens perisztaltikus és felszálló enterális reflexek közvetítésében (ld. Barthó és Holzer, 1985; Barthó és mtsai, 1992a; Holzer és Maggi, 1993; Maggi és mtsai, 1994a; Holzer és mtsai, 1993, 1995, 1998). A továbbiakban a VI. fejezetben foglalkozom a tachykininek szerepével.

Meg kell jegyezni, hogy a később szóba kerülő 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 tachykininiket szabadítanak föl, de pl. az NO képes direkt módon mind összehúzódást, mind elernyedést létrehozni, valamint fokozni a bazális, de csökkenteni a stimulált acetilkolin-felszabadulást (ld. Barthó és Lefebvre, 1995).

#### I.3.2.2. Gátló NANC transzmitterek

Bayliss és Starling (1899) már a századfordulón kimutattak leszálló idegi gátlást a vékonybélben. Azóta ismert, hogy ezeket intrinszik gátló motoneuronok közvetítik. Fontos szerepet tulajdonítanak a gátló beidegzésnek a sphincterek nyitására is (ld. Wood, 1994; Kunze és Furness, 1999). Később számos enterális simaizomszervben leírtak ideg-közvetített elernyedést és membrán hiperpolarizációt. Az ezen hatásokat közvetítő NANC transzmitter anyagok azonosításával kapcsolatban már kb. négy évtizede folynak intenzív kutatások, azonban számos kérdés még ma sem tisztázott teljes mértékben.

NANC gátló transzmitterként először az ATP-vel kapcsolatban találtak meggyőző bizonyítékokat (Burnstock és mtsai, 1970; review: Burnstock, 1990). Pár évvel később a vazóaktív intestinalis polipeptid (VIP) szerepét bizonyították a NANC gátlásban (Goyal és mtsai, 1980). A 90-es években pedig kimutatták, hogy enterális NANC idegek ingerlésekor nitrogénmonoxid (NO) szabadul fel (Bult és mtsai, 1990) és az NO részt vesz számos simaizom-preparátum gátló beidegzésében (Stark és Szurszewski, 1992). Újabb bizonyítékok merültek fel az egy évtizede felfedezett új neuropeptid, a pituitaer adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) (Schwörer és mtsai, 1992; McConalogue és mtsai, 1995a), ill. a szénmonoxid (CO) (Rattan és Chakder, 1993) szerepével kapcsolatban is.

Bebizonyosodott, hogy egy adott preparátumon belül is sokszor nem egyetlen, hanem kettő, vagy akár három gátló transzmitter együtt felelős a gátló hatásért (izomrelaxáció, membrán hiperpolarizáció) (pl. VIP + NO, VIP + egy apamin érzékeny mechanizmus - ATP?). Számos faj (tengerimalac, patkány, oposszum, stb., ill. humán szövetekben) számos gastrointestinalis simaizomszervében kimutatták, hogy a NANC gátlást több gátló transzmitter (ATP, NO, VIP, PACAP) együtt közvetíti, ill. hogy több komponensű a kiváltott hiperpolarizáció (Furness és mtsai, 1995).

Úgy tűnik azonban, a kísérleti eredmények nem extrapolálhatók: sem a különböző fajok között, sem egy-egy fajon belül a különböző intestinalis régiók között nem lelhető fel szabályosság, eltérőek a gátlást mediáló anyagok, ill. ezen anyagok részesedésének mértéke a válaszokban (Furness és mtsai, 1995). (Pl. az NO legtöbbször a lassú hiperpolarizáció mediálásában vesz részt, kutya colonban viszont a gyors komponensért felelős; apamin általában a gyors komponenset gátolja, oposszum nyelőcsőben ellenben a gyors válasz apamin-rezisztens; a NANC idegi gátlás kivédésében a VIP receptor antagonisták patkány distalis vastagbélben hatásosak, a proximális colonban nem, fordítva: a NOS-gátlása hatásos patkány proximális vastagbélben, hatástalan a distalis részen, stb. (ld. Furness és mtsai, 1995).

## II. Nitrogénmonoxid (NO)

A nitrogénmonoxid több mint egy évtizede a biológiai kutatások egyik legizgalmasabb tárgya. Az 1998-as orvosi Nobel-díjat három kutató (R. Furchgott, L. Ignarro és F. Murad) az NO jelátvivő szerepének tisztázásáért vehette át. Az NO-nak szerepet tulajdonítanak többek közt pl. a vasodilatációban, a kórokozók elleni védelemben, ill. a

központi és a perifériás idegrendszer működésében. Úgy tűnik, a nitrogénmonoxid egyaránt szerepet játszik a különböző szervek, szervrendszerek fiziológiás és patológiás működésében.

### Az EDRF és az NO azonosítása

Furchgott és Zawadski (1980) leírta, hogy az acetilkolin és rajta kívül számos vasodilatator relaxáló hatása endothel jelenlététől függ, az elernyedést az endothelből felszabaduló humorális faktor okozza, melyet később elneveztek EDRF-nek ("endothelium-derived relaxing factor", endothel eredetű relaxáló faktor). Endothel függő relaxációt artériákban, vénákban és mikroerekben is találtak. Leírták, hogy acetilkolinon kívül többek között P-anyag, trombin, adenin-nukleotidok, bradikinin és elektromos ingerlés is létrehoz EDRF felszabadulást.

1977-ben két munkacsoport is igazolta, hogy a szerves nitrátok dózis-függő cGMP szint emelkedést okoznak simaizomsejtekben (Schultz és mtsai, 1977; Katsuki és mtsai, 1977). Később biokémiai vizsgálatokkal azt is kimutatták, hogy a nitro-vasodilatatorok és az NO a szolubilis guanilát ciklázt aktiválják (Murad és mtsai, 1978). Így elfogadottá vált az a vélemény, hogy a nitro-vasodilatatorok ezen enzim aktivációjával az intracelluláris cGMP szintet növelik és ez fehérje foszforiláció révén simaizom relaxációhoz vezet.

1987-ben egymástól függetlenül két munkacsoport is bizonyította, hogy NO szabadul föl vascularis endothel sejtekből és az NO ill. EDRF hatása egymástól nem különbözik (Ignarro, 1987; Palmer, 1987). Az NO és az ózon reakciójának termékét kemilumineszcenciás módszerrel mérve lehetségessé vált az NO direkt meghatározása.

Az a lehetőség is felmerült, hogy a két anyag esetleg mégsem pontosan azonos (pl. a felezési időben, az aktivitásban, az anion cserélő oszlophoz való kötődésben különbségeket is mértek). Mindezeket figyelembe véve is az általános vélemény szerint az EDRF az NO-val azonos, vagy egy NO-t felszabadítani képes rokon nitrozovegyület.

### Az NO tulajdonságai

Az NO színtelen, szagtalan, toxikus, vízben kismértékben oldódó gáz. Töltéssel nem rendelkezik, így lipid membránokon szabadon képes átdiffundálni. Páratlan elektronnal rendelkezik, ezért igen reakcióképes. Nagyon labilis molekula, gyorsan átalakul,  $N_2O_4$ -en keresztül nitritté és nitráttá oxidálódik. Híg oldatokban féléletideje 10 másodperc alatt van, biológiai rendszerekben féléletideje 5 másodpercnél is kevesebb. Szuperoxid-anion az NO bomlását fokozza, szuperoxid-dizmutáz kivédi e hatást. Az NO oxihemoglobinhoz és más

hem-tartalmú proteinekhez erősen kötődik, ennél fogva e molekulák az NO hatását csökkentik.

### Az NO keletkezése

Viszonylag korán tisztázódott, hogy az endothelben az NO enzimatikus úton képződik L-argininből. A folyamatot az NO-szintáz (NOS) enzim katalizálja, az enzim aktivitása kalcium-, kalmodulin- és NADPH-dependens. Az NO-szintázok dioxigenáz enzimek, egy aminosav, az L-arginin terminális guanidino-nitrogén atomjából és egy O<sub>2</sub> molekula oxigén atomjából képeznek NO-t és mellette L-citrullint. Az enzimatikus folyamatban az elektron-transzferhez számos kofaktor szükséges: flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin mononukleotid (FMN), nikotinamid adenin dinukleotid foszfát (NADPH), és tetrahydrobiopterin.

Az enzimatikus szintézis kompetitív módon gátolható L-arginin analógokkal (pl.: N<sup>G</sup>-monometil-L-arginin (L-NMMA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin (L-NNA v. L-NOARG), L-nitro-arginin-metil-észter (L-NAME), vagy L-arginin-etil-észter (L-AEE)). Radioaktív izotóppal jelzett L-arginin alkalmazásával bizonyították, hogy az NO valóban a vázolt módon képződik (ld. Moncada és mtsai, 1991).

Bár számos NOS izoenzimet elkülönítettek, aktivációjuk és regulációjuk különbözősége alapján két alapvető kategóriába szokás sorolni őket.

A konstitutív NOS idegsejtekben és endothel sejtekben állandóan jelen van és megfelelő ingerekre kis mennyiségben szabadít fel NO-t. Kimutatták még trombocitákban és a mellékvesevelőben is. A konstitutív NOS aktivitása erősen kalcium-, kalmodulin- és NADPH-függő. A neuronokban található NO-szintáz külön, neuronális altípusként (nNOS) tartják számon az endothelialis eNOS mellett.

A másik fajta NOS, az indukálható enzim (iNOS) a sejtekben normálisan nincs jelen, csak a sejtek endotoxin, vagy citokinek általi aktivációja következtében termelődik makrofágokban, neutrofil-granulocitákban, májsejtekben, Kupffer-sejtekben, endothel- és simaizomsejtekben. Szemben a konstitutív enzimmal, az indukálható NOS-t nem a kalcium regulálja, hanem transzkripcionálisan szabályozott. Az indukálható NOS hatására folyamatosan és nagy mennyiségben termelődik az NO; az enzim szintézise fehérjeszintézis gátlókkal és glükokortikoidokkal gátolható.

Az NO-szintáz detektálására többféle módszer is használatos: az NO okozta oxihemoglobin-methemoglobin oxidációs átalakulás mérhető spektrofotométerrel, mások

radioaktív izotóppal jelzett L-arginin alkalmazásával az NO mellett képződő L-citrullin méréséből következtettek a NOS aktivitására (Grider és Jin, 1993); az NO-szintáz lokalizációs vizsgálataihoz leginkább az immunhisztokémiai módszerek használatosak (Bredt és mtsai, 1990; Schmidt és mtsai, 1992).

A neurális NO-szintázt a NADPH-diaforáz enzimmel azonosították (Hope és mtsai, 1991; Dawson és mtsai, 1991), így az NO-szintázt egy viszonylag egyszerűbb, hisztokémiai módszerrel lehet detektálni, a nitro blue tetrazolium redukciójának kimutatásával.

### Az NO "raktározása", hatásmechanizmusa

Léteznek elképzelések az NO vesicularis és nem-vesicularis tárolására vonatkozóan is. A szabad NO formában történő raktározás ellen szól többek között, hogy az NO igen reakcióképes molekula, féléletideje mindössze pár másodperc, továbbá lipofil tulajdonsága folytán lipid membránokon könnyedén képes átdiffundálni. Mindezek alapján valószínűtlen, hogy vesiculákban szabad NO raktározódna. Felvetődik, hogy egyáltalán nem is tárolódik az NO, hanem a szükségleteknek megfelelően termelődik, majd rögtön a felhasználás helyére diffundál. Egy elképzelés szerint vesiculákban, savas pH-n, S-nitrozotiol formájában tárolódik és exocitózissal kerül ki a sejtből. A sejtközötti térbe kerülve pedig pH változás hatására spontán NO képződik.

A nitrogénmonoxid a célsejtbe diffundál, ahol kapcsolatba lép a megfelelő receptív molekulákkal. Valódi receptora nem lévén, leginkább a fehérjékben lévő vas (pl. hem-csoportban) nevezhető az NO specifikus kötőanyagának.

Az NO molekula a guanilát cikláz hem-csoportjához kötődve aktiválja az enzimet. A guanilát cikláz GTP-ből cGMP-t képez, az intracelluláris cGMP szint emelkedése pedig további celluláris folyamatokat indít el (Schmidt és mtsai, 1993).

### Az NO szerepe a gyomor-bélrendszerben

#### Véráramlás-szabályozás

Az NO-szintáz gátlószerei csökkentik a gyomornyálkahártya véráramlását patkány gyomorban, ami arra utal, hogy endogén NO-indukált bazális tónus létezik a gyomor ereiben. Lézer-Doppler áramlásmérési módszerrel vizsgálva L-NAME csökkenti a mucosa véráramlását (Pique, 1989). Úgy találták, hogy az NO, ill. a nitroprusszid-nátrium

nyálkahártya protektív, csökkenti a mucosa károsodását (Whittle és mtsai, 1990). Ennek hatásmechanizmusa még nem tisztázott, a vasodilatation és trombocita aggregáció csökkentésén kívül lehetséges egyéb protektív, pl. epithelsejt funkciót befolyásoló hatás is.

A nyálkahártya mikrocirkuláció szabályozásában feltételezik az NO és más vazoaktív mediátorok, vasodilatator szenzoros neuropeptidek (kalcitonin gén-rokon peptid, CGRP) egymásra hatását. Masszív kapszaicin hatás kiüríti a neuropeptideket a szenzoros neuronokból és ez nagymértékben megnöveli az L-NAME, vagy L-NMMA által előidézett mucosa véráramlás csökkenést (Tepperman és Whittle, 1992). Továbbá kimutatták, hogy a szenzoros idegsejtek ingerlésére (gyomor lumenébe cseppentett kapszaicinnel) létrejövő nyálkahártya véráramlásnövekedés (ld. Szolcsányi és Barthó, 1981) L-NAME adásával gátolható (Whittle és mtsai, 1992), tehát a kapszaicin által felszabadított anyagok értágító hatása - legalábbis részben - NO-dependens. A jelenség kórélettani jelentősége abban áll, hogy a nyálkahártya szövetébe visszadiffundáló sav ingerli a szenzoros idegeket. A felszabaduló szenzoros neuropeptidek (és esetleg más vazoaktív anyagok) és az NO kölcsönhatása a mucosában vasodilatatiohoz vezet (Holzer és mtsai, 1991).

### Az NO szerepe a NANC neurotranszmisszióban

1972-ben Gillespie és McGrath nem-purinerg, nem-peptiderg NANC neurotranszmittert írtak le patkány anococcygeus izomban. A transzmittert nem tudták azonosítani, a válaszként kapott simaizomrelaxációt cGMP közvetítette; oxihemoglobin gátolta a NANC ideg ingerlés hatását. Az EDRF megismerése után, kémiai tulajdonságaik és hatásuk hasonlósága alapján felmerült az EDRF-NO és az ismeretlen NANC neurotranszmitter azonossága. Később Li és Rand (1989a) bizonyította az NO részvételét a válaszban.

Az NO NANC neurotranszmitter szerepének fő bizonyítékai:

- A bélrendszer idegelemeiben, a plexus myentericus idegsejtjeiben NO-szintáz jelenlétét mutatták ki immunhisztokémiai módszerrel (Bredt és mtsai, 1990; Schmidt és mtsai, 1992).
- NANC ideg ingerléskor NO-felszabadulását mutatták ki szuperfúziós kísérletekben (Bult és mtsai, 1990).
- Exogén NO, ill. NO-donorok utánozzák a NANC ingerlés- okozta relaxációt és hiperpolarizációt gastrointestinalis preparátumokban (Boeckxstaens és mtsai, 1991).
- Farmakológiai kísérletekben az NO szintézisét csökkentő NO-szintáz gátlók, ill. az NO-t inaktiváló oxihemoglobin gátolják az elektromos NANC ingerlés- okozta relaxációt számos



faj különböző gastrointestinalis szerveiben (Burleigh, 1992) (ld. még Whittle, 1994; Rand és Li, 1995).

### NO-kiváltotta hiperpolarizáció

A kívülről beadott NO által okozott membrán hiperpolarizáció nagy mértékben hasonlít a NANC ideg ingerlés hatására létrejövő IJP-hez (inhibitoros junkciós potenciál) (Stark és mtsai, 1993). Még nem ismert teljesen, hogy a kiváltott hiperpolarizáció az NO membráncsatornákra kifejtett direkt hatása révén, vagy NO indukált cGMP szint növekedés révén jön-e létre. Metilénkék, ami csökkenti az NO hatását a guanilát cikláz gátlásán keresztül, csökkenti a NANC gátló junkciós potenciált kutya vékonybél körkörös izmán (Christinck és mtsai, 1991). Valószínű tehát, hogy a cGMP szint emelkedésének fontos szerepe van az NO okozta hiperpolarizációban. "Patch clamp" módszerrel végzett vizsgálatok szerint a NANC ingerlés és az exogén NO által okozott hiperpolarizáció kalcium-aktivált káliumcsatornák működésének befolyásolásán keresztül jön létre (Thornbury és mtsai, 1991).

Emberi jejunum körkörös izmán NANC ingerléskor szintén kétféle komponensét különböztették meg az IJP-nek (Stark és mtsai, 1993). NO-szintézisgátlók csökkentik a későbbi, lassúbb, kisebb amplitúdójú hiperpolarizációt, de nem befolyásolják a kezdeti gyors, nagyobb amplitúdójú hiperpolarizációt. Az eredmények szerint tehát valószínű, hogy a későbbi, lassúbb, apamin-rezisztens komponens az NO mediálja, a kezdeti, gyors apamin-érzékeny hiperpolarizációt pedig valamely más NANC transzmitter váltja ki (esetleg ATP - Crist és mtsai, 1992). Ezzel szemben kutya jejunumán csak gyors hiperpolarizációt mutattak ki, amit NO szintézis gátlók csökkentettek (Stark és mtsai, 1993).

### Az NO lehetséges interakciói a NANC gátlásban

A legelfogadottabb elképzelés szerint az NO végső gátló NANC idegsejtből (enterális motoneuron) szabadul fel és okoz simaizom relaxációt.

Számos más lehetséges mechanizmust is leírtak az NO szerepére vonatkozóan a NANC gátlásban; pl. lehetséges, hogy más gátló NANC neuronok (VIP, ATP) végső közös mediátora az NO, vagy más NANC neuronok nem-idegi sejtekből szabadítanak föl NO-t, ill. esetleg magában a cél-izomsejtben serkentik NANC transzmitterek az NO képződését. Számos preparátumon a gátló junkciós potenciált és a NANC relaxációt mind az NO, mind a VIP gátlószereivel csökkenteni lehet. Több adat szól az NO és a VIP interakciója mellett ezekben a válaszokban: leírták, hogy a VIP a simaizomzatból NO-t képes felszabadítani

(Grider és mtsai, 1992); az NO valószínűleg befolyásolhatja a VIP felszabadulását (Grider és Jin, 1993), továbbá lehetséges NO-VIP interakciót mutattak ki a perisztaltikus reflexben is (Grider, 1993; Murthy és mtsai, 1996). Ezek az adatok főleg egy (korábban a VIP elsődleges szerepét hangsúlyozó) munkacsoporttól származnak, és még megerősítésre várnak. Az is felmerült, hogy a disszociált simaizomsejtekben a preparálás során indukálódik a NOS, és a VIP erre hatva okoz NO felszabadulást (Lefebvre, 1999)

Az NO és a tachykininerg rendszer kapcsolatára utalnak azok az eredmények, melyek szerint az endogén NO prejunctionálisan gátolja a P-anyag felszabadulását téringlerlés alkalmazásakor (Gustafsson és mtsai, 1990), hasonlóan az acetilkolin felszabadulásához (Hebeiss és Kilbinger, 1996).

Ugyanakkor az exogén NO hatására létrejövő utókontrakciót részben peptiderg transzmitter közvetíti, mivel az utókontrakció atropin-rezisztens része P-anyag antagonistával gátolható (tehát az NO valószínűleg acetilkolint és tachykinint felszabadító neuronokat képes aktiválni) (Barthó és Lefebvre, 1994). Ezt a kettős hatást a nem-stimulált és stimulált acetilkolin felszabadulásra neurokémiai módszerekkel is igazolták (Hebeiss és Kilbinger, 1996).

### Az NO-felszabadulás modulációja és az NO szerepe a neuromodulátorok hatásában

Kimutatták, hogy enkefalin és dinorfin található gastrointestinalis idegi plexusokban, a plexus myentericus pedig gazdag  $\mu$ -receptorokban. Ismert, hogy az endogén opioidok transzmitterek felszabadulását preszinaptikusan képesek gátolni, pl. acetilkolin és P-anyag esetében (ld. Vizi, 1979; Barthó és Holzer, 1985).

Kutya pylorus záróizmán metionin-enkefalin és enkefalin gátolja az inhibitoros junkciós potenciált, e hatást L-NAME előkezelés kivédi (Bayguinov és Sanders, 1993). Valószínű tehát, hogy az opioidok a "nitreger" transzmissziót regulálhatják. Rövid stimulus nem okoz akkora opioid felszabadulást, hogy effektíven regulálja a junkciós potenciált. Nagyobb frekvenciájú, vagy hosszabb idejű ingerlés szükséges, hogy elegendő koncentrációjú endogén opioid szabaduljon föl effektív moduláló hatáshoz. Így kérdéses, hogy van-e fiziológiai szerepe az endogén opioidoknak az NO közvetített hatások modulálásában.

Kimutatták, hogy az NO felszabadulása  $\alpha_2$ -adrenerg, ill. muszkarin receptorok közvetítésével adrenerg, ill. kolinerg prejunctionális gátló moduláció alatt is áll (Lefebvre és

Smits, 1992; Boeckxstaens és mtsai, 1993; Li és Rand, 1989b).

### Az NO szerepe a gastrointestinalis motilitásban

A különféle gastrointestinalis simaizmokban az egyik leginkább bizonyított NANC gátló transzmitter az NO (Bult és mtsai, 1990; Stark és Szurszewski, 1992). Így a gyomor-bélrendszerben számos motoros funkcióban lehet az NO-nak szerepe. Az NO neurotranszmitterként szerepet játszik záróizmok nyitásában (Rattan és Chakder, 1992), a perisztaltikus reflexben a leszálló gátlásban (Hata és mtsai, 1990), továbbá a gyomor adaptív és vagus ingerlést követő relaxációjában (Desai és mtsai, 1991; Meulemans és mtsai, 1993). "A hatás azonossága" és "az antagonizálás azonossága" kritériumok alapján az NO neurotranszmitter-szerepére bizonyítékok vannak nyelőcsőben (Dent és mtsai, 1979; Yamato és mtsai, 1992a), beleértve a humán nyelvcső alsó záróizmat (ld. Whittle, 1994). A gyomorban az idegingerléssel (téringelés vagy vagus-izgatás) kiváltott NANC elernyedést, ill. a "receptív relaxációt" az NO önmagában vagy VIP-pel együtt közvetíti; szerepe lehet az acetilkolin-felszabadulás modulálásában is (Li és Rand, 1990; Boeckxstaens és mtsai, 1991; Desai és mtsai, 1991; Allescher és mtsai, 1992; Lefebvre, 1995). A vékony-és vastagbélben elektromos ingerlés hatására létrejött NANC relaxációban és a gátló funkciós potenciál kialakításában, valamint a spontán tónus szabályozásában szerepet tulajdonítanak az NO-nak számos fajban (ld. Burleigh, 1992; Whittle, 1994). Az NO valószínűleg részt vesz a belső analis sphincter elernyedésében és a recto-analis gátló reflexben (Rattan és Chakder, 1992). Valószínű az NO moduláló (gátló) szerepe az epehólyag, ill. Oddi-sphincter motilitásában is (ld. többek közt Mourelle és mtsai, 1993).

### Az NO okozta kontraktilis válasz

NO mediált kontraktilis válaszokat is leírtak:

Tengerimalac ileum hosszanti izom plexus myentericus preparátumon az NO-okozta relaxációt utókontrakció követi. Utóbbit az idegvezetés gátló tetrodotoxin blokkolja, atropin csökkenti, az atropin-rezisztens részét P-anyag antagonistá gátolja (Barthó és Lefebvre, 1994). Valószínű tehát, hogy az NO kolinerg, ill. peptiderg (tachykinint felszabadító) neuronokat képes aktiválni. Olgart és mtsai (1997) szerint cGMP-mediált.

NANC idegek ingerlését gyakran követi kikapcsoláskor ún. "off" kontrakció, amit NO-szintáz gátlókkal befolyásolni lehet. L-NAME gátolja a téringelést követő "off"

kontrakciót oposszum nyelőcső körkörös izom preparátumon (Yamato és mtsai, 1992b).  
 Macska izolált distalis vastagbelén szintén csökkentik az "off" kontrakciót L-arginin  
 analógok.

NO okozta primer kontrakció:

Patkány ileum hosszanti izom plexus myentericus preparátumon atropin jelenlétében  
 téringerlés elsődleges összehúzódást okoz, amit relaxáció követ és esetenként utókontrakció.  
 NO-szintáz inhibitorokkal a primer kontrakció gátolható, L-argininnel felfüggeszthető a  
 gátlás (D-arginin hatástalan), ami valószínűsíti az NO szerepét a kontrakcióban (Barthó és  
 mtsai, 1992b). Továbbá oposszum nyelőcső izomzatán is kimutattak elsődleges NO-mediált  
 kontrakciót (Saha és mtsai, 1993). Oposszum nyelőcsövön az NO, ill. nátrium-nitroprusszid  
 okozta primer kontrakció valószínűleg guanilát cikláz aktiváláson keresztül hat, mivel  
 metilénkével gátolható a hatás, ill. a cGMP analóg 8-bromo-cGMP szintén kontrakciót  
 okoz. Patkány ileumon viszont a cGMP analóg relaxál és metilénké sem gátolja a  
 kontraktilis választ, apamin viszont igen. Így felvetődik, hogy a válaszban a kis-  
 konduktanciájú  $K^+$  csatornák záródása szerepet játszhat (Lefebvre és Barthó, 1997).

### Terápiás lehetőségek

Felmerül több olyan kóros folyamatban a gyógyszeres beavatkozás lehetősége,  
 melyben a túlzott mértékben termelődő NO, vagy az NO képződés zavara patogenetikus  
 faktor; tehát szóba jöhet egyrészt NO-szintáz gátlók, másrészt NO, vagy NO-donorok  
 alkalmazása. (Lehet, hogy normális NO szintézis mellett is terápiásan alkalmazható az NO  
 (pl. nitro-vasodilatátorok).)

A gastrointestinalis rendszerben az NO fontos a véráramlás szabályozásában, a  
 mucosa integritás védelmében, ugyanakkor túlzott, szabályozatlan NO felszabadulás  
 citotoxikus, ulcerogén hatású. (Lehetséges, hogy lokális toxinok, pl. Helicobacter pylori  
 toxinja indukálják a NOS-t. Ennek eredményeképpen a túlzott mértékben termelődő NO  
 citotoxikus hatása szerepet játszhat a peptikus fekély kialakulásában.) A bélmotilitás  
 rendellenességeiben, gastrointestinalis mikrocirkulációs zavarokban, ischaemiában esetleg  
 védelmet jelentene szövetszelektív NO-donorok alkalmazása. Próbálkoznak nem-szteroid  
 gyulladásgátló-NO-donor komplex terápiás felhasználásával. Az erről a gyomorban, ill. felső  
 vékonybélben lehasadó kis mennyiségű NO nyálkahártya-védő hatást fejtene ki. Csökkent  
 NO képződés esetében, záróizmok elernyedési nehézségeiben (pl. infantilis pylorus stenosis,  
 achalasia), szintén szóba jöhet NO-donorok használata. A túlzott mértékű NO felszabadulást

pedig (pl. gyulladásoos bélbetegségekben, colitis ulcerosaban, fulminans colitisben) az indukálható NOS szelektív gátlásával lehetne csökkenteni, anélkül, hogy beavatkoznánk a bélmozgások és a bél-véráramlás fiziológias "nitreg" szabályozásába (ld. Whittle, 1994).

### **III. Adenozin-trifoszfát (ATP)**

Az ATP jól ismert, energetikai folyamatokban játszott intracelluláris szerepe mellett a sejtek közötti kommunikációban közreműködve extracelluláris funkciókkal is bír. Már a 20-as években Szent-Györgyi Albert, később mások is foglalkoztak az adenin nukleotidok szív-érrendszeri hatásaival. Majd Holton és Holton (1954) mutatták ki, hogy az ATP szenzoros idegekből is felszabadulhat, így felmerült az ATP idegi transzmitter szerepe is.

A 70-es évekből, Burnstock-tól származik az ún. purinerg hipotézis, mely szerint az addig azonosítatlan, nem-adrenerg, nem-kolinerg idegek transzmitter anyaga az ezen idegekből felszabaduló ATP, vagy közeli rokon nukleotid (Burnstock, 1972). Azóta számos bizonyító erejű eredmény gyűlt össze arra vonatkozóan, hogy az ATP neuromuscularis transzmitterként funkcionál az autonóm idegrendszerben: kimutatták szenzoros, enterális, szimpatikus és paraszimpatikus neuronokban az ATP jelenlétét, ill. ATP felszabadulását ezen sejtekből. Az ATP neurotranszmitterként, ko-transzmitterként és neuromodulátorként is szerepet játszik az idegek működésében (ld. Burnstock, 1990, 1997; Hoyle, 1992).

#### **Az ATP tárolása, lebomlása**

Az ATP ubikviter molekula, minden neuronban is megtalálható. Vesiculakban tárolják azok az idegsejtek, melyek transzmitterként használják. A vesicularis tárolás kimutatására, ill. az ATP lokalizáció meghatározására az uranaffin-reakciót használják, melynek során a kétértékű kation uránium-dioxid komplexet képez a nukleotidok foszfát-csoportjaival, és a komplex elektrondenz precipitátumot képez. Így kimutatták a purin nukleotidokat a vas deferens szimpatikus idegvégződéseiben, a mellékvesevelő szekretoros granuláiban, vagy tengerimalac ileumon a myentericus és submucosus plexus kis vesiculaiban is (Wilson és mtsai, 1979).

A felszabadult ATP enzimatis hidrolízis során nagyon gyorsan lebomlik. Inaktiválásában extracelluláris enzimek, az adenozin-trifoszfátáz (ekto-ATP-áz), ekto-ADP-

az és 5'-nukleotidáz vesz részt, a lebomlás során ADP, AMP és adenzin keletkezik (azonban a keletkező molekulák  $P_2$ , ill. főként  $P_1$ -es purinoceptorok (ld. később) közvetítésével további hatásokat okozhatnak). A felszabadult ATP végeredményben kb. 100 ms-on belül inaktiválódik (Bao, 1993).

### Purinoceptorok

1978-ban Burnstock a purin nukleotidok különböző szöveteken okozott hatásai, ill. az ATP, ADP, AMP és adenzin relatív hatásossága, ill. antagonizálhatóságuk különbözősége alapján  $P_1$  és  $P_2$  típusú purinoceptorokat különböztetett meg.

