

**A NYÚL ODDI SPHINCTER NITRERG RELAXÁCIÓJÁNAK
KÁROSODÁSA NITRÁTTOLERANCIÁBAN,
DIÉTÁS HIPERKOLESZTERINÉMIÁBAN ÉS
LOVASTATIN KEZELÉS UTÁN**

Ph.D. Értekezés Tézisei

Írta

Sári Zs. Réka

**Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar
Szent-Györgyi Albert Orvostudományi és Gyógyszerésztudományi
Centrum
I. sz. Belgyógyászati Klinika
Szeged**

2002

Bevezetés és célkitűzések

Az Oddi sphincter (OS) relaxáló funkciójának integritása előfeltétele a duodenumba történő normális epeürülésnek. Bizonyított, hogy az OS relaxációs funkciójának szabályozása non-adrenerg, non-cholinerg (NANC) idegeken keresztül történik, melyben az L-arginin-NO-cGMP rendszer meghatározó jelentőségű. A nyúl OS-en a NANC relaxáció blokkolható NO-szintáz gátlóval azaz N ω -nitro-L-arginin metilészterrel (L-NAME). Az L-NAME gátló hatása visszafordítható egyidejű L-arginin inkubációval, viszont D-argininnel nem, ami azt mutatja, hogy a válasz alapvetően nitrerg. Továbbá ismert, hogy a nitroglicerín (NG) és más nitrovazodilatátorok biológiai hatásukat az intracelluláris cGMP szint emelésén keresztül fejtik ki.

Mindeddig hiányosak voltak ismereteink az extrahepatikus epeúti motilitás - azon belül is az OS neurogén relaxációjának megváltozásáról – nitráttoleranciában, hiperkoleszterinémiás (HC) és 3-hidroxi-3-metil-glutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktáz gátlóval kezelt állatokban, mindazok ellenére, hogy az érrendszer endotélsejtjeiben a funkcionális defektusokat már régebben felismerték, mely az NO felszabadulás és/vagy hatás elégtelenségének tulajdonítható. Ezek közül mindkettőhöz különböző G-protein effektor rendszerek integritása, épsége szükséges. Biológiai funkciójuk betöltéséhez, a G-proteineknek be kell épülni a sejtmembránba, melynek előfeltétele az izoprenilált fehérjékkel való kapcsolat. Ezen prenilált egységek elérhetősége csökken mind diétás HC-ban, mind HMG-CoA reduktáz kezelést követően, ezért feltételeztük, hogy a diétás HC ill. HMG-CoA reduktáz kezelés befolyásolja a nitrerg relaxációt az érrendszerhez hasonlóan a gasztrointesztinumban is. Ugyanakkor a farnezil analógokról kimutatták, hogy renormalizálják a diétás HC ill. HMG-CoA-reduktáz gátlás által károsított vaszkuláris tónust. A HMG-CoA-reduktáz a mevalonát út kulcsenzime, mely a plazma koleszterin szinttől független.

Amennyiben az NO felszabadulás/hatás nitráttoleranciában, HC-ban ill. HMG-CoA reduktáz kezelés után csökken az extrahepatikus epeutakban, akkor az OS-en bizonyítottan döntő jelentőségű NANC relaxációs mechanizmus is sérül, minek következtében a koleszterin dús epe ürülése gátolt, ami kedvez a kőképződésnek. Epekövesség pedig egyidejű sphincter relaxációs károsodás, valamint HC mellett megnövekedett rizikót jelent hasnyálmirigy gyulladás kialakulására.

Munkánk során céljaink a következők voltak:

- I. A nitroglicerín tolerancia hatásának vizsgálata a nyúl Oddi sphincter relaxációjára in vitro.
- II. A nyúl Oddi sphincter neurogén relaxációjának változása hiperkoleszterinémiás állatokon és farnezol szubsztitúciót követően.
- III. A nyúl Oddi sphincter neurogén relaxációjának változása HMG-CoA reduktáz gátló kezelés és farnezol szubsztitúciót követően.

Módszerek

A kísérleteket him (3000-4000 g) új-zélandi fehér nyulakon végeztük.

