

Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) receptor agonisták és a római kamilla hatásainak vizsgálata humán és rágcsáló izolált szervi simaizom-preparátumokon

Doktori (PhD) - értekezés tézisei

Dr. Sándor Zsolt

Gyógyszertudományok Doktori Iskola (D92)

Témavezető: dr. Barthó Loránd

(emer. egyetemi tanár)

A doktori iskola vezetője: dr. Pintér Erika

(egyetemi tanár, intézetigazgató)

Programvezetők: dr. Barthó Loránd, majd dr. Helyes Zsuzsanna

(egyetemi tanárok)



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

Általános Orvostudományi Kar

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Pécs

2019.

Általános bevezetés a bélrendszer felépítésébe, beidegzésébe és a TRP receptorok témakörébe

A gyomor-bélhuzam intramuralis ganglionjaiban (plexus myentericus, plexus submucosus) legalább annyi idegsejt foglal helyet, mint a gerincvelőben (10^7 - 10^8 neuron). Ezek a neuronok részint enterális érző neuronok, részint más idegsejteket izgatnak vagy gátolnak a belőlük felszabaduló transzmitter-anyagok segítségével, de jelentős részük a (körkörös és/vagy hosszanti) simaizomzatot kontrahálja vagy relaxálja (neuromuszkuláris, neuroeffektor ingerületátvivő anyagok felszabadításával). Ezek az „enterális motoneuronok”. Nyúlványaik mindkét izomrétegben megtalálhatók. Egy adott hatás döntően közvetítő anyag (mediátor) vagy anyagok („komediátorok”, „ko-transzmitterek”) mellett még módosító (modulátor) anyagok részvételével is számolni kell a gyomor-bélhuzam ingerületáttevődési folyamataiban.

A motoneuronok tehát az effektor rendszereket idegzik be: a simaizmot, a pacemaker sejteket, a vérereket, a mucosalis mirigyeket. Az izgató motoneuronok olyan transzmittereket szabadítanak fel, melyek az izmok kontrakcióját és a mucosából víz és elektrolitok szekrécióját váltják ki. Izgató transzmitterek az acetil-kolin és a P-anyag, melyek simaizomkontrakciót hoznak létre, másrésről az acetil-kolin és a VIP (vazoaktív intestinalis peptid) az intestinalis kripták sejtjeiből fokozzák a szekréciót. A gátló motoneuronok csökkentik a simaizom kontraktilis aktivitását és a szekréciót. Transzmittereik az ATP, VIP és főként az NO (nitrogén-monoxid) [ld. Furness és mtsai 2014].

Ez a komplexitás teszi lehetővé, hogy a bélhuzamban saját (intrinszik) reflexek jöjjenek létre (pl. a bélfal feszülése által kiváltott perisztaltikus reflex). Szintén az összetettség és a kiterjedtség indokolja, hogy az enterális idegrendszert a vegetatív idegrendszer külön részének tekintsük [ld. Furness és mtsai 1998]. Ehhez a rendszerhez tartoznak még az epehólyag és az epeutak intrinszik neuronjai is.

Továbbá: jóllehet a vékony- és vastagbél nagy része képes külső idegi összeköttetések nélkül is működni, *in vivo* ezek a külső (extrinszik) idegek, sőt hormonális befolyások is hatnak rá. Nem meglepő, hogy a hatások eme sokféleségét számos anyag közvetíti. A „feltételezett transzmitterek” élettani/kórélettani szerepe különböző mértékben bizonyított és ehhez társulnak még a különböző állatfajok közti különbségek is. (A béltartalom propulzióját és

keverését természetesen minden állatfaj megvalósítja, de a funkciók hasonlósága nem feltétlenül jár együtt a neurotranszmitter „háttér” azonosságával.)

Az érző neuronok szintén az intrinszik és extrinszik kategóriákba sorolhatók. A bélfal saját érző neuronjai érzékelik pl. a feszülést vagy más ingert, az ingerületet pedig interneuronoknak és ezek közvetítésével motoneuronoknak adják át, amelyek létrehozzák „a bél törvénye” néven számontartott körkörös izomösszehúzódot az ingertől orálisan és elernyedést az ingertől aborálisan [Mazet 2015]. A külső érző neuronok (amelyek a n. vagus-szal vagy a gerincvelőből érkeznek) részben tudatosodó érzetek, részben pl. vegetatív reflexek kiindulásai. A gerincvelői szenzoros neuronok különlegessége, hogy belőlük a periférián, így a gyomor-bélhuzamban is transzmitterek szabadulnak fel („lokális efferens hatás”). Ezek egyrészt beleszólnak a zsigeri szervek működésébe, másrészt viszonylag egyszerűen megközelíthető módját kínálják a szenzoros neurotranszmitterek azonosításának [ld. Barthó és mtsai 2004]. A módosított Dale-elv alapján valószínűleg ugyanazon transzmitterkombináció szabadul fel a neuronok perifériás és centrális idegvégződéseiből. Ezért a bél extrinszik afferens idegeinek nyúlványaiból kiszabaduló transzmitterek azonosak a bélben és a gerincvelőben [ld. Barthó és mtsai 2008].

Ezek az érző neuronok ingerelhetők például kapszaicinnal, a csípős paprika szenzoros izgató anyagával. Bár a n. vagus rostjainak 80-90% -a afferens (és köztük sok a kapszaicin érzékeny), kevesebbet tudunk a belőlük a periférián felszabaduló anyagokról.

Magától értetődik, hogy a gyomor-bélhuzam betegségei érintik az ingerületátviteli folyamatokat, transzmitteranyagokat is. Nem könnyű eldönteni, vajon ezek a változások okai vagy következményei-e a betegségeknek. A tünetek létrehozásában azonban mindenképpen szerepet játszanak.

Ideg-izom transzmitterek

Mivel a gyomor-bélhuzam idegelemeiben nagyon sokféle „transzmitter jelölt” kimutatható morfológiai eszközökkel, fontos komolyan vennünk az ingerületátvivő anyagok azonosításában használt, a XX. sz. első-második harmadában kidolgozott kritériumokat.

A kísérletes munkánk folyamán is szem előtt tartott, alapelvekként kezelt és egyben legfontosabbnak vett neurotranszmitter-kritériumok a következők:

- a feltételezett anyag jelenléte (1.);

- a transzmitter-jelölt felszabadulása idegingerlés hatására, „utánzás” (2.);
- az általunk beadott – exogén – transzmitter-jelölt hatása utánozza az idegingerlését, „a hatás azonossága” (3.);
- a gyanúba vett ingerületátvivő anyag specifikus antagonistája gátolja mind az exogén anyag, mind az idegingerlés hatását, „az antagonizmus azonossága” (4.).

Ha specifikus antagonista nem áll rendelkezésre, speciális szintézisgátló, receptor deszenzibilizáció, illetve knock-out állatok is használhatók.

Azokat a válaszokat, amelyekben a „klasszikus” neurotranszmitter: acetyl-kolin és noradrenalin nem vesz részt (amelyek tehát atropin és pl. adrenerg neuronblokkoló jelenlétében is kiválthatók), „nem- adrenerg, nem-cholinerg” (NANC) válaszoknak nevezzük. Ezek lehetnek izgató és gátló jellegűek [ld. Barthó és mtsai 2005].

Jelenleg intenzív kutatások tárgyát képezik sejtszintű és *in vivo* rendszerekben egyaránt az ún. TRP receptorok. Izolált szervi körülmények között ennél jóval kevesebben vizsgálják a farmakológiai kutatásokban ezt a problémakört. A kapszaicin-érzékeny receptor a TRPV1, melyet elsőként 1997-ben klónoztak [Caterina, Julius és mtsai 1997].

TRP receptorok fogalma és fajtái

A TRP receptorok testszerte jelenlévő kation-csatornák. A „TRP” az angol „transient receptor potential” rövidítése. Megkülönböztetünk TRPC, TRPV („V”, mint vanilloid), TRPM, TRPN, TRPA („A”, mint ankyrin) , illetve TRPP és TRPML receptorokat. A további altípusaikat számmal jelölik (pl.: TRPM8). Különböző kémiai ágensekre érzékenyek (pl.: piperin, kapszaicin, mentol, allil-izotiocianát); aktiválhatja őket forróság, hideg, feszülés, nyomás vagy vibráció is. Sok közülük intracelluláris kalciumot szabadít fel, ha aktiválódik [Caterina, Julius 2001; Vyklicky és mtsai 2008; Cavanaugh és mtsai 2008].

A TRPV1 receptor: A kapszaicin, az erős paprika hatóanyaga a TRPV1 receptor stimulációját váltja ki. Ezen receptor nagy számban helyezkedik el az érző idegvégződéseken. Ez okozza az égető érzést és a bőrpírt a bőrön és a nyálkahártyán kapszaicin hatására [ld. Barthó és mtsai 2004]. A TRPV1 receptor egy kation csatorna, amit magas hőmérséklet (> 43°C), alacsony pH (pH <6,5) és különféle vegyi anyagok, mint pl.: a kapszaicin, phorbol-észterek aktiválnak. Tulajdonképpen egy nem-szelektív kation csatorna, aminek aktiválódása Na⁺ és Ca⁺⁺ beáramláshoz (és némi K⁺ kiáramláshoz) vezet. Ezen hatások eredőjeként a szenzoros idegvégződés membránja depolarizálódik [Yang és mtsai 2014].

A resiniferatoxin (RTX) –ami bizonyos afrikai *Euphorbia* fajokban található meg –a legpotensebb agonistája a TRPV1 receptornak– 500-szor nagyobb az affinitása a kapszaicinnél.

A piperin (a fekete bors csípősségét adó vegyület) kis koncentrációban csak a TRPV1 receptort aktiválja, nagy koncentrációban már a TRPA1 receptort is [Bencsik és mtsai 2015].

A TRPA1 receptor: A kapszaicin-szenzitív érző afferens idegvégződéseken nagy számban fordul elő a TRPV1 receptorral együtt [Koivisto és mtsai 2014]. Aktiválhatja a hideg, az allil-izotiocianát stb. Az allil-izotiocianát (AITC) a mustár, a wasabi és a torma csípősségét adja. Ezen receptor agonistája még a fahéj illatát adó fahéjaldehid/cinnamaldehyd (CINN) [Cavanaugh és mtsai 2008].

A TRPM8 receptor fő stimuláló tényezőjének az alacsony hőmérsékletet és a mentolt tartják. Újabban az icilin aktiváló szerepét és a receptor mechanonocicepcióban betöltött szerepét is leírták [ld. Xiaoyun és mtsai 2015]. A TRPM8 receptornak egy –munkacsoportunk által bizonyítottan [Benkó és mtsai 2012a] – specifikus antagonistája a BCTC nevű vegyület, amit jelen munkában gyakran alkalmaztunk a TRPV1 és M8 receptorok gátlására.

A TRP receptoroknak egyre jelentősebb szerepet tulajdonítanak a normál és patológiás folyamatokban is, mint például a zsigeri és testi fájdalomérzékelésben, a gyulladásban és az ahhoz társuló hyperalgesziában és a hőszabályozásban [Kaji és mtsai 2012, Bautista és mtsai 2013, Kaneko és mtsai 2014, Sousa-Valente és mtsai 2014, Koivisto és mtsai 2014, Kun és mtsai 2014, Benemei és mtsai 2015, Cenac és mtsai 2015, Mueller-Tribbensee és mtsai 2015, Mickle és mtsai 2015].

Az AITC az egér [Capasso és mtsai 2012] és a tengerimalac [Barthó és mtsai 2013] bélmozgásait stimulálja. A TRPA1 szelektív és potens antagonistája a HC030031 nevű vegyület [ld. Alexander és mtsai 2018]. A tengerimalac vékonybélben az AITC idegi eredetű, kolinerg összehúzóást okoz, amit nem gátol a HC030031, de – meglepő módon– gátolja a purinoceptor antagonistá PPADS [Barthó és mtsai 2013]. Az egér disztális vastagbélben AITC által kiváltott kontrakciót szintén nem gátolja a fent említett TRPA1-antagonista [Capasso és mtsai 2012].

Az emlősök gastrointestinalis rendszerében mintegy 28 féle TRP receptor altípus van jelen, amelyek szerepet játszanak még az ízlelésben, a kemo- és mechanoszenzációban és a nyálkahártya működésében, valamint a homeosztázisban. Habár a TRP receptorok a szervezet egészében részt vesznek az érzőműködés folyamatában, kiemelt szerepet kapnak a gyomor-bél huzamban. Bizonyos TRP receptorok fontos funkciót töltenek be a Mg^{++} ionháztartás

egyensúlyában (TRPM6; TRPM7), a Cajal-féle interstitialis sejtek pacemaker aktivitásában (TRPM7). A TRPM5 a glükóz-dependens inzulin felszabadulást szabályozza hasnyálmirigy Langerhans-szigeteinek β -sejtjeiben és hozzájárul az ízérzékeléshez is [Holzer 2011].