#### $P_1$ purinoceptorok:

$P_1$  purinoceptorokra jellemző, hogy az agonisták közül leghatásosabb az adenzin, majd az AMP, sokkal kevésbé az ADP és az ATP. Metilxantin származékokkal, pl. teofilinnel, koffeinnel antagonizálhatók és általában az adenilát cikláz enzimrendszer működését befolyásolják, G-proteinek közreműködésével. Később további receptor altípusokat különítettek el a  $P_1$  purinoceptorokon belül ( $A_1$ ,  $A_2$  és  $A_3$ -receptorok). Az  $A_1$ -receptorokon hatásosabbak az  $N^6$ -adenzin-analógok és az adenilát cikláz aktivitását gátolják (továbbá a  $K^+$  konduktanciát növelik, a  $Ca^{2+}$ -ét csökkentik, a foszfolipáz-C-t aktiválják, stb. - ld. Fredholm és mtsai, 1994).  $A_2$ -es receptorok az adenilát cikláz aktivitását fokozzák és a receptorokat 5'-analógok aktiválják erősebben (ld. Burnstock, 1990). Az  $A_2$ -es receptorokat további  $A_{2a}$  és  $A_{2b}$  altípusra osztották. Az  $A_3$  receptorokkal ellentétben a másik két receptor metilxantinokkal nem antagonizálható és aktiválásuk nem befolyásolja az adenilát cikláz aktivitását (Riberio és Sebastiao, 1986).

A  $P_1$  purinoceptorokon keresztül az adenzin általában neuromodulátorként hatva prejunkcionális gátló hatásokat közvetít (ld. Vizi, 1979), különböző neurotranszmitterek felszabadulását gátolja, de az agyban pozitív moduláló hatásáról is beszámoltak ( $A_{2a}$ -receptorokon hatva).

#### $P_2$ purinoceptorok:

$P_2$  purinoceptorokon az ATP és az ADP sokkal hatásosabb, mint az AMP vagy adenzin. Ezek a receptorok metilxantinokkal nem antagonizálhatók. Számos altípust különítettek el, közülük a legfontosabbak és a bélrendszer működését leginkább befolyásolók a  $P_{2x}$  és a  $P_{2y}$  receptorok. Az ATP analógok relatív hatásossága és az antagonisták hatásai

alapján Burnstock és Kennedy (1985) jellemezték először e két típust. A  $P_{2x}$  purinoceptoron leghatásosabb az  $\alpha,\beta$ -metilén ATP, majd a  $\beta,\gamma$ -metilén ATP, végül az ATP és 2-metiltio ATP. Hosszabb idejű  $\alpha,\beta$ -metilén ATP alkalmazása szelektíven deszenzibilizálja a  $P_{2x}$  receptort (a  $P_{2y}$ -t ellenben nem). A  $P_{2y}$  receptort legerősebben a 2-metiltio ATP és az ATP aktiválja, sokkal kevésbé hatásos az  $\alpha,\beta$ -metilén ATP és a  $\beta,\gamma$ -metilén ATP. Az antrakinon szulfonsav származék reactive-blue-2 szelektíven gátolja a  $P_{2y}$  receptort egy szűk koncentráció-tartományban, azonban pl. a hólyagban  $P_{2x}$  hatásokat is gátol. A  $P_2$  purinoceptor antagonistá suramin, vagy a piridoxál-foszfát-6-azofenil-2',4'-diszulfonsav (PPADS) szintén nem szelektív a  $P_{2x}$  vagy  $P_{2y}$  receptorokra (ld. Fredholm és mtsai, 1994).

A  $P_{2y}$  receptorok izgatása G-proteinekhez kapcsolódó szekunder jelátvivő rendszerek aktiválását okozza, a  $P_{2x}$  receptorok ionotróp típusú receptorok,  $Na^+$ ,  $K^+$  és  $Ca^{2+}$  csatornák permeabilitását fokozzák.

Wiklund és Gustafsson (1988) leírták, hogy tengerimalac ileumon az  $\alpha,\beta$ -metilén ATP és a 2-metiltio ATP kontraktilis hatása nem gátolható sem reactive-blue-2-vel, sem  $\alpha,\beta$ -metilén ATP-deszenzibilizációval, továbbá a két agonista hatáserőssége hasonló. Ezen eredmények alapján a szerzők felvetették, hogy egy új típusú (sem  $P_{2x}$ , sem  $P_{2y}$ ) purinoceptor közvetíti a válaszokat az ileumon, amit  $P_{2s}$  purinoceptoroknak neveztek el. Patkány fark artériában adenzin, ATP és még számos ATP-analóg egyformán gátolják a noradrenalin felszabadulását a szimpatikus idegekből és e hatások metilxantin-származékokkal gátolhatók. Ezt a hatást közvetítő receptor típust  $P_3$  purinoceptoroknak nevezték el (Shinozuka és mtsai, 1988).

### Az ATP hatásai

Az ATP kontraktilis válaszokat mediál vas deferens, hólyag és számos érkészítményen  $P_{2x}$  receptorok közvetítésével (Fedan és mtsai, 1981; Kasakov és Burnstock, 1983).  $P_{2y}$  receptorok jellegzetesen relaxációs válaszokat közvetítenek pl. tengerimalac taenia caecin és ereken (Kennedy és Burnstock, 1985a).

Az ATP az ereken kettős hatással rendelkezik, direkt módon ( $P_{2x}$  receptorokon keresztül) vasoconstrictio okoz, indirekten pedig ( $P_{2y}$  receptorokon hatva) az endothelből NO-felszabadítás útján vasodilatator hatású. Továbbá az ATP bomlása során keletkező adenzin ugyancsak erős vasodilatatiót okoz a simaizomzaton hatva (Kennedy és Burnstock, 1985b).

### Az ATP neurotranszmitter szerepe

Idegingerléskor  $\text{Ca}^{2+}$ -dependens ATP-felszabadulást mutattak ki számos szövetféleségben. Specifikus, kompetitív purinoceptor antagonisták szükségeltetnének azonban a purinerg hipotézis egyértelmű bizonyításához. Az apamin (bizonyos  $\text{K}^+$ -csatornák gátlószere) a vastagbél taenián gátolja a NANC ideg ingerlés és az ATP relaxációs hatását is. Az apamin-érzékeny  $\text{K}^+$  csatornákat azonban más gátló neurotranszmitterek is "használhatják". ATP-deszenzibilizáció, a  $\text{P}_2$  purinoceptor antagonistaként is ható suramin, ill. az új, viszonylag specifikus purinoceptor antagonista a PPADS (Lambrecht és mtsai, 1992) segítségével további eredmények születtek, melyek támogatják az ATP neurotranszmitter szerepét vas deferens, hólyag és gastrointestinalis preparátumokon (Kasakov és Burnstock, 1983; Meldrum és Burnstock, 1983; Lambrecht és mtsai, 1992; Zagorodnyuk és mtsai, 1996). A kapszaicin-érzékeny afferensekből felszabaduló ATP részt vehet a plexus myentericus idegeinek aktiválásában (Barthó és mtsai, 1999a).

Az ATP neuromuscularis transzmitterként izgató és gátló hatásokat is mediál: részt vehet az erek simaizmainak NANC összehúzódásában, ill. elernyedésében, a húgyhólyag és a vas deferens izomzatának kontrakciójában, a coecum taenia relaxációjában. A bélrendszerben általában a gyors, apamin-érzékeny gátló junkciós potenciálokat mediálja (ld. Barthó és mtsai, 1999a), ill. elernyedést okoz.

Az ATP a noradrenalin, acetilkolin és neuropeptidokkal ko-transzmitterként is szerepet játszik a neurotransmisszióban, ill. neuromodulátorként is részt vesz az idegműködések szabályozásában (ld. Burnstock, 1990, 1997).

## IV. Vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP)

A 70-es évek elején Said és Mutt azonosított és izolált sertés bélből egy 28 aminosavat tartalmazó, vasodilatator hatású peptidet, melyet vazoaktív intestinalis polipeptidnek (VIP) neveztek el (Said és Mutt, 1970a, 1970b). Később kimutatták, hogy a VIP a szekretin-glukagon-peptidcsaládhoz tartozik (Said és Mutt, 1972), a család további tagjai: gastric inhibitory polypeptide (GIP), PHI, growth hormone-releasing factor (GRF), pituitaer adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) és a helospektinek, heloderminek. Kezdetben feltételezték, hogy a VIP új bél-hormon. Később jelenlétét immunhisztokémiai



vizsgálattal kimutatták a bél neuronjaiban (és az agyban is). Kiderült, hogy emlősökben a bél endokrin sejtjei nem tartalmaznak VIP-et (alacsonyabb rendűeknél lehetséges). Ellenben emlősökben a VIP jelen van számos neuronban a bélrendszerben és más szövetekben (agy, gerincvelő és az urogenitalis traktus idegsejtjeiben is) (ld. Said, 1982; Murthy és mtsai, 1996; Lundberg, 1996).

### A VIP szintézise és lebomlása

A VIP egy 170 aminosav tartalmú prekursor-peptidből (prepro-VIP) képződik (Itoh és mtsai, 1983). A képződött 28 aminosav hosszúságú peptid axonális transzporttal jut az idegvégződésekhöz és nagy, "densecore" vesiculákban tárolódik (Johansson és Lundberg, 1981) és (Lundberg és mtsai, 1981). Idegingerlés hatására létrejövő VIP felszabadulás frekvencia függő, a maximumot magasabb (10 Hz körüli) frekvenciáknál éri el (Fahrenkrug és mtsai, 1978).

A VIP felezési ideje viszonylag hosszú, a plazmában kb. 1 perc (Domschke és mtsai, 1978). A hatás megszűnéséért elsősorban enzimatikus lebomlás felelős, kimutatták, hogy neutrális endopeptidáz (NEP 24.11), enkefalináz és endopeptidáz enzimek is képesek hidrolizálni a VIP-et (Goetzl és mtsai, 1989; Jeohn és Takahashi, 1995).

### VIP (VIP/PACAP) receptorok

A VIP sejt felszíni receptorokhoz kötődve fejti ki hatásait a célsejteken. A peptidnek mind a C-, mind az N-terminálisa rendelkezik biológiai aktivitással, de a teljes hatáshoz az egész molekula szükséges (Bodanszki és mtsai, 1973). A VIP-hez hasonló rokon peptid, a PACAP szintén aktiválja a VIP receptorokat, és szelektív, hatásos receptor antagonisták hiányában a VIP receptorok klasszifikációja a VIP, ill. a két természetes PACAP (PACAP(1-38) és PACAP(1-27)) molekula relatív hatásosságán alapul.

Három nagy affinitású VIP/PACAP receptort klónoztak és izoláltak, ezen alapul a legújabb receptor klasszifikáció (Harmar és mtsai, 1998). E szerint megkülönböztetnek VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub> és PAC<sub>1</sub> típusú receptorokat. A VPAC<sub>1</sub> receptor (a korábbi II. PACAP/VIP, ill. VIP<sub>1</sub> receptor) hasonló affinitással köti a VIP-et, a PACAP(1-38)-at és a PACAP(1-27)-et, alacsony affinitással a GRF-et és a szekretint. A receptor izgatása az adenilát cikláz-rendszert aktiválja. Megtalálható a központi idegrendszerben az agykéregben és a hippocampusban, ill. a periférián a májban, a tüdőben és a bélrendszerben (ld. Harmar és mtsai, 1998).

A VPAC<sub>2</sub> receptor szintén hasonló affinitású a VIP-hez és PACAP-hoz is (korábbi VIP<sub>2</sub> receptor). Kis mértékben ugyancsak köti a GRF-et és a szekretint is. A központi idegrendszeren kívül (thalamus, hippocampus, gerincvelő) kimutatták a pancreasban, a szívben, vesében, herékben és a gasztrointesztinumban is (Usdin és mtsai, 1994; Adamou és mtsai, 1995).

1993-ban klónozták a legújabb nómenklatúra szerinti harmadik VIP/PACAP receptort (korábbi I. PACAP receptor), amit PAC<sub>1</sub> receptornak neveztek el. A PAC<sub>1</sub> receptor jóval nagyobb affinitással köti a PACAP(1-38)-at és PACAP(1-27)-et, mint a VIP-et, és mRNS-e főként a központi idegrendszerben expresszálódik. (A korábbi I. típusú PACAP receptoron belül további két altípust különítettek el: a PACAP-A receptorok adenilát ciklázt aktiválnak és nagyobb affinitással kötődik hozzájuk a PACAP(1-27), mint a PACAP(1-38), a PACAP-B receptorok foszfolipáz C-t aktiválnak, és fordítva, a hosszabb PACAP formát (1-38) kötik jobban, mint a PACAP(1-27)-et (ld. Shuttleworth és Keef, 1995).) Ugyanakkor számos gastrointestinalis szövetben lévő PACAP receptor nem illik be ebbe az osztályozásba. A PACAP-okozta simaizom relaxáció apaminnal gátolható (Schwörer és mtsai, 1992; Jin és mtsai, 1994), így felvetődik, hogy a PACAP receptor apamin-érzékeny K<sup>+</sup> csatornákkal van kapcsolatban.

### A VIP hatásmechanizmusa

A gastrointestinalis simaizomokban VIP (és egyes peptidek) aktiválják az adenilát ciklázt és növelik a cAMP szintet (Lefebvre, 1993). Számos enterális gátló ideg ingerlése szintén cAMP szint emelkedést okoz (Ito és mtsai, 1990), így felmerül a VIP szerepe gátló transzmitterként a bélben. A cAMP szint növekedése a sejtekben cAMP-függő protein kinázokat aktivál, mely további lépéseken keresztül simaizom relaxációhoz vezet. A cAMP szint növelése mellett a VIP a cGMP szintet is megemeli a simaizomsejtekben. Egyesek szerint a VIP-okozta cGMP növekedés NO-szintáz gátlókkal kivédhető, így felmerül, hogy a VIP a simaizomban stimulálja az NO szintézisét (Grider és mtsai, 1992; ld. Murthy és mtsai, 1996). Továbbá leírták, hogy a VIP-okozta relaxáció gátolható az L-arginin-NO-út blokkolásával (Li és Rand, 1990; Grider, 1993). Mások szerint azonban a VIP-okozta elemnyedés nem csökkenthető NO-szintézis gátlókkal és a VIP nem indukál NO szintézist (Keef és mtsai, 1994; Desai és mtsai, 1994).

## VIP mint neurotranszmitter

A gyomor-bélrendszer külső beidegzésében valószínűleg a VIP is szerepet játszik. Ismert, hogy a paraszimpatikus idegvégződésekben a VIP az acetilkolin mellett ko-transzmitterként szerepel. Nyálmirigyek, pancreas vagy a különböző bélszakaszokat ellátó extrinszik idegek elektromos ingerlése VIP felszabadulást okoz (párhuzamosan vasodilatatio és szekréció-növekedés a válasz). Azonban hexamethonium gátolja a felszabadulást, ami kolinerg (nikotin receptorok) mechanizmusra utal, vagyis hogy az acetilkolin VIP-et szabadít fel intrinszik idegekből (Bloom és Edwards, 1980).

Az enterális idegrendszerben a VIP főként gátló NANC transzmitterként működik. Számos gastrointestinalis preparátumban VIP felszabadulást mutattak ki elektromos téringerlés, nikotin alkalmazás vagy reflexek kiváltása során (Lefebvre, 1993; D'Amato és mtsai, 1992).

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal VIP jelenlétét detektálták enterális neuronokban, az exogén VIP pedig elernyeszti a legtöbb gastrointestinalis preparátumot. Azonban hatásos és szelektív receptor antagonistá hiányában nehézkes a VIP szerepeinek tisztázása a különböző mozgásválaszokban. Specifikus antiszérummal (a VIP immunológiai neutralizációjával), vagy a peptidáz-hatású  $\alpha$ -kimotripszin alkalmazásával bizonyos fókig valószínűvé tették a VIP részvételét a gátló neurotranszmisszióban a gyomorban, a vékony- és vastagbélben (Grider és Makhlouf, 1988; Furness és mtsai, 1992b; Fahrenkrug, 1993). A VIP(10-28)-fragmentum egyesek szerint antagonistá aktivitást mutat, tengerimalac taenián csökkenti az ideg ingerlés- okozta elernyedést (Grider és Rivier, 1990).

A téringerlés- okozta gátló junkciós potenciál (IJP) az enterális simaizmokban általában két komponensű, az első apamin-érzékeny a második apamin-rezisztens. A VIP- okozta relaxáció és hiperpolarizáció nem gátlható apaminnal, tehát valószínűleg a VIP nem játszik szerepet a gyors, apamin-érzékeny IJP-komponens mediálásában. Az apamin-rezisztens IJP létrejöttében bizonyos preparátumokon az NO szerepe a legfontosabb (Stark és mtsai, 1993). Más elképzelés szerint a VIP indirekt módon hatva felelős a lassúbb, apamin-érzéketlen IJP-ért, a simaizomsejtekből NO-t szabadít fel (Grider és mtsai, 1992).

A legfontosabb bizonyítékok a VIP gátló neurotranszmitter szerepével kapcsolatban a bélben, hogy enterális neuronokban jelen van a VIP, ideg ingerléskor felszabadul a neuronokból, ill. különböző gátlószerekkel csökkenthető az ideg ingerlés- okozta relaxáció. Ez utóbbi kérdés azonban még nem tekinthető eldöntöttnek (ld. később).

## A VIP hatásai

A VIP fokozza a pancreas és a bél exokrin szekrécióját (Fahrenkrug, 1993).

Valószínű, hogy a VIP a hasnyálmirigyben neurotranszmitterként hat: pancreas exokrin sejteken VIP receptorok találhatók, exogén VIP fokozza a pancreas exokrin működését, ill. kimutatták, hogy vagus-ingerléskor VIP szabadul fel a pancreasból. A VIP bélszekréciót fokozó hatását valószínűleg direkt módon fejtik ki a bélhámsejtekre, bennük stimulálva az adenilát cikláz, de lehetséges a válaszban indirekt komponens is (atropin részlegesen csökkenti a VIP hatását) (Mailman, 1978). A bél véráramlás szabályozásában szintén szerepe lehet a VIP-nek: a mucosa mechanikai ingerlése fokozza a bél véráramlását - a válasz indirekt és szerotoninnak van benne szerepe -, ugyanakkor a mucosa ingerlésekor bekövetkező vasodilatatio és az ezzel párhuzamos VIP-felszabadulás tetrodotoxinnal gátolható (Eklund és mtsai, 1980).

## VIP szerepe a bélmotilitásban

A VIP gátló neurotranszmitterként a legtöbb simaizom-preparátumot relaxálja. Kimutatták izolált simaizomsejteken is, hogy a VIP direkt módon ernyeszti el a tengerimalac fundus és kutya antrum sejteket (Bitar és Makhlof, 1982). Specifikus VIP antiszérum segítségével bizonyították, hogy a VIP felelős a vagus-reflex-okozta gyomor relaxációért (Grider és mtsai, 1985a), a VIP mediálja az elernyedést oposszum és nyúl alsó nyelőcső záróizmon (Biancini és mtsai, 1984a; Goyal és mtsai, 1980), tengerimalac coecum taenián és belső anális záróizomzaton (Biancini és mtsai, 1984b). Továbbá a myentericus VIP neuronok anális irányú projekciója támogatja a VIP lehetséges szerepét a bélben a leszálló gátlásban.

A VIP a gastrointestinumban általában gátló hatásokat mediál, azonban indirekt módon izgató hatásokat is közvetíthet a simaizmokra. A VIP tengerimalac ileum hosszanti izomzatán neurogén kontrakciót okoz, myentericus neuronokból acetilkolint és P-anyagot szabadítva fel (Williams és North, 1979; Cohen és Landry, 1980; Katsoulis és mtsai, 1992).

## A VIP kórélettani szerepe

VIP-tartalmú idegek hiányát feltételezik impotencia, nyelőcső-achalasia, ill. több olyan kórállapot létrejöttében, ahol a simaizom-relaxáció kóros. Ezért pl. VIP agonisták alkalmazása hatásos lehet impotencia (Gerstenberg és mtsai, 1992), vagy asthma esetében.

Különböző tumorok, VIP-omák extrém VIP termeléssel járhatnak, hasmenést, hipotenziót okozva. VIP antagonisták ilyen esetekben hatásosak lehetnek. Hasonlóan, pl.

vazomotoros rhinitisben VIP antagonisták csökkenthetik a vérbőséget és a nyálkahártya duzzanatot.

## **V. Pituitaer adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)**

Miyata és mtsai 1989-ben izoláltak egy új, 38 aminosavból álló peptidet birka hypothalamusból, melyet adenilát cikláz stimuláló hatása alapján elneveztek pituitaer adenilát cikláz aktiváló polipeptidnek (PACAP). A PACAP új tagja a szekretin/glukagon/VIP-peptidcsaládnak, az N-terminális 28 aminosav 68%-os homológiát mutat a VIP-pel. Később kimutattak egy 27 aminosavból felépülő természetes PACAP változatot - PACAP(1-27) - melynek szerkezete megegyezik a hosszabb molekula-forma a PACAP(1-38) N-terminális 27 aminosavból álló részével (Miyata és mtsai, 1990).

A PACAP molekula egy 176 aminosavat tartalmazó prekursor peptidből képződik. A birka PACAP(1-38) aminosav-sorrendje megegyezik a patkányból és az emberből izolált molekulák aminosav-sorrendjével. Radioimmunoassay (RIA)-módszerrel vizsgálták a PACAP megoszlását a különböző szövetekben. Megállapították, hogy a hypothalamus tartalmazza legnagyobb koncentrációban a PACAP-ot, de megtalálható az agykéregben, a hippocampusban, a herékben, magasabb koncentrációban a mellékvesében és előfordul más perifériás szövetekben is, pl. a bélrendszerben. Gastrointestinalis kivonatokban RIA-val mind a PACAP(1-38), mind a PACAP(1-27) kimutatható (Arimura és mtsai, 1991). A szövetek PACAP(1-27) tartalma jóval kisebbnek bizonyult, mint a PACAP(1-38) tartalma, azonban a PACAP(1-38)/PACAP(1-27) arány a különböző szövetekben más és más (Arimura, 1992). Kettős immunfestéssel a VIP és a PACAP együttes lokalizációját mutatták ki emberben és csirkében (más fajokban azonban, pl. sertésnél, menyétnél nem) (Sundler és mtsai, 1992).

A PACAP-ot a gastrointestinalis rendszer különböző szakaszain számos neuronban kimutatták és egyre több adat támogatja a PACAP neurotransmitter szerepét az enterális idegrendszerben (Arimura, 1992; Sundler és mtsai, 1992; Shuttleworth és Keef, 1995; Katsoulis és Schmidt, 1996).

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutatták a PACAP jelenlétét a nyelőcső, gyomor, a vékony- és a vastagbél izomrétegeiben (a körkörös és hosszanti izom motoneuronokban, ill. myentericus interneuronokban is (Portbury és mtsai, 1995), az azokat ellátó kis artériákban, arteriolákban, a Brunner-mirigyek környezetében, ill. a pancreas

exokrin és endokrin szöveteiben is (ld. Arimura, 1992). Ezen morfológiai adatok alapján valószínűsítik a PACAP reguláló szerepét az emésztőrendszer motilitásában, vérellátásában, szekréciós működésében és a hasnyálmirigy exokrin és endokrin funkcióiban.

Számos PACAP receptort leírtak (a legújabb nomenklatúra szerint VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub> és PAC<sub>1</sub> receptorok), ezek egy része VIP-re is érzékeny (VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub>) (részletesebb leírásukat ld. a VIP-ről szóló fejezetben). Az endogén PACAP hatásainak tanulmányozása tachyphylaxia létrehozásával, specifikus PACAP-antitestek, ill. újabban a PACAP receptor antagonistá PACAP(6-38) peptid-fragmentum alkalmazásával lehetséges.

### A PACAP neurotransmitter-szerepének bizonyítása, ill. lehetséges szerepe a gyomor-bél-motilitásban

A morfológiai vizsgálatokból, melyek szerint a PACAP számos neuronban megtalálható, ill. az exogén PACAP simaizmokat relaxáló hatásából és a molekula nagyfokú hasonlóságából a VIP-hez, felmerült a PACAP szerepe neuromuscularis transzmitterként. Ma már számos eredmény támasztja alá - habár többnyire indirekt módon - ezt a feltételezést: tengerimalac taenia coecin az exogén PACAP és a téringerlés is elernyedést okoz, mindkét hatás apaminnal gátolható, idegingerléskor tetrodotoxin-érzékeny PACAP-felszabadulást mutattak ki (Jin és mtsai, 1994). Az elektromos-téringerlés okozta relaxáció PACAP-tachyphylaxiával, PACAP-antitestekkel, ill. PACAP antagonistával (PACAP(6-38)) gátolható (McConalogue és mtsai, 1995a; Jin és mtsai, 1994; Schwarzhoff és mtsai, 1995). Saját adataink azonban azt mutatják, hogy a PACAP(6-38) a VIP hatását is gátolja ezen a preparátumon (ld. később).

A PACAP általánosan relaxálja a gastrointestinalis simaizmokat (Mungan és mtsai, 1992; Schwörer és mtsai, 1993; Katsoulis és mtsai, 1993a; McConalogue és mtsai, 1995a), ugyanakkor indirekt módon, izgató neuronok aktiválásával kontrakciót is okozhat (Katsoulis és mtsai, 1993b; Rattan és Chakder, 1998; Pang és Kline, 1998).

Patkány gyomorból készített fundus-preparátumokat a PACAP elernyeszti (hasonló mértékben, mint a VIP). Patkány vékonybél-készítményt (ileum-strip) szintén relaxálja a PACAP, kb. 50-szer erősebben, mint a VIP. Ez a hatás nem gátolható apaminnal (Katsoulis és mtsai, 1993a). Sertés vékonybél izomzatán a spontán fázikus izomtevékenységet (fázisos kontrakciók) PACAP gátolja, apaminnal hatása antagonizálható (Schwörer és mtsai, 1991), humán colon-preparátumokon a PACAP szintén gátolja a spontán izommozgásokat és relaxálja is a vastagbelet, és ez a hatás ugyancsak apamin-érzékeny (Schwörer és mtsai,

1993). Tengerimalac taenia coecin szintén direkt relaxációt vált ki a PACAP, mely apaminnal gátolható.

Tengerimalac ileumon a VIP-hez hasonlóan a PACAP(1-38) és PACAP(1-27) is kontrakciót okoz (Katsoulis és mtsai, 1993b) (saját kísérleteinkben az összehúzódást rövid, kb. 20-30 másodpercig tartó relaxációs fázis előzi meg). A kontrakciót tetrodotoxin kivédi, atropin és a P-anyag antagonistá spantide csökkenti. Az atropin-rezisztens összehúzódást spantide, vagy P-anyag tachyphylaxia teljesen kivédi. Hosszanti izom - plexus myentericus preparátumokon a tríciummal jelzett acetilkolin felszabadulását vizsgálva a PACAP (és a VIP is) kétféle hatást okoz: a spontán acetilkolin-felszabadulást stimulálja, az elektromos ingerlés- okozta acetilkolin-release-t viszont gátolja (Katsoulis és mtsai, 1993b). Az ileumon a PACAP- okozta kontrakció kolinerg és peptiderg idegekből acetilkolin, ill. P-anyag felszabadítása révén jön létre, ugyanakkor feltételeznünk kell gátló preszinaptikus PACAP receptorok létét is, melyeken hatva a PACAP az idegingerlés- okozta acetilkolin-release-t gátolja.

## VI. Tachykininek

A tachykininek egy olyan neuropeptid-család tagjai, melyeknek C-terminális aminosav-sorrendje közös; képviselőik emlősökben: P-anyag, neurokinin-A, neurokinin-B, neuropeptid-K és neuropeptid- $\gamma$  (két utóbbi a neurokinin-A hosszabb formái). A legkorábban felfedezett neuropeptid a bélben a P-anyag. 1931-ben írták le, hogy a bélből kivont faktor nyúl jejunumon atropin-rezisztens kontrakciót okoz (von Euler, 1931). Később ezt a faktort P-anyagnak nevezték el. Csaknem 40 év múlva, 1970-ben izolálták (hypothalamus-szövetből), és jellemezték kémiaailag a P-anyagot (Chang és Leeman, 1970), majd nem sokkal később az autentikus anyag jelenlétét a bélrendszerben is kimutatták. Később a többi tachykinin peptidet is izolálták és lokalizálták enterális neuronokban (a neurokinin-B kivételével, melyet főként a központi idegrendszerben mutattak ki és RIA vizsgálatok szerint bélszövetben nem található) (Shuttleworth és Keef, 1995).

### Szintézis, tárolás, inaktiváció

A tachykininek a neuronok sejttestjében szintetizálódnak, majd tároló vesiculakban

raktározódnak és axonális transzport révén jutnak el az idegvégződésekre (ld. Lundberg, 1996). Két gén kódolja a peptidek szintézisét: a prepro-tachykinin I gén kódolja a P-anyag, neurokinin-A, neuropeptid-K és neuropeptid- $\gamma$  szekvenciáját, a prepro-tachykinin II gén pedig a neurokinin-B aminosavsorrendjét.

A tachykininek hatásait specifikus, G-proteinekhez kapcsolódó receptorok, a tachykinin  $NK_1$ ,  $NK_2$  és  $NK_3$  receptorok (ld. később) közvetítésével fejtik ki. A receptorok izgatása még nem pontosan tisztázott módon vezet a simaizmok összehúzódásához.

Valószínűleg ebben legfontosabb a foszfolipáz-C aktiválása, de a feszültségfüggő- $Ca^{2+}$ -csatornák P-anyag-okozta aktiválásáról is beszámoltak (Shuttleworth és Keef, 1995).

A gastrointestinalis szövetekben a tachykininek gyorsan inaktiválódnak (félélet-idejük kevesebb mint 30 s), lebontásukért peptidáz enzimek felelősek. A P-anyag lebontásában valószínűleg fontos szerepet játszik az endopeptidáz 24-11 (enkefalináz) (ld. Maggi, 1995).

### Tachykinin receptorok

A tachykininek biológiai hatásait három receptor típus (tachykinin  $NK_1$ ,  $NK_2$  és  $NK_3$  receptor) közvetíti (Lee és mtsai, 1986; Regoli és mtsai, 1987; Maggi és mtsai, 1987). Mára már klónozták is mindhárom receptor típus fehérjéit kódoló géneket. Ezen receptorok nem specifikusak az egyes endogén tachykinin-peptidekre (mindegyik természetes tachykinin képes teljes mértékben aktiválni mindhárom receptor típust), azonban az egyes peptidek receptorokhoz való affinitásában különbségek vannak: az  $NK_1$  receptorok a P-anyagot preferálják, az  $NK_2$  receptorok a neurokinin-A-t, az  $NK_3$  receptorok pedig a neurokinin-B-t (ld. Lundberg, 1996). Mindhárom receptor típus megtalálható a gastrointestinalis szövetekben, bár megoszlásuk fajonként és intestinalis régióként eltérő.