Izometriás feszülés mérése

Az Oddi sphincter kb. 3 mm hosszú ampulláris részét a Vater papilla eliminálása után horizontálisan két L-alakú üveghorogra helyeztük, melynek másik végét egy erőmérőhöz (SG-02, Experimetria, Budapest, Magyarország) kapcsoltuk. A mérőt összekötöttük egy 6 csatornás poligráffal (R61 6CH, Mikromed, Budapest, Magyarország), amellyel az izometriás feszülést mértük és regisztráltuk. A kísérleteket 5 ml-es, Krebs-bikarbonát puffer oldattal teli szervfürdőben végeztük, melyet állandóan 37 °C-on tartottunk és carbogénnel levegőztettünk. Az izomgyűrűket 1 órán át inkubáltuk és 10 mN-os előfeszítést alkalmaztunk. Egy állatból egy izomgyűrűt preparáltunk ki.

A ciklikus nukleotid tartalom meghatározása az izolált nyúl Oddi sphincter preparátumból

A szöveti cAMP és cGMP tartalmat radioimmunoassay (RIA) (Amersham RIA kittel; Les Ulis, Franciaország) módszerével határoztuk meg, amint azt már korábban leírtuk (Szilvássy és mtsai., 1994.). Mintavétel: az izomgyűrűket lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, hogy megakadályozzuk a foszfodiészterázok cGMP bontó hatását. A minták 6%-os triklórecetsavban történő homogenizálását, ülepítését, többszöri vízzel telített éterrel történő extrahálását követően nitrogén alatt bepárlást végeztünk. Az értékeket pmol/mg nedves tömegre adtuk meg.

3 Membrán preparátumok és Western blot analízis

Az Oddi sphincter izomgyűrűk homogenizálása jéghideg 50 mM Tris/HCl (pH 7.4, 25 C°-on) oldatban történt, mely 10 µg/ml szójabab tripszin inhibitor, 5 µg/ml leupeptint, 200 µg/ml bacitracint, 2 mM EDTA-t és 100 µM fenil-metil-szulfonil-fluoridot tartalmazott, a proteolízis megelőzésére. Többszöri centrifugálást követően, a végső pellet jéghideg vizsgáló (assay) pufferben (50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4, 25 C°-on) történő reszuspendálását követően, a proteintartalom meghatározása Lowry módszerével történt, marha szérum albumint használva standardként. Nátrium-dodecil-szulfát / poliakrilamid-gél elektroforézist (SDS/PAGE) és Western blot-ot alkalmaztunk, mely műveletet korábban Miyamoto és mtsai (1992.) már leírtak. Az immunjelzett G-proteinek és a specifikus sávok intenzitásának vizsgálata Lágý Lézer Páztázó Denzitométerrel (Biomed Instruments, USA) történt.

Szöveti NO meghatározás elektron spin rezonancia segítségével

A frissen homogenizált Oddi sphincter szövet nitrogén monoxid tartalmát elektron spin rezonancia spektroszkópia felhasználásával mértük. Irodalmi források: Csont és mtsai., 1998; Ferdinándy és mtsai., 2000; Radak és mtsai., 1999.

NANC neurotranszmitter felszabadulási tanulmányok

A kalcitonin gén-related peptid (CGRP) koncentrációját a preparátumok szervfolyadékának 200 µl-es mintáiból határoztuk meg RIA módszerrel, melyet laboratóriumunkban fejlesztettek ki (Helyes és mtsai., 1997; Németh és mtsai., 1999). A VIP meghatározásához a kereskedelmi forgalomban is elérhető RIA kité (Phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA, USA) használtuk. A mintavételt a téringelés (maximum kontrakció / relaxáció) előtt (nyugalmi értékek) ill. azt követően azonnal végeztük.