A szerotonin lehetséges szerepe a gyomor-bélrendszer perisztaltikájában

A szerotonin (5-HT) jelen van az emlős gastrointestinalis rendszerben. [ld. Spiller 2007, Grundy 2008]. Míg az enterochromaffin sejtek egyaránt szintetizálják és felszabadítják a szerotonint, az enterális neuronok a környezetükből veszik fel és megfelelő ingerekre felszabadítják. Az 5-HT összehúzza a bél simaizomsejteket a különböző preparátumokban [Prins és mtsai 1997, Gelal és mtsai 1998, Delesalle és mtsai 2006], de tengerimalac vékonybélben mind a közvetlen simaizom összehúzó hatás, mind az idegi hatás jelen van. Ez a kutatókban a kezdeti vizsgálati szakban felvetette M (morphin-érzékeny) és D (dibenzylin-{phenoxybenzamin}-érzékeny) receptorok létezésének lehetőségét [Gaddum és mtsai 1957]. Az „M” receptoroknak az idegvezetésen keresztül és –az atropin hatásossága miatt–, részben kolinerg mechanizmuson át tulajdonítottak szerepet az összehúzó hatásban. A „D” receptorok direkt simaizomkontraháló hatását vetették fel [Day és mtsai 1963, Brownlee és mtsai 1963]. A közvetlen simaizomkontraháló hatás magas koncentrációjú (10 $\mu\text{g/ml}$) szerotonin antagonistával methysergiddel gátolható volt [Costa, Furness 1979]. A szerotonin kiváltotta neurális kontraktilis választ a tengerimalac vékonybélben a methysergid kevésbé befolyásolta. Napjainkig a szerotonin receptoroknak hét altípusát fedezték fel (5-HT₁₋₇), ezeken belül több alcsoport –izoforma– létezik. Valószínűleg az idegi hatást 5-HT₃ és 5-HT₄ receptorok közvetítik, ezek kolinerg neuronokon helyezkednek el. Az 5-HT₃ receptor –egyedül a szerotonin receptorok csoportján belül– ionotróp receptor (kation csatorna), míg az 5-HT₄ egy G_s-protein kapcsolt receptor [ld. Alexander és mtsai 2018]. A tengerimalac ileum simaizomsejtjein elhelyezkedő 5-HT receptorok 5-HT₁- és 5-HT₂-típusúak [Eglen és mtsai 1990].

A szenzoros izgató AITC a TRPA1 receptorok agonistája [Alexander és mtsai 2018]. Valószínű, hogy az AITC hatás intestinalis hatáshelyei nem korlátozódnak a kapszaicin-érzékeny érző idegekre, vagy csak a TRPA1 csatornára [Capasso és mtsai 2012; Barthó, Nordtveit és mtsai 2013]. Sőt, Nozawa és munkatársai [Nozawa és mtsai 2009] felvetették, hogy az enterokromaffin sejtekből felszabaduló szerotonin felelős az AITC-kiváltotta összehúzó hatásért a tengerimalac ileumon.

Bár még sokféle TRP receptor létezik, amelyek egymással strukturális hasonlóságot mutatnak, a tézisben –gyakorlati jelentőségük miatt– a TRPV1, TRPA1, illetve a TRPM8 receptor gátlókat, illetve a kapszaicin receptor deszenzibilizációját alkalmaztuk (az utóbbi a teljes idegvégződés funkcióképtelenségét maga után vonja) [Barthó és mtsai 2004].

A római kamilla mint gyógynövény rövid jellemzése

A római kamilla (1. ábra) (*Chamaemelum nobile*, *Anthemis nobilis*) az őszirózsafélék (*Asteraceae*) családjába tartozó gyógynövény [EMA-HMPC, 2012].



1. ábra. Római kamilla (Köhler és mtsai 1898)

Frissen és szárítva használhatják. Teája vagy 70%-os etanollal készített kivonata használható enyhe gastrointestinalis panaszok, pl. puffadás vagy gyomor- és bélgyörcsök ellen [EMA-HMPC, 2012]. Gyulladásgátló [Baghalian és mtsai 2011] és görcsoldó [European Pharmacopoeia, 2008; British Herbal Pharmacopoeia, 1971], vérnyomáscsökkentő [Zeggwagh és mtsai 2009], valamint antibakteriális hatást tulajdonítanak neki [Piccaglia és mtsai 1993, Chao és mtsai 2000, Bail és mtsai 2009].

A kísérletes részben a római kamilla izolált szerveken való hatásainak vizsgálata volt a célunk, fenti népi megfigyelésen alapuló görcsoldó hatás [Kandelous és mtsai 2016, Augustin és mtsai 1948, Rápóti és Romváry 1974, Melegari és mtsai 1988, Rossi és mtsai 1988, Bradley és mtsai 1992] tudományos alapokon nyugvó igazolása vagy elvetése. Kísérleteinkben az izolált szervek magukba foglalják a humán vékonybelet, a tengerimalac ileumot, húgyhólyagot, valamint a patkány vastagbelet, ileumot és gyomor fundust.

Célkitűzések

Kísérleteinkben izolált szervi módszerekkel vizsgáltuk az AITC, a CINN és római kamilla zsigeri szerveken –gastrointestinalis traktus, húgyhólyag, trachea– kifejtett motoros hatásait, valamint ezek mechanizmusait.

A beidegzett simaizom-preparátumok mozgásválaszainak előidézésére kémiai stimulusként a TRPA1-agonista AITC-t, CINN-t; illetve a római kamilla extraktumát (RKE-t), illóolaját, frakcióit és a belőle kivont flavonoidokat használtuk fel, vagy az idegek elektromos „tér”- ingerlését alkalmaztuk.

A rágszáló simaizom-készítmények mellett lehetőségünk volt a PTE Sebészeti Klinikával való együttműködésünk keretében humán, műtéti mintákból származó vékonybél preparátumokon is izolált szervi kísérleteket végezni. A Szegedi Tudományegyetem Farmakognóziai Intézetével való kollaborációnk keretében vizsgáltuk a római kamilla kivonatának, illóolajának, frakcióinak, illetve flavonoidjainak a simaizom-készítményekre gyakorolt hatásait.

Munkánk folyamán a következő kérdésekre kerestük a választ:

1./a. Az AITC milyen hatásmechanizmus útján fejt ki kontraháló hatását az emberi vékonybél hosszanti, illetve körkörös simaizom-preparátumokon. Van-e különbség a humán és a tengerimalac vékonybélen a farmakológiai hatásmódban az AITC összehúzó hatásában?

1./b. Az általunk leggyakrabban vizsgált tengerimalac ileumon milyen az AITC elernyesztő, illetve kontraháló hatásmechanizmusának farmakológiai háttere; illetve van-e az összehúzó hatás hátterében –mint egyes kutatók állítják–, a szerotoninnak, illetve a bélnyálkahártyának szerepe?

1./c. Az AITC milyen hatásmechanizmus útján hat a tengerimalac más simaizom-szervein, milyen transzmittereknek van ebben szerepe? Létezik TRPA1 receptortól független hatása az AITC-nek?

1./d. A CINN milyen farmakológiai úton fejt ki az elernyesztő, illetve összehúzó hatását a tengerimalac különböző izolált simaizom-készítményeken? Az AITC esetében is alkalmazott (TRPA1-) antagonistáknak van-e gátló hatása –nem specifikus hatások kiváltása nélkül–, és ha igen, milyen koncentrációban? A CINN-nek milyen hatása van a humán preparátumokon?

2./a. A római kamilla gyógynövény görcsoldó hatásának van-e megalapozott farmakológiai bizonyítéka? A különböző rágszáló fajok (tengerimalac, patkány)

simaizom-szervein és a humán vékonybélben az illóolajának, a 70%-os etanolos extrakcióval készített kivonatának és az abból metanol-víz különböző arányú elegyével kivont frakcióinak, milyen hatásai vannak és ezeknek mi a receptorális háttere?

2./b. Az RKE-nek mely összetevői felelősek a görcsoldó hatásért? A növény illóolajának, illetve a relaxációs hatásért felelős összetevőinek milyen összefüggése van ezzel és milyen neurotranszmitter-mechanizmusok állhatnak a háttérben? Van-e a TRP receptoroknak ebben szerepe; illetve függ-e ezen hatás az idegvezetéstől?

Kísérleti elrendezés és vizsgálati módszerek

Kísérleti modellek

Izolált szervi kísérleteink elmozdulás-mérők (izotóniás rendszer) és közel-izotóniás jelátalakítók segítségével (auxotóniás rendszer) történtek [Barthó, Sándor és mtsai 2014].

A humán vékonybél pancreas carcinoma miatt eltávolított jejunumszakasz nem infiltrált részéből nyertük. Kísérleteinket az ETT-TUKEB és a Pécsi Tudományegyetem Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte. A nyálkahártyát eltávolítottuk és az izomrétegekből körkörös illetve hosszanti irányú kb. 2 x 30 mm-es preparátumokat készítettünk. A preparátumokat Krebs-Henseleit oldatot tartalmazó szervfürdőkbe helyeztük (37 °C-on) és folyamatosan oxigenizáltuk 95% O₂ és 5% CO₂ elegyével. A megfelelő hőfokot keringtető termosztát pumpa (Experimetria, Budapest) segítségével tartottuk fenn. A mozgásokat jelátalakító (Hugo-Sachs Elektronik/Harvard Instruments vagy Experimetria), valamint híderősítő (Hugo Sachs) segítségével regisztráltuk. A szövetek alaptónusát, illetve összehúzódásait-elernyedéseit online –személyi számítógépen– vagy kompenzográfon (Rikadenki, Finnország) regisztráltuk. 10 mN előfeszítést alkalmaztunk. Egy 40 perces nyugalmi időszak után a maximális kontrakciót 30 µmol/l acetyl-kolinval váltottunk ki, amit többszöri kimosás követett.

Az állatkísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottsága és a Regionális Kutatásetikai Bizottság engedélyével végeztük. A tartási körülmények

a következők voltak. Relatív páratartalom: 55 ± 10 %, hőmérséklet: 22 ± 2 °C, fény-sötét ciklus: 12/12 óra, légsere: 15-ször óránként történt. Az állatok a leölés előtt standard rágcáló tápot és csapvizet kaptak *ad libitum*.

A tengerimalacok mindkét nemből származtak, súlyuk 330-450 gramm között volt. Occipitális tájékra mért ütés után kivéztettük őket. Teljes ileumot, disztális colont vettünk ki. Átlagosan 2 cm hosszúságú preparátumokat használtunk. Ezeket szervfürdőkbe helyeztük. Az oxigenizáció és a reagensek elkeveredése céljából karbogénnel (95% O₂, 5% CO₂) levegőztettük a Krebs-Henseleit oldatot 37 °C-on. A szervürdőkben lévő oldat összetevői a következők voltak (mmol/l -ben): NaCl: 119; NaHCO₃: 25; KCl: 2,5; MgSO₄: 1,5; CaCl₂: 2,5; KH₂PO₄: 1,2; glükóz: 11. A mozgásokat jelátalakító, valamint híderősítő segítségével regisztráltuk. 7 mN-os előfeszítést alkalmaztunk. A kísérlet 40 perc inkubációs periódus után kezdődött, ami után a maximális összehúzódnást hisztamin segítségével váltottuk ki (3 μmol/l; 30 s-ig volt a szervfürdőben). További 40 perc kimosási periódus után a kísérlet kezdetét vette [Sándor és mtsai 2016b].

Az elektromos téringerlést (nagy teljesítményű stimulátor: Experimentria, Budapest és Power Amplifier) a szervfürdőben alul és fent elhelyezett platina elektród-pár segítségével végeztük (távolságuk 4 cm). Az ingerlés paraméterei a következők voltak: a négyszögimpulzus amplitúdója: 60 V, szélessége: 0,1 ms, egyes impulzusok 20 másodpercenként (kolinerg „twitch”-kontrakciók) [Id. Benkó és mtsai 2012b]. A regisztrálás az emberi bélmintáknál leírtakhoz hasonlóan történt.

A tengerimalac húgyhólyag esetében a következőképpen jártunk el [Benkó és mtsai 2012a]: A húgyhólyagot Krebs-oldatba tettük a preparáció alatt. A hólyagot sagittális irányban kettéválasztottuk, a hólyag felekből hosszanti detrusor simaizom-preparátumot készítettünk. Az előfeszítés 5 mN volt. A maximális kontrakciót a kísérlet végén 100 mmol/l KCl-dal váltottuk ki.

A tengerimalac trachea esetében az alábbi preparálási módszert követtük [Szolcsányi, Barthó 1982]: a légcsövet Krebs-oldatba tettük a preparáció alatt. A trachea-porcokat hosszanti irányban átvágtuk (a simaizomzat sértetlen maradt) és 5-7 porcot tartalmazó „cikk-cakk” preparátumot készítettünk. Az előfeszítés mértéke 3 mN volt. A maximális kontrakciót a kísérlet végén 100 mmol/l KCl-dal váltottuk ki.

A tengerimalac oesophagus esetében a preparálási mód megegyezik a fentebb említett ileum preparálási protokollal [részletesen lásd: Barthó, Lénárd és mtsai 1999]. Az előfeszítés mértéke 10 mN volt. A maximális összehúzódást a kísérlet végén 200 mmol/l KCl-dal váltottuk ki.

A tengerimalac gyomor fundusból 2 cm-es hosszanti preparátumokat készítettünk. Az előfeszítés mértéke 5 mN volt. A maximális összehúzódást a kísérlet végén 200 mmol/l KCl-dal váltottuk ki.

A tengerimalac taenia coeci esetében a taenia libera-t választottuk le. A preparátumok 15-20 mm hosszúságúak voltak [részletesebben lásd: Lénárd és mtsai 2000]. Az előfeszítés mértéke 5 mN volt. A maximális relaxációt a kísérlet végén 10 μ mol/l isoprenalinnal váltottuk ki.