### A tachykininek lokalizációja

Immunhisztokémiai és radioimmunológiai vizsgálatok szerint a P-anyag túlnyomó része a bélrendszerben idegsejtekben található, és csak jelentéktelen hányadát tartalmazzák a mucosa endokrin sejtjei. P-anyag immunreaktivitást az emésztőrendszer szinte minden rétegében kimutattak, legintenzívebb mértékben a plexus myentericusban, a cirkuláris izomzatban és a plexus submucosusban (Costa és mtsai, 1981; ld. Barthó és Holzer, 1985). P-anyagot tartalmazó idegrostokat ugyancsak kimutattak a submucosa kis artériáit körülvevő paravascularis plexusokban is. A P-anyag immunpozitív idegsejtek szómái többségében a plexus myentericusban és submucosusban található (intrinszik neuronok). Ugyanakkor



extrinszik idegelemek is tartalmaznak P-anyag immunpozitivitást, melyek a vagus, sacralis idegek, vagy mesenterialis idegek közvetítésével érik el a bélrendszert (ld. Costa és mtsai, 1980, 1987; Barthó és Holzer, 1985). A bélbe érkező P-anyag tartalmú extrinszik idegvégződések többnyire myelinhüvely nélküli afferens, kapszaicin-érzékeny rostok, melyeknek szómája a gericvelő hátsógyöki ganglionjaiban található. Azonban ezen érőidegekben a bélrendszer neurális P-anyag tartalmának csak kisebb hányada található (Maggi és mtsai, 1993).

### A tachykininek neurotranszmitter szerepe és hatásai a bélrendszerben

A bélben a fő izgató transzmitter az acetilkolin, azonban a bélrendszer számos szakaszán kimutatható ideg-közvetített membrán-depolarizáció és simaizom összehúzódás mind a körkörös, mind a hosszanti izomzaton a muszkarin receptor blokkoló atropin jelenlétében, főként magasabb frekvenciájú elektromos téringerlés vagy reflex-stimulálás esetében (Furness és Costa, 1987).

Az exogéne farmakonként alkalmazott tachykininek utánozzák a téringerlés mechanikai és elektromos hatásait. Továbbá endogén tachykinineket lokalizáltak az enterális motoneuronokban (Barthó és Holzer, 1985; Costa és mtsai, 1987) és idegingerlés-okozta felszabadulásukat is kimutatták (Furness és Costa, 1980). Ezen eredmények jelentős bizonyítékot jelentenek arra nézve, hogy a tachykininek az acetilkolin mellett fontos izgató transzmitterek az enterális idegrendszerben. Azonban direkt farmakológiai bizonyíték sokáig nem állt rendelkezésre potens és szelektív receptor antagonisták hiánya miatt. Kezdetben a tachykininek hatásainak blokkolására receptor deszenzibilizációt alkalmaztak: magas dózisu (kezdetben nem is vegytiszta) P-anyag szelektíven gátolta az exogén P-anyag hatásait és gátolta a nem-kolinerg ideg-mediált kontrakciókat és izgató potenciálokat, ill. az atropin-rezisztens perisztaltikát (Paton és Zar, 1966; ld. Barthó és Holzer, 1985). Később tachykinin antagonisták, ill. receptor típus szelektív antagonisták segítségével mutatták ki ezen receptorok részvételét a nem-kolinerg izgató válaszokban (Maggi és mtsai, 1993).

Bizonyítékok vannak a tachykininek szerepére a szenzoros idegek működésében is: primer afferens idegek végződéseiből P-anyag és neurokinin-A is felszabadulhat és ezen idegek lokális efferens hatásait közvetíthetik (ld. Barthó és Holzer, 1985; Maggi, 1995). Kimutatták a tachykininek és az acetilkolin ko-lokalizációját izgató motoros neuronokban pl. tengerimalac ileumon és colon taenián (Llewellyn-Smith és mtsai, 1988; Furness és mtsai, 1992a).

A P-anyag a gerincesek gyomor-bélrendszerének számos szegmentumán kontrakciót okoz (Lembeck és Zetler, 1962; Bury és Mashford, 1977; Bertaccini, 1982), ugyanakkor a kontrakció mértéke és mechanizmusa (direkt simaizom-hatás vagy indirekt, ideg-közvetített hatás) szegmentumonként és fajonként eltérő lehet. Számos bizonyíték támasztja alá, hogy a P-anyag izgató transzmitterként működik a myentericus plexusban (Katayama és North, 1978; Katayama és mtsai, 1979; Morita és mtsai, 1980; North, 1982) és a P-anyag kontraktilis hatásait részben kolinerg myentericus neuronok izgatása révén fejt ki (Holzer és Lembeck, 1980). Ugyanakkor sok morfológiai, farmakológiai és elektrofiziológiai adat bizonyítja a P-anyag direkt simaizom-összehúzó hatását is (Burcher és mtsai, 1984; Fujisawa és Ito, 1982; Barthó és Holzer, 1985).

Nyelőcső körkörös és hosszanti izmait, ill a muscularis mucosae-t is összehúzza a P-anyag, egyes fajokban direkt, másokban indirekt módon (ld. Barthó és Holzer, 1985). A gyomor, ill. a pylorus izmokat többnyire simaizmokon lévő receptorokon keresztül kontrahálja, a vékony- és vastagbél régióiban pedig direkt és indirekt összetevői is lehetnek az összehúzódnak.

P-anyag serkenti a vékonybél perisztaltikus működését, valószínűleg e hatás kolinerg neuronok izgatásán keresztül jön létre, mivel atropin gátolja a P-anyag serkentő hatását (Barthó és mtsai, 1982b). A perisztaltikus reflex kiváltásában úgy tűnik endogén tachykinineknek nincs meghatározó szerepük, P-anyag deszenzibilizáció vagy tachykinin antagonisták nem gátolják a perisztaltikát. Ugyanakkor az atropin-rezisztens perisztaltikát (atropin jelenlétében ugyan magasabb intraluminális nyomással, de kiváltható perisztaltikus reflex) P-anyag antagonisták koncentráció-függően és reverzibilisen gátolják vagy megszüntetik (Barthó és Holzer, 1985), bizonyítva, hogy az atropin-rezisztens perisztaltika kiváltásában tachykininek szerepet játszanak (ld. Holzer és mtsai, 1995, 1998).

A bélrendszer motilitásában játszott szerepein túl a tachykinineknek szerepük van a bél véráramlás szabályozásában, a pancreas exokrin működésében, továbbá kimutatták, hogy a P-anyag gátolja a sav-szekréciót és az intestinalis felszívódást is (ld. Dockray, 1987).

## VII. Kísérletes munka

### A jelen munka célkitűzései

Munkánk célja az enterális idegrendszer neurotranszmittereinek azonosítása a különböző gastrointestinalis simaizom-preparátumok mozgásválaszaiban. Munkánk alap kutatás-jellegű, azonban hozzájárulhat hosszú távon bizonyos motilitászavarok gyógyszeres terápiájához, ill. a gyomor-bélrendszer bonyolult mozgásainak pontosabb megértéséhez. A kapszaicin-érzékeny afferens idegek transzmitter-anyagainak tisztázása pedig elősegítheti a nocicepció mechanizmusainak felderítését.

Jelen kísérleteink célja a nem-adrenerg, nem-kolinerg (NANC) gátló transzmitterek (NO, ATP, PACAP) eddig ismeretlen, vagy nem egyértelmű szerepeinek tisztázása, ill. a kapszaicin hatásmechanizmusának tanulmányozása simaizom-készítményeken. Munkánkat négy fő témakör köré csoportosítottuk:

1. Tengerimalac vékonybél körkörös izomzatán előzetes kísérletek alapján állandó, tónusos gátlást mutattunk ki. Megvizsgáltuk, hogy ez összefüggésben van-e a morfin ismert körkörös izom-összehúzó hatásával és az NO-mediált, "nitreger" neurotranszmisszióval. Más kísérletekben pedig tisztázni kívántuk, hogy a kolecisztokinin-oktapeptid (CCK-8) acetilkolin-mediált hatásában (Vizi és mtsai, 1973; Holzer és mtsai, 1980) részt vesz-e valamilyen módon az NO.
2. Megkíséreltük azonosítani tengerimalac coecum taenián a NANC-idegingerléskor fölszabaduló, simaizom-relaxációt kiváltó gátló transzmittereket. Vizsgáltuk új P2 purinoceptor antagonist (PPADS), ill. az NO-szintáz bénítása segítségével az ATP, ill. az NO lehetséges szerepét, továbbá a viszonylag újonnan felfedezett neuropeptid, a PACAP lehetséges részvételét is a válaszban.
3. Vizsgáltuk az ATP lehetséges részvételét a vékonybél idegingerlésre adott kolinerg összehúzó hatásában.
4. Tengerimalac nyelőcső készítményeken a kapszaicin izgató hatásának mechanizmusát vizsgáltuk, nevezetesen hogy ezen izgató válaszban szerepe van-e tachykinineknek.

## VII. 1. Tónusos "nitreg" gátlás kimutatása vékonybél körkörös izomzaton

### Bevezetés

Ismert, hogy a morfin a gyomor-bélrendszerben a körkörös izomzat tónusát fokozza, a záróizmokat összehúzza. (Ez a hatás - legalábbis részben - valószínűleg felelős a morfinkezelések során fellépő propulzió-gátló mellékhatásért.) Számos simaizomszerv-preparátumban tónusosan aktív, intrinszik gátló neuronokat mutattak ki; ezen idegsejtek blokkolása fokozza a simaizom aktivitást (Tonini, 1974; Wood, 1987). Leírták, hogy patkány vastagbél-készítményen az opioid-peptidek összehúzó hatásában VIP-et felszabadító neuronok is szerepet játszanak (Grider és Makhlouf, 1987).

Előzetes kísérleteinkben tengerimalac ileum körkörös izomzatán az idegvezetést gátló tetrodotoxin (TTX,  $10^{-6}$  M) tónusos összehúzódást okozott. A nitrogénmonoxid (NO) szintézisét gátló L-arginin analóg  $N^G$ -nitro-L-arginin (L-NOARG,  $10^{-4}$  M) segítségével vizsgáltuk azt a hipotézisünket, hogy a morfin (és a TTX) által okozott összehúzódás a plexus myentericus tónusosan aktív, NO-t felszabadító neuronjainak gátlása révén jön létre. Az NO-donor nitroprusszid-nátrium hatását is vizsgáltuk a cirkuláris izomzaton.

Megvizsgáltuk, hogy tengerimalac ileum hosszanti izom preparátumokon létezik-e tónusos idegi gátló befolyás.

A körkörös izmon a különböző kontraháló anyagok hatása átmeneti. A kolecisztokinin-oktapeptid (CCK-8) jellegzetes tónusos-fázisos kontrakciók együtteséből álló kolinerg izgató választ hoz létre, mely 1-3 perc elteltével spontán megszűnik. Nem világos, hogy mi vet véget ezen hatásnak. Megvizsgáltuk annak a lehetőségét, hogy az NO mint gátló transzmitter részt vesz-e a CCK-8 kontraháló hatásának terminálásában. Ugyanakkor az NO acetilkolint is felszabadít a plexus myentericusból (Barthó és Lefebvre, 1994, 1995), tehát az NO elvileg a CCK-8 hatásának létrehozásában is részt vehet.

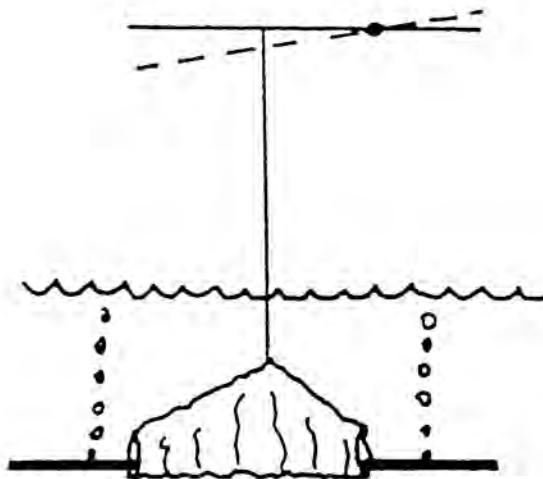
### Kérdéseink:

- in vitro rendszerünkben kimutatható-e tónusos idegi gátló hatás tengerimalac ileum körkörös izomzatán, ill. a hosszanti izmon?
- a feltételezett tónusos gátlást a "nitreg" neuronokból felszabaduló NO közvetíti-e?
- a morfin által létrehozott tónusos kontrakcióban van-e szerepük "nitreg" neuronoknak?

- az NO-donor nitroprusszid-nátrium miként hat a körkörös simaizomra?
- részt vesz-e az NO a CCK-8 hatásának terminálásában vagy közvetítésében?

### Módszerek

Kísérleteinket 400-600 g súlyú tengerimalacokon végeztük. Az állatokat éter-gőzben elaltattuk, tarkóütéssel leöltük és elvéreztettük. Az ileumból kb. 20 cm-es szakaszt metszettünk ki (az ileum terminális 5 cm-es részét nem használtuk fel). A kimetszett bélből állatonként 4 db preparátumot készítettünk: kb. 2 cm-es béldarabot ráhúztunk egy 1 mm átmérőjű rozsdamentes acélrúdra és a béldarab két szélét lazán rögzítettük hozzá. A körkörös izomzat összehúzódásainak regisztrálásához a bélszakasz közepén kis mesenterium-részlethez cérnaszál segítségével kapcsoltunk jelátalakítót (VII.1./1. ábra). A mozgásválaszokat Hugo-Sachs karos jelátalakító és híd segítségével izotóniásan, kompenzográfon regisztráltuk. A preparátumokat 10-15 ml-es szervfürdőben vízszintesen függesztettük fel, 5 mN feszülés mellett. A szervfürdő oxigenizált (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>), 37°C-os Tyrode-tápoldatot tartalmazott. A tápoldathoz (egyes kísérletek kivételével) atropint (10<sup>-6</sup> M) is adtunk az intramuralis kolinerg neuronok hatásainak kivédésére.



VII.1./1. ábra

A kísérleti elrendezés sémás rajza. Oxigenizált tápoldatban felfüggesztett tengerimalac izolált ileum-szakasz. A körkörös izomzat mozgásválaszait regisztráltuk.

A felhasznált anyagok: atropin-szulfát, nitroprusszid-nátrium (Merck); tetrodotoxin, N<sup>o</sup>-nitro-L-arginin (L-NOARG), L-arginin, D-arginin, naloxon-hidroklorid (Sigma); kolekisztokinin-oktapeptid (Bachem); morfin-szulfát (Alkaloida). Izoprenalin-hidrokloridot Isuprel injekció formájában használtunk (Sanofi-Winthrop). Az anyagokat izotóniás NaCl oldatban oldottuk fel, ill. higítottuk. A következő koncentrációjú törzsoldatokat készítettük: 10<sup>3</sup> M (atropin, morfin, naloxon, TTX), 10<sup>4</sup> M (CCK-8), 10<sup>2</sup> M (L-NOARG, nitroprusszid-nátrium), 5x10<sup>2</sup> M (L- és D-arginin). A kontaktusidő CCK-8 esetében 1.5-3 perc, morfin, naloxon és TTX esetében 10 perc, L-NOARG, L- és D-arginin, ill. atropin inkubálásnál 20 perc volt. A kapott összehúzódások és elernyedések nagyságát a KCl (8x10<sup>-2</sup> M) segítségével kiváltott maximális kontrakció, ill. az izoprenalinnal (2x10<sup>-6</sup> M) létrehozott maximális relaxáció százalékában adtuk meg. A CCK-8 okozta tónusos-fázisos kontrakciók értékelésénél a tónusos összehúzódásokat az előbbiek szerint értékeltük, a fázisos kontrakciók esetében az aktuális alapvonal figyelembe vételével számoltunk és az adatokat "circular muscle contraction units" (CU)-egységekben adtuk meg (1 CU = kontrakció az aktuális alapvonalától a maximumig; ld. Barthó és mtsai, 1994). Adatainkat az átlag±S.E.M. formájában mutatjuk be. A szignifikáns eltérések megállapítására két kapcsolódó minta esetén Wilcoxon-féle előjeles rang-próbát, 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.

### *Eredmények*

Tengerimalac ileum körkörös izomzatán atropin (10<sup>-6</sup> M) jelenlétében mind a tetrodotoxin (10<sup>-6</sup> M), mind a morfin (10<sup>-6</sup> M), ill. az L-NOARG (10<sup>-4</sup> M) tónusos, lassú kontrakciót okozott (VII.1./2. ábra). A morfin kiváltott összehúzódás a másik két szer hatásához képest szignifikánsan kisebb volt. A morfin okozta kontrakciós válasz küszöbdózisa 1-3x10<sup>-8</sup> M körül volt. 10<sup>-7</sup> M koncentrációban a morfin hatása (6,5±0,7%, n=5) nem volt szignifikánsan kisebb, mint 10<sup>-6</sup> M-nál (7,3±0,7%, n=6).

TTX jelenlétében a morfin gyakorlatilag hatástalan volt. L-NOARG jelenlétében mind a morfin, mind a TTX hatástalannak bizonyult. L-NOARG szintén alig hozott létre kontrakciós választ TTX előkezelést követően (VII.1./1. táblázat, VII.1./2. ábra).

Az opioid antagonistá naloxon (10<sup>-6</sup> M) megszüntette a morfin által okozott összehúzódást a naloxon beadás utáni 5. percben (VII.1./3. ábra) (a kontrakció 8,5±1,3%,

naloxon után:  $1,5 \pm 0,8\%$ ), ugyanakkor nem befolyásolta önmagában a körkörös izomzat tónusát ( $n=4$ ), ill. a TTX vagy az L-NOARG által kiváltott kontrakciót ( $n=5 - 5$ ). Az L-NOARG okozta tónusos kontrakciót megszüntette az L-arginin ( $10^{-3}$  M) (kontroll válasz:  $11,2 \pm 1,1\%$ , L-arginin jelenlétében:  $3,2 \pm 1,1\%$ ,  $n=6$ ,  $p < 0,001$ ), D-arginin ( $10^{-3}$  M) viszont nem ( $n=5$ ). L-arginin nem befolyásolta a TTX által létrehozott összehúzódást ( $12,9 \pm 1,5\%$ , ill. L-arginin után  $12,5 \pm 1,3\%$ ,  $n=6$ ), ill. a bazális tónust sem ( $n=4$ ).

#### Morfín ( $10^{-6}$ M)-okozta kontrakció

Előkezelés	Válasz	n	szignifikáns különbség
1. —	$6,8 \pm 1,6\%$	9	
2. TTX ( $10^{-6}$ M)	$0,2 \pm 0,2\%$	6	$p < 0,001$ vs. 1
3. L-NOARG ( $10^{-4}$ M)	$0,4 \pm 0,2\%$	7	$p < 0,001$ vs. 1

#### TTX ( $10^{-6}$ M)-okozta kontrakció

4. —	$13,6 \pm 1,7\%$	9	$p < 0,01$ vs. 1
5. Morfín ( $10^{-6}$ M)	$2,5 \pm 0,9\%$	6	$p < 0,001$ vs. 4
6. L-NOARG ( $10^{-4}$ M)	$0,8 \pm 0,4\%$	8	$p < 0,001$ vs. 4

#### L-NOARG ( $10^{-4}$ M)-okozta kontrakció

7. —	$11,9 \pm 1,8\%$	15	$p < 0,01$ vs. 1
8. TTX ( $10^{-6}$ M)	$1,4 \pm 0,9\%$	5	$p < 0,001$ vs. 7

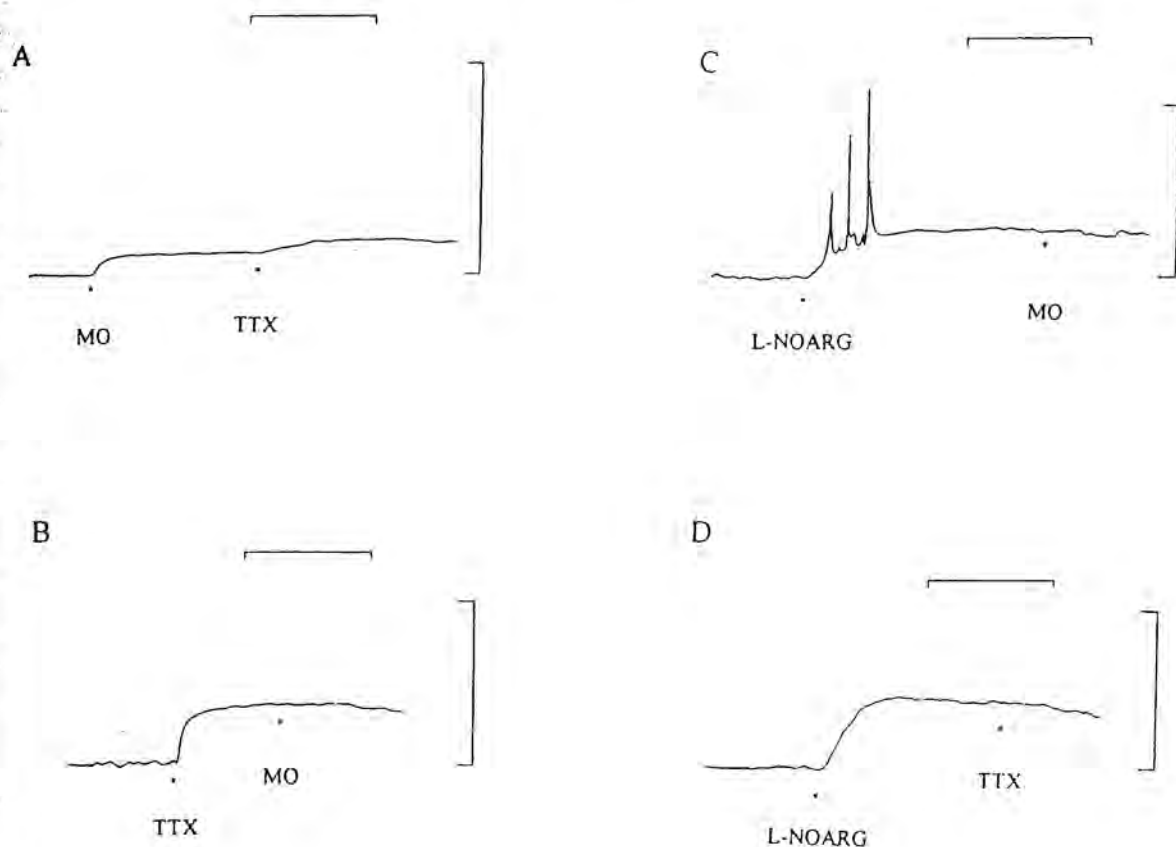
#### VII.1./1. táblázat

A morfín, a tetrodotoxin (TTX) és az  $N^G$ -nitro-L-arginin (L-NOARG) által létrehozott összehúzódások tengerimalac ileum körkörös izomzatán a maximális kontrakció %-ában kifejezve kontroll kísérletekben, ill. TTX, L-NOARG vagy morfín előkezelések után. A statisztikai értékelés a Kruskal-Wallis teszttel történt.

Az NO-donor nitroprusszid-nátrium (SNP,  $10^{-4}$  M) maximális elernyedést okozott (a küszöb-koncentráció  $10^{-7}$  M volt) (VII.1./4. ábra). Atropin nélkül kb. 1 perc után utókontrakció követte a relaxációt, atropin jelenlétében eltűnt az utókontrakció, tartós elernyedés volt a válasz ( $n=5$ ) (VII.1./5. ábra).

A hosszanti izom preparátumokon sem a morfin ( $10^{-6}$  M), sem a TTX ( $10^{-6}$  M) vagy az L-NOARG ( $10^{-4}$  M) nem okozott összehúzódást atropin jelenlétében ( $n=5 - 5$ ).

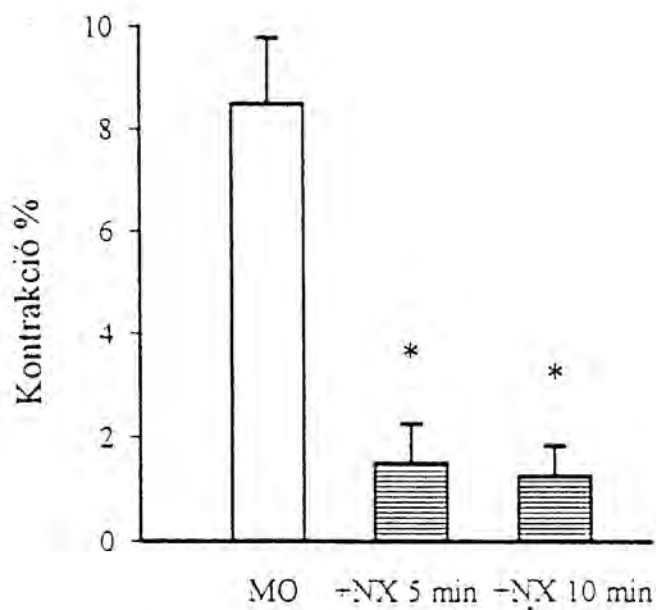
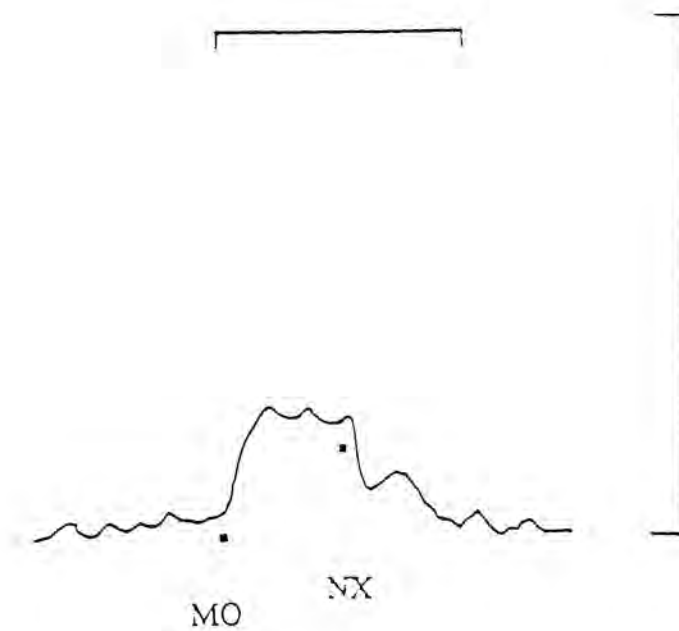
Megerősítettük, hogy az atropinnal nem kezelt preparátumokon a kolecisztokinin-  
oktapeptid (CCK-8,  $10^{-9}$  M) tónusos-fázisos kolinerg kontrakciók együttesét hozza létre a  
körkörös izmon (VII.1./6. ábra); a válasz 1-3 percen belül véget ért, kimosást követően 30  
perc múlva megismételhető volt ( $n=9$ ). A CCK-8 hatásának megszünte után alkalmazott  
ugyanakkora dózis (kimosás nélkül) nem váltotta ki a jellemző hatást ( $n=6$ ) (VII.1./6. ábra).  
L-NOARG előkezelés nem befolyásolta a CCK-8 hatásának sem tónusos, sem fázisos  
összetevőjét, ill. annak tartamát (tónusos kontrakció L-NOARG nélkül:  $34,7 \pm 2,7\%$ , L-  
NOARG jelenlétében:  $28,4 \pm 1,1\%$ ; fázisos kontrakció L-NOARG előtt:  $22,5 \pm 2,2$  CU, L-  
NOARG után:  $19,3 \pm 2,7$  CU,  $n=6$ ) (VII.1./6. ábra).



VII.1./2. ábra

A morfin (MO,  $10^{-6}$  M) (A), a TTX ( $10^{-6}$  M) (B), ill. az L-NOARG ( $10^{-6}$  M) (C, D) okozta tónusos összehúzódás tengerimalac ileum körkörös izomzatán, atropin ( $10^{-6}$  M) jelenlétében. Kalibrációk: függőleges - a KCl-okozta maximális összehúzódás 50%-a, vízszintes - 10 perc. Látható, hogy morfin hatástalan TTX vagy L-NOARG jelenlétében, hasonlóan a TTX L-NOARG előkezelést követően.



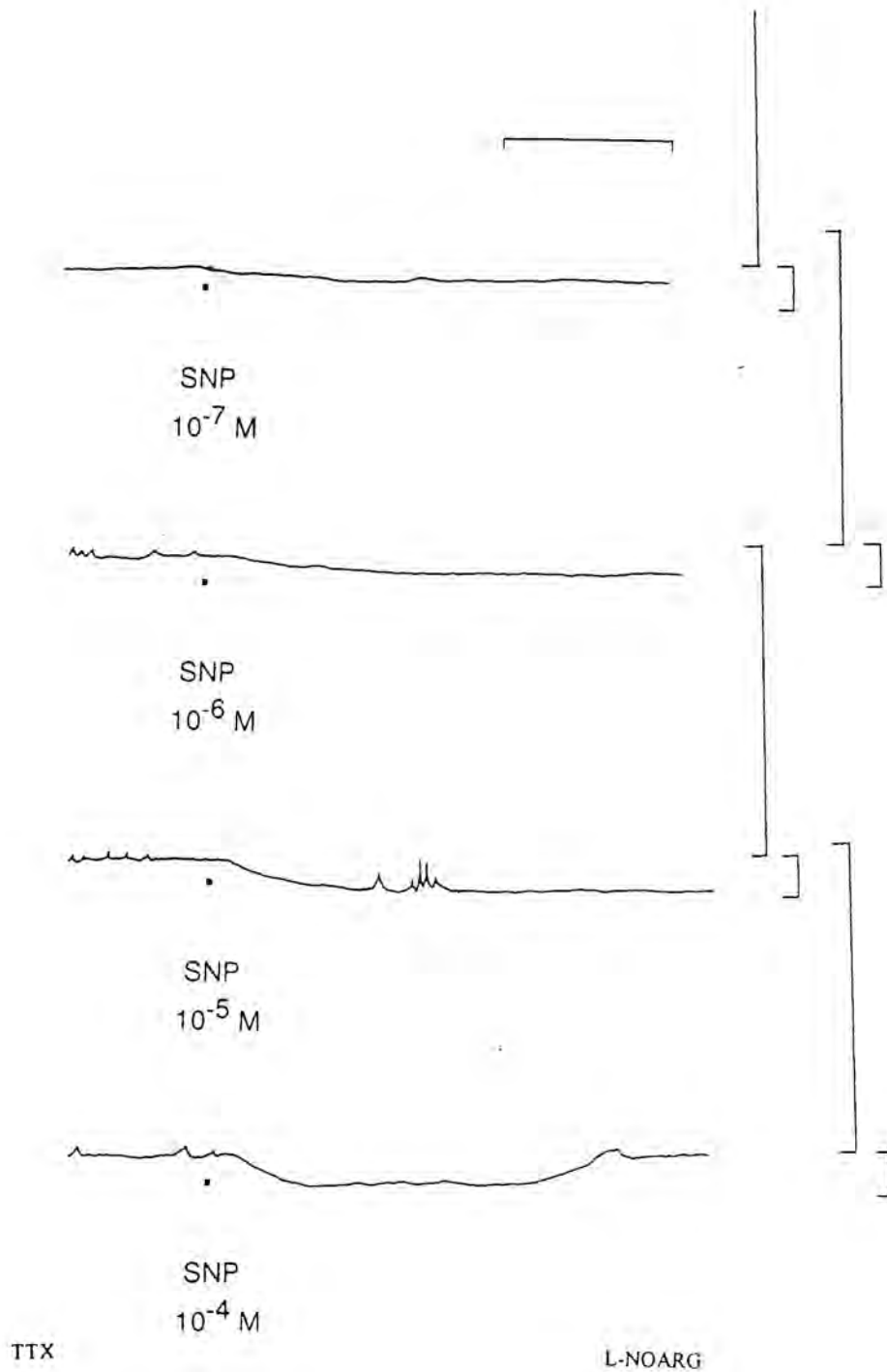


VII.1./3. ábra

Felső rész: a morfin (MO,  $10^{-6}$  M) okozta kontrakciót naloxon (NX,  $10^{-6}$  M) megszünteti.