Kísérleti csoportok

I. A nitroglicerín tolerancia hatása a nyúl Oddi sphincter idegi relaxációjára

Kísérleteinkben azt tanulmányoztuk, hogy a nitroglicerín tolerancia hatással van-e a nyúl OS NANC relaxációjára in vitro. Az OS izomgyűrűket előzetesen EC50 koncentrációjú CCK8-cal kontraháltattuk, melyeket azután kumulatív növekedő koncentrációjú NG-nek tettünk ki, és az izometrikus feszülés mérésével vizsgáltuk a relaxációt. Egy hat gyűrűből álló külön csoportot előzetesen 60 percen át inkubáltunk 275 µM NG-vel, hogy in vitro NG toleranciát indukáljunk. Mind a toleráns, mind a nem toleráns gyűrűket elektromosan téringeltük (TI: 50 V, 0.1 ms, 20 Hz, 3 és 10 inger). A gyűrűket azután 20 percig NANC oldattal inkubáltuk (fentolamin, oxprenolol és atropin, mind 1 µM), majd ismét TI-t alkalmaztunk. A TI-t megismételtük egy NO-szintáz gátló, a L-NAME (30 µM) kiegészítő adása után, majd egy rákövetkező L-arginines (3 mM) inkubáció után.

II. A nitreg relaxáció visszaállítása farnezollal hiperkoleszterinémias nyúl Oddi sphincteren

A tanulmányt négy kísérleti csoporttal végeztük (csoportonként 11 állattal). 1. csoport: normál állatok a farnezol oldószerével kezelve 3 napon át napi kétszer; 2. csoport: normál állatok farnezollal kezelve (30 µmol/ttkg) 3 napon át napi kétszer; 3. csoport: hyperlipidémias nyulak (1.5% koleszterintartalmú diéta 8 héten át), és farnezol oldószerével kezelve; 4. csoport: farnezollal kezelt hyperlipidémias nyulak. Minden csoport két alcsoportra oszlik: 6 állatból 6 preparátumot használtunk az izometriás feszülés méréséhez, mely során az izomgyűrűk izometriás feszülésének változását vizsgáltuk NANC oldatban (1 µM atropin és 4 µM guanetidin) az elektromos téringelés (TI: 0,5 V; 0,1 ms; 20 Hz; 40 inger) impulzusainak két egymást követő ingersorozatát követően. További 5 nyulból származó izomgyűrűkből cGMP meghatározása történt RIA módszerrel.

III. A nitreg relaxáció visszaállítása farnezollal HMG-CoA reduktáz gátlóval kezelt nyúl Oddi sphincteren

A tanulmányt négy kísérleti csoporttal végeztük. 1. csoport: kezeletlen állatok; 2. csoport: lovastatinnal kezelt állatok (5 mg/kg/nap intragastricusan, 5 napon át, MEVACOR, MSD Hungária Kft. Budapest, Magyarország); 3. csoport: farnezollal (1 mg/kg intravénásan, napi kétszer, öt napon át, Sigma, St. Louis, MO) kezelt; 4. csoport: lovastatin + farnezol (5 napon át) kezelést kaptak. Mindegyik csoport 23 állatból származó 23 preparátumot tartalmazott, melyek közül hatot az izometriás feszülés mérésére használtunk; öt gyűrűt a RIA mérésekhez használtunk fel az alap 5 cAMP és cGMP szintek meghatározásához, nyolc gyűrűt használtunk

fel a szöveti NO meghatározásához és csoportonként négy gyűrű szolgált a membrán asszociált G-protein G_{sa} alegység Western blot analíziséhez. Két további csoportot képeztünk a farnezol oldószerének tesztelésére ill. a lovastatin placebo csoportnak (4 preparátum az izometriás feszülés mérésére, három a ciklikus nukleotid és négy az NO meghatározásához csoportonként). Hogy csökkentjük a kísérleti állatok számát, a téringlerlés-indukálta szöveti nukleotid koncentráció változását ugyanazokból a preparátumokból határoztuk meg, mint amelyeket az izometriás feszülés mérésére használtunk fel.

Eredmények

I. A nitroglicerín tolerancia hatása a nyúl Oddi sphincter idegi relaxációjára

A CCK8 maximális kontrakciókat hozott létre a toleráns (29.9 ± 5.8 mN) és nem toleráns (28.3 ± 5.2 mN) sphinctereken. Tehát a CCK8-ra való érzékenység nem tért el a két csoport között EC_{50} (-log M) 8.5 ± 0.2 és 8.3 ± 0.1 értékeknél.