A patkány kísérletekhez mindkét nemből Wistar-patkányokat (220-330 gramm) használtunk fel. Az állatot a fejre és nyakszirtre mért erős ütéssel megöltük. A patkány gyomrokat a kis- és a nagygörbület mentén vágtuk fel és a két fél fundus-régiójából hosszanti, körülbelül 2x 20 mm-es preparátumokat készítettünk [Id. Benkó és mtsai 2012b]. A disztális, teljes vastagbélből és vékonybélből hasonló hosszúságú preparátumok készültek. A készítményeket oxigenizáltuk (95% O₂, 5% CO₂ elegyével) és szervfürdőkben Krebs-Henseleit oldatban tartottuk 37 °C-on. A szervek mozgásait a fent leírt módon regisztráltuk. Az előfeszítés mértéke a colonnál, ileumnál 7 mN, a gyomor fundusnál 5 mN volt. Egy 40 perces nyugalmi időszak után maximális kontrakciót 30 μ mol/l acetyl-kolinnal váltottunk ki, amit többszöri kimosás követett. A patkány ileumon alkalmazott elektromos stimuláció módja és paraméterei a következők voltak: a négyszögimpulzus amplitúdója: 60 V, szélessége: 0,1 ms volt; 30 másodpercen át alkalmaztunk 4 Hz-es ingerlést.

Az α , β -metilén ATP deszenzibilizálás menete a következő volt: 15 μ mol/l-t adtunk a fürdőbe 10 percre, majd ismét 15 μ mol/l koncentráció következett 15 percre. A második beadás már gyakorlatilag hatástalan volt. A tesztelt anyagokat az α , β -metilén ATP jelenlétében adtuk be [Benkó és mtsai 2005]. (Az α , β -metilén ATP az ATP metabolikusan stabilabb analógja, főként P_{2x} receptorokat aktivál.)

A kapszaicin tachyphylaxia a következőképp zajlott: 10 μ mol/l kapszaicint adtunk be a szervfürdőbe 10 percre, majd kimostuk; ezt követően egy óra inkubáció következett többszöri mosással [Id. Barthó és mtsai 2004].

Célunk volt specifikus szerotonin antagonistát, ill. kombinációt találni, ami gátolja az exogén 5-HT hatását a simaizomban, nem-specifikus hatások nélkül. Az SB204070-et az 5-HT₄ receptor gátlására [Alexander és mtsai 2018], az Y25130-at (azasetron) az 5-HT₃ receptorok blokkolására [Sato és mtsai 1992] alkalmaztuk. A methysergid többféle szerotonin receptoron fejt ki gátlást [Prins és mtsai 1997, Mylecharane 1989].

A kontrakciók mértékét a maximális összehúzódás százalékában adtuk meg, a relaxációk százalékos arányát bizonyos preparátumokon a maximális relaxáció százalékos arányában számoltuk ki, amit a kísérlet végén beadott 10 µmol/l isoprenalinnal váltottunk ki. Alacsony tónusú szervek esetében viszont előkontraháló anyagot alkalmaztunk és az alapvonalhoz való visszatérést vettük 100%-nak.

Felhasznált anyagok

Cinnamaldehyd /CINN/, allil-izotiocianát /AITC/ (Sigma); α,β-metilén ATP (Tocris), atropin hydrochlorid (Sigma), PPADS (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid tetrasodium salt) (Tocris), tetrodotoxin /TTX/ (Tocris), kapszaicin (Ashian Herbex Ltd.), indometacin (Sigma), acetil-kolin (Sigma), szerotonin (Tocris), hisztamin (Sigma), propranolol hydrochlorid (Sigma), suramin (Sigma), apamin (Sigma), TEA {tetraethyl-ammonium chloride} (Sigma). L-NOA {N^G-nitro-L-arginine}: (Sigma), A967079 ((1*E*,3*E*)-1-(4-Fluorophenyl)-2-methyl-1-pentene-3-one oxime) (Tocris), HC030031 (2-(1,3-Dimethyl-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7*H*-purin-7-yl)-*N*-(4-isopropylphenyl) acetamide) (Tocris), BCTC (4-(3-Chloro-2-pyridinyl)-*N*-[4-(1,1-dimethylethyl)phenyl]-1-piperazinecarboxamide) (Biomol). SR140333 (1-[2-[(3*S*)-3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-[2-[3-(1-methylethoxy)phenyl]acetyl]-3-piperidinyl]ethyl]-4-phenyl-1-azoniabicyclo [2.2.2] octane chloride) (Sanofi), SR48968 (N-[(2*S*)-4-(4-acetamido-4-phenylpiperidin-1-yl)-2-(3,4-dichlorophenyl)butyl]-*N*-methylbenzamide) (Sanofi), SR142801 (N-[1-[3-[(3*R*)-1-benzoyl-3-(3,4-dichlorophenyl)piperidin-3-yl]propyl]-4-phenylpiperidin-4-yl]-*N*-methylacetamide) (Sanofi), isoprenalin (Sigma), glibenclamid (Sigma), methysergid (Sandoz), SB204070 (8-Amino-7-chloro-2,3-dihydro-1,4-benzodioxan-5-carboxylic acid, 1'-butyl-4'-piperidinylmethyl ester) (Tocris), Y25130 (*N*-(1-Azabicyclo [2.2.2] oct-3-yl)-6-chloro-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydro-2*H*-1,4-benzoxazine-8-carboxamide hydrochloride) (Tocris), prosztoglandin F_{2α} tris só (Sigma).

A CINN és az AITC Krebs-Henseleit oldatban kerültek feloldásra. A vivőanyag az atropin, tetrodotoxin, hisztamin, szerotonin, apamin, suramin, propranolol, α,β-metilén ATP, acetil-kolin, PPADS, TEA, L-NOA, Y25130, methysergid és az

isoprenalin esetében fiziológiás NaCl oldat volt. Az indometacint, a prostaglandin $F_{2\alpha}$ /PGF $_{2\alpha}$ -t és a kapszaicint etanolban oldottuk fel. A BCTC, az A967079, a HC030031, SR140333, SR48968, SR142801, glibenclamid és az SB204070 dimetil-szulfoxidban (DMSO) kerültek feloldásra.

Felhasznált anyagok a római kamillával végzett izolált szervi kísérletek során

A kísérletsorozatban alkalmazott római kamilla illóolaj az Aromax Zrt.-től származik, a kivonatokat a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszerésztudományi Karának Farmakognóziái Intézetében készítették; **az alkalmazott eljárások nem képezik értekezésem tárgyát.**

Az etanolos törzsoldat (RKE) az EMA Monográfiában szereplő előirat alapján készült [EMA-HMPC, 2012]: 10,0 g növényi drogot 3×100 ml 70%-os etanollal extraháltak ultrahangos vízfürdőben; liofilizálást követően a szárazanyag-tartalom 3,169% lett. A frakcionálás vákuum folyadékkromatográfia segítségével poliamid oszlopon történt metanol–víz különböző arányú (20:80, 40:60, 60:40, 80:20, 100:0) elegyeivel, a frakciók kódja ennek megfelelően: F20, F40, F60, F80 és F100.

A liofilizált mintákat a farmakológiai vizsgálatokhoz DMSO-ban oldottuk, első lépésben 200 mg/ml-es törzsoldatokat készítettünk, amelyeket szükség esetén tovább hígítottunk.

A kivonatok és az illóolaj összetételének meghatározására HPLC és GC analízist végeztek (részletesen lásd: Sándor, Mottaghipisheh és mtsai 2018). Az általunk vizsgált illóolaj fő összetevői a 3-metil-pentil-angelát, metilallil-angelát, 3-metil-amil-izobutirát és 2-metil-butil-angelát, az alkoholos kivonat fő komponensei az eupafolin, luteolin, hiszpidulin és apigenin flavonoidok voltak [Sándor, Mottaghipisheh és mtsai 2018].

További anyagok: α,β -metilén ATP (Tocris), atropin (Sigma), proszttaglandin $F_{2\alpha}$ tris só (Sigma), PPADS (Tocris), tetrodotoxin (Tocris). Kapszaicin (Ashian Herbex Ltd.), indometacin (Sigma), acetyl-kolin (Sigma), hisztamin (Sigma), propranolol (Sigma), methysergid (Sandoz), SB204070 (Tocris), Y25130 (Tocris), isoprenalin (Sigma).

Az oldószer az atropin, tetrodotoxin, Y25130, hisztamin, propranolol, α,β -metilén ATP, acetyl-kolin, PPADS, methysergid és az isoprenalin esetében

fiziológiás sóoldat volt. A $\text{PGF}_{2\alpha}$; az indometacin, a kapszaicin 96%-os etanolban kerültek feloldásra; az SB204070-t DMSO-ban oldottuk fel.

Statisztikai módszerek

A dolgozatban az átlagok és a hozzájuk tartozó középérték középhibája (SEM) vannak feltüntetve. Az "n" az elemszámot jelentette.

Két független csoport összehasonlítására a Mann-Whitney tesztet, ennél több független csoport adatainak összevetésére a Kruskal-Wallis tesztet és poszt-tesztjét, a Dunn-féle tesztet alkalmaztuk. Két függő minta csoport összehasonlítására a Wilcoxon-signed rank tesztet használtuk.

Ha a $P < 0,05$ volt; az eredményt szignifikánsnak tekintettük. A statisztikai tesztek kiszámításához a „GraphPad Prism 5” nevű szoftvert használtuk.

Eredmények

1./a, AITC kontraháló hatása humán vékonybélben:

Az AITC tónusos összehúzódást eredményezett az emberi jejunum preparátumon. Mivel az AITC hatása nem volt ismételtető (a második beadás rendre jelentősen kisebb kontrakciót eredményezett), független csoportokat alkalmaztunk, és minden preparátum csak egyszer kapott AITC-t. Az összehúzódás mértéke koncentráció függő volt a 100 és 600 $\mu\text{mol/l}$ közötti tartományban.

Tetrodotoxin (0,5 $\mu\text{mol/l}$) nem gátolta az AITC hatását, de az AITC által kiváltott összehúzódás szinte eltűnt atropin (0,5 $\mu\text{mol/l}$) jelenlétében. Egy másik muszkarin receptor antagonist, a szkopolamin, 30 nmol/l koncentrációban 68%-os csökkenést eredményezett; 0,1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban pedig teljesen gátolta a kontrakciókat. Az AITC (300 $\mu\text{mol/l}$) kontraháló hatását a kolinészteráz-inhibitor fizosztigmin (50 nmol/l 20 perces kontaktusidővel), jelentősen (43%-kal) megnövelte (a kontroll, előkezelésen át nem esett, ugyanabból a betegből vett mintákkal összevetve).

A purinerg receptorokat gátló PPADS (50 $\mu\text{mol/l}$) és suramin (100 $\mu\text{mol/l}$) nem befolyásolta az AITC kiváltotta összehúzódásokat, de a TRPA1-antagonista HC030031 (30 $\mu\text{mol/l}$) és A967079 (1 $\mu\text{mol/l}$) jelentősen csökkentette azokat. A HC030031 oldószerének (DMSO) nem volt gátló hatása az AITC válaszra, szintúgy a kapszaicin deszenzibilizációnak sem. A TRPV1/TRPM8 receptor-antagonista BCTC-nek [Benkó és mtsai 2012a] (2 $\mu\text{mol/l}$), a ganglionbénító

hexamethoniumnak (100 $\mu\text{mol/l}$), vagy az indometacinnak (5 $\mu\text{mol/l}$) sem volt gátló hatása.

I./b, AITC kontraháló hatása tengerimalac ileumon:

A kísérletek kezdetén beadott hisztamin maximum után egy 40 perces kimosási periódust követően, a szerotonin, vagy a TRPA1-izgató AITC összehúzó hatását vizsgáltuk. Az 5-HT-t 20 másodpercre adtuk be a szervfürdőbe- kétszer, 40 perc különbséggel. A válaszok reprodukálhatónak bizonyultak. Az antagonisták inkubációs ideje 20 perc volt a második szerotonin beadás előtt. Az 5-HT 0,5-2 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban szubmaximális kontrakciót okozott (a cél a maximális kontrakció 50-70 %-ának elérése volt). A kontroll szerotonin válasz előtt a vizsgált antagonisták oldószerét is (ez az SB204070 esetében DMSO volt, a többi kémiai ágensnél fiziológias sóoldat) beadtuk a szervfürdőbe, ami nem csökkentette a szerotonin okozta kontrakciókat. A szerotonin deszenzitizációt 5 + 5 $\mu\text{mol/l}$ szerotonin beadásával értük el, 5 perces különbséggel. A második deszenzibilizáló koncentráció beadása után 10 perccel (mosás nélkül), a preparátumok nem kontraháltak a teszt koncentrációkra (0,5-2 $\mu\text{mol/l}$) –amik előzőleg félmaximális kontrakciót produkáltak. Az AITC kontaktusideje 2 perc volt, ez alatt az idő alatt az összehúzó válasz teljesen kifejlődött, majd el is tűnt. A kísérletek egy részében, hosszanti izom-plexus myentericus preparátumokat [Paton és Vizi 1969] használtunk. Az előfeszítés mértéke itt 3 mN volt. A téringerlés gyanánt egyes impulzusokat alkalmaztunk- specificitási vizsgálat céljából (0,03 Hz). A vizsgált szert folyamatos ingerlés alatt adtuk be. Az elektromos válaszok teljesen eltűntek TTX-re (0,5 $\mu\text{mol/l}$).

A **szerotonin** kiváltotta félmaximális kontrakciók a fent leírt körülmények között ismételtetők voltak (DMSO jelenlétében és anélkül); a DMSO-nak nem volt összehúzó befolyásoló hatása. A methysergid (0,3 $\mu\text{mol/l}$), az SB204070 (2 $\mu\text{mol/l}$), vagy az Y25130 (1 $\mu\text{mol/l}$) enyhén, de szignifikánsan csökkentette az 5-HT keltette kontrakciókat. A három antagonisták kombinációja majdnem teljes gátlást okozott, a szerotonin kiváltotta összehúzó mozgásokban. A három szerotonin antagonisták együtt adása a hosszanti izom-plexus myentericus preparátumokon is majdnem teljes egészében eltűntette az összehúzó mozgásokat. A szerotonin deszenzitizáció teljes egészében eltűntette a szerotonin okozta szubmaximális válaszokat, mind a teljes ileumon, mind a hosszanti izom-plexus myentericus preparátumokon.