Kalibrációk: ld. előző ábra.

Alsó rész: A morfin okozta kontrakció kontroll kísérletekben, ill. a naloxon beadás utáni 5., ill. 10. percben. ( $P < 0,05$ ; Wilcoxon-teszt;  $n = 5 - 5$ )

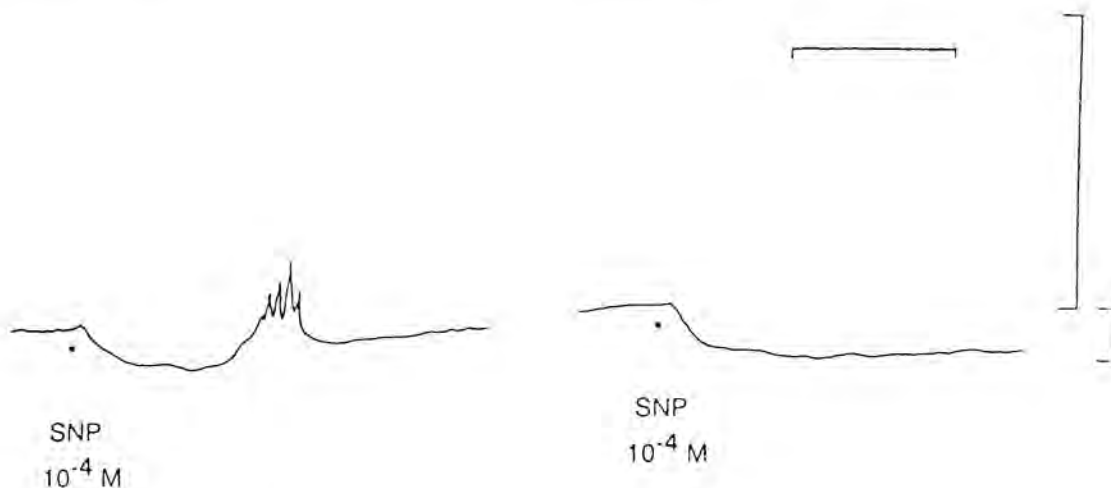


## VII.1./4. ábra

Atropin ( $10^6$  M) jelenlétében nitroprusszid-nátrium (SNP,  $10^7$  -  $10^4$  M) relaxációt okoz a körkörös izomzaton, mely  $10^6$  és  $10^4$  M között gyakorlatilag maximális.

Kalibrációk: függőleges - a maximális spazmus 50%-a, ill. az izoprenalin-okozta maximális relaxáció, vízszintes - 1 perc.

KONTROLL

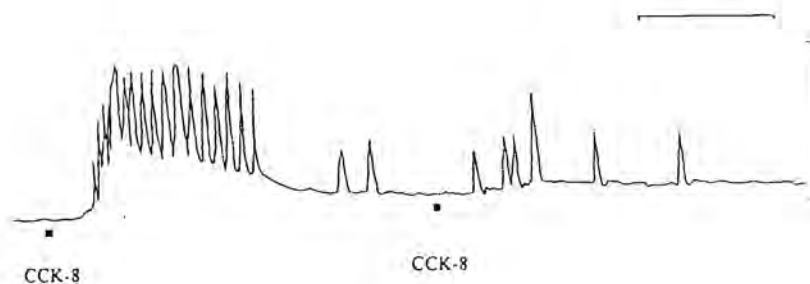
ATROPIN  $10^{-6}$  M

## VII.1./5. ábra

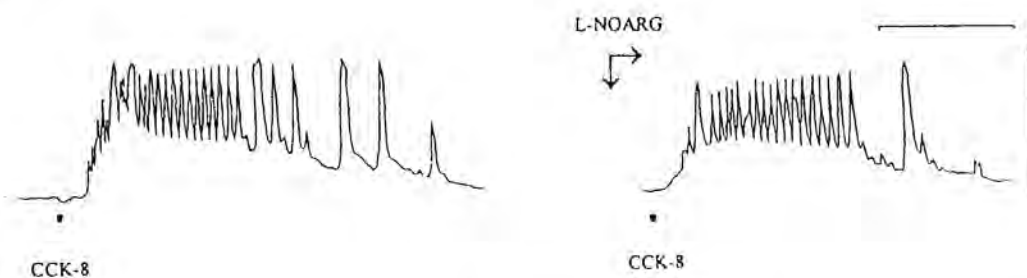
Nitroprusszid-nátrium (SNP) atropin alkalmazása nélkül relaxációt okoz, melyet kb. 1 perc után kontrakció követ. Atropin ( $10^{-6}$  M) jelenlétében az SNP hatása tartós relaxáció.

Kalibráció: ld. előző ábra.

A



B



## VII.1./6. ábra

Felső rész (A): Kolecisztokinin-oktapeptid (CCK-8,  $10^{-9}$  M) tónusos és fázisos kontrakciókat okoz tengerimalac ileum cirkuláris izomzatán, a jellegzetes válasz azonban átmeneti, kb. 1-3 perc múlva megszűnik. A válasz "lecsengése" után közvetlenül újból adott CCK-8 a jellegzetes választ nem hozza létre. Kalibrációk: függőleges - a maximális spazmus, vízszintes - 1 perc. A szervfürdő atropint nem tartalmazott. Alsó rész (B): A CCK-8 ( $10^{-9}$  M) jellegzetes hatása L-NOARG ( $10^{-4}$  M, 20 perces kontaktus-ideje) beadása előtt, ill. után.

Kalibrációk: ld. felső rész.

### *Megbeszélés*

Általánosan elfogadottá vált, hogy az egyik legfontosabb NANC gátló transzmitter a bélben a plexus myentericusból felszabaduló nitrogénmonoxid (Bult és mtsai, 1990; Moncada és mtsai, 1991; Stark és Szurszewski, 1992; Lowenstein és mtsai, 1994; Barthó és Lefebvre, 1995).

Jelen kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogy "nitreerg" neuronok befolyásolják-e a körkörös, ill. a hosszanti izomzat tónusát, illetve, hogy a morfin körkörös izomtónust fokozó hatásában van-e szerepe a plexus myentericus neuronjaiból felszabaduló NO-nak.

Eredményeink azt bizonyítják, hogy mind a morfin, mind a tetrodotoxin, mind az L-NOARG tónusosan működő, NANC gátló neuronok hatását függeszti fel a simaizomzatra. Mivel vizsgálataink szerint az NO-szintáz bénító L-NOARG után adva a morfin és az idegvezetést gátló TTX is hatástalan volt, a tónusos gátlást valószínűleg a "nitreerg" gátló idegekből felszabaduló NO hozza létre és a morfin, a TTX ill. az L-NOARG, a "gátlás gátlása" révén okoz tónusos összehúzódást. Ismert, hogy a morfin gátolni képes neurotranszmitterek felszabadulását a plexus myentericus neuronjaiból (pl. acetilkolin (Vizi, 1979), P-anyag (Barthó és mtsai, 1982c)). Jelen eredményeink arra utalnak, hogy az NO felszabadulását a plexus myentericusból szintén gátolja a morfin.

Munkacsoportunk írta le elsőként, hogy az NO a bélben kontrakciót is képes létrehozni (Barthó és mtsai, 1992b). Tengerimalac ileum hosszanti izomzaton az NO acetilkolin-mediált kontrakciót okoz (Barthó és Lefebvre, 1994), ezt később neurokémiai kísérletekkel is megerősítették: NO-donorok acetilkolin felszabadulást váltanak ki tengerimalac myentericus neuronokból (Hebeiss és Kilbinger, 1996). Jelen eredményeink szerint tengerimalac ileumon a hosszanti izomzathoz hasonlóan a körkörös izmon is összehúzódást okozhat az NO: az NO-donor nátrium-nitroprusszid alkalmazásával átmeneti relaxációt követő kolinerg utókontrakciót mutattunk ki.

Tengerimalac ileum cirkuláris izomzatán a különböző izgató anyagok kontraktilis válaszai jellegzetesen átmenetiek (Holzer és mtsai, 1980; Barthó és mtsai, 1994; Barthó és Pethő, 1993). Nem ismert, hogy mi vet véget ezeknek az izgató hatásoknak. Eredményeink szerint a jelenség oka valószínűleg nem a szer eliminációja, mivel a hatásmegszűnés után közvetlenül alkalmazott újabb, ugyanakkora dózis nem hozza létre a jellegzetes választ. Mivel a CCK-8 izgatja a plexus myentericus neuronjait (Vizi és mtsai, 1973), lehetséges, hogy az NO felszabadulását is stimulálja. Mivel azonban az L-NOARG előkezelés sem a CCK-8 okozta tónusos, sem a fázisos összehúzódásokat, sem azok időtartamát nem

módosította szignifikánsan, valószínű, hogy a "nitregerg" neuronok nem modulálják a CCK-8 hatását, nincs szerepük sem annak létrehozásában, sem terminálásában.

### *Konklúziók*

- Eredményeink szerint a morfin körkörös izomtónust fokozó hatását "nitregerg" gátló tónus felfüggesztése révén hozza létre.
- Az exogén nitrogénmonoxid (nitroprusszid-nátrium) a körkörörös izomzaton a relaxáció mellett kolinerg aktivációt is okoz.
- A CCK-8 izgató hatásának közvetítésében, ill. spontán megszűnésében az NO valószínűleg nem vesz részt.

## *VII. 2. Nitrogénmonoxid, ATP és PACAP szerepe a coecum mozgásaiban*

### *Bevezetés*

Mai tudásunk szerint a gastrointestinalis traktusban valószínűleg a két legfontosabb NANC gátló neurotranszmitter az ATP és a nitrogénmonoxid (Burnstock, 1990, 1997; Fredholm és mtsai, 1994; Lefebvre, 1995; Rand és Li, 1995). Számos adat bizonyítja, hogy az NO és az ATP mellett a neuropeptid VIP és PACAP szintén fontos NANC gátló transzmitterek a perifériás idegrendszerben (Grider és mtsai, 1985a,b; Fahrenkrug, 1989, 1993; Sundler és mtsai, 1992; Jin és mtsai, 1994; McConalogue és mtsai, 1995a; Portbury és mtsai, 1995), bár mindkét peptid indirekt, neurogén izgató hatásokat is közvetíthet (Williams és North, 1979; Cohen és Landry, 1980; Katsoulis és mtsai, 1993b; Rattan és Chakder, 1998; Pang és Kline, 1998).

Tengerimalac coecum taenián ideg ingerlés jellegzetes NANC relaxációt okoz (Burnstock és mtsai, 1966). Hogy ezen relaxációt mely transzmitter(ek) közvetítik, még nem tisztázott kellőképpen.

Az ATP szerepe mellett és ellen is található adatok az irodalomban: P<sub>2</sub> purinoceptor bénítók alkalmazásával egyes adatok szerint a NANC relaxáció gátlható (Hoyle és mtsai, 1990; Windscheif és mtsai, 1995), mások kísérleteikben hatástalannak találták a P<sub>2</sub> purinoceptor antagonistákat (Grider és mtsai, 1985b).

Az NO-val kapcsolatban a legtöbb adat ezen anyag részvétele ellen szól a NANC

relaxációban. Atropin jelenlétében elektromos téringeléskor több kutatócsoport szerint is az NO-szintáz gátlók nem csökkentették a relaxációs választ (Ward és mtsai, 1996; Knudsen és Tøttrup, 1992). Selemidis és mtsai (1997) szerint az NO-szintáz gátló L-NOARG csak abban az esetben gátolja az elektromos ingerlés okozta NANC elernyedést, ha apamin is jelen van a szervfurdőben. (A  $K^+$ -csatornák egy típusát blokkoló apamint ATP-közvetített válaszok gátlására széles körben használják, de gátolja a PACAP elernyesztő hatását is (Schwörer és mtsai, 1992).) A szerzők szerint az NO csak mint tartalék, vagy "redundáns transzmitter" vesz részt a válaszban. Ugyanakkor Piotrowski és mtsai (1993) szerint NOS gátlóval kismértékben, de szignifikánsan csökkenthető NANC ingerléskor az elernyedés a taenián.

Az irodalomban egyre több adat támogatja a PACAP lehetséges részvételét a NANC relaxációban a coecum taenián: immunhisztokémiai módszerrel PACAP immunpozitivitást mutattak ki a taeniát ellátó neuronokban, a kívülről beadott PACAP pedig elernyeszti a taenia simaizomzatát (Schwörer és mtsai, 1992; Jin és mtsai, 1994; McConalogue és mtsai, 1995a; Portbury és mtsai, 1995). Továbbá PACAP elleni antitestekkel létrehozott immunneutralizáció, valamint PACAP-tachyphylaxia vagy a PACAP receptor antagonistá PACAP(6-38) gátolja az elektromos téringelés okozta relaxációt (Jin és mtsai, 1994; Schwarzhoff és mtsai, 1995). PACAP(1-27) hiperpolarizálja a taenia simaizomzatát, továbbá PACAP receptor deszenzibilizáció jelentősen csökkenti az elektromos téringelés okozta gátló junkciós potenciált (inhibitory junction potential, IJP) (McConalogue és mtsai, 1995b).

Jelen kísérleteinkben az NO-szintáz gátló L-NOARG, a viszonylag új  $P_2$  purinoceptor antagonistá PPADS (Lambrecht és mtsai, 1992), ill. PACAP(1-27) tachyphylaxia és a PACAP receptor antagonistá PACAP(6-38) segítségével megvizsgáltuk az NO, az ATP és a PACAP lehetséges részvételét a NANC relaxációban tengerimalac coecum taenián, ill. ezen transzmitterek egymáshoz való viszonyát a válasz közvetítésében.

### **Módszerek**

Tengerimalacok leölése után a coecumról lemetszettük a taenia liberát és kb. 2 cm-es preparátumokat készítettünk, melyeket 5 ml-es, oxigenizált, 37°C-os Krebs-táplódatban (2 mN feszülés mellett) függesztettünk fel. A hosszanti izommozgásokat regisztráltuk izotóniás jelátalakítók segítségével kompenzográfion, ill. számítógépes programmal (Geopolita, Pécs). Egy kísérletsorozatban izometriás regisztrálást alkalmaztunk megfelelő erőmérő jelátalakítók és híd (Experimetria) segítségével. Az elektromos téringelést (80 V, 0,1 ms impulzus szélesség, 1 és 10 Hz, 20 s-os inger-sorozatok) nagy teljesítményű ingerlővel, a szervfurdők

alján és tetején elhelyezett platina elektróda-pár segítségével hoztuk létre. Minden kísérletben a tápoldat atropint ( $10^{-6}$  M) és guanetidint ( $3 \times 10^{-6}$  M) tartalmazott a kolinerg motoneuronok, ill. a szimpatikus neuronok hatásainak kivédésére. A preparátumokat elő-kontraháltuk szubmaximális koncentrációjú ( $10^{-7}$  M) hisztaminnal, mielőtt bármilyen relaxáló stimulust alkalmaztunk volna (elektromos ingerlés, ATP, PACAP, VIP, nitroprusszid-nátrium). Az elernyedések nagyságát az izoprenalinnal ( $8 \times 10^{-6}$  M) kiváltott maximális relaxáció %-ában adtuk meg.

A következő anyagokat használtuk: atropin-szulfát, nitroprusszid-nátrium (Merck); L-arginin, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin (L-NOARG), tetrodotoxin, guanetidin-szulfát (Sigma); izoprenalin (Isuprel, Sanofi-Winthrop); piridoxál-foszfát-6-azofenil-2',4'-diszulfonsav (PPADS), adenzin-trifoszfát (ATP) (RBI); pituitaer adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)(1-38), PACAP(1-27), PACAP(6-38) (Bachem, ill. a Szegedi Orvostudományi Egyetem Orvosi Kémia Intézet), vazóaktív intestinalis polipeptid (VIP) (Peninsula). A kontaktusidő L-NOARG, L-arginin és PPADS esetében 30 perc, atropin, tetrodotoxin esetén 20 perc, PACAP(6-38) esetén pedig 10 perc volt. A relaxáló anyagokat 3 perc eltelté után mostuk ki a fürdőkből. PACAP tachyphylaxiát nagyobb dózisú ( $10^{-7}$  M) PACAP(1-27) beadásával hoztuk létre. Az anyagot 10 percig, kimosás nélkül alkalmaztuk a vizsgálandó relaxáló stimulus alkalmazása előtt.

Adatainkat az átlag $\pm$ S.E.M. formájában adtuk meg. A statisztikai összehasonlításokat két minta esetén Wilcoxon-féle előjeles rangpróba, több minta esetén Quade-teszt alkalmazásával végeztük,  $p < 0,05$  probabilitásnál fogadtuk el szignifikánsnak a különbségeket.

### *Eredmények*

Tengerimalac coecum taenián atropin ( $10^{-6}$  M) és guanetidin ( $3 \times 10^{-6}$  M) jelenlétében az elektromos téringерlés (1 és 10 Hz, 20 s) elernyedést okozott, mely reprodukálható volt (VII.2./1. ábra). Kontroll kísérletekben az első, a második, ill. a harmadik megismételt ingerlés nagysága 1 Hz 20s-nél:  $41,9 \pm 6\%$ ,  $43,1 \pm 5,9\%$ ,  $43,5 \pm 5,8\%$ ; 10 Hz 20s-es ingerlésnél:  $62,2 \pm 3,8\%$ ,  $59,7 \pm 4,6\%$ , ill.  $60,8 \pm 4,8\%$  volt. Mindkét frekvenciánál a választ az idegvezetést gátló tetrodotoxin ( $10^{-6}$  M) teljesen kivédte ( $n=4 - 4$ ).

Mind az L-NOARG ( $10^{-4}$  M), mind a PPADS ( $5 \times 10^{-5}$  M) szignifikánsan csökkentette (mindkét szer kb. a felére) az ingerlésre kapott választ mind 1, mind 10 Hz-es ingerlés

esetében (VII.2./2-5. ábra). A két gátlószert kombinálva kb. 80%-os csökkenést kaptunk mindkét ingerlési frekvenciánál, függetlenül a szerek sorrendjétől (VII.2./2-5. ábra). Az L-NOARG gátló hatása L-argininnel ( $10^{-3}$  M) részben visszafordítható volt (VII.2./6. ábra); L-arginin önmagában nem befolyásolta a kiváltott elernyedést ( $n=4$ ).

A kívülről beadott ATP ( $10^{-6}$ - $10^{-4}$  M) reprodukálható, koncentráció-függő elernyedést okozott (VII.2./7. ábra). PPADS szignifikánsan gátolta az ATP ( $10^{-6}$ - $10^{-5}$  M) elernyesztő hatását (VII.2./7. ábra). L-NOARG nem befolyásolta az ATP okozta relaxációt, a PPADS pedig nem hatott az NO-donor nitroprusszid-nátrium ( $10^{-8}$ , ill.  $10^{-5}$  M) okozta elernyedésre (VII.2./8. ábra).

Izometriás regisztrálás során idegingerléskor nagyobb relaxáló válaszokat kaptunk, mint izotóniás méréseinknél (10 Hz-nél majdnem maximális a relaxáció). 1 Hz-es ingerlés hatását L-NOARG kismértékben, de szignifikánsan csökkentette (kb. 10%-os a gátlás), PPADS kb. 20%-os gátlást okozott, a két szer kombinált alkalmazásánál a gátlás 60%-os volt. 10 Hz esetén az L-NOARG szintén kismértékben, de csökkentette a választ, amit PPADS tovább gátolt (VII.2./1. táblázat).

A PACAP receptor agonista PACAP(1-38) ( $1-3 \times 10^{-8}$  M) és PACAP(1-27) ( $10^{-8}$  M) elernyedést okozott a pre-kontrahált taenián. Ezek a válaszok kb. 40 perces kimosási periódusok után ismételhetők voltak (VII.2./9. ábra). VIP ( $10^{-8}$  M) szintén relaxálta a taeniát. Tetrodotoxin (TTX,  $5 \times 10^{-7}$  M) nem befolyásolta a PACAP(1-38) vagy VIP okozta relaxációt (VII.2./2. táblázat), valószínűsítve, hogy mindkét peptid direkt módon relaxálja a taeniát, közvetlenül a simaizomsejteken hatva.

PACAP(1-27) ( $10^{-7}$  M) - tachyphylaxia gátolta mind a PACAP(1-38), mind a PACAP(1-27) (mindkettő  $10^{-8}$  M) okozta elernyedést (VII.2./2. táblázat), ill. az 1 és 10 Hz frekvenciájú elektromos téringerlés kiváltotta relaxációt (utóbbiaknál a %-os csökkenés: 67 ill. 54%, VII.2./3. táblázat).

A PACAP antagonistá PACAP(6-38) ( $5 \times 10^{-7}$  M) csökkentette a PACAP(1-38) ( $10^{-8}$  M) és a PACAP(1-27) ( $10^{-8}$  M) által kiváltott elernyedést; magasabb koncentrációban alkalmazva a PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$  M) teljesen kivédte mindkét PACAP receptor agonista (PACAP(1-38) és PACAP(1-27)) hatását (VII.2./2. táblázat). PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$  M) önmagában nem váltott ki hatást a pre-kontrahált taenián ( $n=4$ ). További kísérleteinkben ez utóbbi, magasabb PACAP antagonistá koncentrációt használtuk. A VIP ( $10^{-8}$  M) okozta relaxációt a PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$  M) szintén kivédte (VII.2./2. táblázat), ellenben az adrenerg  $\beta$ -receptor izgató izoprenalin ( $4-8 \times 10^{-8}$  M), vagy a purinoceptor agonista ATP ( $10^{-6}$



M) elernyesztő hatását a PACAP(6-38) nem befolyásolta (VII.2./2. táblázat).

PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$  M) kismértékű, de szignifikáns gátlást okozott az elektromos téringerlés kiváltotta relaxációban 1 és 10 Hz-es ingerlésnél is (VII.2./3. táblázat). Az NO-szintáz gátló L-NOARG ( $10^{-4}$  M) jelenlétében a PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$  M) tovább gátolta a téringerlés relaxációs hatását mind 1, mind 10 Hz-es ingerlésnél (VII.2./3. táblázat). PPADS ( $5 \times 10^{-5}$  M) előkezelést követően a PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$  M) nem okozott további gátlást az elektromos ingerlés kiváltotta elernyedésben sem 1 sem 10 Hz esetében (VII.2./3. táblázat). L-NOARG és PPADS együttes jelenlétében a PACAP(6-38) szintén nem okozott további gátlást 10 Hz-es NANC ingerléskor (VII.2./3. táblázat). (1 Hz-es ingerlésnél az antagonisták kombinált alkalmazásakor kapott válaszok túl kicsik voltak a további vizsgálatokhoz.) PPADS ( $5 \times 10^{-5}$  M) és L-NOARG ( $10^{-4}$  M) együttes alkalmazása nem befolyásolta a PACAP(1-38) ( $1-2 \times 10^{-8}$  M) által okozott elernyedést (a relaxáció  $34,4 \pm 4,3\%$  a kontroll válaszoknál és  $30,3 \pm 2,4\%$  PPADS + L-NOARG jelenlétében,  $n=6$ ).

Előkezelés	Relaxáció%	p<	n
<b>1 Hz-es ingerlés</b>			
—	67,1±10,2		
L-NOARG	61,4±12,3 *	0,05	6
L-NOARG + PPADS	25,2±11,8 *	0,01	
—	73,5±5,5		
PPADS	57,1±11,4 *	0,05	6
PPADS + L-NOARG	26,5±7,5 *	0,01	
<b>10 Hz-es ingerlés</b>			
—	94,6±1,4		
L-NOARG	86,7±2,6 *	0,01	6
L-NOARG + PPADS	38,2±8,5 *	0,01	

#### VII.2./1. táblázat

Elektromos téringerlés (1 és 10 Hz, 20 s) relaxáló hatása izometriás regisztrálás során, atropin ( $10^{-6}$  M) és guanetidin ( $3 \times 10^{-6}$  M) jelenlétében prekontrahált tengerimalac coecum taenián kontroll kísérletekben, ill. L-NOARG ( $10^{-4}$  M), PPADS ( $5 \times 10^{-5}$  M) vagy L-NOARG + PPADS kombinált előkezelést követően. A statisztikai értékelés Quade teszttel készült.

Előkezelés	Relaxáció%	p<	n
<b>PACAP(1-38) (<math>1-3 \times 10^{-8}</math> M)</b>			
—	38,7±6,1		
TTX ( $5 \times 10^{-7}$ M)	38,5±5,9	n. s.	5
—	23,8±3,6		
PACAP(1-27) ( $10^{-7}$ M)	2,5±1,2 *	0,05	7
—	25,9±7,4		
PACAP(6-38) ( $5 \times 10^{-7}$ M)	9,3±6,2 *	0,05	5
—	29,8±6,1		
PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$ M)	2,7±2,7 *	0,05	6
<b>PACAP(1-27) (<math>10^{-8}</math> M)</b>			
—	53,6±8,4		
PACAP(6-38) ( $5 \times 10^{-7}$ M)	19,9±6,6 *	0,05	6
—	52,5±10,1		
PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$ M)	∅ *	0,05	8
<b>VIP (<math>10^{-8}</math> M)</b>			
—	35,5±6,7		
TTX ( $5 \times 10^{-7}$ M)	36,9±6,6	n. s.	5
—	45,9±4,8		
PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$ M)	2,6±1,2 *	0,05	6
<b>Izoprenalin (<math>4-8 \times 10^{-8}</math> M)</b>			
—	54,0±5,3		
PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$ M)	51,0±6,0	n. s.	6
<b>ATP (<math>10^{-6}</math> M)</b>			
—	32,0±6,0		
PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$ M)	34,8±6,1	n. s.	6

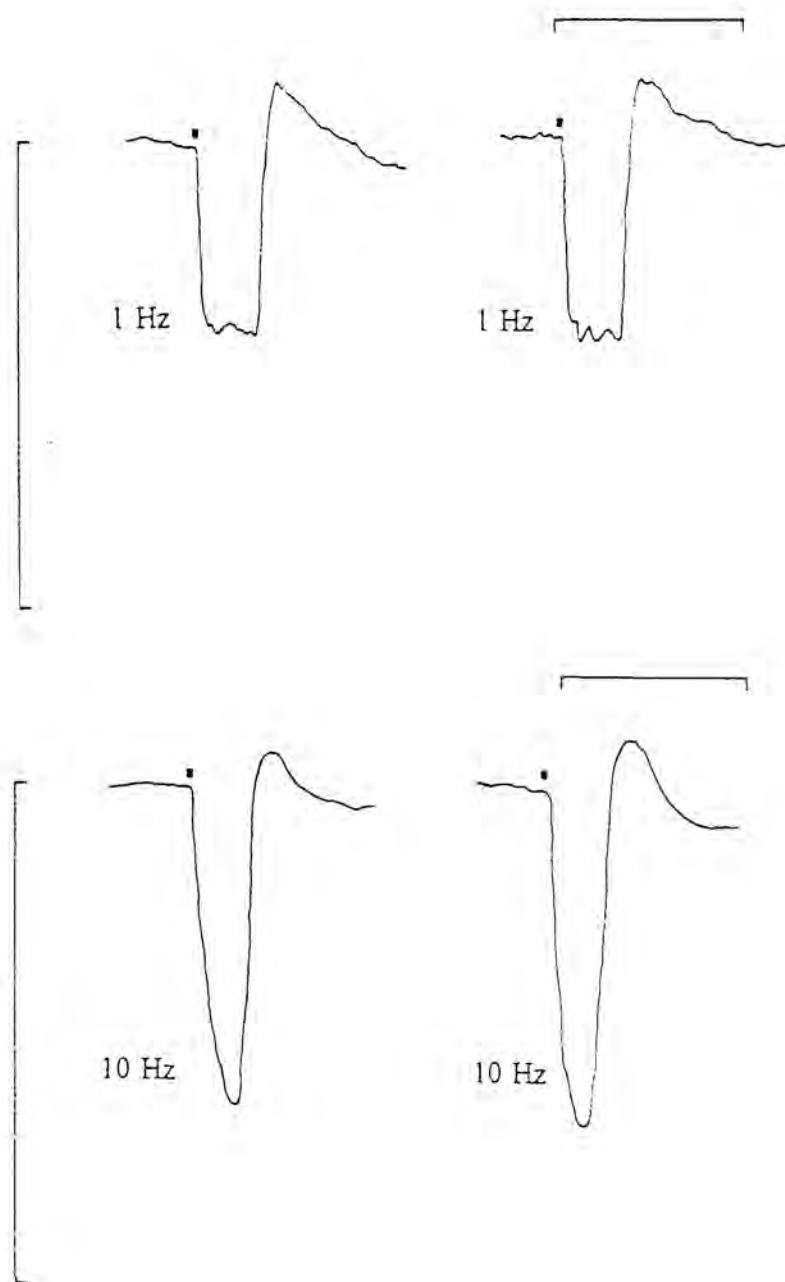
## VII.2./2. táblázat

PACAP(1-38), PACAP(1-27), VIP, izoprenalin és ATP relaxáló hatása taenia coecin kontroll kísérletekben, ill. különböző előkezelések után. A statisztikai értékelés Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával készült.