A téringlerlés mind a toleráns, mind a nem toleráns ampulláris OS preparátumon kontrakciót követő relaxációt hozott létre. A NANC oldattal történő inkubáció a TI-re adott válaszként monofázisos relaxációt hozott létre a nem toleráns sphinctereken, de a toleránsokon nem. Az L-NAME ($30 \mu\text{M}$) megfordította a NANC relaxációt a nem toleráns izomgyűrűkben, ugyanakkor nem módosította a NANC kontrakciókat a toleráns preparátumokban. Az L-arginin (3 mM) megfordította az L-NAME NANC relaxációra gyakorolt hatását a nem toleráns gyűrűkben és nem volt hatással a TI-indukálta kontrakciókra a toleráns OS-ben.

Ahogy az RIA-val megmértük, a NG tolerancia nem volt hatással sem a szövetek cAMP, sem cGMP tartalmára. A TI szignifikánsan fokozta a szöveti cAMP és cGMP tartalmat a nem toleráns preparátumokban. A TI nem tudta növelni egyik ciklikus nukleotid szöveti szintjét sem a toleráns szövetben.

II. A nitrerg relaxáció visszaállítása farnezollal a hiperkoleszterinémias nyúl Oddi sphinteren

A koleszterin-gazdag diéta felemelte a szérumszintet (1.4 ± 0.3 mmol/l-ről 22.6 ± 3.8 mmol/l-re) és drámaian csökkentette a NANC, lényegében nitrerg relaxációt a nyúl OS-en. A normál táppal táplált nyulakban a szérumszint nem változott és a farnezolnak sem volt hatása a szérumszintre.

A normál (farnezol oldószerével kezelt) állatokból származó OS izomgyűrűkben a téringlerlés (TI)-kiváltotta monofázisos NANC relaxációt láttunk (1. csoport).

A farnezol kezelés sem módosította ezt a választ (2. csoport). A farnezol oldószerével kezelt HC nyulakból származó preparátumok TI-re NANC kontrakcióval válaszoltak (3. csoport), míg farnezollal kezelt HC nyulaknál az OS-en TI-re monofázisos NANC relaxáció volt megfigyelhető (4. csoport).

A TI növelte a cGMP szintet az 1. és 2. csoport NANC oldatban inkubált izomgyűrűiben. A HC teljesen blokkolta a poszt-stimulációs cGMP szint növekedést és az alap cGMP szint is csökkent HC-ban. A farnezollal kezelt HC nyulak Oddi sphincterében a poszt-stimulációs cGMP értékek megközelítőleg elérték a normál állatok preparátumaiban mértéket.

III. A nitrerg relaxáció visszaállítása farnezollal a HMG-CoA reduktáz gátlóval kezelt nyúl Oddi sphinteren

A téringlerlés kiváltotta NANC relaxációs választ a lovastatinnal kezelt állatokban kontrakcióvá konvertálódott. A lovastatin-farnezol kombináció visszaállította a normális NANC relaxációs választ. A farnezol maga nem volt hatással a NANC relaxációra. A NANC relaxáció nem módosult a lovastatin placebojára vagy a farnezol oldószerére.

Az Oddi sphincter szöveti mintáiban sem a lovastatin, sem a farnezol, sem pedig kombinációjuk nem befolyásolta sem az alapvonalat, sem pedig az elektron spin rezonanciával meghatározott, NO-L-N-metil-glukózamin-ditiokarbamát komplex specifikus spektrumának poszt-stimulációs intenzitását, összehasonlítva a kezeletlen állatokból származó mintákkal.