Ellenben az AITC (200 $\mu\text{mol/l}$) összehúzó hatását nem befolyásolta a három 5-HT antagonisták kombinált alkalmazása vagy a szerotonin deszenzitizáció sem a teljes vékonybélben, sem a hosszanti izom-plexus myentericus készítményeken. A hosszanti izom-plexus myentericus preparátumokon –hasonlóan a teljes ileumhoz– az alkalmazott tetrodotoxin vagy atropin (0,5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban –mind a kettő) eltüntette az AITC (200 $\mu\text{mol/l}$) által okozott kontrakciókat. A purinerg receptor gátló PPADS (50 $\mu\text{mol/l}$) a hosszanti izom-plexus myentericus készítményeken is erőteljes gátlást okozott.

I./c, AITC kontraháló hatása tengerimalac nyelőcsövön:

Az AITC választott koncentrációja 1 mmol/l volt, ez szubmaximális kontrakciót okozott (minden preparátum csak egyszer kapott AITC-t). TTX (0,5 $\mu\text{mol/l}$) szignifikánsan csökkentette a kontrakciókat: 44%-kal; az atropin ugyanakkor nem csökkentette az összehúzódásokat. Annak megítélése céljából, hogy az AITC szabadít-e fel tachykinineket, specifikus tachykinin NK receptor gátlókat alkalmazunk. A tachykinin NK₁ receptorok blokkolására az SR140333, az NK₂ receptorok gátlására az SR48968, az NK₃ receptorok inhibíciója céljából pedig az SR142801 nevű vegyületet alkalmaztuk. A 3 tachykinin-antagonista (SR140333 3 $\mu\text{mol/l}$, SR48968 3 $\mu\text{mol/l}$ és SR142801 0,1 $\mu\text{mol/l}$) [Barthó, Lénárd és mtsai 1999] a DMSO kontrollhoz képest szignifikánsan csökkentette az összehúzódásokat 63%-kal. A TRPA1-antagonista, 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációjú A967079 nem okozott jelentős változást a DMSO kontrollhoz képest.

I./d, AITC kontraháló hatása tengerimalac húgyhólyagon:

A kísérletekhez 200 $\mu\text{mol/l}$ AITC-t választottunk. Az indometacin az összehúzódásokban 37%-os, szignifikáns mértékű gátlást okozott, a nagyobb koncentrációjú TRPA1-antagonista (A967079: 44%-os gátlás) szintén, még nem-specifikus gátlások nélkül.

I./e, AITC kontraháló hatása tengerimalac légcsövön:

A kísérletekhez választott koncentráció az AITC 200 $\mu\text{mol/l}$ volt. Az antagonisták (a muszkarin receptor blokkoló atropin; a feszültség-függő Na⁺ csat. blokkoló TTX; a TRPA1 antagonisták HC030031; a TRPM8 és V1 gátló BCTC; valamint a purinerg receptor blokkoló PPADS és a nem szelektív ciklooxygenáz gátló indometacin) nem voltak hatásosak a trachea kontrakciókkal szemben, csak a kapszaicin tachyphylaxia; amely 90%-os gátlást okozott.

I./f, AITC kontraháló hatása tengerimalac gyomor funduson:

A választott AITC koncentráció 200 $\mu\text{mol/l}$ volt, ez szubmaximális kontrakciót okozott. Ismételhetőségét tekintve, 40 perc és többszöri szervfürdő folyadékcseré után ismételt beadás csökkent kontrakciót okozott. Ezért az AITC-t a gyomor fundusnak egyszer adtuk be. Atropin (0,5 $\mu\text{mol/l}$) szignifikánsan csökkentette a kontrakciókat: 69 %-kal; a TTX (0,5 $\mu\text{mol/l}$) ugyanakkor nem csökkentette az összehúzódásokat. A P_2 -purinoceptor gátló PPADS szintén szignifikánsan csökkentette az összehúzódásokat 68 %-kal.

~ ~ ~ ~ ~

I./g, AITC relaxáló hatása tengerimalac ileumon:

Az AITC-t 200 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban adtuk be a preparátumoknak. Atropin és TTX (0,5 $\mu\text{mol/l}$ - mindkettő) jelen volt a szervfürdőkben, az AITC beadása előtt szubmaximális előkontrahálás céljából 0,2 $\mu\text{mol/l}$ hisztamint juttatunk a fürdőbe [v.ö. Sándor és mtsai 2019]. Az AITC-t ez után körülbelül 20 perccel egy platófázis elérése után egyszer alkalmaztuk –ismételhetőség hiányában.

A relaxációk farmakológiai hátterének pontosabb megítélése céljából a méhmembránban is jelenlévő alacsony konduktanciájú Ca^{++} aktivált K^{+} csatorna blokkoló apamin [Vergara és mtsai 1998] (1 $\mu\text{mol/l}$); az ATP függő K^{+} csatorna blokkoló glibenclamidot (10 $\mu\text{mol/l}$) [Sun és mtsai 1994, Fujimoto és mtsai 2006] és a tetraetilammóniumot (TEA: 1 mmol/l) [Suarez-Kurz és mtsai 1991] alkalmaztuk, ami az idegi és a simaizmon lévő [Fan és mtsai 1994] feszültség függő K^{+} csatornák és nem szelektíven a Ca^{++} aktivált K^{+} csatorna gátlásra is alkalmas [Alexander és mtsai 2018].

A kapott eredmények alapján csak a TEA-nak volt szignifikáns gátló hatása. A propranolol nem szignifikáns, enyhe gátlást okozott az elernyedésben.

I./h, AITC relaxáló hatása tengerimalac vastagbélén:

A magas tónus miatt a vastagbélén előkontrahálásra nem volt szükség. AITC 200 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban fél-maximális elernyedést okozott –ez a válasz nem volt ismételhető. A további kísérletekhez a választott AITC koncentráció ez volt. Apamin enyhe, de szignifikáns gátlást okozott, TTX 39%-os; indometacin 15%-os és a kapszaicin deszenzibilizáció 12%-os csökkenést váltott ki kontrolljához képest –amik szintén szignifikánsak voltak.

I./i, AITC relaxáló hatása tengerimalac vakbélén (taenia coeci):

A kísérletekhez választott AITC koncentráció 200 $\mu\text{mol/l}$ volt, ez a maximális elernyedés kétharmadát váltotta ki. Ez a hatás nem bizonyult ismételhetőnek, így az AITC-t a taeniának egyszer adtuk be. A nem-szelektív kálium csatorna

blokkoló tetraetil-ammónium és a TTX egyaránt szignifikáns relaxáció csökkenést váltott ki. A TEA igen jelentős: 71%-os csökkenést okozott.

~ ~ ~ ~ ~

I./j, CINN kontraháló hatása tengerimalac ileumon:

Ismételhetőségét tekintve a CINN (200 $\mu\text{mol/l}$) okozta összehúzódás 40 perces különbséggel és többszöri szervfürdő folyadékcsere után –megbízhatóan ismételőnek bizonyult, ezért a CINN-t kétszer adtuk be. Kísérleteink során atropin és tetrodotoxin 100%-os, PPADS csaknem teljes, α,β -metilén ATP 90%-os, suramin 62%-os csökkenést, A967079 60%-os, HC030031 76%-os gátlást okozott a kontrakciókban, előbb felsoroltak mind szignifikánsnak bizonyultak [Sándor és mtsai 2019].

I./k, CINN kontraháló hatása tengerimalac nyelőcsövön:

Az ismételőség a második CINN beadás előtti alaptónus emelkedés miatt nem volt megbízható, így a második CINN beadástól eltekintettünk. A CINN koncentrációja 1 mmol/l volt ez szubmaximális (50-70 % közötti) kontrakciót okozott. Az atropin vagy a TTX (0,5-0,5 $\mu\text{mol/l}$) nem csökkentette a kontrakciók mértékét. A kapszaicin tachyphylaxia viszont eltörölte a CINN okozta kontrakciókat [Sándor és mtsai 2019].

I./l, CINN kontraháló hatása tengerimalac húgyhólyagon:

A rossz ismételőség miatt a CINN-t egyszer adtuk be hólyagnak –szintén 200 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban, az antagonistákat ez előtt 20 perccel alkalmaztuk. A kapszaicin deszenzibilizálás kb. 70%-os gátlást okozott a CINN kiváltotta összehúzódásokban tengerimalac húgyhólyagon, a többi kezelésnek (a muszkarin receptor blokkoló atropinnak; a feszültség-függő Na^+ csat. blokkoló TTX-nek; a TRPA1 antagonista HC030031-nek és A967079-nek; a TRPM8 és V1 gátló BCTC-nek; valamint a purinerg receptor blokkoló PPADS-nek és az α,β -metilén ATP deszenzibilizációnak) nem volt hatása [Sándor és mtsai 2019].

I./m, CINN kontraháló hatása tengerimalac légcsövön:

A kísérletekhez választott koncentráció az CINN 200 $\mu\text{mol/l}$ volt. A muszkarin receptor blokkoló atropin a trachea összehúzódásokat negyedére csökkentette, míg a kapszaicin deszenzibilizálás 88%-kal gátolta a kontrakciókat. A többi kezelésnek (a feszültség-függő Na^+ csat. blokkoló TTX-nek; a TRPM8 és V1 gátló BCTC-nek; valamint a purinerg receptor blokkoló PPADS-nek) nem volt hatása [Sándor és mtsai 2019].

~ ~ ~ ~ ~

I./n, CINN relaxáló hatása tengerimalac ileumon:

A CINN-et 100 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztuk a preparátumoknak. Atropin és TTX –egyaránt 0,5 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban– is jelen volt a szervfürdőkben, a CINN beadása előtt szubmaximális előkontrahálás céljából 0,2 $\mu\text{mol/l}$ hisztamint adtunk a szervfürdőbe. A CINN-t ez után körülbelül 20 perccel egy platófázis elérésekor alkalmaztuk. A további kísérletekhez választott koncentráció 100 $\mu\text{mol/l}$ volt. Ismételt beadásnál a CINN okozta elernyedés 40 perces különbséggel és többszöri szervfürdő folyadékcsere után –a választott koncentrációban– megbízhatóan ismételhetőnek bizonyult, ezért a CINN-t kétszer adtuk be. A vékonybél relaxációt TEA 21%-kal, szignifikánsan csökkentette, a többi antagonistának vagy ágensnek, ill. a kapszaicin tachyphylaxiának nem volt hatása a CINN kiváltotta inhibitoros válaszra [Sándor és mtsai 2019].

I./o, CINN relaxáló hatása tengerimalac vastagbélen:

A kísérletekhez választott koncentráció 200 $\mu\text{mol/l}$ lett. A maximális relaxációt a kísérlet végén 10 $\mu\text{mol/l}$ isoprenalinnal váltottuk ki. A rossz ismételhetőség miatt, az antagonistákat 20 perccel az egyszer beadott CINN előtt adtuk a szervfürdőbe. A TTX, a PPADS és az apamin nem gátolta az elernyedéseket.

I./p, CINN relaxáló hatása tengerimalac húgyhólyagon:

A CINN-t 200 $\mu\text{mol/l}$ –kontroll– koncentrációban adtuk a preparátumoknak. A CINN beadása előtt félmaximális előkontrahálás céljából 10 $\mu\text{mol/l}$ hisztamint juttatunk szervfürdőbe. Az CINN-t ez után körülbelül 20 perccel egy platófázis elérése után adtuk be. A CINN elernyedést hozott létre, amelynek mértéke csökkent ismételt alkalmazás során. A CINN okozta relaxációt a kapszaicin deszenzibilizálás nem csökkentette szignifikáns mértékben oldószeres kontrolljához képest [Sándor és mtsai 2019], a TTX-nek és az apaminnak sem volt gátló hatása az elernyedésekre.

I./q, CINN relaxáló hatása humán vékonybélen:

A CINN –200 $\mu\text{mol/l}$ – a humán simaizom készítményeken csak elernyesztő hatással bírt. Ennél alacsonyabb koncentrációk nem voltak hatásosak. A relaxáció pontosabb vizsgálata céljából $\text{PGF}_{2\alpha}$ -val (1 $\mu\text{mol/l}$) kiváltott előkontrakciót alkalmaztunk –mivel alacsony tónusú ez a szerv. (A szubmaximális választ az acetil-kolin maximumhoz hasonlítottuk –előtte a bél előkezelést nem kapott, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ kontaktusideje 20 perc volt, a plató-fázis eléréséig; a relaxáció százalékos meghatározásához itt is a $\text{PGF}_{2\alpha}$ beadás előtti alaptónus és a plató közötti távolságot vettük 100%-nak.) Az ismételhetőség nem bizonyult kivihetőnek, ezért

a CINN egyszer adtuk be. A humán jejunum előkontrahált készítményeken TTX, TEA, kapszaicin deszenzibilizáció vagy az A967079 (1 $\mu\text{mol/l}$) nem csökkentette a CINN hatására bekövetkező elernyedést, sem a körkörös, sem a hosszanti izmon.

I./r, CINN relaxáló hatása tengerimalac vakbélén:

A prekontrakció nélküli tengerimalac vakbél-taenián a CINN koncentrációfüggő elernyedéseket okozott.