Előkezelés	Relaxáció%	p<	n
<b>1 Hz-es ingerlés</b>			
—	48,1±3,3		
PACAP(1-27)	16,6±5,8 *	0,05	6
—	32,7±5,8		
PACAP(6-38)	26,4±4,4 *	0,01	10
L-NOARG	16,9±3,0		
L-NOARG + PACAP(6-38)	11,2±3,2 *	0,05	7
PPADS	16,4±6,3		
PPADS + PACAP(6-38)	17,4±6,8	n. s.	6
<b>10 Hz-es ingerlés</b>			
—	62,0±2,9		
PACAP(1-27)	28,7±7,1 *	0,05	6
—	56,7±5,8		
PACAP(6-38)	42,5±5,7 *	0,01	9
L-NOARG	29,6±2,9		
L-NOARG + PACAP(6-38)	24,5±2,7 *	0,05	9
PPADS	31,2±4,7		
PPADS + PACAP(6-38)	28,0±6,0	n. s.	6
L-NOARG + PPADS	15,3±4,4		
L-NOARG + PPADS + PACAP(6-38)	13,8±4,6	n. s.	6

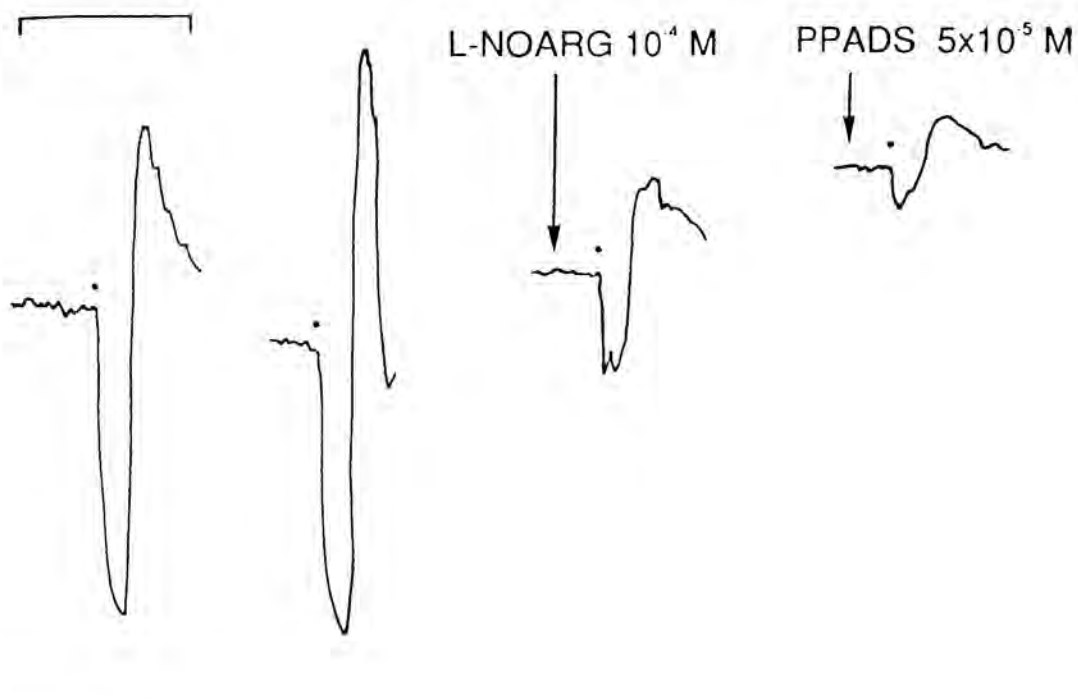
## VII.2./3. táblázat

1 Hz-es és 10 Hz-es NANC idegingerlés relaxáló hatása kontroll kísérletekben, ill. PACAP(1-27) ( $10^{-7}$  M) - tachyphylaxia vagy a PACAP antagonistá PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$  M) alkalmazását követően, ill. a PACAP(6-38) hatása L-NOARG ( $10^{-4}$  M), PPADS ( $5 \times 10^{-5}$  M) vagy ezek kombinációjának jelenlétében. A statisztikai értékelés Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával készült.



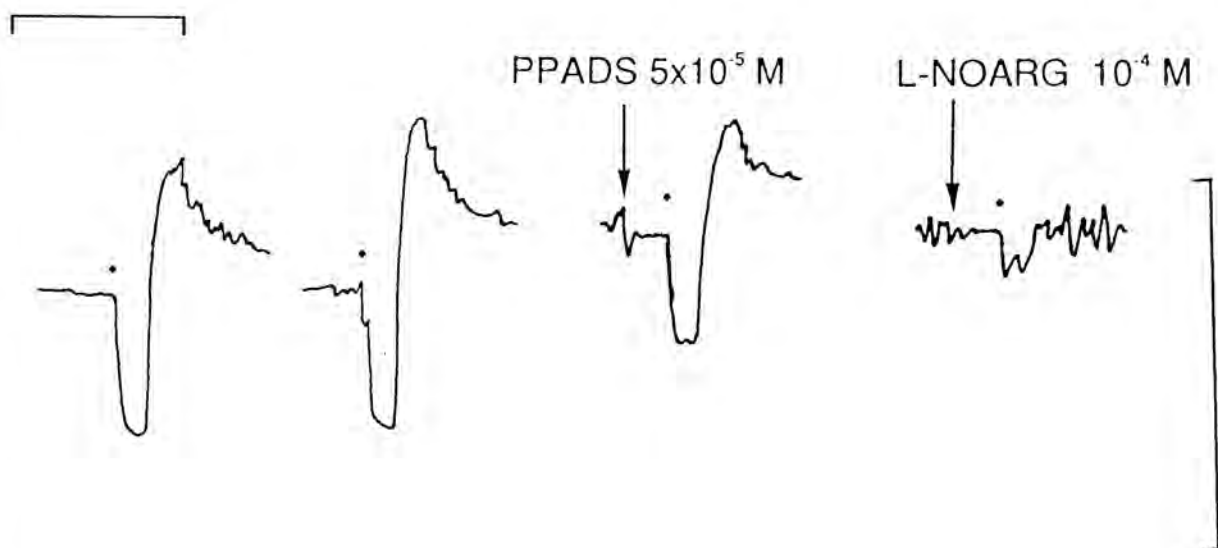
## VII.2./1. ábra

1 Hz 20s-es, ill. 10 Hz 20s-es elektromos téringelés relaxálja a prekontrahált tengerimalac coecum taeniát atropin ( $10^{-6}$  M) és guanetidin ( $3 \times 10^{-6}$  M) jelenlétében. A válaszok reprodukálhatók. Kalibrációk: függőleges - a maximális elernyedés, vízszintes - 1 perc.



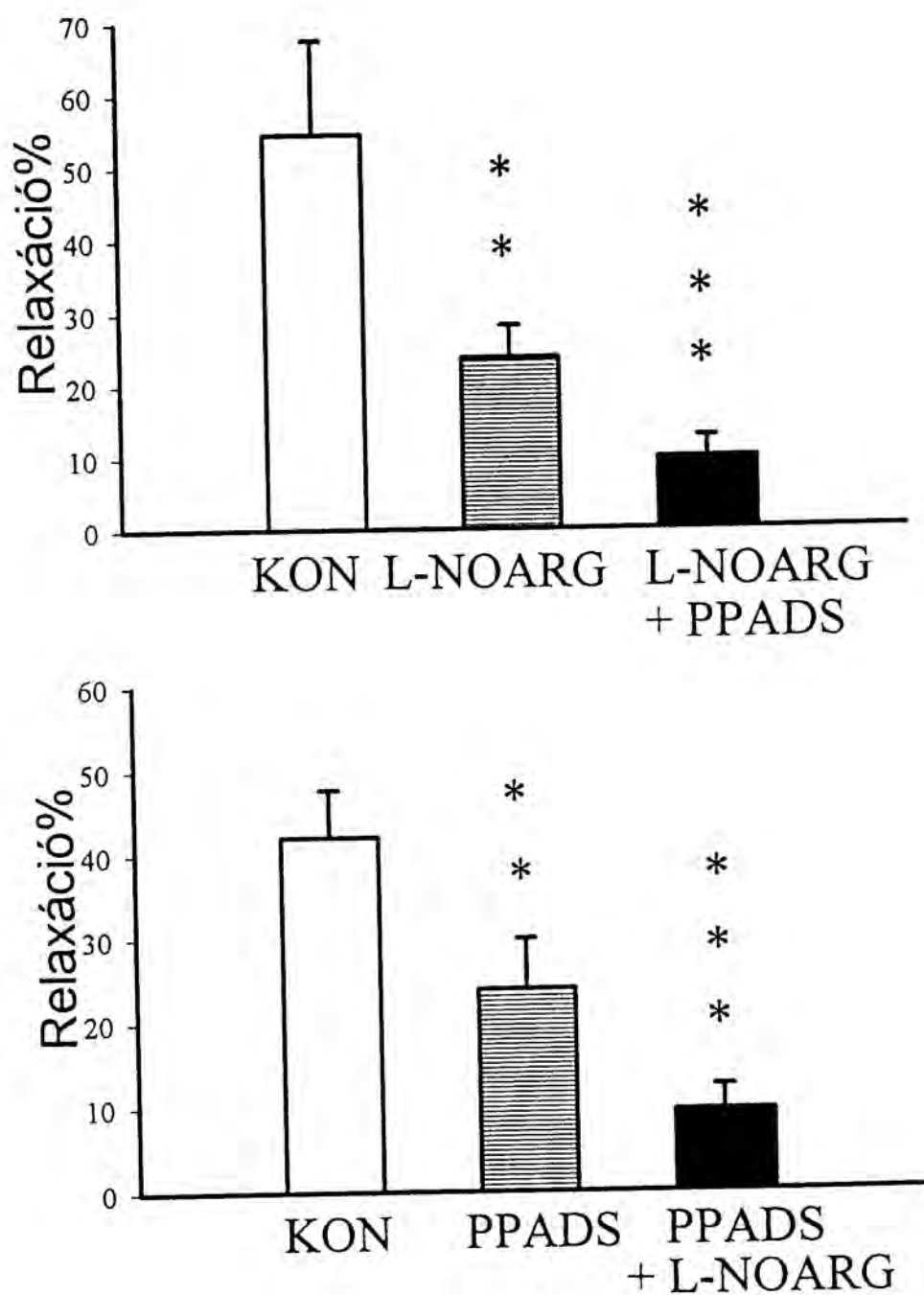
VII.2./2. ábra

Tengerimalac taenia coecki a téringelés (1 Hz, 20 s)-okozta NANC relaxációt L-NOARG kb. a felére csökkenti, PPADS a választ tovább redukálja. Kalibrációk: függőleges - a max. relaxáció 50%-a, vízszintes - 1 perc.



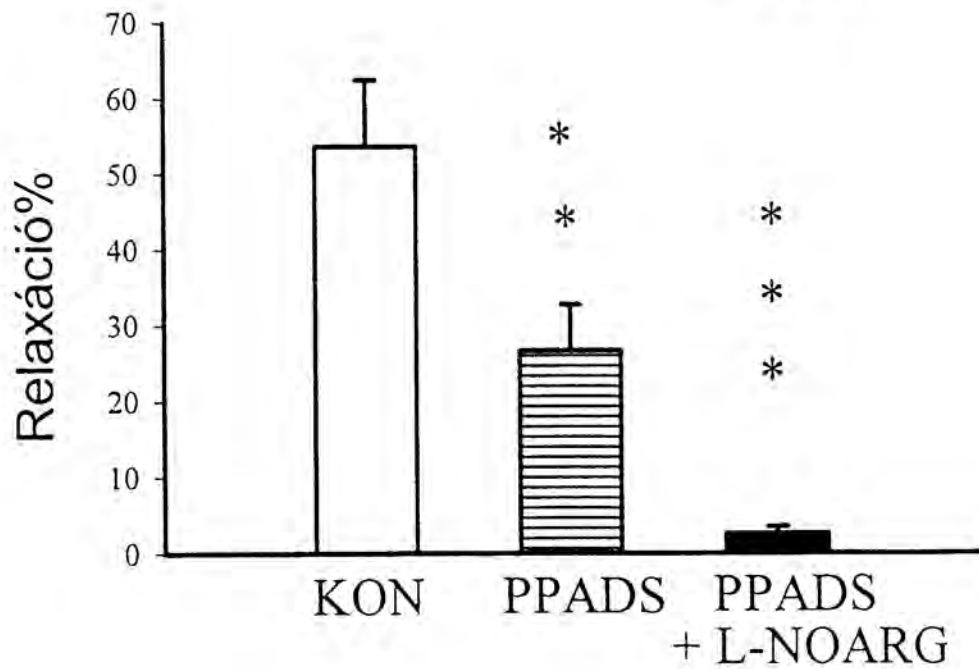
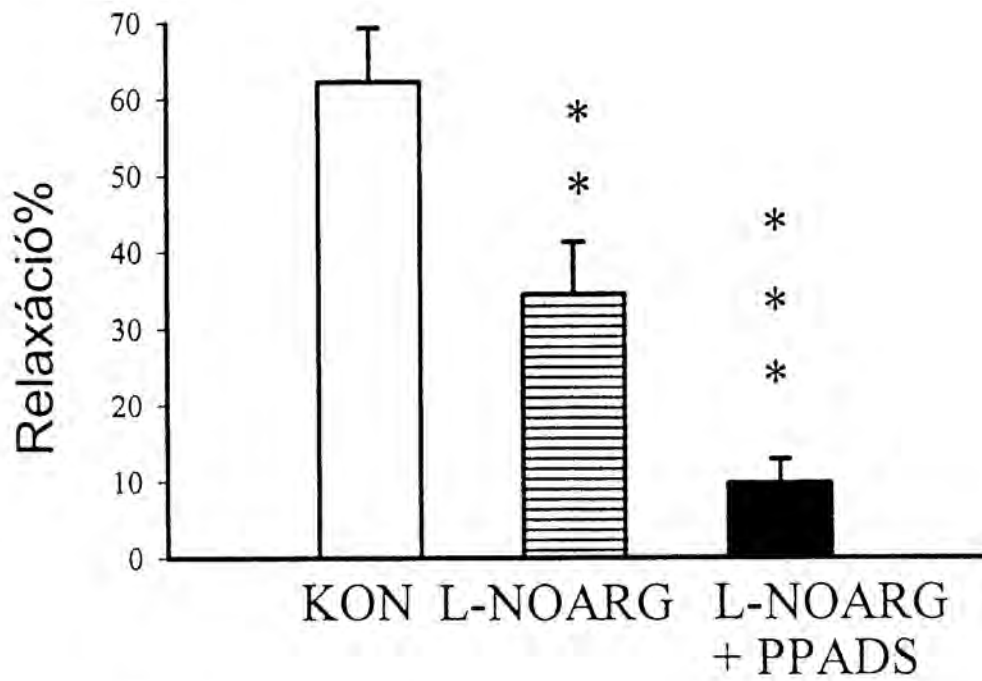
VII.2./3. ábra

A NANC relaxációt (1 Hz, 20 s-es ingerlés) PPADS is kb. felére csökkenti, L-NOARG hozzáadása a választ tovább gátolja. Kalibráció: ld. előző ábra.



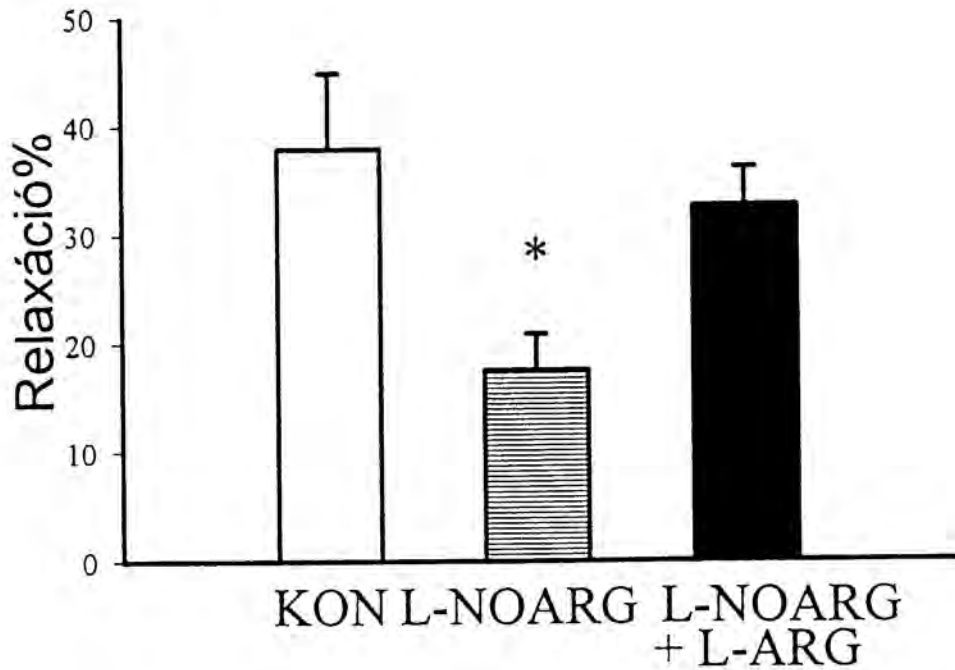
VII.2./4. ábra

1 Hz-es NANC ingerlés relaxáló hatása L-NOARG ( $10^{-4}$  M), PPADS ( $5 \times 10^{-5}$  M), ill. a két gátlószer együttes jelenlétében a maximális elernyedés %-ában kifejezve. Az adatokat átlag $\pm$ S.E.M. formában adtuk meg, n=6-6. A statisztikai értékelés Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával készült.



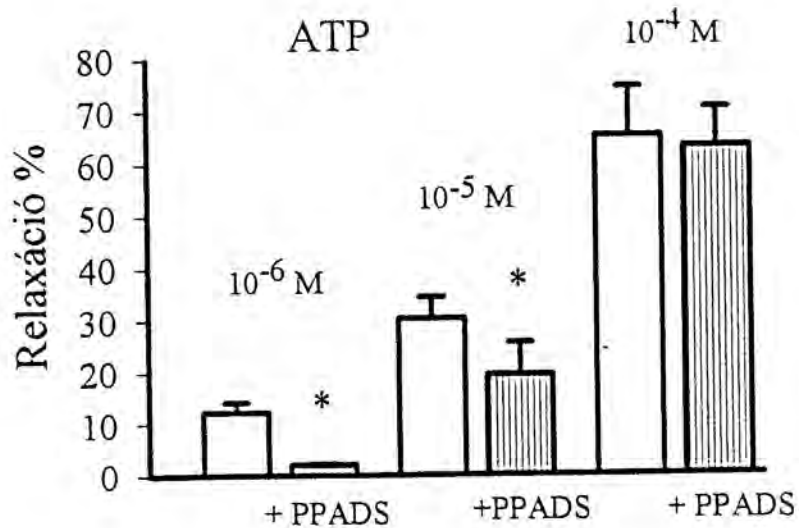
VII.2./5. ábra

10 Hz-es NANC ingerlés relaxáló hatása L-NOARG ( $10^4$  M), PPADS ( $5 \times 10^5$  M) és kombinált alkalmazásuk után tengerimalac coecum taenián. Az adatokat átlag $\pm$ S.E.M. formában adtuk meg, n=5-5. A statisztikai értékelés Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával készült.



VII.2./6. ábra

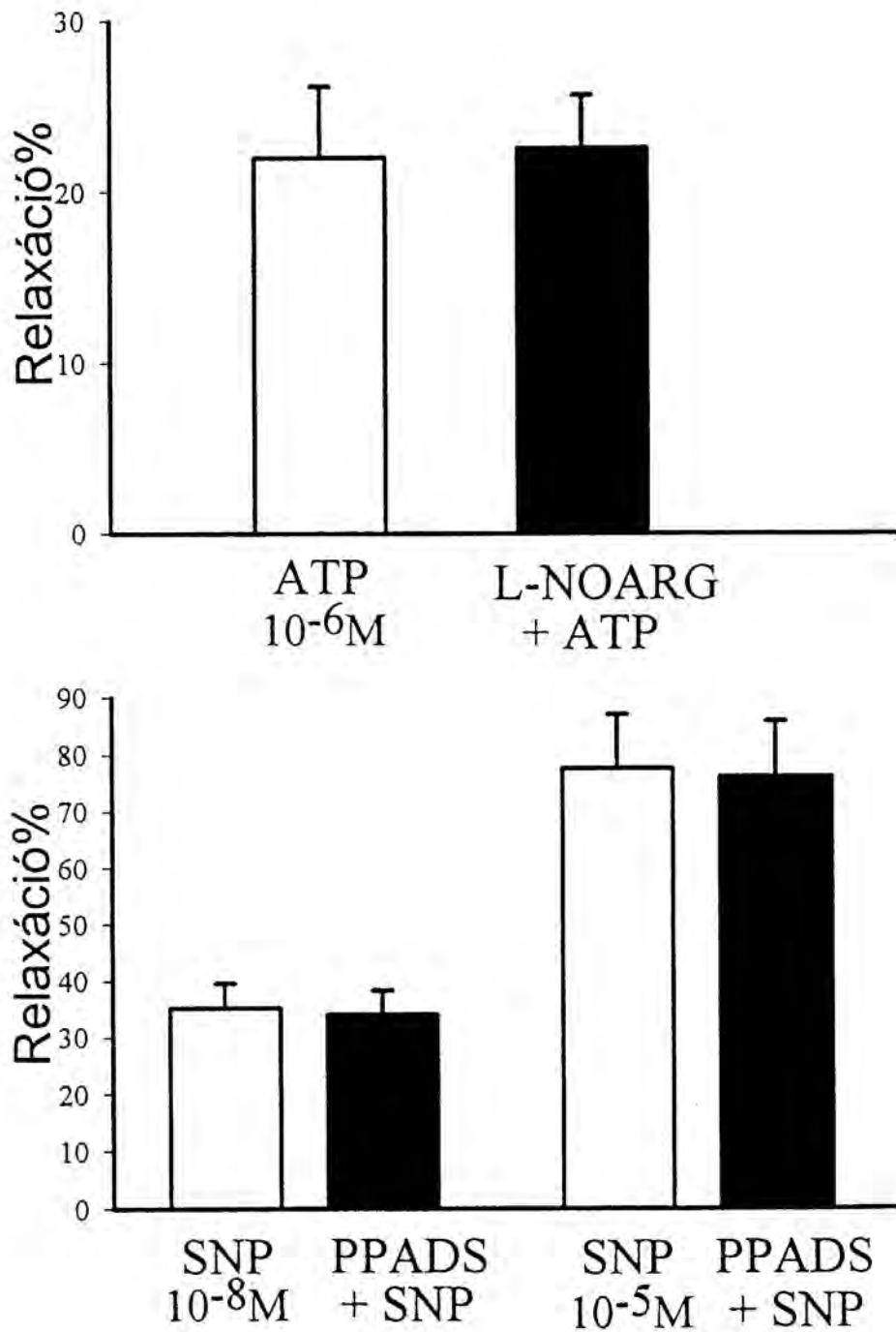
Taenia coecin NANC idegingerlés (1 Hz) relaxáló hatását L-NOARG ( $10^{-4}$  M) kb. felére csökkenti, L-arginin ( $10^{-7}$  M) e gátlást visszafordítja. Az adatokat átlag $\pm$ S.E.M. formában adtuk meg, n=7. A statisztikai értékelést Quade teszttel készítettük.



VII.2./7. ábra

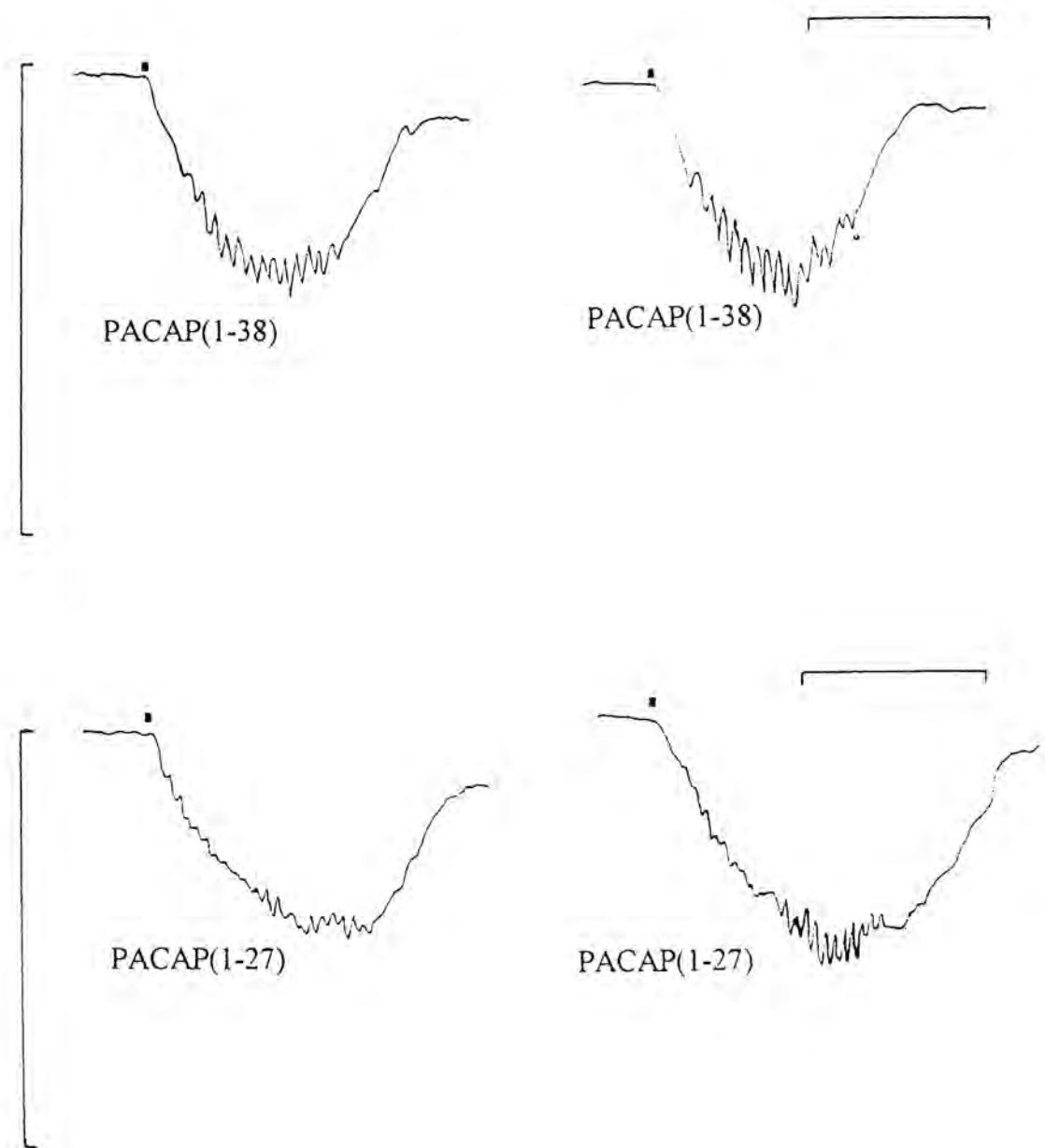
Taenia coecin az ATP ( $10^{-6}$  -  $10^{-4}$  M) koncentráció-függő módon relaxálja az izomzatot. Az exogén ATP hatását a  $P_2$  purinoceptor antagonistá PPADS gátolja ( $10^{-6}$  M és  $10^{-5}$  M koncentrációnál). Az adatokat átlag $\pm$ S.E.M. formában adtuk meg, n=5-6. A statisztikai értékelés Wilcoxon-féle előjeles rangpróbával készült.





VII.2./8. ábra

Tengerimalac coecum taenián az ATP (10<sup>-6</sup> M) relaxáló hatását a NOS-gátló L-NOARG (10<sup>-4</sup> M) nem gátolja. Hasonlóan, a nitroprusszid-nátrium (SNP, 10<sup>-8</sup> M, ill. 10<sup>-5</sup> M)-okozta elernyedést a purinoceptor antagonistá PPADS nem csökkenti. Az adatokat átlag±S.E.M. formában adtuk meg, n=5-7.



VII.2./9. ábra  
 PACAP(1-38) ( $10^{-8}$  M) és PACAP(1-27) ( $10^{-8}$  M) relaxáló hatása a prekontrahált taenia coecini. A válaszok reprodukálhatók. Kalibrációk: függőleges - a maximális elernyedés, vízszintes - 1 perc.

## Megbeszélés

Eredményeink azt bizonyítják, hogy tengerimalac coecum taenián az ideg-közvetített NANC relaxációban az NO, egy  $P_2$  purinoceptor agonista (valószínűleg az ATP) és egy neuropeptid transzmitter (PACAP/VIP) is szerepet játszik.

Leírták hogy taenia coecin a NANC relaxációt apamin csökkenti (Mackenzie és Burnstock, 1980), ami fölvetette purinerg transzmitter (ATP?) szerepét a válaszban, mivel az ATP gátló hatásaiban az apamin-érzékeny  $K^+$  csatornák szerepet játszanak (Maas és mtsai, 1980). Újabban azonban kiderült, hogy a PACAP-okozta relaxáció is apamin-érzékeny (Schwörer és mtsai, 1992). Az ATP részvételére vonatkozóan az adatok nem egyértelműek az irodalomban (ld. Bevezetés). Az NO szerepét a válaszban a legtöbb eddigi eredmény nem támogatja (ld. Bevezetés).

Ezen adatokkal szemben saját kísérleteinkben L-NOARG jelentősen csökkentette az ideg-közvetített elernyedést mindkét vizsgált ingerlési frekvenciánál. Az L-NOARG hatása kb. azonos a  $P_2$  purinoceptor antagonistá PPADS gátló hatásával; mindkét gátlószer elsőként adva, a relaxációt kb. 40-40%-kal csökkenti. A két gátlószer additív hatású, kombinációban alkalmazva a két anyag az elernyedést csaknem teljesen kivédi. Annak ellenére, hogy az L-NOARG-ot igen nagy koncentrációban alkalmaztuk, részben visszafordítható volt gátló hatása L-argininnel, ami specifikus "nitreg" mechanizmus részvételét bizonyítja. Hogy mi a magyarázata az egymásnak ellentmondó eredményeknek az NO szerepével kapcsolatban, az nem teljesen világos; mi elsősorban módszertani különbségekre gondolunk. A korábbi egyetlen, az NO-részvételét támogató adat (Piotrowski és mtsai, 1993), ill. jelen eredményeink izotóniás regisztrációval készültek, a NOS gátlók hatástalanságáról szóló adatok pedig izometriás mérések segítségével. Saját izometriás kísérleteinkben 1 és 10 Hz-es ingerlésnél is gátolta az L-NOARG (első szerként adva) a relaxációt, de az izotóniás méréseinkhez képest jóval kisebb mértékben (hasonló különbséget a kétféle regisztrálási módnál PPADS gátló hatásánál is tapasztaltunk). Másodikként adva mindkét szer jelentős gátló hatást fejtett ki. Shuttleworth és mtsai (1999) (egyébként izometriás módszert használva) megerősítik az NO részvételét a NANC relaxáció mediálásában. Adataik szerint az NO elsősorban a tónusos relaxációban játszik szerepet, és kevésbé a gyors, kezdeti elernyedésben. Ez összeegyeztethető a mi kísérleti eredményeinkkel, mivel mindkét vizsgálatban hosszú ingersorozatokkal történt az ingerlés.