A téringlerlés indukálta NANC relaxáció mind a cGMP, mind a cAMP szignifikáns emelkedésével társult a kezeletlen állatokból származó preparátumokban. A lovastatinnal kezelt csoportból szerzett izomgyűrűkben a téringlerlésre adott válaszként létrejött cGMP szint emelkedés sokkal alacsonyabb volt, mint a kezeletlen nyulakból származó sphinctereknél. Érdekes, hogy a téringlerlés képtelen volt emelni a cAMP szintet a lovastatinnal kezelt csoportban. A farnezol-lovastatin kombináció teljesen helyreállította a téringlerlésre adott mindkét ciklikus nukleotid emelkedéssel járó választ. A farnezolnak, az oldószerének vagy a lovastatin placebojának nem volt hatása.

A téringlerlés szignifikáns VIP és CGRP koncentráció-emelkedést mutatott a preparátumok szervfolyadékában, amint azt RIA-val meg is határoztuk. Ezt az alkalmazott kezelések egyike sem változtatta meg.

$G_{5\alpha}$ protein -a membránhoz kapcsolt G-protein komplex része-, melynek denzitása alapvetően csökkent a lovastatinnal kezelt állatok sphincteréből származó membránpreparátumokban, míg a farnezol pótlása a $G_{5\alpha}$ denzitást re-normalizálta.

Következtetések

- Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a nyúl OS ampulláris részének NANC relaxációja szignifikánsan károsodik az in vitro nitroglicerinnel tolerancia állapotában.
- Kimutattuk, hogy HC drámaian csökkenti a NANC, lényegében nitroglicerinnel relaxációt nyúl OS-n és a HC bármely csillapításának ellenére, a farnesol adagolás a nyúl OS NANC relaxációjának javulását okozza in vitro, valamint
- a HMG-CoA redukáz gátlás (lovastatin kezelés) a diétás HC-hoz hasonlóan rontja a nyúl OS nitroglicerinnel relaxációját, ugyanakkor poliprenil szubsztitúcióval (farnesol kezelés) a HMG-CoA redukáz gátló kezelés extrahepatikus epeúti motilitást károsító hatása ellensúlyozható.

A párhuzam az Oddi sphincter megjavult nitroglicerinnel relaxációja és a hiperkoleszterinemiás sphincter farnesol adását követő megnövekedett cGMP termelő képessége között azt mutatja, hogy fontosak a nem-koleszterin mevalonát termékek az extrahepatikus epeúti motilitás NO-cGMP rendszeren keresztüli szabályozásában olyan metabolikus betegségekben, mint pl. a hiperkoleszterinémia és az arterioszklerózis.

Reményeink szerint vizsgálataink hozzájárultak az Oddi sphincter intrinsec szabályozásának jobb megismeréséhez és kísérleteink kedvező eredményei nagy segítséget nyújthatnak a ma még megoldatlan - az alapbetegségeket is érintő - nitrát-toleranciához, hyperlipidaemiákhoz társult extrahepatikus epeúti motilitászavarok későbbi gyógyszeres kezelésében, valamint az eredmények felhívják a figyelmet a HMG-CoA redukáz gátlók nem lipidsökkentő hatásaira, melyek előjöhethetnek, különösen ezen gyógyszerek hosszútávú használatakor.

Az értekezés alapját képező tudományos közlemények jegyzéke

1. **Sári R.**, Szilvássy Z., Jakab I., Nagy I., Lonovics J.: Cross tolerance between nitroglycerin and neural relaxation of the rabbit sphincter of Oddi. *Pharmacol. Res.* 37: 505-512, 1998. **(0,615)**
2. Szilvássy Z., **Sári R.**, Németh J., Nagy I., Csáti S., Lonovics J.: Improvement of nitroglycerin relaxation by farnesol of the sphincter of Oddi from hypercholesterolaemic rabbits. *Eur. J. Pharmacol.* 353:75-78, 1998. **(1,992)**
3. **Sári R.**, Németh J., Pórszász R., Horvath P., Blasig E. I., Ferdinándy P., Nagy I., Lonovics J., Szilvássy Z.: Impairment by lovastatin of neural relaxation of the rabbit sphincter of Oddi. *Eur. J. Pharmacol.* 30;432(1):91-7, 2001. **(2,047)**