II. A római kamillával végzett kísérletek a római kamilla népi gyógyászatban leírt görcsoldó hatását voltak hívatottak vizsgálni, mivel eddig izolált szervi körülmények között nem igazolták simaizom relaxáló-hatását. Kísérleteinkkel a növény hagyományos kivonatának (RKE), víz-alkohol elegyével előállított frakcióinak, illóolajának és négy flavonoidjának hatásait próbáltuk kideríteni. A növény kivonatának fitokémiai elemzése (amelynek részletei nem képezik a jelen dolgozat tárgyát) 4 flavonoid jelenlétét igazolták: az apigenin, a luteolin, az eupafolin és a hiszpidulin [Sándor, Mottaghipisheh és mtsai 2018]. Az izolált szervi kísérletek a növény vizes-alkoholos kivonatával; ennek frakcióival (F20, F40, F60, F80 és F100-as); a négy flavonoiddal (apigenin, eupafolin, hiszpidulin és luteolin); valamint az illóolajával történtek, *in vitro* (izolált szervi kísérletekben), „túlélő” simaizomszerveken.

A **tengerimalac ileumon** az RKE vizsgálatok 60 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációval történtek. A változó ismételtetés miatt az RKE-t csak egyszer adtuk be minden preparátumnak. Egy állatból csak két készítményt használtunk ugyanarra a kísérletre. A muszkarin receptor-blokkoló atropin jelentősen csökkentette a kontrakciókat. A feszültség-függő Na^+ csatornák blokkolója, a TTX szintén szignifikánsan gátolta az összehúzódásokat. A purinerg-rendszer gátlása céljából PPADS-t alkalmaztunk. PPADS 50 $\mu\text{mol/l}$ nem gátolta a kontrakciót. A szerotonin receptorok gátlása sem hozott csökkenést a kontrakciókban [Sándor és mtsai 2016b]. A specifikus 5-HT₃ receptor-blokkoló Y25130 1 $\mu\text{mol/l}$, a specifikus 5-HT₄ receptor-blokkoló SB204070 1 $\mu\text{mol/l}$, illetve a methysergid 0,3 $\mu\text{mol/l}$ együttes adása nem csökkentette az összehúzódásokat. A kapszaicin-érzékeny afferens idegvégződések funkcionális gátlása céljából kapszaicin deszenzibilizációt alkalmaztunk [Id. Barthó és mtsai 2004; Barthó és mtsai 2013]. Majd ezután adtuk be az RKE-t a fenti koncentrációban. Ezzel a kísérlettel párhuzamosan alkoholos kontrollt alkalmaztunk, az etanol koncentrációja a szervfürdőben 0,5 $\mu\text{l/ml}$ volt. Az alkoholos kontroll és a kapszaicinnel kezelt csoport összehúzódása között nem volt lényeges különbség. A nem-szelektív

ciklooxygenáz gátló indometacint 3 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban adtuk, oldószer kontrolljával párhuzamosan. Az etanol koncentrációja 0,3 $\mu\text{l/ml}$ volt. Indometacin jelenlétében az RKE kiváltotta összehúzódás csökkent az alkoholos kontrolljához képest. A Mann-Whitney teszt szignifikáns különbséget jelzett az indometacin és oldószer kontrollja között.

Az RKE relaxáló hatását **ileumon** atropin és TTX (0,5-0,5 $\mu\text{mol/l}$) jelenlétében mértük, hisztamin (0,2 $\mu\text{mol/l}$) előkontrahálás után. Körülbelül 20 perces várakozást követően, a platófázis (maximális spazmus körülbelül 50-70%-a) megjelenésekor adtuk be a 60 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú RKE-t. /Itt meg kell jegyezni, hogy öt esetben az elernyedést egy enyhe kontrakció vezette be, mely a regisztrátumon tüske-szerű volt és nem haladta meg a maximális összehúzódás 5%-át./ A propranololnak és az L-NOA-nak is 40 perces kontakt ideje volt. A Kruskal-Wallis teszt poszt-tesztje (Dunn) nem találta szignifikánsnak a különbséget a propranolollal, vagy a L-NOA-val kezelt csoportokban a kontroll csoporthoz képest.

A római kamilla illóolaj 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban az ingerlésre adott „twitch” válasz amplitúdóját (0,05 Hz) 32,5 %-kal csökkentette az ileumon. Wilcoxon félesigned rank teszt szignifikánsnak találta a különbséget. Önmagában adva a római kamilla illóolaját 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ és 30 $\mu\text{g/ml}$ illóolaj sem okozott kontrakciót tengerimalac ileumon. A hisztamin (0,2 $\mu\text{mol/l}$) által kiváltott prekontrakció után megvizsgáltuk a kamilla illóolajának relaxáló hatását atropin és TTX jelenlétében és azok nélkül. A relaxációkat szignifikánsnak találtuk 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$ illóolaj koncentráció esetén mindkét esetben, míg 0,1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú olaj esetén nem; a kontroll csoporthoz képest.

A különböző római kamilla frakciókat, többféle koncentrációban próbáltuk ki a kontraháló hatás vizsgálata során ileumon. Az F60, F80, F100 frakciókban is a magasabb koncentrációk felé látható, lefelé tartó koncentráció-hatás összefüggést találtunk.

A különböző római kamilla frakciókat, többféle koncentrációban próbáltuk ki az elernyesztő hatás vizsgálata során ileumon. A római kamilla frakciók relaxáló hatását /atropin és tetrodotoxin jelenlétében (0,5 $\mu\text{mol/l}$ –mindkettő) / jelenlétében hisztamin (0,2 $\mu\text{mol/l}$) prekontrakció után mértük. Az F60, F80, F100 frakciókban is a magasabb koncentrációk felé kifejezettebb relaxáló hatást tapasztaltunk.

A római kamilla flavonoidjainak ileumon való kontraháló hatását vizsgálva, azt találtuk; hogy 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban a flavonoidok nem váltottak ki

kontrakciót, de 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban már volt mérsékelt hatásuk: 20-35 %-os kontrakciót eredményeztek. A hisztaminnal előkontrahált, atropinnal és TTX - el (0,5-0,5 $\mu\text{mol/l}$) kezelt ileumon a római kamilla flavonoidjai relaxációt hoztak létre hasonló hatásereőséggel, mint az összehúzódásnál tapasztaltak.

Tengerimalac **húgyhólyagon** 20 $\mu\text{g/ml}$ és 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú RKE kontraháló hatását vizsgáltuk. A szenzoros idegvégződés funkcionális gátlására kapszaicin deszenzibilizációt alkalmaztunk. Ezután adtuk be az RKE-t 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban. Ezzel kísérlettel párhuzamosan alkohol és idő kontrollt alkalmaztunk, az oldószer koncentrációja a szervfürdőben 0,5 $\mu\text{l/ml}$ volt. Az alkoholos kontrollhoz képest a kapszaicinnal kezelt csoportban a RKE által okozott összehúzódások körülbelül a felére csökkentek.

Az RKE relaxáló hatását tengerimalac húgyhólyagon atropin és TTX (mindkettő: 0,5 $\mu\text{mol/l}$) jelenlétében, valamint – a hólyagban lévő purinerg izgató válaszok [a. Barthó és mtsai 2004, Merrill és mtsai 2016] kivédése céljából– α,β -metilén ATP deszenzibilizálás után mértük hisztamin (1-3 $\mu\text{mol/l}$) előkontrahálás után, a platófázis elérése után. A 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú kivonat a maximális elernyedés kb. kétharmadát eredményezte. A DMSO kontroll (1 $\mu\text{l/ml}$) nem okozott relaxációt.

A római kamilla illóolaj szintén csak elernyesztő hatással bírt húgyhólyagon; kontrakciót a 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció-tartományban nem okozott. Az elernyedés vizsgálatához szubmaximális (50% körüli) előkontrakciót értünk el hisztaminnal (10-20 $\mu\text{mol/l}$), majd a platófázist elérve adtuk be a római kamilla illóolajat. Az illóolaj különböző koncentrációinak beadása után nem volt bevezető, tüskeszerű kontrakció sem. A 10 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú illóolaj kétszer akkora elernyedést eredményezett, mint 0,1 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú olaj.

Humán vékonybél hosszanti készítményeken RKE kontraháló hatása: Az összehúzó hatást 20 $\mu\text{g/ml}$ és 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban vizsgáltuk. A nagyobb koncentrációt kétszer adtuk be 40 perces különbséggel többszöri mosás után, ami nem bizonyult ismételhetőnek. A 200 $\mu\text{g/ml}$ koncentráció hatását TTX kb. felére csökkentette; ez a gátlás szignifikánsnak bizonyult. A megelőző kísérleteink igazolták, hogy atropin jelenlétében ezek a kontrakciók szintén csökkennek.

RKE relaxáló hatása humán vékonybél hosszanti készítményeken: Atropin és tetrodotoxin (0,5 $\mu\text{mol/l}$) előkezelés után 20 perccel $\text{PGF}_{2\alpha}$ -val (1-2 $\mu\text{mol/l}$) előidézett szubmaximális előkontrakciót követően történt a vizsgálat. A 200

$\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú RKE átlag fél-maximális elernyedést produkált. A DMSO kontroll nem okozott változást.

Humán vékonybél körkörös készítményeken Az RKE kontraháló és relaxáló hatása hasonló volt a longitudinális preparátumokon kapott eredményekhez, de itt $200 \mu\text{g/ml}$ koncentrációjú RKE maximális elernyedést okozott.

A humán vékonybél hosszanti simaizmon az illóolaj relaxáló hatását vizsgáltuk, mivel az illóolaj a –már említett– három közül semelyik koncentrációban nem okozott összehúzódást. Az illóolaj relaxáló hatását atropin és tetrodotoxin ($0,5 \mu\text{mol/l}$) előkezelés után $\text{PGF}_{2\alpha}$ -val ($1-2 \mu\text{mol/l}$) előidézett előkontrakciót követően vizsgáltuk, a nagyobb koncentráció felé kifejezettebb elernyedéseket tapasztaltunk.

A patkány ileumon, vastagbélen, acetyl-kolinval előkontrahált gyomor funduson az illóolaj szintúgy csak relaxációt okozott; a vékonybélen a 4 Hz -es 30 s -ig tartó sorozatingerlést szintén $10 \mu\text{g/ml}$ koncentrációban szignifikánsan csökkentette. A DMSO kontrollok nem okoztak semmilyen változást.

Megbeszélés

- I./a, A kísérleti munkáink egyik célja volt az AITC hatásainak vizsgálata az emberi jejunum (idegeket is tartalmazó) hosszanti és körkörös simaizom-preparátumokon. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy az AITC HC030031- és A967079-érzékeny receptorokon keresztül okoz simaizomkontrakciót humán vékonybélen. A válaszban kolinerg mechanizmus részt vesz, a $-\text{Na}^+$ -csatornák által közvetített– idegvezetés viszont nem. A fentiekből az alábbi következtetést tudjuk levonni: az AITC az emberi jejunumot valószínűleg a TRPA1 receptoron át kontrahálja. A kapszaicin-szenzitív idegek nem vesznek részt a folyamatban; mivel a kapszaicin nemcsak a TRPV1 receptorokat, hanem az egész idegvégződést is funkcióképtelenné teszi [Maggi és mtsai 1990, Barthó és mtsai 2004]. Míg a tengerimalac ileumon a purinoceptor-antagonisták gátolják az AITC hatását, addig humán jejunumon nem befolyásolják az AITC kiváltotta összehúzódást. Tehát a humán jejunum simaizom preparátumokon az atropin és szkopolamin meglepő gátló és a fizosztigmin serkentő hatása arra enged következtetni, hogy az AITC –TRPA1 csatornákon át– kolinerg mechanizmust aktivál; ez a folyamat nem igényel idegi

vezetést. Egyik lehetséges magyarázat erre, hogy a kolinerg idegvégződéseken TRPA1 receptorok találhatóak, amelyek acetil-kolint szabadítanak fel.

- I./b, Az enterokromaffin sejtekből származó szerotonin Nozawa és munkatársai [Nozawa 2009] állítása szerint felelős a TRPA1-aktivátor és szenzoros stimuláns AITC kontraktilis hatásáért a tengerimalac vékonybélben. Kísérleteinkben az idegi hatás közvetítette összehúzódást nem gátolta a methysergid (széles spektrumú 5-HT antagonist; 0,3 $\mu\text{mol/l}$), az Y25130 (azasetron, 5-HT₃ receptor antagonist; 1 $\mu\text{mol/l}$) és az SB204070 (5-HT₄ receptor antagonist; 2 $\mu\text{mol/l}$) kombinációja vagy a szerotonin receptor deszenzibilizáció, mindezek viszont gátolták az exogén szerotonin kiváltotta összehúzódást –nem-specifikus hatások kiváltása nélkül. Az AITC összehúzódást váltott ki a hosszanti izom-plexus myentericus preparátumokon, amely hatás teljesen rezisztens volt az 5-HT receptor antagonistákra. A hosszanti izom-plexus myentericus preparátumokon kapott eredmények hasonlóak voltak, mint a teljes ileumon látottak. A szenzoros izgató kapszaicin kontraháló hatását [ld. Barthó és mtsai 2004] sem befolyásolták az 5-HT –antagonisták, vagy az 5-HT deszenzibilizáció, ami azt bizonyítja, hogy az 5-HT nem játszik szerepet ennek a TRPV1 receptor agonistának a hatásában. A fenti három 5-HT antagonist alkalmazott koncentrációi jóval a szakirodalom által előzetesen leírt IC₅₀ értékek felett voltak [Prins és mtsai 1997, Alexander és mtsai 2018, Sato és mtsai 1992, Mylecharane 1989, Borman és mtsai 1995]. A szerotonin deszenzibilizálás szintén hatékony volt az exogén szerotonin hatás gátlásában.