Eredményeink szerint a PPADS gátolja a NANC elernyedést a taenián, az exogén ATP okozta relaxációt úgyszintén. Ezek alapján valószínű, hogy endogén  $P_2$  purinoceptor

izgató (ATP) részt vesz az idegingerlés-mediált NANC relaxációban.

Egyes adatok szerint a neuropeptid VIP és PACAP transzmitter szerepet játszik a NANC gátlásban tengerimalac taenia coecin (Grider és mtsai, 1985b; Jin és mtsai, 1994; McConalogue és mtsai, 1995a). Jelen eredményeink is támogatják az NO-n és az ATP-n kívül további NANC gátló transzmitter részvételét a relaxációban, de konklúzióink jelentősen eltérnek a fenti szerzőkétől.

Kísérleteinkben a PACAP antagonista PACAP(6-38) ( $3 \times 10^{-6}$  M) kivédte a PACAP-okoza szub-maximális relaxációt taenia coecin, azonban hasonlóképpen a VIP elernyesztő hatását is. A legújabb nomenklatura szerint (Harmar és mtsai, 1998) a VIP és a PACAP három különböző receptor típuson 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 szintén kötődik a PACAP(6-38) (Harmar és mtsai, 1998). 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 (ld. korábban).

Eredményeink részben megerősítik Jin és mtsai (1994) adatait, miszerint taenia coeci diszpergált simaizomsejtjein a PACAP-okoza relaxáció kivédhető PACAP(6-38) ( $10^{-5}$  M) alkalmazásával. Ezen tanulmány szerint azonban különbség tehető a PACAP-, ill. a VIP-okoza relaxáció között a PACAP(6-38), ill. VIP(10-28) segítségével, ami szemben áll jelen eredményeinkkel. (A dolgozat alapján nem világos, vajon a fentiek taenia-stripre is vonatkoznak-e vagy csak diszpergált sejtekre.) Ugyanakkor a PACAP(6-38) nem befolyásolta az izoprenalin, vagy az ATP relaxációs hatását saját kísérleteinkben, tehát gátló hatása nem aspecifikus. A munkacsoportunk által elvégzett kiegészítő kísérletek azt mutatták, hogy a VIP(10-28) nem gátolja taenián az exogén VIP hatását. Tengerimalac coecum körkörös izomzatán jelen eredményeinkhez hasonlóan a PACAP(6-38) gátolja mind a PACAP, mind a VIP elernyesztő hatását (Motomura és mtsai, 1998), ezzel szemben patkány distalis colonban leírták, hogy a PACAP(6-38) gátolja a PACAP-indukált relaxációt, viszont a VIP-okoza elernyedést nem (Kishi és mtsai, 1996).

Kísérleteinkben megpróbáltuk tisztázni, hogy PACAP-szerű peptid szerepet játszik-e a NANC relaxációban a taenia coecin 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.

Míg a PACAP(1-27)-tachyphylaxia erősen gátolta a NANC relaxációt, a PACAP antagonistá PACAP(6-38) csak enyhén csökkentette azt, annak ellenére, hogy a VIP- vagy PACAP-okozta elernyedést mind a tachyphylaxia, mind az antagonistá teljesen kivédte. Eredményeink arra utalnak, hogy a VIP/PACAP peptidnek csak kis szerepe van a NANC relaxációban. Úgy gondoljuk, az endogén PACAP/VIP részvételének vizsgálatához biztonságosabb módszer a receptor antagonistá használata, szemben a tachyphylaxia alkalmazásával, aminek során nem zárható ki a nagy dózisú agonista esetleges prejunkcionális, transzmitter-felszabadulást befolyásoló hatása.

Egyes adatok szerint VIP antiszérum (Grider és mtsai, 1985b) vagy VIP antagonistá (Grider és Rivier, 1990) erősen gátolja a NANC relaxációt és PACAP(1-27) tachyphylaxia gátolja az elektromos ingerlés-okozta membrán hiperpolarizációt (McConalogue és mtsai, 1995b) taenia coecin. Jin és mtsai (1994) leírták, hogy mind a PACAP(6-38), mind a feltételezett VIP antagonistá VIP(10-28) gátolja az elektromos ingerlés-okozta relaxációt taenia coecin, és a két antagonistá együttes alkalmazásakor a gátlás kb. 70-90%-os. Saját, PACAP(6-38) alkalmazásával végzett kísérleteink részben megerősítik Jin és mtsai (1994) eredményeit, miszerint az antagonistá gátolja az elektromos ingerlés-okozta elernyedést, azonban a VIP/PACAP részvételének mértéke a válaszban a mi eredményeink szerint jóval szerényebb. A válasz tehát alapvetően nem peptiderg.

További kísérletekben vizsgáltuk a VIP/PACAP kapcsolatát más NANC neurotranszmitterekkel (NO, ATP) az elektromos ingerlés-okozta elernyedés közvetítésében taenia coecin. Eredményeink szerint a NANC relaxáció VIP/PACAP-közvetített komponense átfedésben van a purinerg komponenssel, mivel a PACAP(6-38) teljesen hatástalannak bizonyult PPADS jelenlétében (vagy PPADS és L-NOARG együttes jelenlétében). L-NOARG-előkezelés önmagában azonban nem befolyásolta a PACAP(6-38) gátló hatását.

A purinerg transzmitter (ATP) és VIP/PACAP közötti interakció mechanizmusa nem világos. Mind az ATP, mind a VIP, az NO és a PACAP direkt, tetrodotoxin-rezisztens relaxációt okoz taenia coecin (Grider és mtsai, 1985b; Schwörer és mtsai, 1992). Ugyanakkor az ATP (Barthó és mtsai, 1999a), a VIP és a PACAP (Williams és North, 1979; Cohen és Landry, 1980; Rattan és Chakder, 1998; Katsoulis és mtsai, 1993b; Pang és Kline, 1998), ill. az NO (Barthó és Lefebvre, 1994; Hebeiss és Kilbinger, 1996) is képes myentericus neuronokat stimulálni tengerimalac ileumon. A VIP, és kevésbé a PACAP, ezen neuron-izgató hatása PACAP(6-38) alkalmazásával szintén gátolható (Barthó és mtsai, 2000, in

press). Mindenesetre taenia coecin a téringerlés- okozta válasz PPADS-érzékeny komponensében valószínű szerepe van VIP/PACAP transzmitternek, mely ideg- és/vagy simaizom-izgatás révén fejti ki hatását.

### *Konklúziók*

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az NO és az ATP jelentős mértékben (kb. 40-40%-ban) felelős az elektromos téringerlés által létrehozott NANC relaxációért tengerimalac coecum taenián és együtthatásuk additív.

A feltételezett PACAP receptor antagonistá PACAP(6-38) gátolja mind a PACAP, mind a VIP elernyesztő hatását taenia coecin.

VIP/PACAP neurotranszmitter eredményeink szerint csak kismértékben játszik szerepet a NANC relaxáció mediálásában, és a VIP/PACAP-által közvetített komponens átfedésben van a válasz purinerg összetevőjével.

## *VII. 3. Endogén $P_2$ purinoceptor agonista moduláló hatásának kimutatása a vékonybél kolinerg válaszára*

### *Bevezetés*

Az extracelluláris ATP (elsősorban neurotranszmitterként) főleg a  $P_2$  purinoceptorokon ( $P_{2x}$ ,  $P_{2y}$ , stb.), az AMP és az adenzin (irodalmi adatok alapján elsősorban neuromodulátorok) főként  $P_1$  purinoceptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. Az ATP neurotranszmitter funkciója mellett ko-transzmitterként is működik, ill. lehetséges neuromodulátor szerepe is.

A  $P_2$  purinoceptor antagonistá PPADS számos szövetben gátolja a  $P_2$  purinoceptorok által közvetített válaszokat (Lambrecht és mtsai, 1992; Ziganshin és mtsai, 1993) és alkalmas ideg-közvetített válaszokban az endogén purinoceptor izgató anyagok lehetséges részvételének igazolására (Zagorodnyuk és mtsai, 1996). Miközben kísérleteinkben vizsgáltuk a PPADS specifikusságát, ill. gátló hatásait a  $P_{2x}$  receptor agonista  $\alpha,\beta$ -metilén ATP okozta indirekt (kolinerg) kontrakcióval szemben (Moody és Burnstock, 1982; Sperlágh és Vizi, 1991; Kennedy és Humphrey, 1994), megfigyeltük, hogy a PPADS az elektromos ingerlés okozta kolinerg kontrakciót csökkenti. Jelen munkánkban megvizsgáltuk, hogy a

PPADS okozta gátlás a PPADS specifikus, purinoceptor antagonistá hatásából ered-e, vagy simaizom-kontraktilitást csökkentő nem-specifikus gátló hatás, ill. általános transzmitter-felszabadulás csökkentő hatás-e.

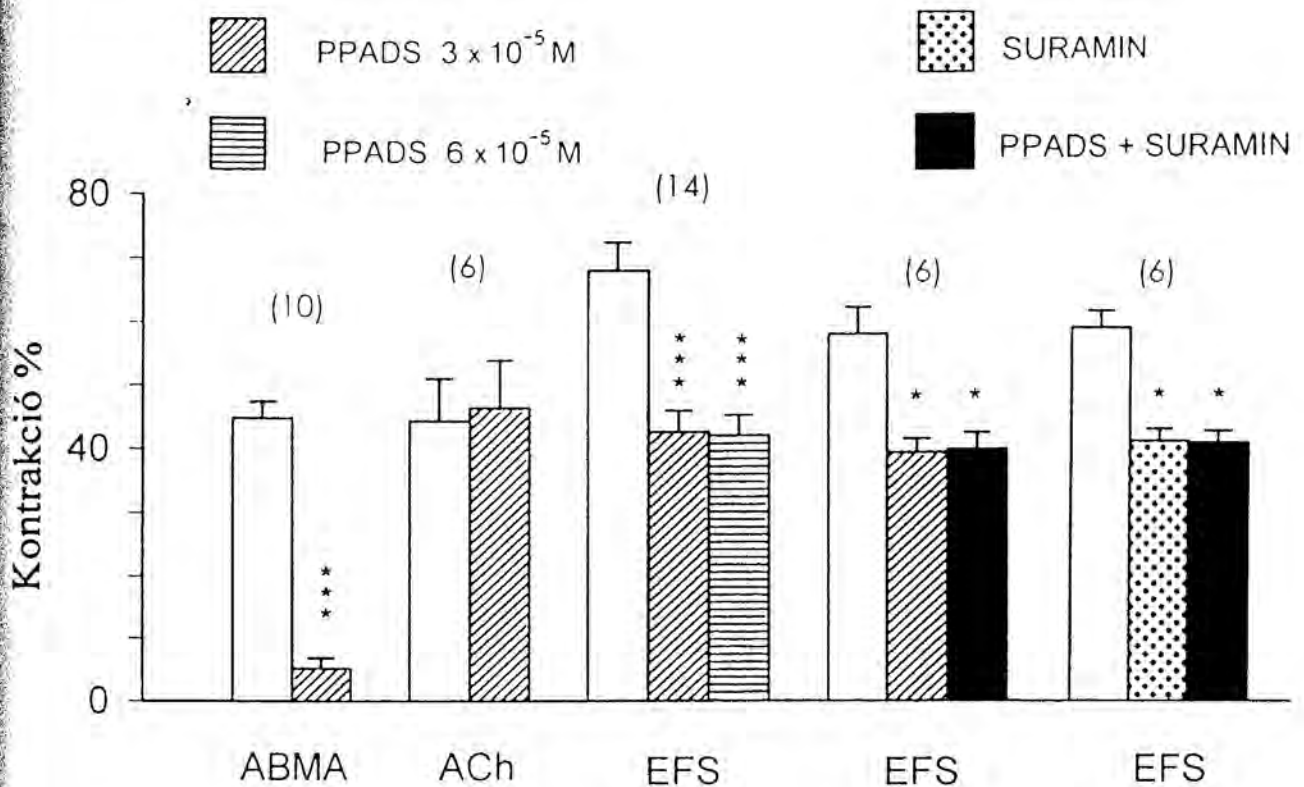
### *Módszerek*

Tengerimalac izolált ileum szakaszait 37°C-os, oxigenizált Krebs-oldatban inkubáltuk. A preparátumok hosszanti mozgásait regisztráltuk izotóniásan, 6 mN feszülés mellett. A kontrakciók nagyságát az acetilkolin ( $10^{-5}$  M) okozta maximális hosszanti izom spazmus %-ában fejeztük ki. Elektromos téringerlést (60 V, 0,1 ms impulzusszélesség, 5 Hz, 5 s-ig atropin nélkül, ill. 80 V, 0,1 ms, 5 Hz, 20 s atropin ( $10^{-6}$  M) jelenlétében) a fürdők alján és tetején elhelyezett platina elektróda-pár segítségével végeztünk. Korábbi kísérleteinkben az 5 Hz 5 s-es ingerlés okozta kontrakciót atropin ( $10^{-6}$  M) több mint 90%-ban gátolta, mind az 5, mind a 20 másodperces ingerlés hatását tetrodotoxin ( $10^{-6}$  M) kivédte. A felhasznált anyagok: PPADS, suramin,  $\alpha,\beta$ -metilén ATP (RBI); tetrodotoxin, acetilkolin (Sigma). A kontaktusidő PPADS esetében 30 perc, suraminnál 40,  $\alpha,\beta$ -metilén ATP-nél 2 perc volt. Adatainkat előző munkáinkhoz hasonlóan átlag $\pm$ S.E.M. formában adtuk meg.

### *Eredmények*

Az  $\alpha,\beta$ -metilén ATP ( $10^{-5}$  M) kb. fél-maximális, gyors kontrakciót okozott, mely gyakorlatilag kolinerg összehúzódnak bizonyult, mivel atropin ( $10^{-6}$  M) csaknem teljesen kivédte (a gátlás  $95,4\pm 1,2\%$ -os volt) (VII.3./1. ábra). Az  $\alpha,\beta$ -metilén ATP-mediált kontrakció 20 másodpercen belül megszűnt, de reprodukálható volt 20-30 perces kimosási periódusok után. PPADS ( $3\times 10^{-5}$  M) erősen gátolta az  $\alpha,\beta$ -metilén ATP hatását (a gátlás  $87,4\pm 3,2\%$ -os csökkenés,  $n=10$ ) (VII.3./1. ábra),  $10^{-5}$  M -os koncentrációjú PPADS kisebb fokú gátlást eredményezett ( $n=3$ ). Suramin ( $10^{-4}$  M), mely szintén  $P_2$  purinoceptor antagonistá (Fredholm és mtsai, 1994), szintén csökkentette az  $\alpha,\beta$ -metilén ATP hatásait ( $55,5\pm 3,9\%$ -os gátlás,  $n=11$ ). Mind a PPADS, mind a suramin kb. 30-30%-kal gátolta az elektromos ingerlés okozta kolinerg kontrakciót, viszont az exogén acetilkolin ( $3-10\times 10^{-8}$  M) okozta kb. fél-maximális összehúzódnak nem befolyásolta (VII.3./1. ábra). Nagyobb mértékű gátlást már nem eredményezett az elektromos ingerlés hatásában, ha a PPADS dózisát megkétszereztük ( $6\times 10^{-5}$  M). A PPADS és a suramin gátló hatása nem adódik össze; további gátlást nem okozott, ha a PPADS ( $3\times 10^{-5}$  M) után suramint ( $10^{-4}$  M) adtunk vagy megfordítva.

Atropin jelenlétében az elektromos téringerlés (5 Hz, 20 s) okozta NANC összehúzódást PPADS ( $3 \times 10^{-5}$  M) nem befolyásolta (a kontrakció  $45,3 \pm 1,3\%$  PPADS előtt, ill.  $45,0 \pm 1,5\%$  PPADS jelenlétében,  $n=6$ ).



VII.3./1. ábra

$\alpha, \beta$ -metilén ATP ( $\alpha, \beta$ -me-ATP,  $10^{-5}$  M), acetilkolin (ACh,  $3 \cdot 10^{-8}$  M) és elektromos téringerlés (EFS, 5 Hz, 5 s) összehúzó hatása tengerimalac ileumon az acetilkolin ( $10^{-5}$  M) okozta maximális kontrakció %-ában kifejezve. Az üres oszlopok a PPADS ( $3-6 \times 10^{-5}$  M) vagy suramin ( $10^{-4}$  M) kezelés előtti kontroll válaszokat mutatják. A kezelt csoportok kódjait ld. az oszlopok felett. A zárójelekben a kísérletek száma található. A szignifikáns eltéréseket csillagok jelzik: \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$ .



### *Megbeszélés*

Tengerimalac ileumon a PPADS hatásos  $P_2$  purinoceptor antagonistának bizonyult. Bár más szövetekben leírtak a PPADS-sel kapcsolatban nem-specifikus hatásokat is (Vigne és mtsai, 1996), jelen kísérleteinkben az anyag csupán az  $\alpha, \beta$ -metilén ATP kontraktilis hatását gátolta erősen, az exogén acetilkolin, ill. az elektomos ingerlés okozta atropin-rezisztens összehúzódást nem befolyásolta. Valószínűleg a PPADS, ill. a suramin kolinerg kontrakciót csökkentő hatása valószínűleg prejunkcionális szinten jut érvényre, mivel az exogén acetilkolin okozta összehúzódást nem csökkentették. Az, hogy a két gátlószer nem additív módon csökkenti a választ szintén ellene szól annak, hogy esetleg valamilyen nem-specifikus módon gátolnák a kolinerg neuronokat. Ismert, hogy a plexus myentericus idegsejtjein purinerg gyors izgató potenciálok mutathatók ki (ld. többek közt LePard és mtsai, 1997; Barthó és mtsai, 1999a). Az endogén purinerg izgató(k) ezen hatása szerepet játszhat a jelen kísérletekben kimutatott kolinerg modulációban.

### *Konklúzió*

Összegésképpen megállapíthatjuk, hogy egy vagy több endogén  $P_2$  purinoceptor izgató anyag (ATP?) valószínűleg pozitív modulátorként hat az idegingerlés-okozta acetilkolin felszabadulásra. Az idegingerléssel kiváltott atropin-rezisztens, tachikinin-mediált kontrakciót (ld. Barthó és Holzer, 1985) nem befolyásolja a PPADS, bizonyítva, hogy a szer nem rendelkezik nem-specifikus, általános transzmitter-felszabadulást moduláló hatással.

## *VII. 4. Tachikinin receptorok szerepe a kapszaicin "lokális efferens" motoros válaszában tengerimalac nyelőcsőben*

### *Bevezetés*

A kapszaicin-érzékeny primer afferens neuronok számos neuropeptid és más, nem-peptid természetű feltételezett neurotranszmitter-anyagot tartalmaznak, például a tachikininekhez tartozó P-anyagot és neurokinin-A-t (Szolcsányi, 1984, 1993; Costa és mtsai, 1987; Holzer, 1988; Maggi és mtsai, 1994a; Maggi, 1995). Ezen neurotranszmitterek résztvesznek a primer afferensek "lokális efferens" működésében, vagyis a biológiailag aktív anyagok a primer afferensek idegvégződéseiből felszabadulva ugyanazon szövetben efferens

válaszokat váltanak ki. Ilyen válaszreakciók pl. az antidiromos vasodilatatio és a neurogén plazma-extravasatio a bőrben és a nyálkahártyákban, vagy a zsigeri szervek mozgásválaszai kapszaicin-érzékeny idegvégződések izgatásakor (monográfia: Geppetti és Holzer, 1996).

Régóta ismert, hogy a kapszaicin összehúzóást okoz tengerimalac ileumon. Széles körben elfogadott, hogy ezen kontrakcióban szerepe van a myentericus neuronoknak, melyeket a kapszaicin-érzékeny primer afferensekből felszabaduló transzmitter-anyagok aktiválnak (Barthó és Szolcsányi, 1978; Barthó és mtsai, 1982a; Szolcsányi és Barthó, 1978; ld. Barthó és Holzer, 1995; Holzer és Barthó, 1996). Hogy mely transzmitterek játszanak szerepet a myentericus neuronok aktiválásában, még nem tisztázott kellőképpen. Az ileumon pl. úgy tűnik, hogy az acetilkolin (nikotin-receptorokon hatva), kolecisztokinin-szerű peptid, vagy a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) nem vesz részt a kapszaicin kontrakciós hatásában (Barthó és Holzer, 1985; Barthó és mtsai, 1987; Barthó és mtsai, 1993). Ugyanakkor számos adat (főleg P-anyag tachyphylaxia alkalmazásával nyert eredmények) a tachykininek lehetséges neuronális izgató szerepét támogatja (Barthó és mtsai, 1982a; Chahl, 1982; Barthó és Holzer, 1985). Azonban az újabb, specifikus receptor antagonisták segítségével kapott eredmények nem egyértelműen támogatják a tachykininek részvételét a kapszaicin-okozta motoros válaszban. Kapszaicin izgató hatását a perisztaltikus reflexre pl. nem védi ki tachykinin  $NK_1$  és  $NK_2$  receptor antagonisták kombinált alkalmazása (Barthó és Holzer, 1995). Továbbá a specifikus tachykinin  $NK_3$  receptor antagonista SR 142801 nem gátolja az ileumon a kapszaicin-okozta összehúzóást (Patacchini és mtsai, 1995). Ez utóbbi eredmény meglepő azon adatok ismeretében, melyek szerint a tachykinin  $NK_3$  receptorok főként a myentericus neuronokon található az ileumban (Laufer és mtsai, 1985; Mann és mtsai, 1997), és farmakológiai (Crocini és mtsai, 1995; Guard és Watson, 1987), ill. elektrofiziológiai (Hanani és mtsai, 1988) eredmények szerint  $NK_3$  receptorok ingerlése idegmediált hatásokat vált ki. Vannak adatok, melyek az  $NK_1$  és  $NK_2$  receptorok jelenlétét is bizonyítják a myentericus neuronokon (Gradyh és mtsai, 1996; Legat és mtsai, 1992; Portbury és mtsai, 1996a, 1996b; Stermini és mtsai, 1995; ld. Holzer és Holzer-Petsche, 1997; Maggi és mtsai, 1993). A neuronális  $NK_2$  receptorok többnyire az idegvégződések varicositásain fordulnak elő, kevésbé a ganglionsejteken (Gradyh és mtsai, 1996; Portbury és mtsai, 1996a). Ezen adatok alapján elméletileg mind a három tachykinin receptor szerepet játszhat a kapszaicin-érzékeny idegek izgató hatásában a myentericus neuronokon.

Tengerimalac nyelőcsőben kimutattak P-anyagot tartalmazó neuronokat (Leander és

mtsai, 1982), ill. a nervus vagusból eredő kapszaicin-érzékeny funkcionális beidegzést (Kerr és mtsai, 1995). Tachykinin agonisták segítségével kapott eredmények valószínűsítik mind a három tachykinin receptor ( $NK_1$ ,  $NK_2$  és  $NK_3$ ) jelenlétét a nyelőcsőben (Kerr és mtsai, 1997). Saját előzetes kísérleteinkben kapszaicin ideg-közvetített hosszanti izom összehúzódást okozott a nyelőcsövön. Mivel P-anyag és neurokinin-A indirekt, tetrodotoxin-érzékeny összehúzódást hozott létre ezen szövetben (saját, nem-publicált eredményeink), lehetségesnek tűnik, hogy a kapszaicin okozta kontrakcióban 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 a kapszaicin kontraktilis hatásában tengerimalac nyelőcsövön.

### Módszerek

350-450 g súlyú tengerimalacokat leöltünk, majd a mellkas és a hasüreg felnyitása után a nyelőcsövet teljes hosszában kipreparáltuk. A nyelőcsövek proximális 1 cm-es részét eltávolítottuk, majd a maradék szövetet horizontálisan átvágva két preparátumot készítettünk minden nyelőcsőből. A hosszanti izommozgásokat izometriás jelátalakítókkal (Experimetria, Budapest) kompenzográfyon regisztráltuk, a kezdeti feszülés 10 mN volt. Mivel a proximális és distalis nyelőcső-részek működése között nem találtunk különbséget, a kísérleti eredményeket összevontuk. A szöveteket karbogén-gázzal buborékolgatott Krebs-oldatban, szervfürdőkben inkubáltuk. A kísérleteket kb. 1,5 órás ekvibrációs periódus után kezdtük meg. Az összehúzódások nagyságát a kísérletek végén adott KCl ( $2 \times 10^{-1}$  M) okozta maximális összehúzódás %-ában adtuk meg.

Bizonyos kísérletek kivételével (amelyekben a tachyphylaxia hatását vizsgáltuk) a kapszaicint ( $10^{-6}$  M) a preparátumokon csak egyszer alkalmaztuk. Az adatokat átlag $\pm$ S.E.M. formában adtuk meg, a statisztikai összehasonlításokhoz Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk, és  $p < 0,05$  probabilitás esetén tekintettük az eltéréseket szignifikánsnak. Egy állatból csoportonként maximum két preparátumot használtunk. A kontroll-preparátumok ugyanazon állatokból származtak, mint a kezelték.

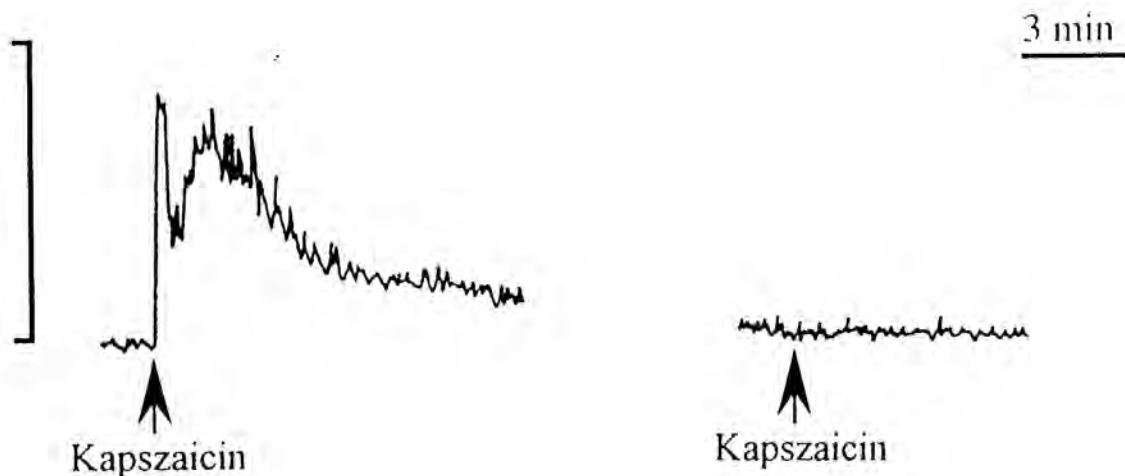
A felhasznált anyagok: Tachykinin receptor antagonisták: [O-Pro<sup>9</sup>,(spiro- $\gamma$ -lactam)Leu<sup>10</sup>, Trp<sup>11</sup>]physalaemin(1-11) (GR 82334), c[[ $(\beta$ -D-GlcNAc)Asn-Asp-Trp-Phe-Dpr-Leu]c(2 $\beta$ -5 $\beta$ )] (MEN 11420), (S)-(N)-(1-(3-(1-benzoyl-3-(3,4-dichlorophenil)piperidin-3-yl)propyl)-4-phenylpiperidine-4-yl)-N-methylacetamide (SR 142801). További anyagok:

atropin hidroklorid, carbachol, hisztamin hidroklorid, kapszaicin, tetrodotoxin (Sigma).  
Előkezelésként a kontaktus idők a következők voltak: GR 82334: 20-30 perc, MEN 11420:  
30 perc, SR 142801: 50-70 perc, atropin: 20 perc, tetrodotoxin: 15 perc.

A törzsoldatokat és oldószereiket ld. Barthó és mtsai, 1999b. A szolvensek nem okoztak semmilyen hatást az alkalmazott koncentrációkban.

### Eredmények

Kapszaicin ( $10^{-6}$  M, 10 percig alkalmazva) kétfázisú kontrakciót okozott tengerimalac nyelőcsövön (VII.4./1. ábra). Második kapszaicin beadás ( $10^{-6}$  M, 60 perccel az első kimosása után) nem okozott összehúzódást ( $n=4$ ). A kapszaicin kontrakciós hatását tetrodotoxin ( $5 \times 10^{-7}$  M) teljesen kivédte ( $n=5$ ). Atropin ( $10^{-6}$  M) kivédte a válasz első, gyors komponensét, a második fázist erősen csökkentette (VII.4./2. ábra).

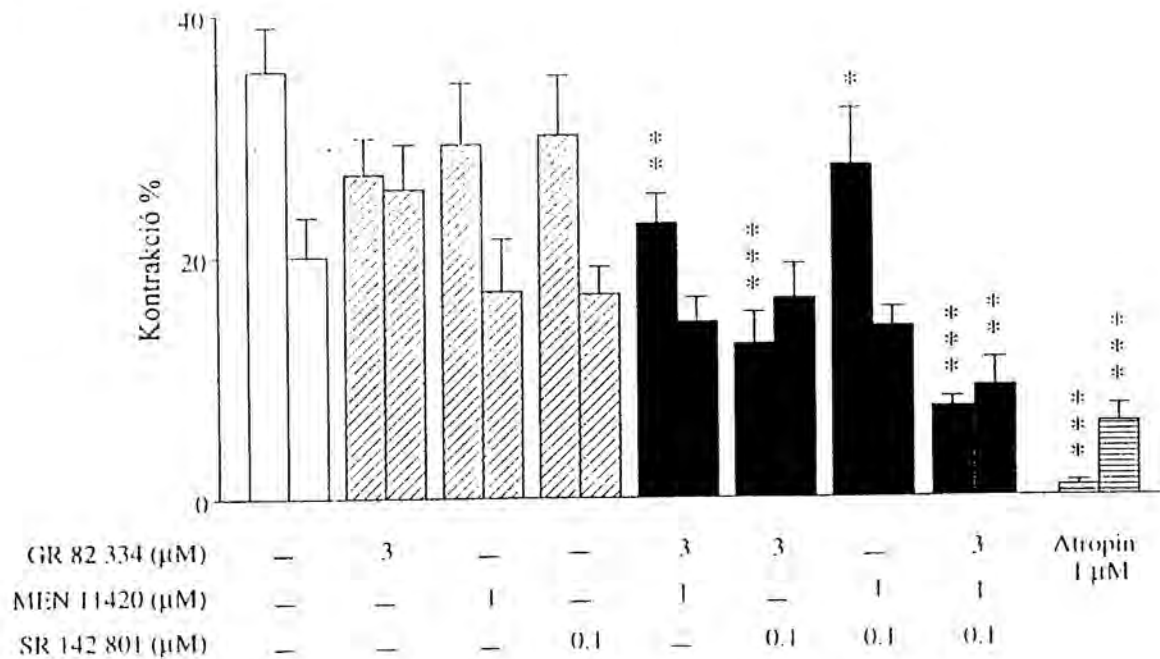


VII.4./1. ábra

Kapszaicin ( $10^{-6}$  M) összehúzó hatása tengerimalac nyelőcsövön. Második kapszaicin alkalmazás (60 perccel az első beadást követően) gyakorlatilag hatástalan. Független kalibráció: a KCl ( $2 \times 10^{-1}$  M)-kiváltotta maximális kontrakció 40%-a.