Tehát, Nozawa és munkatársai [Nozawa 2009] szerint a TRPA1 csatorna aktiváló AITC a tengerimalac vékonybelet az enterokromaffin sejtekből felszabaduló szerotonin révén kontrahálja. Feltételezésük alapja az volt, hogy az 5-HT₃ receptor antagonist ramosetron erőteljesen gátolta az AITC kiváltotta összehúzódást. Ellenben a mi jelenlegi megfigyelésünk nem támasztja alá az AITC 5-HT általi izgató hatását, sem a bélnyálkahártya szerepét az AITC-hatásban. Sem az 5-HT antagonisták, sem pedig az 5-HT deszenzibilizáció nem csökkentette az AITC hatását a teljes ileumon továbbá az AITC szintén összehúzta a „strip” preparátumokat [v.ö. Donnerer és Liebmann 2017] és ezt a hatást szintén nem befolyásolták az 5-HT-antagonisták vagy az 5-HT deszenzibilizáció. Előző, munkacsoportunk által végzett kísérletekben az AITC a tengerimalac vékonybélben idegi mechanizmuson alapuló, kolinerg kontrakciókat okozott, amelyben részt vett purinerg mechanizmus [Barthó és mtsai 2013]. Most hasonló gátló hatást találtunk a P₂ purinoceptor antagonist PPADS [Alexander és mtsai 2018] esetében a hosszanti izom-plexus myentericus készítményeken. Összegezve:

eredményeink nem támasztják alá a szerotonin (és a nyálkahártya) szerepét az AITC kiváltotta összehúzódásokban tengerimalac vékonybélben.

- I./c, Valószínű, hogy az AITC a tengerimalac nyelőcsövön részben neurális mechanizmuson át, idegvégződésekből tachykininek felszabadítása révén fejt ki kontraháló hatását; az axonális feszültség-függő Na^+ csatorna gátló tetrodotoxin és a tachykinin NK receptor blokkolók gátló hatása miatt; továbbá az AITC nem közvetlenül muszkarin receptoron hat a simaizomsejten. Hatásában tehát kolinerg mechanizmus, vagy direkt TRPA1 receptoron kifejtett hatás valószínűleg nem játszik szerepet, az atropin, ill. a specifikus TRP receptor gátló hatástalansága miatt.

- I./d, Tengerimalac hólyagon az AITC okozta összehúzódásban a prosztanoidoknak lehet szerepe, az indometacin hatásossága miatt. Az A967079 TRPA1-antagonista a legmagasabb általunk alkalmazott koncentrációban nem specifikus hatások kiváltása nélkül gátolta az AITC által kiváltott összehúzódást. A két mechanizmus összefüggését kapacitás hiányában nem vizsgáltuk.

- I./e, Tengerimalac tracheán az AITC által kiváltott összehúzódások érzékenyek voltak kapszaicin deszenzibilizációra; lehetséges, hogy az AITC tachykininek (SP, neurokinin A) felszabadítása útján át fejt ki kontraháló hatását. Nincs szerepük a feszültség-függő Na^+ csatornáknak, sem a P_2 purinoceptoroknak, sem pedig az M_3 muszkarin és –a BCTC ill. a HC030031 hatástalansága alapján– a TRPV1 és TRPA1 receptoroknak sem. Az indometacin nem szignifikáns gátlása miatt a prosztanoidoknak sem valószínű a szerepe.

- I./f, A gyomor funduson AITC által kiváltott kontrakcióban szerepe van az acetil-kolin felszabadulásnak. Az acetil-kolin a plexus myentericus kolinerg neuronjaiból szabadulhat fel és a simaizmot muszkarin receptoron keresztül kontrahálja, de részben purinerg mechanizmus is közre játszik. Elképzelhető, hogy az AITC PPADS-érzékeny purinoceptorokat aktivál, ezek magukon a kolinerg motoneuronok idegvégződésén helyezkednek el [v.ö. Sándor és mtsai 2016a], ez vezet az acetil-kolin felszabadulásához. Ezt a hipotézist korábban munkacsoportunk tengerimalac vékonybélben végzett kísérletek során felvetette [Barthó és mtsai 2013].

~ ~ ~ ~ ~

- I./g, Az előkontrahált tengerimalac vékonybélben az AITC kiváltotta relaxációban [Donnerer és Liebmann 2017] a feszültség függő és Ca^{++} aktiválta (TEA-érzékeny) K^+ csatornáknak lehet szerepe. Nem játszanak szerepet az AITC

kiváltotta relaxációban az előkontrahált vékonybélben a TRPA1 receptorok (specifikus gátlók hatástalansága alapján), szintúgy a TRPV1 receptor sem, sőt valószínűleg a kapszaicin-érzékeny idegvégződések sem. A P₂ purinoceptorok (specifikus gátló: PPADS nem hatott) vagy az NO (L-NOA hatástalan volt) sem közvetíti az elernyedéseket az ileumon. Az adrenerg β_2 receptoroknak sem valószínű a szerepe (β_1 , β_2 receptor nem szelektív gátló propranolol nem szignifikáns gátlása alapján).

- I./h, Tengerimalac disztális colonon az AITC elernyesztő hatását idegvezetés útján át fejt ki, a feszültség-függő Na⁺ csatorna blokkoló TTX hatásossága alapján. Bár az apamin, illetve az indometacin és kapszaicin az oldószeres kontrolljához képest statisztikailag szignifikáns csökkenést okozott az AITC kiváltotta elernyedésekben, ez az enyhe különbség biológiailag nem látszik jelentősnek. A hatásban nem játszik szerepet a TRPA1 receptor, mivel a specifikus antagonisták nem gátolt. Az AITC szintén nem a purinerg rendszeren keresztül hat a vastagbélben.

- I./i, A tengerimalac vakbél-taenián az AITC kiváltotta relaxációban szerepe van az idegvezetésnek és a feszültség-függő, valamint a Ca⁺⁺ aktiválta K⁺ csatornáknak.

(Az AITC az előkontrahált húgyhólyagon sem okozott relaxációt, csak kontrakciót.)

~ ~ ~ ~ ~

- I./j, Tengerimalac ileumon a CINN kontraháló hatását részben purinerg-mechanizmus, és muszkarin receptorok útján fejt ki; szerepe van benne az axonális vezetésnek és a TRPA1 receptor aktivációnak, de a pontos mediáció még tisztázásra szorul [Sándor és mtsai 2019]. Az A967079 (TRPA1-antagonista) tengerimalac vékonybélben, 0,3 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban nem-specifikus hatásokról mentes volt. A 3-10 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció tartományban a szer nem-specifikus hatásokkal bírt, ezért ennek további alkalmazását elvetettük. Ezek a specifikussági vizsgálatok is hasznosak lehetnek más kutatók számára TRPA1-gyel kapcsolatos kísérleteikhez.

- I./k, A CINN a tengerimalac nyelőcsövön összehúzódásokat hozott létre, amely független volt az idegvezetéstől, illetve nem-kolinerg mechanizmus játszik benne szerepet, a kapszaicin tachyphylaxia viszont eltüntette –teljes mértékben– a kontrakciókat [Sándor és mtsai 2019]. Lehetséges, hogy a CINN tachykinint szabadít fel a szenzoros idegvégződésből [Barthó, Lénárd és mtsai 1999], ez pedig direkt módon

kontrahálja a simaizmot. További részletesebb farmakológiai elemzésre egyelőre nem volt lehetőségünk.

- I./l, Tengerimalac hólyagon CINN által kiváltott összehúzóadások érzékenyek voltak kapszaicin deszenzibilizációra, így valószínűleg kapszaicin-érzékeny idegek aktiválása útján jönnek létre [Sándor és mtsai 2019]. Lehetséges, hogy a CINN tachykininek felszabadítása útján át fejt ki kontraháló hatását, de TRPA1 és TRPV1 receptor aktivációjától függetlenül, mivel ezek specifikus antagonistái hatástalanok voltak. A szokatlannak látszó mechanizmus elemzése további vizsgálatokat igényel. Továbbá az összehúzó hatás nem függ a purinerg rendszertől, az idegvezetéstől, valamint a közvetlen simaizomsejten kifejtett kolinerg hatástól.

- I./m, Tengerimalac tracheán CINN által kiváltott összehúzóadások érzékenyek voltak kapszaicin deszenzibilizációra [Sándor és mtsai 2019]; valószínű, hogy a CINN –TRPA1 receptor aktiváció után– a kapszaicin-érzékeny idegvégződésből tachykininek felszabadítása útján át fejt ki kontraháló hatását. A válaszban a muszkarin receptornak is szerepe van. Elképzelhető, hogy a tachykinin kolinerg motoneuronokat aktivál az axon terminális részén, amelyek így acetyl-kolin felszabadítás útján összehúzzák a simaizmot. (A folyamatban nem vesz részt az idegvezetés, a P₂ receptorok és a TRPV1 receptor aktiváció sem –a tetrodotoxin, a PPADS és a specifikus TRPV1/TRPM8 gátló BCTC hatástalansága alapján.)

~ ~ ~ ~ ~

- I./n, Tengerimalac előkontrahált ileumon CINN koncentrációfüggő és reprodukálható elernyedést okozott. A vékonybélben a CINN kiváltotta relaxációban bizonyos mértékig szerepet játszhatnak a TEA-érzékeny K⁺-csatornák. Nem játszanak viszont szerepet a CINN kiváltotta relaxációban a TRPA1 receptorok (specifikus gátlók hatástalansága következtében); a kapszaicin érzékeny idegvégzésekkel felszabadítható transzmitterek [ld. Barthó és mtsai 2004]; a P₂-purinoceptorok (specifikus gátló: PPADS nem hatott), vagy (az NO-szintáz gátló hatástalansága alapján) az NO-nak, valamint az adrenerg β receptoroknak sincs szerepe az elernyedésben (β₁-, β₂ receptor nem-szelektív gátló propranolol hatástalan volt) [Sándor és mtsai 2019].

- I./o, Tengerimalac colonon a CINN okozta relaxációk hátterében nem sikerült az axonális feszültség-függő Na⁺ csatornák, P₂-purinerg receptorok, vagy a kis konduktanciájú, apamin-érzékeny K⁺ csatornák szerepét igazolni.

- I./p, Tengerimalac előkontrahált húgyhólyagon CINN koncentrációfüggő elernyedést okozott, ezt sem apamin, sem TTX, sem a kapszaicin deszenzibilizálás [Sándor és mtsai 2019] nem csökkentette. Ebből következtük, hogy a hatásában nincs szerepe az idegi feszültség-függő Na⁺ csatornáknak, sem az SK Ca⁺⁺ aktiválta K⁺-csatornáknak; sem a CGRP (calcitonin gene-related peptide/ calcitonin génhez rendelt peptid) relaxáló hatásának [ld. Barthó és mtsai 2004].
- I./q, A humán jejunum előkontrahált készítményeken a CINN kiváltotta elernyedésben nincs szerepe az idegi feszültség-függő Na⁺ csatornáknak, sem a feszültség-függő, ill. Ca⁺⁺ aktiválta K⁺-csatornáknak, a TRPA1 vagy TRPV1 receptornak; sem a körkörös, sem a hosszanti izmon. (További farmakológiai vizsgálatok nem történtek.)

II. Az RKE hatásai. A vizes-alkoholos kivonatnak mind stimuláló, mind relaxáló hatása volt a tengerimalac vékonybélben. A mérsékelt és átmeneti kontraháló hatás a kolinerg neuronok aktivációjának volt tulajdonítható, amit a tetrodotoxinnal és atropinnal (az acetyl-kolin muszkarin receptorainak blokkolója) való gátlhatóság is megerősített. Habár a kapszaicin, mint az érző idegvégződések TRPV1 receptorainak stimuláló anyaga (amelyeken keresztül az “helyi efferens” választ vált ki) kolinerg összehúzóhatást okoz a tengerimalac vékonybél preparátumokon [ld. Barthó és mtsai 2004], a kapszaicin-érzékeny afferens rostok kapszaicin tachyphylaxiával való blokkolása nem gátolta meg az RKE ileumon való összehúzó hatását. Az endogén prosztanoidok moduláló hatását veti fel az, hogy az RKE összehúzó hatását mérsékeltén, de szignifikánsan csökkentette a ciklooxygenáz gátló indometacin. Más farmakológiai gátló szereknek nem volt gátló hatása, ezért feltételezzük, hogy sem az endogén szerotonin, sem PPADS érzékeny purinerg mechanizmus nem játszik szerepet az RKE kontraháló hatásában. Meg kell jegyeznünk, hogy mind a szerotonin, mind az ATP, vagy P_{2X} receptor agonista α , β -metilén ATP képes kolinerg összehúzóhatások kiváltására a tengerimalac ileumon [ld. Benkó és mtsai 2005; Barthó és mtsai 2006; Sándor és mtsai 2016b].

Az RKE atropin és tetrodotoxin jelenlétében tartós elernyesztő hatást mutatott a tengerimalac vékonybél előkontrahált preparátumain. Az atropin és TTX használatát az indokolta, hogy a vizsgálat tárgya a simaizom-sejteken közvetlen módon kifejtett hatás vizsgálata volt. (Hasonló elernyesztő hatást kaptunk azonban tájékoztató kísérleteink során atropin és tetrodotoxin hiányában is). Az RKE összehúzóhatást kiváltó koncentrációi durván megegyeztek az elernyedést kiváltókéval. A relaxáló hatás kiváltó helye tehát a simaizmon magán van. Sem

az adrenerg β receptor-antagonista propranolol, sem a nitrogén monoxid-szintáz inhibitor N^G -nitro-L-arginin nem gátolta szignifikánsan a kivonat relaxáló hatását; ezért nem találtunk arra bizonyítékot, hogy ezeknek a jelátviteli utaknak szerepe lenne az elernyesztő hatás kiváltásában. Másrészt a relaxáló hatás tengerimalac húgyhólyagon, emberi és patkány gastrointestinalis készítményeken is kimutatható volt. A viszonylag magas tónusú készítményeken úm. a patkány vékonybél és vastagbél, csak elernyesztő hatást találtunk.

A különböző római kamilla frakciók mind elernyedést, mind összehúzódást kiváltottak a tengerimalac ileumon. Míg a flavonoid tartalom és a relaxáló hatás között egyértelmű összefüggés volt fellelhető, a kontraháló hatást tekintve ilyen tendenciát nem találtunk. A magas flavonoid tartalmú frakciók (F60, F80 és F100-as) jóval erősebb elernyesztő hatással bírtak, míg a flavonoidot nem tartalmazó (F20) vagy alacsony flavonoid koncentrációjú (F40) frakciók ilyen hatást nem fejtettek ki.

A tiszta flavonoidok önmagukban –a kivonathoz hasonlóan– kettős hatást mutattak a vékonybélen. A flavonoidok hatáserősségében nem volt lényegi különbség. Ez azt jelenti, hogy mindegyikük egyformán hozzájárulhat az összehúzó és az azt követő tartós elernyesztő hatáshoz.

Az illóolaj nem okozott összehúzódást a készítményeken, hanem egyértelmű elernyesztő hatást tapasztaltunk. Ebből arra következtetünk, hogy az illóolajból hiányoznak a stimuláló hatásért felelős komponensek. Míg a flavonoidok kontraháló és relaxáló hatást is ki tudtak váltani, az illóolaj csak relaxációt okozott, ebből feltételezzük, hogy az illóolajban a flavonoidokon kívül valamilyen más anyag is jelen lehet.

Az RKE hatására történő hólyagkontrakció egyedinek bizonyult, mivel a kapszaicin előkezelés az összehúzódásokat felére csökkentette. Ez azt bizonyítja, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros neuronok a hólyagfalban részt vesznek az RKE excitátoros hatásában [ld. Barthó és mtsai 2004]. Az RKE és illóolaj az előkontrahált hólyagokon relaxációt idézett elő –hasonló koncentrációkban, mint amiket a kontraháló hatás kiváltásához alkalmaztunk.

A növény kivonata az emberi jejunum készítményeken is hatásos volt. Mind a kontraháló, mind a tetrodotoxin- és atropin-rezisztens elernyesztő hatás fellelhető volt. A simaizom-relaxáló hatás sokkal kifejezettebb és tartósabb volt, mint az összehúzó. A megelőző kísérletek felfedték, hogy a kezdeti kontrakciót az atropin

csökkentette. A humán minták korlátozott hozzáférhetősége miatt ezt a választ nem tudtuk tovább vizsgálni az adott időkorlátok közt.

Új eredmények, gyakorlati jelentőség

Experimentális munkánk során a következő új megfigyeléseket tettük:

A humán jejunumban, valószínűleg a kolinerg idegvégződéseken TRPA1 receptorok találhatóak, amelyek acetil-kolint szabadítanak fel [Sándor és mtsai 2016a].

A tengerimalac ileumon az AITC által kiváltott kontrakciókban neurális, kolinerg- és purinerg-mechanizmusnak van szerepe. Viszont sem az endogén 5-HT, sem a nyálkahártya nem járul hozzá az AITC izgató hatásához a tengerimalac vékonybélben [Sándor és mtsai 2016b].

A tachykininek felszabadulásának szerepe lehet a CINN kontraháló hatásában a tengerimalac nyelőcső, légcső és hólyag esetében [Sándor és mtsai 2019]; az AITC okozta kontrakciót tachykininek elgondolásunk szerint csak a trachea és oesophagus esetében mediálják.

Purinerg mechanizmus vesz részt a TRPA1-agonisták kontraháló hatásában a tengerimalac ileum [Sándor és mtsai 2016b; Sándor és mtsai 2019] esetében és az AITC excitációs hatását tekintve a gyomor fundus esetén.

Az axonális vezetés szerepet játszik a TRPA1-agonisták kontraháló hatásában a tengerimalac vékonybél [Sándor és mtsai 2016b; Sándor és mtsai 2019] és –az AITC-t tekintve– a nyelőcső esetében. Az RKE tengerimalac és humán vékonybél összehúzó hatásában is szerepük van a feszültség-függő Na^+ csatornáknak [Sándor, Mottaghipisheh és mtsai 2018].

A TRPA1 receptor mediáció valószínű az AITC kontraháló hatásában a tengerimalac húgyhólyag esetén, valamint a CINN összehúzó hatását tekintve az ileumon [Sándor és mtsai 2019] és valószínű a tracheán. (Valamint, a fent már említett emberi vékonybél esetén is ennek a receptornak van szerepe az AITC kontraháló hatásában.)

A kolinerg mechanizmus áll a háttérben a TRPA1-agonisták kontraháló hatását tekintve a tengerimalac ileum esetén [Sándor és mtsai 2016b; Sándor és mtsai 2019]. A gyomor fundust is az acetil-kolin kontrahálja az AITC beadását követően. A tengerimalac légcső kolinerg összehúzódása jön létre CINN alkalmazása után. Az

RKE tengerimalac és humán vékonybél összehúzó hatásában is szerepe van az acetil-kolinnak [Sándor, Mottaghipisheh és mtsai 2018]. (Valamint, a fent már említett emberi vékonybél esetén is kolinerg mechanizmusnak van szerepe az AITC kontraháló hatásában.)

A prosztanoid termelődésnek lehet szerepe az AITC kontraháló hatását tekintve a tengerimalac húgyhólyag esetében és az RKE tengerimalac ileum összehúzó hatásában is szerepe van [Sándor, Mottaghipisheh és mtsai 2018].

A kapszaicin deszenzibilizáció hatásossága alapján a kapszaicin-érzékeny szenzoros idevégződések szerepére az RKE tengerimalac hólyagkontrakciót okozó hatásában [Sándor, Mottaghipisheh és mtsai 2018], valamint a CINN húgyhólyag, trachea és oesophagus kontraháló hatásában [Sándor és mtsai 2019] és az AITC trachea összehúzóhatást kiváltó hatásában találtunk bizonyítékot.

~ ~ ~ ~ ~

A TRPA1-agonisták relaxáló hatásában a TEA-érzékeny K⁺-csatonáknak van szerepe a tengerimalac ileum [Sándor és mtsai 2019] és –az AITC elernyesztő hatását tekintve– a vakbél esetén.

Az AITC kiváltotta relaxációban az axonális vezetésnek van szerepe a tengerimalac vastagbél és a vakbél esetén.

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

A római kamilla származékokat tekintve a simaizom elernyesztő hatás minden készítmény esetében kifejezettebb és tartósabb volt, mint az összehúzó hatás. A relaxáló hatás közvetlenül a simaizmokon érvényesül. A fentiekből következik, hogy a római kamilla alkalmazásának, egyrészt kedvező hatása lehet a gyomor-bél rendszer görcsös állapotaiban a simaizom elernyesztő hatása miatt, másrészt a perisztaltika-csökkenéssel járó kórállapotokban is jótékony hatása lehet az idegmediálta, enyhe-közepes összehúzó hatása miatt. Mivel a kísérleteinkben használt növényi kivonat az Európai Gyógyszerügynökség szabályainak megfelelően

készítették el, jelen tanulmány eredményei hozzájárulnak – a bizonyítékokon alapuló orvoslás tekintetében– a klinikai felhasználhatósághoz [Sándor, Mottaghipisheh és mtsai 2018].

Irodalomjegyzék

- Alexander S.P.**, Striessnig J., Kelly E., Marrion N.V., Peters J.A., Faccenda E., Harding S.D., Pawson A.J., Sharman J.L., Southan C., Davies J.A., CGTP Collaborators; 2018: THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18. Br. J. Pharmacol. 174 (1).
- Augustin B.**, Javorka S., Giovannini R. R. P.; 1948: Magyar Gyógynövények [Hungarian Herbal Drugs]. New Delhi: Ministry of Agriculture, 299–300.
- Bail S.**, Buchbauer G., Jirovetz L., Denkova Z., Slavchev A., Stoyanova A.; 2009: Antimicrobial activities of Roman chamomile oil from France and its main compounds. J. Essent. Oil Res. 21, 283–286.
- Baghalian K.**, Abdoshah S., Khalighi-Sigaroodi F., Paknejad F.; 2011: Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). Plant Physiol. Biochem. 49, 201–207.
- Barthó L.**, Lénárd L. Jr., Patacchini R., Halmi 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 (1): 221-228.
- Barthó L.**, Benkó R., Patacchini R., Pethő G., Holzer-Petsche U., Holzer P.; 2004: Effects of capsaicin on visceral smooth muscle: a valuable tool for sensory neurotransmitter identification. Eur. J. Pharmacol. 500, 143–157.
- Barthó L.**, Undi S., Benkó R., Wolf M.; 2005: Ideg-simazom transzmitterek a gyomor-bélhuzamban a motilitászavarok lehetséges háttere. Praxis 14. évf. 12. szám.
- Barthó L.**, Undi S., Benkó R., Wolf M., Lázár Z., Lénárd L.; 2006: Multiple motor effects of ATP and their inhibition by P purinoceptor antagonist, pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulphonic acid in the small intestine of the guinea-pig. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 98, 488–495.
- Barthó L.**, Benkó R., Holzer -Petsche U., Holzer P., Undi S., Wolf M.; 2008: Role of extrinsic afferent neurons in gastrointestinal motility. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 12 (Suppl 1): 21-31.
- Barthó L.**, Nordtveit E., Szombati V., Benkó R.; 2013: Purinoceptor-mediated, capsaicin-resistant excitatory effect of allyl isothiocyanate on neurons of the guinea-pig small intestine, Basic Clin. Pharmacol Toxicol. 113(2): 141-3.
- Barthó L.**, Sándor Zs. I., Kelemen D., Papp R., Benkó R.; 2014: Smooth muscle-depressant activity of AP-18, a putative TRPA1 antagonist in the guinea pig intestine. Pharmacology. 94 (3-4): 131-4.
- Bautista D.M.**, Pellegrino M., Tsunozaki M.; 2013: TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. Annu Rev Physiol. 75 : 181–200.
- Bencsik T.**, Sándor Zs. I., Barthó L.; 2015: High-concentration piperine: Capsaicin-sensitive and -insensitive effects on isolated organs. Pharmacology. 96 (1-2): 86-9.
- Benkó R.**, Undi S., Wolf M., Barthó L.; 2005: Effects of acute administration of and tachyphylaxis to alpha, beta-methylene ATP in the guinea-pig small intestine. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 97, 369–373.
- Benkó R.**, Illényi L., Kelemen D., Papp R., Papp A., Barthó L.; 2012a: Use and limitations of three TRPV1 receptor antagonists on smooth muscles of animals and man: a vote for BCTC. Eur J Pharmacol. 674 (1):44-50.
- Benkó R.**, Antwi A., Barthó L.; 2012b: The putative somatostatin antagonist cyclo-somatostatin has opioid agonist effects in gastrointestinal preparations. Life Sci. 90 (19-20): 728-32.
- Benemei S.**, Patacchini R., Trevisani M., Geppetti P.; 2015: TRP channels. Curr Opin Pharmacol. 22 : 18-23.
- Borman R.A.**, Burleigh D.E.; 1995: Functional evidence for a 5-HT2B receptor mediating contraction of longitudinal muscle in human small intestine. Br. J. Pharmacol. 114: 1525-1527.
- Bradley P.**, 1992: British Herbal Compendium. Bristol: British Herbal Medicine Association, 191–193.
- British Herbal Pharmacopoeia**, 1971. London: British Herbal Medicine Association.
- Brownlee G.**, Johnson E.S.; 1963: The site of the 5-hydroxytryptamine receptor on the intramural nervous plexus of the guinea-pig isolated ileum. Br J Pharmacol Chemother. 21: 306-322.
- Capasso R.**, Aviello G., Romano B., Borrelli F., De Petrocellis L., Di Marzo V., Izzo A.A.; 2012: Modulation of mouse gastrointestinal motility by allyl isothiocyanate, a constituent of cruciferous vegetables (Brassicaceae): evidence for TRPA1-independent effects. Br. J. Pharmacol. 165: 1966-77.
- Chao S. C.**, Young D. G., Oberg C. J.; 2000: Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. J. Essent. Oil Res. 12, 639–649.
- Caterina M. J.**, Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., Julius D.; 1997: The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 389: 816-24.
- Caterina M.J.**, Julius D.; 2001: The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. Annu. Rev.

Neurosci. 24: 487-517.