A tachykinin  $NK_1$ ,  $NK_2$  és  $NK_3$  receptorok részvételét a kapszaicin összehúzó hatásában a receptor antagonisták GR 82334 ( $3 \times 10^{-6}$  M), MEN 11420 ( $10^{-6}$  M) és SR 142801 ( $10^{-7}$  M) segítségével vizsgáltuk. Külön-külön alkalmazva egyik antagonistát sem okozott szignifikáns gátlást a kapszaicin kontraháló hatásában (VII.4./2. ábra). Bármelyik két tachykinin receptor antagonistát kombinált beadásánál az első fázis szignifikánsan csökkent, mindhárom antagonistát jelenlétében a teljes válasz erősen gátlódott (a redukció kb. 80%-os volt az első fázisnál és kb. 55%-os a másodikonál) (VII.4./2. ábra).

Külön kísérletekben vizsgáltuk, hogy a tachykinin receptor antagonisták (ugyanolyan koncentrációkban és kontaktus-időkkel, mint az előző kísérletekben) rendelkeznek-e esetleg valamilyen nem-specifikus hatással is. Nyelőcső preparátumokon a hármas tachykinin receptor antagonisták kombináció (GR 82334 + MEN 11420 + SR 142801) nem okozott változást a kolinerg agonista carbachol ( $5 \times 10^{-7}$ - $10^{-6}$  M) kiváltotta összehúzó hatásban ( $54,3 \pm 3,8\%$  és  $54,8 \pm 4,4\%$  az antagonisták beadása előtt, ill. jelenlétében,  $n=8$ ), ill. a hisztamin ( $5 \times 10^{-6}$ - $10^{-5}$  M) okozta kontrakcióban ( $48,1 \pm 4,4\%$ , ill. az antagonisták beadása után  $49,3 \pm 4,6\%$ -os válasz,  $n=8$ ).



VII.4./2. ábra

Tachykinin antagonisták és atropin hatásai a kapszaicin ( $10^{-6}$  M) kontraktilis válaszára tengerimalac nyelőcsövön. A hosszanti izom-összehúzó mozgások a KCl ( $2 \times 10^{-1}$  M)-okozta maximális kontrakció %-ában vannak kifejezve. Minden oszloppár esetében az első oszlop a gyors, a második a lassúbb kontrakciós fázist mutatja. Az előkezeléseket az oszlopok alatt tüntettük fel. A csillagok a szignifikáns eltéréseket mutatják az üres oszloppárral jelzett kontroll csoporttól (\* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ ;  $n=6-9$ ).

## Megbeszélés

Eredményeink szerint a tachykininek részt vesznek a kapszaicin összehúzó hatásában tengerimalac nyelőcsövön. Az általunk használt tachykinin receptor antagonisták hatásosak és szelektívek a megfelelő receptorokra (Catalioto és mtsai, 1998; Croci és mtsai, 1995; Emonds-Alt és mtsai, 1993; Hagan és mtsai, 1991; Maggi és mtsai, 1994a,b; Patacchini és mtsai, 1995, 1997).

Ezen kísérletek alapján a kapszaicin hatásában résztvevő endogén tachykinin természete pontosan nem határozható meg. Mind a P-anyag, mind a neurokinin-A szerepet játszhat a válaszban: az idegsejteken mind a három tachykinin receptor ( $NK_1$ ,  $NK_2$  és  $NK_3$ ) típus megtalálható (ld. Bevezetés), és az endogén P-anyag, ill. neurokinin-A nem-szelektív módon izgatja a receptorokat (bár a P-anyag az  $NK_1$ , a neurokinin-A pedig az  $NK_2$  receptorokat preferálja). Meg kell jegyezni, hogy mind a korábbi tanulmányokban (Barthó és Szolcsányi, 1978; Barthó és mtsai, 1982a), mind jelen eredményeink szerint (atropin előkezelés) a fő végső mediátor a kapszaicin összehúzó 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 aktiválja a myentericus neuronokat (bár a tachykinin antagonisták enyhe posztjuncionális moduláló hatását nem lehet teljesen kizárni).

További lehetőség, hogy az acetilkolin magukból a kapszaicin-érzékeny idegvégződésekből is felszabadul. A primer afferensekben kolin-acetiltranszferáz immunreaktivitást mutattak ki (Sann és mtsai, 1995). Acetilkolin a myentericus neuronokat nikotin-receptorok izgatásával aktiválhatja. Ugyanakkor a kapszaicin-okozta kontrakció korábbi eredmények szerint nem gátolható ganglionbénító szerekkel (Barthó és Szolcsányi, 1978; Szolcsányi és Barthó, 1978). Az, hogy az így felszabadult acetilkolin közvetlenül izgatná a simaizomzatot, szintén nem valószínű, mivel a szenzoros idegvégződésekből a transzmitterek felszabadulása tetrodotoxin-rezisztens (Szolcsányi, 1984), jelen válaszainkat viszont a tetrodotoxin gátolja.

Eredményeink szerint tengerimalac nyelőcső preparátumokon a kapszaicin-okozta kontrakcióban tachykininek szerepet játszanak. A tachykinin  $NK_1$ ,  $NK_2$  és  $NK_3$  receptorok kombinált, supra-additív módon vesznek részt a válaszban. Úgy gondoljuk, hogy ezen receptorok aktiválják az intrinszik kolinerg neuronokat; szerepük főként a kontrakció kezdeti, gyors komponensében jelentős. A második, tónusos fázisban egy atropin-rezisztens (de tetrodotoxin-érzékeny) összetevő mutatható ki, mely egy nem-kolinerg izgató transzmitter-

anyag jelenlétét jelzi. (Ez az atropin-rezisztens komponens azonban túl kicsi volt a további vizsgálatokhoz.) Azt az elképzelésünket, hogy a kapszaicin-érzékeny idegekből felszabaduló tachykininek aktiválják a kolinerg myentericus neuronokat, alátámasztják azok az adatok is, melyek szerint a nyelőcsövön a P-anyag és a neurokinin-A indirekt, ideg-közvetített összehúzódást okoz (ld. Bevezetés). A szelektív NK<sub>3</sub> receptor izgató [MePhe<sup>7</sup>]neurokinin-B (Kerr és mtsai, 1997), és senktide (saját, nem-publikált eredményeink) szintén indirekt, ideg-mediált összehúzódást okoznak.

### *Konklúziók*

Eredményeink azt bizonyítják, hogy endogén tachykininek szerepet játszanak a kapszaicin kontrakciós hatásában tengerimalac nyelőcsövön. Valószínűleg mindhárom tachykinin receptor típus (tachykinin NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> és NK<sub>3</sub>) részt vesz a válaszban és együtt hatásuk szupra-additív. A válasz végső közvetítője az acetilkolin.

## VIII. 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 mozgásválaszokat közvetítő ingerületátvivő anyagokat. A vizsgálat tárgyát képező idegek a gastrointestinalis traktus belső (intrinszik) 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 anyag az acetilkolin.

Bizonyítottuk, hogy a nitrogénmonoxid (NO) állandó, tónusos gátlást tart fenn tengerimalac ileum körkörös izomzatán és ez közvetíti a morfin izomtónust fokozó hatását. Hasonló tónusos gátlás a hosszanti izomzat esetében nem mutatható ki.

Tisztáztuk, hogy - az irodalmi adatokkal ellentétben - az NO jelentős mértékben részt vesz az elektromos téringerlés okozta NANC relaxációban tengerimalac coecum taenián. Kimutattuk, hogy ebben a válaszban egy másik fontos NANC gátló neurotranszmitter, az ATP is szerepet játszik és hatása az NO-éval additív.

A PACAP-antagonistaként számontartott PACAP(6-38) jellemzése során azt találtuk, hogy az anyag egyaránt gátolja a PACAP és a VIP elernyesztő hatását taenia colin. PACAP(6-38) segítségével kimutattuk, hogy VIP/PACAP-szerű anyag szerepet játszik a taenia coli NANC elernyedésében, bár befolyása kisebb mértékű, mint az NO-é vagy az ATP-é. A válasz VIP/PACAP-mediált összetevője teljes átfedést mutat a purinerg válasszal.

Kimutattuk, hogy tengerimalac ileumon endogén  $P_2$  purinoceptor agonista (valószínűleg az ATP) pozitív irányban modulálja az acetilkolin felszabadulását az idegsejtekből.

Bizonyítottuk, hogy tengerimalac nyelőcsövön a kapszaicin-okozta kontrakcióban tachykininek szerepet játszanak és ebben a hatásban mind a három tachykinin receptor altípus részt vesz, supra-additív módon.

Az értekezésben foglalt eredmények alapkutatási jellegűek, és a gyomor-bélhuzam mozgásai mechanizmusainak jobb megértését szolgálják. Hosszú távon ezek az eredmények is hozzájárulhatnak a kóros változások felderítéséhez, diagnosztikájához és terápiájához.



## **IX. Irodalomjegyzék**

- Adamou JE, Aiyar N, Van Horn S, Elshourbagy NA (1995): Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 209: 385-392
- Allescher HD, Tougas G, Vergara P, Lu S, Daniel EE (1992): Nitric oxide as a putative noradrenergic noncholinergic inhibitory transmitter in the canine pylorus in vivo. *Am J Physiol* 262: G695-702
- Arimura A (1992): Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of research. *Regul Pept* 37: 287-303
- Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Miyata A, Mizuno K, Coy DH, Kitada C (1991): Tissue distribution of PACAP as determined by RIA: Highly abundant in the rat brain and testes. *Endocrinology* 129: 2787-2789
- Bao JX (1993): Sympathetic neuromuscular transmission in rat tail artery. *Acta Physiol Scand Suppl* 610: 1-58
- Barthó L, Szolcsányi J (1978): The site of action of capsaicin on the guinea-pig isolated ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 305: 75-81
- Barthó L, Holzer P, Lembeck F, Szolcsányi J (1982a): Evidence that the contractile response of the guinea-pig ileum to capsaicin is due to substance P. *J Physiol Lond* 332: 157-167
- Barthó L, Holzer P, Donnerer J, Lembeck F (1982b): Evidence for the involvement of substance P in the atropine-resistant peristalsis of the guinea-pig ileum. *Neurosci Lett* 32: 69-74
- Barthó L, Sebők B, Szolcsányi J (1982c): Indirect evidence for the inhibition of enteric substance P neurons by opiate agonists but not capsaicin. *Eur J Pharmacol* 77: 273-279
- Barthó L, Holzer P, Lembeck F (1983): Sympathetic control of substance P releasing enteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neurosci Lett* 38: 291-296
- Barthó L, Holzer P (1985): Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility. *Neuroscience* 16: 1-32
- Barthó L, Holzer P, Lembeck F, Lippe ITh, Setnikar I (1987): Evaluation of a new and potent cholecystokinin antagonist on motor responses of the guinea-pig intestine. *Br J Pharmacol* 90: 753-761
- Barthó L, Holzer P, Leander S, Lembeck F (1989): Evidence for an involvement of substance P, but not cholecystokinin-like peptides, in hexamethonium-resistant intestinal peristalsis. *Neuroscience* 28: 211-217
- Barthó L, Santicioli P, Patacchini R, Maggi CA (1992a): Tachykininergic transmission to the circular muscle of the guinea-pig ileum: evidence for the involvement of NK2 receptors. *Br J Pharmacol* 105: 805-810
- Barthó L, Kóczán G, Pethő G, Maggi CA (1992b): Blockade of nitric oxide synthase inhibits nerve-mediated contraction in the rat small intestine. *Neurosci Lett* 145: 43-46
- Barthó L, Pethő G (1993): Cholinergic neurons are involved in the effect of substance P on the circular muscle of the guinea-pig small intestine. In: *Cell Injury and Protection in the Gastrointestinal Tract: from Basic Sciences to Clinical Perspectives*, ed. Mózsik Gy, Pár A, Csomós G, Kitajima M, Kondo M, Pfeiffer CJ, Rainsford KD, Sikiric P, Szabó S; Akadémiai Kiadó, Budapest, 1993, pp. 311-316
- Barthó L, Kóczán G, Maggi CA (1993): Studies on the mechanism of the contractile action of rat calcitonin gene-related peptide and of capsaicin on the guinea-pig ileum: effect of hCGRP(8-37) and CGRP tachyphylaxis. *Neuropeptides* 25: 325-329
- Barthó L, Lefebvre R (1994): Nitric oxide induces acetylcholine-mediated contractions in the guinea-pig small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 350: 582-584
- Barthó L, Maggi CA, Wilhelm M, Patacchini R (1994): Tachykinin NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptors mediate atropine-resistant ileal circular muscle contractions evoked by capsaicin. *Eur J Pharmacol* 259: 187-193
- Barthó L, Holzer P (1995): The inhibitory modulation of guinea-pig intestinal peristalsis caused by capsaicin involves calcitonin gene-related peptide and nitric oxide. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 353: 102-109
- Barthó L, Lefebvre R (1995): Nitric oxide-mediated contraction in enteric smooth muscle. *Arch Int Pharmacodyn Théor* 329: 53-66
- Barthó L, Lénárd L Jr, Lázár Zs, Maggi CA (1999a): Connections between P<sub>2</sub> purinoceptors and capsaicin-sensitive afferents in the intestine and other tissues. *Eur J Pharmacol* 375: 203-210
- Barthó L, Lénárd L Jr, Patacchini R, Halmai V, Wilhelm M, Holzer P, Maggi CA (1999b): Tachykinin receptors are involved in the "local efferent" motor response to capsaicin in the guinea-pig small intestine and oesophagus. *Neuroscience* 90: 221-228
- Barthó L, Lázár Zs, Lénárd L Jr, 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* (in press)
- Bayguinov O, Sanders KM (1993): Regulation of neuronal responses in the canine pyloric sphincter by opioids. *Br J Pharmacol* 108: 1024-1030
- Bayliss WM, Starling EH (1899): The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol* 24: 99-143
- Bertaccini G (1982): Substance P. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, ed. Bertaccini G; Springer, Berlin, 1982, 59/II, pp. 85-105
- Biancini P, Walsh JH, Behar J (1984a): Vasoactive intestinal polypeptide: A neurotransmitter for lower esophageal sphincter relaxation. *J Clin Invest* 73: 963-967
- Biancini P, Walsh JH, Hillemeier C, Behar J (1984b): Role of VIP and PHI in internal anal sphincter (IAS) relaxation. *Dig Dis Sci* 29: 10S
- Bitar KN, Makhlof GM (1982): Relaxation of isolated gastric smooth muscle cells by vasoactive intestinal polypeptide. *Science* 216: 531-533
- Bloom SR, Edwards AV (1980): Vasoactive intestinal peptide in relation to atropine resistant vasodilatation in the submaxillary gland of the cat. *J Physiol (Lond)* 300: 41-53
- Bodanszky M, Klausner YS, Said SI (1973): Biological activities of synthetic peptide corresponding to fragments of and to the entire sequence of the vasoactive intestinal peptide. *Proc Natl Acad Sci* 70: 382-384
- Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bogers JJ, Bult H, De Man JG, Oosterbosch L, Herman AG, Van Maercke YM (1991): Release of nitric oxide upon stimulation of nonadrenergic noncholinergic nerves in the rat gastric fundus. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 441-447
- Boeckxstaens GE, De Man JG, Pelckmans PA, Herman AG, Van Maercke YM (1993):  $\alpha_2$ -adrenoceptor-mediated modulation of the nitrergic innervation of the canine isolated ileocolonic junction. *Br J Pharmacol* 109: 1079-1084
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990): Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-770
- Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Jordaens FH, Van Maercke YM, Herman AG (1990): Nitric oxide as an inhibitory non adrenergic non cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345: 346-347
- Burcher E, Shults CW, Buck SH, Chase TN, O'Donohue TL (1984): Autoradiographic distribution of substance K binding sites in rat gastrointestinal tract: a comparison with substance P. *Eur J Pharmacol* 102: 561-562
- Burks TF (1994): Neurotransmission and neurotransmitters. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd ed., ed. Johnson LR; Raven Press, New York, 1994, pp. 211-242
- Burleigh DE (1992):  $N^G$ -nitro-L-arginine reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxations of human gut. *Gastroenterology* 102: 679-683
- Burnstock G, Campbell G, Bennett M, Holman ME (1963): Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli. *Nature* 200: 581-583
- Burnstock G, Campbell G, Rand MJ (1966): The inhibitory innervation of the taenia of the guinea-pig caecum. *J Physiol (Lond)* 182: 504-526
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A (1970): Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic nerves in the gut. *Br J Pharmacol* 40: 668-688
- Burnstock G (1972): Purinergic nerves. *Pharmacol Rev* 24: 509-560
- Burnstock G (1978): A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones*, ed. Bolis L, Straub W; Raven Press, New York, 1978, pp. 107-118
- Burnstock G, Kennedy C (1985): Is there a basis for distinguishing two types of  $P_2$ -purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16: 433-440
- Burnstock G (1990): Overview: purinergic mechanisms. *Ann New York Acad Sci* 603: 1-18
- Burnstock G (1997): The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacol* 36: 1127-1139
- Bury RW, Mashford ML (1977): Substance P: its pharmacology and physiological roles. *Aust J Exp Biol Med Sci* 55: 671-735
- Catalioto R-M, Criscuoli M, Cucchi P, Giachetti A, Giuliani S, Lecci A, Lippi A, Patacchini R, Quartara L, Renzetti AR, Tramontana M, Arcamone F, Maggi CA (1998): MEN 11420, a novel glycosylated bicyclic peptide tachykinin  $NK_2$  receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 123: 81-91
- Chahl LA (1982): Evidence that the contractile response of the guinea-pig ileum to capsaicin is due to substance P. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 319: 212-215
- Chang MM, Leeman SE (1970): Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its

- characterization as substance P. *J Biol Chem* 245: 4784-4790
- Christinck F, Jury J, Cayabyab F, Daniel EE (1991): Nitric oxide may be the final mediator of nonadrenergic noncholinergic inhibitory junction potentials in the gut. *Can J Physiol Pharmacol* 69: 1448-1458
- Cohen ML, Landry AS (1980): Vasoactive intestinal polypeptide: Increased tone, enhancement of acetylcholine release and stimulation of adenylate cyclase in intestinal smooth muscle. *Life Sci* 26: 811-822
- Costa M, Furness JB (1979): The sites of action of 5-hydroxytryptamine in nerve-muscle preparations from the guinea-pig small intestine and colon. *Br J Pharmacol* 65: 237-248
- Costa M, Cuello AC, Furness JB, Franco R (1980): Distribution of enteric neurons showing immunoreactivity for substance P in the guinea-pig ileum. *Neurosci* 5: 323-331
- Costa M, Furness JB, Llewellyn-Smith IJ, Cuello AC (1981): Projections of substance P neurons within the guinea-pig small intestine. *Neurosci* 6: 411-424
- Costa M, Furness JB, Llewellyn-Smith IJ (1987): Histochemistry of the enteric nervous system. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 2nd ed., ed. Johnson LR, Christensen J, Jackson MJ, Jacobson ED, Walsh JH; Raven Press, New York, 1987, pp. 1-40
- Costa M, Brookes SJ (1994): The enteric nervous system. *Am J Gastroenterol* 89: (Suppl) S129-S137
- Crist JR, He XD, Goyal RK (1992): Both ATP and the peptide VIP are inhibitory neurotransmitters in guinea-pig ileum circular muscle. *J Physiol (Lond)* 447: 119-131
- Croci T, Landi M, Emonds-Alt X, LeFur G, Manara L (1995): Neuronal NK-3 receptors in the guinea-pig ileum and taenia coli: in vitro characterization by their first non-peptide antagonist, SR 142 801. *Life Sci* 57: 361-366
- D'Amato M, Curro D, Montuschi P (1992): Evidence of dual components in the non-adrenergic non-cholinergic relaxation in the rat gastric fundus: role of endogenous nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide. *J Auton Nerv Sys* 37: 175-186
- Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH (1991): Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7797-7801
- Dent J, Dodds WJ, Hogan WJ, Wood JD, Amdorfer RC (1979): Depressant effect of sodium nitroprusside on the lower esophageal sphincter of the opossum. *Gastroenterology* 76(4): 784-789
- Desai KM, Sessa WC, Vane JR (1991): Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature* 351: 477-479
- Desai KM, Warner TD, Bishop AE, Polak JM, Vane JR (1994): Nitric oxide, and not vasoactive intestinal peptide, as the main neurotransmitter of vagally induced relaxation of the guinea-pig stomach. *Br J Pharmacol* 113: 1197-1202
- Dhasmana MK, Zhu YN, Cruz SL, Villalón CM (1993): Gastrointestinal effects of 5-hydroxytryptamine and related drugs. *Life Sci* 53: 1651-1661
- Dockray GJ (1994): Physiology of enteric neuropeptides. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 3rd ed., ed. Johnson LR; Raven Press, New York, 1994, pp. 169-209
- Domschke S, Domschke W, Bloom SR, Mitznegg P, Mitchell SJ, Lux G, Strunz U (1978): Vasoactive intestinal polypeptide in man: pharmacokinetics, metabolic and circulatory effects. *Gut* 19: 1049-1053
- Donaldson LF, Haskell CA, Hanley MR (1996): Functional characterization by heterologous expression of a novel cloned tachykinin peptide receptor. *Biochem J* 320: 1-5
- Eklund S, Fahrenkrug J, Jodal M, Lundgren O, Schaffalitzky de Muckadell OB, Sjoquist A (1980): Vasoactive intestinal polypeptide, 5-hydroxytryptamine and reflex hyperaemia in the small intestine of the cat. *J Physiol (Lond)* 302: 549-557
- Emonds-Alt X, Doutremepuich J-D, Heaulme M, Neliat G, Santucci V, Steinberg R, Vilain P, Bichon D, Ducoux J-P, Proietto V, Van Broeck D, Soubrié P, Le Fur G, Breliere J-C (1993): In vitro and in vivo biological activities of SR 140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK<sub>1</sub> receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 250: 403-413
- Euler US von, Gaddum JH (1931): An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol (Lond)* 72: 74-87
- Fahrenkrug J, Galbo H, Holst JJ, Schaffalitzky DE, Muckadelli OB (1978): Influence of the autonomic nervous system on the release of vasoactive intestinal polypeptide from the porcine intestinal tract. *J Physiol (Lond)* 280: 405-422
- Fahrenkrug J (1989): VIP and autonomic neurotransmission. *Pharmacol Ther* 41: 515-534
- Fahrenkrug J (1993): Transmitter role of vasoactive intestinal peptide. *Pharmacol Toxicol* 72: 354-363
- Fedan JS, Hogaboom GK, O'Donnell JP, Colby J, Westall DP (1981): Contributions by purines to the neurogenic response of the vas deferens of the guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 69: 41-53

- Folkow B, Uvnäs B (1948): The chemical transmission of vasoconstrictor impulses to the hind limbs and the splanchnic region of the cat. *Acta Physiol Scand* 15: 365-388
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M (1994): Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 143-156
- Fujisawa K, Ito Y (1982): The effects of substance P on smooth muscle cells and on neuro-effector transmission in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 76: 279-290
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980): The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376
- Furness JB, Costa M (1980): Types of nerves in the enteric nervous system. *Neurosci* 5: 1-20
- Furness JB, Costa M, Eckenstein F (1983): Neurones localised with antibodies against choline acetyltransferase in the enteric nervous system. *Neurosci Lett* 40: 105-109
- Furness JB, Costa M (1987): The enteric nervous system. Churchill Livingstone
- Furness JB, Pompolo S, Shuttleworth CWR, Burleigh DE (1992a): Light- and electron-microscopic immunohistochemical analysis of nerve fibre types innervating the taenia coli of the guinea-pig caecum. *Cell Tissue Res* 270: 125-137
- Furness JB, Bornstein JC, Murphy R, Pompolo S (1992b): Roles of peptides in transmission in the enteric nervous system. *Trends Neurosci* 15: 66-71
- Furness JB, Young HM, Pompolo S, Bornstein JC, Kunze WAA, McConalogue K (1995): Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. *Gastroenterology* 108: 554-563
- Furness JB, Kunze WAA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC (1998): Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol* 54: 1-18
- Geppetti P, Holzer P (1996): Neurogenic inflammation. CRC Boca Raton
- Gershon MD, Kirchgessner AL, Wade PR (1994): Functional anatomy of the enteric nervous system. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd ed., ed. Johnson LR; Raven Press, New York, 1994, pp. 381-422
- Gerstenberg TC, Metz P, Ottesen B, Fahrenkrug J (1992): Intracavernous self-injection with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and phentolamine in the management of erectile failure. *J Urol* 147: 1277-1279
- Gillespie JS, McGrath JC (1972): The origin of the inhibitory nerve pathway to the rat anococcygeus muscle. *J Physiol (Lond)* 244: 448-458
- Giuliani S, Maggi CA (1995): Effect of SR 142801 on nitric oxide-dependent and independent responses to tachykinin NK<sub>1</sub> receptor agonists in isolated guinea-pig colon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352: 512-519
- Goetzl EJ, Sreedharan S, Turc CW, Bridenbaugh R, Malfroy B (1989): Preferential cleavage of amino- and carboxyl-terminal oligopeptides from vasoactive intestinal polypeptide by human recombinant enkephalinase (neutral endopeptidase, EC3.4.24.11). *Biochem Biophys Res Commun* 158: 850-854
- Goyal RK, Rattan S, Said SI (1980): VIP as a possible neurotransmitter of non-cholinergic non-adrenergic inhibitory neurons. *Nature* 288: 378-380
- Goyal RK, Hirano I (1996): The enteric nervous system. *New England J Med* 334: 1106-1115
- Gradyh EF, Baluk P, Boehm S, Gamp PD, Wong H, Payan DG, Ansel J, Portbury AL, Furness JB, McDonald DM, Burnett NW (1996): Characterization of antisera specific to NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> and NK<sub>3</sub> neurokinin receptors and their utilization to localize receptors in the rat gastrointestinal tract. *J Neurosci* 16: 6975-6986
- Grider JR, Cable MB, Said SI, Makhlof G (1985a): Vasoactive intestinal peptide as a neural mediator of gastric relaxation. *Am J Physiol* 248: G73-G78
- Grider JR, Cable MB, Bitar KN, Said SI, Makhlof G (1985b): Vasoactive intestinal peptide. Relaxant neurotransmitter in taenia coli of the guinea-pig. *Gastroenterol* 89: 36-42
- Grider JR, Makhlof GM (1987): Suppression of inhibitory neural input to colonic circular muscle by opioid peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 243: 205-210
- Grider JR, Makhlof GM (1988): Vasoactive intestinal peptide: transmitter of inhibitory motor neurons of the gut. *Ann N Y Acad Sci* 527: 369-377
- Grider JR, Rivier JR (1990): Vasoactive intestinal peptide (VIP) as transmitter of inhibitory motor neurons of the gut: evidence from the use of selective VIP antagonists and VIP antiserum. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 738-742
- Grider JR, Murthy KS, Jin JG, Makhlof GM (1992): Stimulation nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. *Am J Physiol* 262: G774-G778
- Grider JR (1993): Interplay of VIP and nitric oxide in regulation of the descending relaxation phase of peristalsis. *Am J Physiol* 264: G334-G340

- Grider JR, Jin JG (1993): VIP release and L-citrullin production from isolated ganglia of the myenteric plexus: evidence for regulation of vasoactive intestinal peptide release by nitric oxide. *Neurosci* 54: 521-526
- Guard S, Watson SP (1987): Evidence for NK<sub>1</sub> receptor-mediated tachykinin release in the guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* 144: 409-412
- Gustafsson LE, Wiklund CV, Wiklund NP, Persson MG, Moncada S (1990): Modulation of autonomic neuroeffector transmission by nitric oxide in guinea-pig ileum. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 106-110
- Gustaw P, Pawlik WW, Jacobson ED, Sendur R, Konturek SJ (1995): Role of capsaicin-sensitive neurons in the control of intestinal blood flow and oxygen uptake. *J Physiol Pharmacol* 46: 63-70
- Hagan RM, Ireland SM, Bailey F, McBride C, Jordan CA, Ward P (1991): A spiro lactam conformationally-constrained analogue of physalaemin which is a peptidase resistant, selective NK<sub>1</sub> receptor agonist. *Br J Pharmacol* 102: 168P
- Hanani M, Chorev M, Gilon C, Selinger Z (1988): The actions of receptor-selective substance P analogs on myenteric neurons: an electrophysiological investigation. *Eur J Pharmacol* 153: 247-253
- Hannibal J, Ekblad E, Mulder H, Sundler F, Fahrenkrug J (1998): Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: distribution and effects of capsaicin or denervation. *Cell Tissue Res* 291: 65-79
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, Rawlings SR, Robberecht P, Said AI, Sreedharan SP, Wank SA, Waschek JA (1998): International Union of Pharmacology. XVIII. nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *Pharmacol Rev* 50: 265-270
- Hata FT, Ishii T, Kanada A, Yamano N, Kataoka T, Takeuchi T, Yagasaki O (1990): Essential role of nitric oxide in descending inhibition in the rat proximal colon. *Biochem Biophys Res Commun* 172: 1400-1406
- Hebeiss K, Kilbinger H (1996): Differential effects of nitric oxide donors on basal and electrically evoked release of acetylcholine from guinea-pig myenteric neurones. *Br J Pharmacol* 118: 2073-2078
- Holton FA, Holton P (1954): The capillary dilator substances in dry powders of spinal roots: a possible role of ATP in chemical transmission from nerve endings. *J Physiol (Lond)* 126: 124-140
- Holzer P, Lembeck F (1980): Neurally mediated contraction of ileal longitudinal muscle by substance P. *Neurosci Lett* 17: 101-105
- Holzer P, Lembeck F, Donnerer J (1980): Caerulein, substance P, serotonin and cholinomimetics induce rhythmic contractions of the intestinal circular muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 312: 131-137
- Holzer P (1988): Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neurosci* 24: 739-768
- Holzer P (1991): Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43: 143-201
- Holzer P, Livingston EH, Saria A, Guth PH (1991): Sensory neurons mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. *Am J Physiol* 260: G363-370
- Holzer P, Maggi CA (1993): Stimulation and propagation of the ascending enteric reflex contraction: role of tachykinins and acetylcholine. *Regul Pept* 46: 383-385
- Holzer P, Schület W, Maggi CA (1995): Substance P stimulates and inhibits intestinal peristalsis via distinct receptors. *J Pharm Exp Ther* 274: 322-328
- Holzer P, Barthó L (1996): Sensory neurons in the intestine. In: *Neurogenic Inflammation*, ed. Geppetti P, Holzer P; CRC Press, New York, pp. 153-167
- Holzer P, Holzer-Petsche U (1997): Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol Ther* 73: 173-217
- Holzer P, Lippe IT, Heinemann A, Barthó L (1998): Tachykinin NK<sub>1</sub> and NK<sub>2</sub> receptor-mediated control of peristaltic propulsion in the guinea-pig small intestine in vitro. *Neuropharmacol* 37: 131-138
- Hope GT, Michael GJ, Knigge KM, Vincent SR (1991): Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2811-2814
- Hoyle CHV, Knight GE, Burnstock G (1990): Suramin antagonizes responses to P<sub>2</sub>-purinoceptor agonists and purinergic nerve stimulation in the guinea-pig urinary bladder and taenia coli. *Br J Pharmacol* 99: 617-621
- Hoyle CHV (1992): Transmission: purines. In: *Autonomic Neuroeffector Mechanisms*, ed. Burnstock G, Hoyle CHV; Harwood Academic Publishers, Chur, 1992, pp. 367-407
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrus RE, Chandhuri G (1987): Endothelium-derived relaxing factor

- produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 9265-9269
- Itoh N, Obata KI, Yanaihara N, Okamoto H (1983): Human prepro-vasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. *Nature* 304: 547-549
- Jeohn GH, Takahashi K (1995): Purification and characterization of a vasoactive intestinal polypeptide-degrading endoprotease from porcine antral mucosal membranes. *J Biol Chem* 270: 7809-7815
- Jin JG, Katsoulis S, Schmidt WE, Grider JR (1994): Inhibitory transmission in taenia coli mediated by distinct vasoactive intestinal peptide and apamin-sensitive pituitary adenylate cyclase activating peptide receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 433-439
- Johansson O, Lundberg JM (1981): Ultrastructural localization of VIP-like immunoreactivity in large densecored vesicles of cholinergic-type nerve terminals in cat exocrine glands. *Neurosci* 5: 847-862
- Kasakov L, Burnstock G (1983): The use of the slowly degradable analogue,  $\alpha,\beta$ -methylene ATP, to produce desensitisation of the  $P_2$ -purinoceptor: effect of non-adrenergic, non-cholinergic responses of the guinea-pig urinary bladder. *Eur J Pharmacol* 86: 291-294
- Katayama Y, North RA (1978): Does substance P mediate slow synaptic excitation within the myenteric plexus? *Nature* 274: 387-388
- Katayama Y, North RA, Williams JT (1979): The action of substance P on neurons of the myenteric plexus of the guinea-pig small intestine. *Proc R Soc B* 206: 191-208
- Katsoulis S, Schmidt WE, Clemens A, Schwörer H, Creutzfeldt W (1992): Vasoactive intestinal polypeptide induces neurogenic contraction of guinea-pig ileum. Involvement of acetylcholine and substance P. *Regul Pept* 38: 155-164
- Katsoulis S, Clemens A, Schwörer H, Creutzfeldt W, Schmidt WE (1993a): Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) is a potent relaxant of the rat ileum. *Peptides* 14: 587-592
- Katsoulis S, Clemens A, Schwörer H, Creutzfeldt W, Schmidt WE (1993b): PACAP is a stimulator of neurogenic contraction in guinea-pig ileum. *Am J Physiol* 265: G295-G302
- Katsoulis S, Schmidt WE (1996): Role of PACAP in the regulation of gastrointestinal motility. *Ann N Y Acad Sci* 805: 364-378
- Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F (1977): Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 3: 23-35
- Keef KD, Schuttleworth CWR, Xue C, Bayguinov O, Publicover NG, Sanders KM (1994): Relationship between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in enteric inhibitory neurotransmission. *Neuropharmacol* 33: 1303-1314
- Kennedy C, Burnstock G (1985a): Evidence for two types of  $P_2$ -purinoceptor in longitudinal muscle of rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol* 111: 49-56
- Kennedy C, Burnstock G (1985b): ATP produces vasodilation via  $P_1$  purinoceptors and vasoconstriction via  $P_2$  purinoceptors in the isolated rabbit central ear artery. *Blood-Vessels* 22: 145-155
- Kennedy I, Humphrey PPA (1994): Evidence for the presence of two types of  $P_2$  purinoceptor in the guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle preparation. *Eur J Pharmacol* 261: 273-280
- Kerr KP, Mitchelson F, Coupar IM (1995): Vagal nerve stimulation of the guinea-pig oesophagus. *Acta Physiol Scand* 154: 213-220
- Kerr KP, Mitchelson F, Coupar IM (1997): Tachykinin receptors in the guinea-pig isolated oesophagus: a complex system. *Br J Pharmacol* 120: 1021-1028
- Kishi M, Takeuchi T, Suthamnatpong N, Ishii T, Nishio H, Hata F, Takewaki T (1996): VIP- and PACAP-mediated nonadrenergic, noncholinergic inhibition in longitudinal muscle of rat distal colon: involvement of activation of charybdotoxin- and apamin-sensitive  $K^+$  channels. *Br J Pharmacol* 119: 623-630
- Knudsen MA, Tøttrup A (1992): A possible role of the L-arginine-nitric oxide pathway in the modulation of cholinergic transmission in the guinea-pig taenia coli. *Br J Pharmacol* 107: 837-841
- Krause JE, Staveteig PT, Nave Mentzer J, Schmidt SK, Tucker JB, Brodbeck RM, Bu J-Y, Karpitskiy VV (1997): Functional expression of a novel human neurokinin-3 receptor homolog that binds [ $^3$ H]senktide and [ $^{125}$ I-Mephe $^7$ ]neurokinin B, and is responsive to tachykinin peptide agonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 310-315
- Kunze WAA, Furness JB (1999): The enteric nervous system and regulation of intestinal motility. *Annu Rev Physiol* 61: 117-142
- Lambrecht G, Friebe T, Grimm U, Windscheif U, Bungardt E, Hildebrandt C, Bäumert HG, Spatz-Kümbel G, Mutschler E (1992): PPADS, a novel functionally selective antagonist of  $P_2$  purinoceptor-mediated responses. *Eur J Pharmacol* 217: 217-219
- Laufer R, Wormser U, Friedman ZY, Gilon C, Chorev M, Selinger Z (1985): Neurokinin B is a preferred

- agonist for a neuronal substance P-receptor and its action is antagonized by enkephalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 7444-7448
- Leander S, Brodin E, Håkanson R, Sundler F, Uddmann R (1982): Neuronal substance P in the esophagus. Distribution and effects on motor activity. *Acta Physiol Scand* 115: 427-435
- Lee CM, Campbell NJ, Williams BJ, Iversen LL (1986): Multiple tachykinin binding sites in peripheral tissues and in brain. *Eur J Pharmacol* 130: 209-217
- Lefebvre RA, Smits GJM (1992): Modulation of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurotransmission in rat gastric fundus by the  $\alpha_2$ -adrenoceptor agonist, UK -14,304. *Br J Pharmacol* 107: 256-261
- Lefebvre RA (1993): Non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in the proximal stomach. *Gen Pharmacol* 24: 257-286
- Lefebvre RA (1995): Nitric oxide in the peripheral nervous system. *Annals of Medicine* 27: 379-388
- Lefebvre RA, Barthó L (1997): Mechanism of the nitric oxide-induced contraction in the rat isolated small intestine. *Br J Pharmacol* 120: 975-981
- Lefebvre RA (1999): Influence of superoxide and antioxidants on nitergic neurotransmission in the stomach. *Fundam Clin Pharmacol* 13/Suppl. 1: 106s
- Legat FJ, Griesbacher T, Lembeck F (1992): CP 96,345, a non-peptide antagonist of substance P: I. Effects on the actions mediated by substance P and related tachykinins on the guinea-pig ileum and rabbit jejunum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346: 315-322
- Lembeck F, Zetler G (1962): Substance P: a polypeptide of possible physiological significance especially within the nervous system. *Int Rev Neurobiol* 4: 159-215
- LePard KJ, Messori E, Galligan JJ (1997): Purinergic fast excitatory postsynaptic potentials in myenteric neurons of guinea-pig: distribution and Pharmacology. *Gastroenterology* 113: 1522-34
- Li CG, Rand MJ (1989a): Evidence for a role of nitric oxide in the neurotransmitter system mediating relaxation of the rat anococcygeus muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16: 933-938
- Li CG, Rand MJ (1989b): Prejunctional inhibition of non-adrenergic non-cholinergic transmission in the rat anococcygeus muscle. *Eur J Pharmacol* 168: 107-110
- Li CG, Rand MJ (1990): Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 191: 303-309
- Llewellyn-Smith IJ, Furness JB, Gibbins IL, Costa M (1988): Quantitative ultrastructural analysis of enkephalin, substance P-, and VIP-immunoreactive nerve fibres in the circular muscle of the guinea-pig small intestine. *J Comp Neurol* 272: 139-148
- Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH (1994): Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Int Med* 120: 227-237
- Lundberg JM, Fahrenkrug J, Brimijoin S (1981): Characteristics of the axonal transport of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in nerves of the cat. *Acta Physiol Scand* 112: 427-436
- Lundberg JM (1996): Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev* 48: 113-178
- Maas AJJ, den Hertog A, Ra R, van den Akker J (1980): The action of apamin on guinea-pig taenia caeci. *Eur J Pharmacol* 67: 265-274
- Mackenzie I, Burnstock G (1980): Evidence against vasoactive intestinal polypeptide being the non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory transmitter released from nerves supplying the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *Eur J Pharmacol* 67: 255-264
- Mailman D (1978): Effects of vasoactive intestinal polypeptide on intestinal absorption and blood flow. *J Physiol (Lond)* 279: 121-132
- Maggi CA, Giuliani S, Santicioli P, Regoli D, Meli A (1987): Peripheral effects of neurokinins: functional evidence for the existence of multiple receptors. *J Auton Pharmacol* 7: 243-255
- Maggi CA, Patacchini R, Rovero P, Giachetti A (1993): Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. *J Auton Pharmacol* 13: 23-93
- Maggi CA, Patacchini R, Barthó L, Holzer P, Santicioli P (1994a): Tachykinin NK1 and NK2 receptor antagonists and atropine-resistant ascending excitatory reflex to the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 112: 161-168
- Maggi CA, Astolfi M, Giuliani S, Goso C, Manzini S, Meini S, Patacchini R, Parvone V, Pedone C, Quartara L, Renzetti AR, Giachetti A (1994b): MEN 10,627, a novel polycyclic peptide antagonist of tachykinin NK<sub>2</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 1489-1500
- Maggi CA (1995): Tachykinins and calcitonin gene-related peptide (CGRP) as co-transmitters released from peripheral endings of sensory nerves. *Prog Neurobiol* 45: 1-98

- Mann PT, Southwell BR, Ding YQ, Shigemoto R, Mizuno N, Furness JB (1997): Localization of neurokinin 3 (NK<sub>3</sub>) receptor immunoreactivity in the rat gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 289: 1-9
- McConalogue K, Furness JB, Vremec MA, Holst JJ, Tornøe K, Marley PD (1995a): Histochemical, pharmacological, biochemical and chromatographic evidence that pituitary adenylyl cyclase activating peptide is involved in inhibitory neurotransmission in the taenia of the guinea-pig caecum. *J Auton Nerv Syst* 50: 311-322
- McConalogue K, Lyster DJK, Furness JB (1995b): Electrophysiological analysis of the actions of pituitary adenylyl cyclase activating peptide in the taenia of the guinea-pig caecum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352: 538-544
- Meldrum LA, Burnstock G (1983): Evidence that ATP is involved as a co-transmitter with noradrenaline in sympathetic nerves supplying the guinea-pig vas deferens. *Eur J Pharmacol* 92: 161-163
- Meulemans AL, Helsen LF, Schuurkes JA (1993): Role of NO in vagally-mediated relaxations of guinea-pig stomach. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 347: 225-230
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989): Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylyl cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164: 567-574
- Miyata A, Jiang L, Dahl RR, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A (1990): Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP 38). *Biochem Biophys Res Commun* 170: 643-648
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991): Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-138
- Moody CJ, Burnstock G (1982): Evidence for the presence of P1-purinoceptors on cholinergic terminals in the guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* 77: 1-9
- Morita K, North RA, Katayama Y (1980): Evidence that substance P is a neurotransmitter in the myenteric plexus. *Nature* 287: 151-152
- Motomura Y, Chijiwa Y, Iwakiri Y, Ochiai T, Nawata Y (1998): Interactive mechanisms among pituitary adenylyl cyclase activating peptide, vasoactive intestinal peptide, and parathyroid hormone receptors in guinea-pig cecal circular smooth muscle cells. *Endocrinology* 139: 2869-2878
- Mourelle M, Guarner F, Moncada S, Malagelada JR (1993): The arginine/nitric oxide pathway modulates sphincter of Oddi motor activity in guinea-pigs and rabbits. *Gastroenterology* 105: 1299-1305
- Mungan Z, Arimura A, Ertan A, Rossowski WJ, Coy DH (1992): Pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide relaxes rat gastrointestinal smooth muscle. *Scand J Gastroenterol* 27: 375-380
- Murad F, Mittal CK, Arnold WP, Katsuki S, Kimura H (1978): Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9: 145-158
- Murthy KS, Grider JR, Jin JG, Makhoul GM (1996): Interplay of VIP and nitric oxide in the regulation of neuromuscular function in the gut. *Ann N Y Acad Sci* 805: 355-362
- North RA (1982): Electrophysiology of the enteric nervous system. *Neurosci* 7: 315-325
- Olgart C, Wiklund NP, Gustafsson LE (1997): Blockade of nitric oxide-evoked smooth muscle contractions by an inhibitor of guanylyl cyclase. *Neuroreport* 8(15): 3355-3358
- Orrego F (1979): Criteria for the identification of central neurotransmitters and their application to studies with some nerve tissue preparations in vitro. *Neurosci* 4: 1037-1057
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987): Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526
- Pang PK, Kline LW (1998): Protein kinase C mediates the contractile action of pituitary adenylyl cyclase activating polypeptide in guinea-pig gallbladder strips. *Regul Pept* 77: 69-76
- Patacchini R, Barthó L, Holzer P, Maggi CA (1995): Activity of SR 142801 at peripheral tachykinin receptors. *Eur J Pharmacol* 278: 17-25
- Patacchini R, Barthó L, Maggi CA (1997): Characterization of receptors mediating contraction induced by tachykinins in the guinea-pig common bile duct. *Br J Pharmacol* 122: 1633-1638
- Paton WD, Zar MA (1966): Evidence for transmission of nerve effects by substance P in guinea-pig longitudinal muscle strips. In Abstracts of the Third International Congress of Pharmacology, Sao Paulo p 9
- Petersen G, Ahlman H, Dahlstrom A, Kewenter J, Larsson I, Larsson PA (1979): The effect of transmural field stimulation on the serotonin content in rat duodenal enterochromaffin cells-in vitro. *Acta Physiol Scand* 107: 83-87
- Piotrowski W, Simon MC, Brennan L (1993): Effect of N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine and methylene blue on non-adrenergic, non-cholinergic responses of isolated guinea-pig taenia caeci. *Br J Pharmacol* 110: 157P



- Pique JM, Whittle BJ, Esplugues JV (1989): The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation. *Eur J Pharmacol* 174: 293-296
- Portbury AL, McConalogue K, Furness JB, Young HM (1995): Distribution of pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PACAP) immunoreactivity in neurons of the guinea-pig digestive tract and their projections in the ileum and colon. *Cell Tissue Res* 279: 385-392
- Portbury AL, Furness JB, Southwell BR, Wong H, Walsh JH, Bunnett NW (1996a): Distribution of neurokinin-2 receptors in the guinea-pig gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 286: 281-292
- Portbury AL, Furness JB, Young HM, Southwell BR, Vigna SR (1996b): Localisation of NK1 receptor immunoreactivity to neurons and interstitial cells of the guinea-pig gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 367: 342-351
- Rand MJ, Li CG (1995): Nitric oxide as a neurotransmitter in peripheral nerves: nature of transmitter and mechanism of transmission. *Ann Rev Physiol* 57: 659-682
- Rattan S, Chakder S (1992): Role of nitric oxide as a mediator of internal anal sphincter relaxation. *Am J Physiol* 262: G107-G112
- Rattan S, Chakder S (1993): Inhibitory effect of CO on internal anal sphincter: heme oxygenase inhibitor inhibits NANC relaxation. *Am J Physiol* 265: G799-G804
- Rattan S, Chakder S (1998): Sites of actions of contractile and relaxant effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the internal anal sphincter smooth muscle. *Ann NY Acad Sci* 865: 503-511
- Regoli D, Drapeau G, Dion S, D'Orleans-Juste P (1987): Pharmacological receptors for SP and neurokinins. *Life Sci* 40: 109-117
- Riberio JA, Sebastiao AM (1986): Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A<sub>3</sub>) adenosine receptor. *Prog Neurobiol* 26: 179-209
- Saha JK, Hirano I, Goyal RK (1993): Biphasic effect of SNP on opossum esophageal longitudinal muscle: involvement of cGMP and eicosanoids. *Am J Physiol* 265: G403-407
- Said SI, Mutt V (1970a): Polypeptide with broad biological activity. Isolation from small intestine. *Science* 169: 1217-1218
- Said SI, Mutt V (1970b): Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* 225: 863-864
- Said SI, Mutt V (1972): Isolation from porcine intestinal wall of a vasoactive octacosapeptide related to secretin and to glucagon. *Eur J Biochem* 28: 199-204
- Said SI (ed) (1982): *Vasoactive Intestinal Polypeptide*. Raven Press, New York
- Sann H, McCarthy PW, Mäder M, Schemann M (1995): Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in small diameter neurones of the rat dorsal root ganglion. *Neuroscience Letters* 198: 17-20
- Schmidt HHHW, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F (1992): Mapping of neuronal nitric oxide synthase in the rat suggests frequent colocalization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* 10: 1439-1456
- Schmidt HHHW, Lohmann SM, Walter U (1993): The nitric oxide and cGMP signal transduction system - regulation and mechanism of action. *Biochem Biophys Acta* 1178: 153-175
- Schultz K, Schultz K, Schultz G (1977): Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature* 265: 750-751
- Schwarzhoff R, Schwörer H, Fornefeld H, Morys-Wortmann C, Katsoulis S, Creutzfeldt W, Folsch UR, Schmidt WE (1995): Specific monoclonal antibodies neutralize the action of PACAP 1-27 or PACAP 1-38 on intestinal muscle strips in vitro. *Regul Pept* 55: 57-66
- Schwörer H, Schmidt WE, Katsoulis S, Creutzfeldt W (1991): The effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on porcine small intestinal smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 343: 103
- Schwörer H, Katsoulis S, Creutzfeldt W, Schmidt WE (1992): Pituitary adenylate cyclase activating peptide, a novel VIP-like gut-brain peptide, relaxes the guinea-pig taenia caeci via apamin-sensitive potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346: 511-514
- Schwörer H, Clemens S, Katsoulis S, Köhler H, Creutzfeldt W, Schmidt WE (1993): Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a potent modulator of human colonic motility. *Scand J Gastroenterol* 28: 625-632
- Selemidis S, Satchell DG, Cocks TM (1997): Evidence that NO acts as a redundant NANC inhibitory neurotransmitter in the guinea-pig isolated taenia coli. *Br J Pharmacol* 121: 604-611
- Sengupta JN, Gebhart GF (1994): Gastrointestinal afferent fibers and sensation. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd ed., ed. Johnson LR; Raven Press, New York, 1994, pp. 483-519

- Shinozuka K, Bjur RA, Westfall DP (1988): Characterization of prejunctional purinoceptors on adrenergic nerves of the rat caudal artery. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 338: 221-227
- Shuttleworth CWR, Keef KD (1995): Roles of peptides in enteric neuromuscular transmission. *Regul Pept* 56: 101-120
- Shuttleworth CW, Sweeney KM, Sanders KM (1999): Evidence that nitric oxide acts as an inhibitory neurotransmitter supplying taenia from the guinea-pig caecum. *Br J Pharmacol* 127: 1495-14501
- Sperlágh B, Vizi ES (1991): Effect of presynaptic P2 receptor stimulation on transmitter release. *J Neurochem* 56: 1466-1470
- Stark ME, Szurszewski JH (1992): Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 103: 1928-1949
- Stark ME, Bauer AJ, Sarr MG, Szurszewski JH (1993): Nitric oxide mediates inhibitory nerve input in human and canine jejunum. *Gastroenterology* 104: 398-409
- Sternini C, Su D, Gamp PD, Bunnnett NW (1995): Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 358: 531-540
- Sundler F, Ekblad E, Absood A, Håkanson R, Köves K, Arimura A (1992): Pituitary adenylate cyclase activating peptide: a novel vasoactive intestinal peptide-like neuropeptide in the gut. *Neurosci* 46: 439-454
- Szolcsányi J, Barthó L (1978): New type of nerve-mediated cholinergic contractions of the guinea-pig small intestine and its selective blockade by capsaicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 305: 83-90
- Szolcsányi J, Barthó L (1981): Impaired defense mechanisms to peptic ulcer in the capsaicin-desensitized rat. In: *Advances in Physiological Sciences, Vol. 29, Gastrointestinal Defence Mechanisms*, ed. Mózsik Gy, Hanninen O, Jávör T; Akadémiai Kiadó, Budapest, 1981, pp. 39-51
- Szolcsányi J (1984): Capsaicin-sensitive chemoceptive neural system with dual sensory-efferent function. In: *Antidromic Vasodilatation and Neurogenic Inflammation*, ed. Chahl LA, Szolcsányi J, Lembeck F; Akadémiai Kiadó, Budapest, 1984, pp. 27-56
- Szolcsányi J (1993): Actions of capsaicin on sensory receptors. In: *Capsaicin and the Study of Pain*, ed. Wood JN; Academic Press, London, 1993, pp. 1-26
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs, Oroszi G, Németh J (1998): Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol* 125: 916-922
- Tepperman BL, Whittle BJ (1992): Endogenous nitric oxide and sensory neuropeptides interact in the modulation of the gastric microcirculation. *Br J Pharmacol* 105: 171-175
- Thornbury KD, Ward SM, Dabriel HH, Carl A, Westfall DP, Sanders KM (1991): Nitric oxide and nitrosocysteine mimic nonadrenergic, noncholinergic hyperpolarization in canine proximal colon. *Am J Physiol* 261: 6553-6557
- Tonini M, Lecchini S, Frigo G, Crema A (1974): Action of tetrodotoxin on spontaneous electrical activity of some smooth muscle preparations. *Eur J Pharmacol* 29: 236-240
- Tonini M, Costa M (1990): A pharmacological analysis of the neural circuitry involved in distribution-evoked enteric excitatory reflex. *Neuroscience* 38: 789-795
- Usdin TB, Bonner TI, Mezey E (1994): Isolation and characterization of the intestinal peptide porcine PHI (PHI-27), a new member of the glucagon-secretin family. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6603-6607
- Vigne P, Pacaud P, Urbach V, Feolde E, Breittmayer JP, Frelin C (1996): The effect of PPADS as an antagonist of inositol (1,4,5) triphosphate induced intracellular calcium mobilization. *Br J Pharmacol* 119: 360-364
- Vizi ES, Bertaccini G, Impicciatore M, Knoll J (1973): Evidence that acetylcholine release by gastrin and related polypeptides contributes to their effect on gastrointestinal motility. *Gastroenterology* 64: 268-277
- Vizi ES (1979): Presynaptic modulation of neurochemical transmission. *Prog Neurobiol* 12: 181-290
- Ward SM, Dalziel HH, Khoyi MA, Westfall AS, Sanders KM, Westfall DP (1996): Hyperpolarization and inhibition of contraction mediated by nitric oxide released from enteric inhibitory neurones in guinea-pig taenia coli. *Br J Pharmacol* 118: 49-56
- Whittle BJ, Lopez-Belmonte J, Moncada S (1990): Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *Br J Pharmacol* 99: 607-611
- Whittle BJ, Lopez-Belmonte J, Moncada S (1992): Nitric oxide mediates rat mucosal vasodilatation induced by intragastric capsaicin. *Eur J Pharmacol* 218: 334-341

- Whittle BJ (1994): Nitric oxide in gastrointestinal physiology and pathology. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 3rd ed., ed. Johnson LR; Raven Press, New York, 1994, pp. 267-294
- Wiklund NP, Gustafsson LE (1988): Indications for P<sub>2</sub>-purinoceptor subtypes in guinea-pig smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 148: 361-370
- Williams JT, North RA (1979): Vasoactive intestinal polypeptide excites neurones of the myenteric plexus. *Brain Res* 175: 174-177
- Wilson AJ, Furness JB, Costa M (1979): A unique population of uranaffin-positive intrinsic nerve endings in the small intestine. *Neurosci Lett* 14: 303-308
- Windscheif U, Pfaff O, Ziganshin AU, Hoyle CHV, Bäumert HG, Mutschler E, Burnstock G, Lambrecht G (1995): Inhibitory action of PPADS on relaxant responses to adenine nucleotides or electrical stimulation in guinea-pig taenia coli and rat duodenum. *Br J Pharmacol* 115: 1509-1517
- Wood JD (1987): Physiology of the enteric nervous system. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 2nd ed., ed. Johnson LR; Raven Press, New York, 1987, pp. 67-109
- Wood JD (1994): Physiology of the enteric nervous system. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract, 3rd ed., ed. Johnson LR; Raven Press, New York, 1994, pp. 423-475
- Yamato S, Saha JK, Goyal RK (1992a): Role of nitric oxide in lower esophageal sphincter relaxation to swallowing. *Life Sci* 50: 1263-1272
- Yamato S, Spechler SJ, Goyal RK (1992b): Role of nitric oxide in esophageal peristalsis in the opossum. *Gastroenterology* 103:197-204
- Zagorodnyuk V, Santicioli P, Maggi CA, Giachetti A (1996): The possible role of ATP and PACAP as mediators of apamin-sensitive NANC inhibitory junction potentials in circular muscle of guinea-pig colon. *Br J Pharmacol* 119: 779-786
- Ziganshin AU, Hoyle CHV, Bo X, Lambrecht G, Mutschler E, Bäumert HG, Burnstock G (1993): PPADS selectively antagonises P<sub>2x</sub>-purinoceptor-mediated responses in the rabbit urinary bladder. *Br J Pharmacol* 110: 1491-1495

## X. A disszertáció alapját képező publikációk

### *Közlemények:*

Barthó L, Lénárd L Jr, Maggi C A (1997): Evidence for the involvement of P<sub>2</sub> 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 Pharmac 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* (in press)

### *További közlemények:*

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

Barthó L, Lénárd L Jr, Lázár Zs, Maggi CA (1999): Connections between P<sub>2</sub> purinoceptors and capsaicin-sensitive afferents in the intestine and other tissues. *Eur J Pharmacol* 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-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360: 344-353

Barthó L, Lázár Zs, Lénárd L Jr, 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* (in press)

*Előadások, poszterek:*

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, June 16-19, 1995. (Abstract: *Pharmacological Research* 31, Supplement, 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 (LX.), Budapest, 1995. július 6-8.

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. 1995 Annual Meeting of the Austrian Neuroscience Association, Graz, September 22-23, 1995.

ifj. Lénárd L, Halmai V, Barthó L: Tónusos "nitreg" gátlás kimutatása tengerimalac-ileum körkörös izomzatán. MÉT vándorgyűlés, Pécs, 1997. július 9-12.

Halmai V, Barthó L, ifj. Lénárd L: Capsaicin-érzékeny afferensek szerepe a tengerimalac-

ileum myentericus plexus nitroprusszid-nátrium (SNP) létrehozta aktivációjában. MÉT vándorgyűlés, Pécs, 1997. július 9-12.

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. jan. 21-24. (Abstract: Evidence for the involvement of NO and ATP in the NANC relaxant response of the guinea-pig taenia caeci. *Neurobiology* 6(2): 223-224, 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, May 14-16, 1998.

ifj. Lénárd L, Barthó L, Benkó R, Báthori Zs, Tóth G, Penke B: PACAP-antagonista gátolja a nem-adrenerg, nem-cholinerg elernyedést a coecumban. MITT vándorgyűlés, Harkány, 1999. jan. 27-30. (Abstract: PACAP antagonist inhibits non-adrenergic, non-cholinergic relaxation in the taenia caeci. *Neurobiology* 7(3): 349-350, 1999)

Barthó L, Patacchini R, ifj. Lénárd L, Wilhelm M: Tachykinin-közvetítette válaszok tengerimalac-nyelőcsövön és ductus choledochuson. MITT vándorgyűlés, Harkány, 1999. jan. 27-30. (Abstract: Tachykinin-mediated responses in the oesophagus and common bile duct of the guinea-pig. *Neurobiology* 7(3): 282-283, 1999)

Barthó L, Lénárd L Jr, Benkó R, Tóth G, Penke B: PACAP antagonist inhibits non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) relaxation in the guinea-pig taenia caeci. *Neuropeptides - Ferrara 1999 (9th Annual Meeting of the European Neuropeptide Club)*. Ferrara, Italy, 12-15 May, 1999. (Abstract: *Regul. Pept.* 80:146, 1999)

Barthó L, Lénárd L Jr, Szigeti R, Benkó R, Báthori Zs, Tóth G, 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 July 3-7, Budapest, Hungary*. (Abstract: *Fundam. Clin. Pharmacol.* 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, July 3-7, Budapest, Hungary. (Abstract: Fundam. Clin. Pharmacol. 13/Suppl. 1, 1999, 207s)

## **XI. Köszönetnyilvánítás**

Ezúton mondok köszönetet **dr. Szolcsányi János** egyetemi tanár úrnak, intézet igazgatónak, a doktori neurofarmakológia-program programvezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézetben a folyamatos tudományos kutatómunkát.

Őszinte köszönetemet fejezem ki **dr. Barthó Loránd** egyetemi tanár úrnak, témavezetőmnek, a 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. Gáabrielné 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 Józsefnének** a kísérletek előkészítésében végzett munkájáért és **Zöldhegyi Józsefnének** az eredmények ábrázolásában való segítségéért.

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

Hálás köszönettel tartozom feleségemnek, dr. Várady Editnek és kisfiamnak, Lénárd Álmosnak türelmükért és megértésükért, ill. szüleimnek, dr. Meskó Saroltának és dr. Lénárd Lászlónak támogatásukért, orvosi és kutatói tanácsaikért, melyekkel munkámat segítették.