- Cavanaugh E. J., Simkin D, Kim D.;** 2008: Activation of transient receptor potential A1 channels by mustard oil, tetrahydrocannabinol and Ca²⁺ reveals different functional channel states. *Neuroscience*. 154 (4):1467-76.
- Cenac N., Bautzova T., Le Faouder P., Veldhuis N.A., Poole D.P., Rolland C.;** 2015: Quantification and potential functions of endogenous agonists of transient receptor potential channels in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 149 : 433-44.
- Costa M., Furness J.B.;** 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.
- Day M., Vane J.R.;** 1963: An analysis of the direct and indirect actions of drugs on the isolated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 20: 150-170.
- Delesalle C., Deprez P., Schuurkes J.A., Lefebvre R.A.;** 2006: Contractile effects of 5-hydroxytryptamine and 5-carboxamidotryptamine in the equine jejunum. *Br. J. Pharmacol.* 147: 23-35.
- Donnerer J., Liebmann I.;** 2017: Effects of Allyl Isothiocyanate, Acetaminophen, and Dipyrone in the Guinea-Pig Ileum. *Pharmacology*. 99 (1-2): 79-83.
- Eglen R.M., Swank S.R., Walsh L.K., Whiting R.L.;** 1990: Characterization of 5-HT₃ and 'atypical' 5-HT receptors mediating guinea-pig ileal contractions *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* 101: 513-520.
- EMA-HMPC (2012).** Community Herbal Monograph on *Chamaemelum nobile* (L.) All., Flos. London: EMA-HMPC.
- European Pharmacopoeia,** 2008. 6th Edn. Strasbourg: Council of Europe.
- Fan S.F., Wang S., Kao C.Y.;** 1994: Release of TEA blockade of maxi-K⁺ channels by isoproterenol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201 (1): 24-9.
- Fujimoto S., Mori M., Tsushima H., Kunimatsu M.;** 2006: Capsaicin-induced, capsazepin-insensitive relaxation of the guinea pig ileum. *European Journal of Pharmacology* 530. 144-151.
- Furness J. B., Kunze W. A. A., Bertrand P.P., Clerc N., Bornstein J.C.;** 1998: Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Progress in Neurobiology* Vol. 54. pp. 1-18.
- Furness J. B., Callaghan B.P., Rivera L.R., Cho H.-J.;** 2014: The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: Integrated local and central control. *Microbial endocrinology: The Microbiota- Gut- Brain axis in health and disease. Advances in experimental medicine and biology.* 817, Chapter 3.
- Gaddum J.H., Picarelli Z.P.;** 1957: Two kinds of tryptamine receptor. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 12: 323-328.
- Gelal A., Guven H.;** 1998: Characterization of 5-HT receptors in rat proximal colon. *Gen. Pharmacol.* 30: 343-346.
- Grundy D.;** 2008: 5-HT system in the gut: roles in the regulation of visceral sensitivity and motor functions. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 12 (suppl. 1): 63-67.
- Holzer P.;** 2011: TRP channels in the digestive system. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 12, 24-34.
- Kandelous Mostafapour H., Salimi M., Khori V., Rastkari N., Amanzadeh A., Salimi M.;** 2016: Mitochondrial Apoptosis Induced by *Chamaemelum nobile* Extract in Breast Cancer Cells. *Iran J. Pharm. Res.* 15: 197-204.
- Kaneko Y., Szallasi A.;** 2014: Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br. J. Pharmacol.* 171 : 2474-2507.
- Kaji I., Yasuoka Y., Karaki S., Kuwahara A.;** 2012: Activation of TRPA1 by luminal stimuli induces EP4-mediated anion secretion in human and rat colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302 : G690-701.
- Koivisto A., Chapman H., Jalava N., Korjamo T., Saarnilehto M., Lindstedt K., Pertovaara A.;** 2014: TRPA1: a transducer and amplifier of pain and inflammation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 114: 50-55.
- Köhler F. E., Müller W.O., Günther K., Schmidt C. F., Pabst G., Köhler H. A.;** 1898: Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem Texte: Atlas zur Pharmacopoea germanica. Verlag Schäfer, Hannover
- Kun J., Szitter I., Kemény A., Perkecz A., Kereskai L., Pohóczy K.;** 2014: Upregulation of the transient receptor potential ankyrin 1 ion channel in the inflamed human and mouse colon and its protective roles. *PLoS One* 9.
- Lénárd L. Jr, Lázár Z., Benkó R., Szigeti R., Báthori Z., Tóth G.K., 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 coeci. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 361(5): 492-7.
- Maggi C.A., Giuliani S., Santicioli P., Patacchini R., Said S.I., Theodorsson E.;** 1990: Direct evidence for the involvement of vasoactive intestinal polypeptide in the motor response of the human isolated ileum to capsaicin. *Eur. J. Pharmacol* 185: 169-78.
- Mazet B.;** 2015: Gastrointestinal motility and its enteric actors in mechanosensitivity: past and present. *Pflugers Arch.* 467 (1): 191-200.
- Melegari M., Albasini A., Pecorari P., Vampa G., Rinaldi M., Rossi T.;** 1988: Chemical characteristics and pharmacological properties of the essential oils of *Anthemis nobilis*. *Fitoterapia* 59, 449-455.
- Merrill Liana, Gonzalez Eric J., Beatrice M., Vizzard Girard & Margaret A.;** 2016: Receptors, channels, and

signalling in the urothelial sensory system in the bladder. *Nature Reviews Urology* 13, 193-204.

Mickle A.D., Shepherd A.J., Mohapatra D.P.; 2015: Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 131: 73-118.

Mueller-Tribbensee S.M., Karna M., Khalil M., Neurath M.F., Reeh P.W., Engel M.A.; 2015: Differential contribution of TRPA1, TRPV4 and TRPM8 to colonic nociception in mice. *PLoS One* 10.

Mylecharane E.J., 1989: The classification of 5-hydroxytryptamine receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 16: 517-522.

Nozawa K., Kawabata-Shoda E., Doihara H., Kojima R., Okada H., Mochizuki S., Sano Y., Inamura K., Matsushime H., Koizumi T., Yokoyama T., Ito H.; 2009: TRPA1 regulates gastrointestinal motility through serotonin release from enterochromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 3408-3413.

Paton W. D., Vizi E.S.; 1969: The inhibitory action of noradrenaline and adrenaline on acetylcholine output by guinea-pig ileum longitudinal muscle strip. *Br. J. Pharmacol.* 35: 10-28.

Piccaglia R., Marotti M., Giovanelli E., Deans S. G., Eaglesham, E.; 1993: Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Ind. Crops Prod.* 2, 47-50.

Prins N.H., Briejer M.R., Schuurkes J.A.; 1997: Characterization of the contraction to 5-HT in the canine colon longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 120: 714-720.

Rápóti J., Romváry V.; 1974: Gyógyító Növények [Medicinal Plants], 4th Edn. Budapest: Medicina Kiadó.

Rossi T., Melegari M., Bianchi A., Albasini A., Vampa G.; 1988: Sedative, anti-inflammatory and anti-diuretic effects induced in rats by essential oils of varieties of *Anthemis nobilis*: a comparative study. *Pharmacol. Res. Commun.* 20 (Suppl. 5): 71-74.

Sándor Zs.I., **Mottaghipisheh J.**, Veres K., Hohmann J., Bencsik T., Horváth A., Kelemen D., Papp R., Barthó L., Csupor D.; 2018: Evidence Supports Tradition: The *in vitro* Effects of Roman Chamomile on Smooth Muscles. *Frontiers in Pharmacology* 9: Paper 323. 11 p.

Sándor Zs. I., Dékány A., Kelemen D., Bencsik T., Papp R., Barthó L.; 2016a: The TRPA1 Activator Allyl Isothiocyanate (AITC) Contracts Human Jejunal Muscle: Pharmacological Analysis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119 (3): 341-2.

Sándor Zs. I., Bencsik T., Dékány A., Barthó L.; 2016b: Serotonin or the Mucosa Do Not Mediate the Motor Effect of Allyl Isothiocyanate in the Guinea-Pig Small Intestine. *Pharmacology.* 98 (5-6): 199-203.

Sándor Zs. I., Bencsik T., Dékány A., Barthó L.; 2019: Effects of Cinnamaldehyde on Smooth Muscle Preparations. *Pharmacology.* 104 (3-4): 207-211.

Sato N., Sakamori M., Haga K., Takehara S., Setoguchi M.; 1992: Antagonistic activity of Y25130 on 5-HT₃ receptors. *Jpn. J. Pharmacol.* 59: 443-448.

Sousa-Valente J., Andreou A.P., Urban L., Nagy I.; 2014: Transient receptor potential ion channels in primary sensory neurons as targets for novel analgesics. *Br. J. Pharmacol.* 171: 2508-27.

Spiller R., 2007: Recent advances in understanding the role of serotonin in gastrointestinal motility in functional bowel disorders: alterations in 5-HT signalling and metabolism in human disease. *Neurogastroenterol Motil.* 19 (suppl 2): 25-31.

Suarez-Kurtz G., Garcia L.M., Kaczorowski G.J.; 1991: Effects of charybdotoxin and iberiotoxin on the spontaneous motility and tonus of different guinea pig smooth muscle tissues. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 259. 439-443.

Ya-Ding **Sun**, Benishin C.G.; 1994: K⁺ channel openers relax longitudinal muscle of guinea pig ileum. *European Journal of Pharmacology* 271. 453-459.

Szolcsányi J., Barthó L.; 1982: Capsaicin-sensitive non-cholinergic excitatory innervation of the guinea-pig tracheobronchial smooth muscle. *Neurosci. Lett.* 34 (3): 247-251.

Xiaoyun Yu, Mingran Yu, Yingzhe Liu, Shaoyong Yu; 2015: TRP channel functions in the gastrointestinal tract. *Rewiev- Seminars in immunopathology* pp. 1-12.

Yang F., Ma L., Cao X., Wang K., Zheng J.; 2014: Divalent cations activate TRPV1 through promoting conformational change of the extracellular region. *J. Gen. Physiol.* 143 (1): 91-103.

Vergara C., Latorre R., Marrion N.V., Adelman J.P.; 1998: Calcium-activated potassium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8 (3): 321-9.

Vyklicky L., Novakova-Tousova K., Benedikt J., Samad A., Touska F., Vlachova V.; 2008: Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: A mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol. Res.* 57 (Suppl. 3): S59-S68.

Zeggwagh N. A., Moufid A., Michel J. B., Eddouks M.; 2009: Hypotensive effect of *Chamaemelum nobile* aqueous extract in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 31: 440-450.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Sándor Zs. I.*, **Mottaghipisheh J.***, Veres K., Hohmann J., Bencsik T., Horváth A., Kelemen D., Papp R., Barthó L., Csupor D.; 2018: Evidence Supports Tradition: The *in vitro* Effects of Roman Chamomile on Smooth Muscles. *Frontiers in Pharmacology* 9: Paper 323. 11 p. **IF:3,845**

*Ezen szerzők egyenlő mértékben járultak a cikkhez első szerzőként.

Sándor Zs. I., Dékány A., Kelemen D., Bencsik T., Papp R., Barthó L.; 2016a: The TRPA1 Activator Allyl Isothiocyanate (AITC) Contracts Human Jejunal Muscle: Pharmacological Analysis. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119 (3): 341-2. **IF:3,176**

Sándor Zs. I., Bencsik T., Dékány A., Barthó L.; 2016b: Serotonin or the Mucosa Do Not Mediate the Motor Effect of Allyl Isothiocyanate in the Guinea-Pig Small Intestine. *Pharmacology.* 98 (5-6): 199-203. **IF:1,442**

Sándor Zs. I., Bencsik T., Dékány A., Barthó L.; 2019: Effects of Cinnamaldehyde on Smooth Muscle Preparations. *Pharmacology.* 104 (3-4): 207-211. **IF:1,615**

ÖSSZESÍTETT IMPAKT FAKTOR SZÁM AZ ELSŐ SZERZŐS PUBLIKÁCIÓKBÓL: **10,078**

A jelölt egyéb közleményei

Barthó L., Sándor Zs. I., Bencsik T.; 2018: Effects of the venom of the brown bullhead catfish (*Ameiurus nebulosus*) on isolated smooth muscles. *Acta Biologica Hungarica* 69: (2) pp. 135-143. **IF:0,679**

Bencsik T., Sándor Zs. I., Barthó L.; 2015: High-concentration piperine: Capsaicin-sensitive and -insensitive effects on isolated organs. *Pharmacology.* 96 (1-2): 86-9. **IF:1,533**

Tóth B., Barthó L., Vasas A., Sándor Zs. I., Jedlinszki N., Pinke G., Hohmann J.; 2015: Dual excitatory and smooth muscle-relaxing effect of *Sideritis montana* extract on guinea-pig ileum. *Nat. Prod. Commun.* 10 (3): 487-90. **IF:0,884**

Barthó L., Sándor Zs. I., Kelemen D., Papp R., Benkó R.; 2014: Smooth muscle-depressant activity of AP-18, a putative TRPA1 antagonist in the guinea pig intestine. *Pharmacology*. 94 (3-4): 131-4. ***IF:1,672***

Köszönetnyilvánítás

Őszinte köszönetemet fejezem ki dr. Barthó Loránd egyetemi tanárnak, témavezetőmnek, aki bevezetett a tudományos kutatómunka világába és mindvégig magas szintű szakmai tanácsaival irányította a PhD munkámat.

Köszönettel tartozom még dr. Bencsik Tímea adjunktusnak a több közös publikációmban megjelent munkájáért és a PhD dolgozat átolvasásáért, javításáért; valamint szakmai javaslataiért.

Köszönetet szeretnék még mondani dr. Helyes Zsuzsanna egyetemi tanárnak a doktori tézis ellenőrzéséért és revíziójáért és dr. Pintér Erika egyetemi tanárnak, intézetvezetőnek sokrétű segítségéért.

Végül köszönöm Ordonicsné Szombati Veronikának, hogy megtanulhattam tőle az izolált szervi laborokban folyó kutatómunka menetét és a technikai segítségét a labormunka folyamán és a statisztikai adatok feldolgozásában.