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó tudományos előadások

1. **Sári R.**, Németh J., Szilvássy Z., Nagy I., Lonovics J.: Involvement of the interplay between NO and VIP in CCK-induced phasic contractile activity in the rabbit sphincter of Oddi. *Z. Gastroenterol.*, 36(5):A110, 1998.
2. Szilvássy Z., **Sári R.**, Jakab I., Németh J., Lonovics J.: Nitroglycerin relaxation recaptured by farnesol in the sphincter of Oddi (SO) from hypercholesterolaemic (HC) rabbits. *Z. Gastroenterol.*, 36(5):A128, 1998.
3. **Sári R.**, Németh J., Szilvássy Z., Nagy I., Lonovics J.: Interplay between nitric oxide and VIP in CCK-8-induced phasic contractile activity in the rabbit sphincter of Oddi. *Gastroenterology*, 116: A30, 1999.
4. **Sári R.**, Szilvássy Z., Nagy I., Németh J., Lonovics J.: The role of cholesterol and non-cholesterol mevalonate products in the nitroglycerin relaxation of the sphincter of Oddi from rabbits. *Z. Gastroenterol.*, 37(5):A160, 1999.
5. **Sári R.**, Szilvássy Z., Pálvölgyi A., Nagy I., Lonovics J.: Enteric neural mechanisms in the CCK8-stimulated phasic contractile activity in the rabbit sphincter of Oddi. *Z. Gastroenterol.*, 38(5):A103, 2000.

6. **Sári R.**, Szilvássy Z., Nagy I., Jakab I., Németh J., Lonovics J.: The role of cholesterol and non-cholesterol mevalonate products in the nitregeric relaxation of the sphincter of Oddi from rabbits Gastroenterology, 118: A202,2000.

7. **Sári R.**, Lonovics J., Pálvölgyi A., Nagy I., Szilvássy Z.: Cyclic GMP-mediated activation of a glibenclamide sensitive mechanism in the rabbit sphincter of Oddi Z. Gastroenterol., 39(5):A153,2001.

További munkák

1. Németh J., Szilvássy Z., Than M., Oroszi G., **Sári R.**, Szolcsányi J.: Decreased sensory neuropeptide release from trachea of rats with streptozotocin-induced diabetes Eur. J. Pharmacol 369:221-224,1999. **(2,047)**

2. Németh J., Thán M., **Sári R.**, Peitl B., Oroszi G., Farkas B., Szolcsányi J., Szilvássy Z.: Impairment of neurogenic inflammatory and anti-inflammatory responses in diabetic rats Eur. J. Pharmacol 386:83-88,1999. **(2,047)**

3. Nagy I., Jármay K., Pálvölgyi A., **Sári R.**, Lonovics J.: Time course of apoptotic/necrotic liver damage induced by thioacetamide plus LPS in the rat Z. Gastroenterol., 37(5):A125,1999.

4. Nagy I., Jármay K., Pálvölgyi A., **Sári R.**, Lonovics J.: Apoptotic/necrotic liver damage induced by thioacetamide plus LPS in the rat Gastroenterology, 116: A1252,1999.

5. Takács T., Hegyi P., Czakó L., Góg Cs., Farkas A., Rakonczay Z., **Sári R.**, Gyöngyösi M., Jambrik Z., Lonovics J.: Somatostatin prevents serum IL-6 and TNF- α level elevation in NATC-induced acute experimental pancreatitis in rabbits Gastroenterology, 118: A1155,2000.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Lonovics János** professzor úrnak, hogy klinikáján lehetőséget biztosított számomra Ph.D. tanulmányaim elvégzéséhez.

Külön köszönettel tartozom, **Dr. Szilvássy Zoltán** professzor úrnak, aki megtanított a metodikai ismeretekre és tanácsaival végig segítette munkámat.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Németh József**, **Dr. Csáti Sándor** és **Dr. Nagy István** adjunktus uraknak, **Dr. Mód Lászlónénak**, valamint **Magyarné Pálfi Edit**, **Árva Miklósné**, **Fuksz Zoltánné** asszisztensnőknak.

Hálával tartozom szüleimnek **Sári Jánosnak** és **Zsuzsannának**, bátyámnak **Dr. Sári Tamásnak** és családjának, valamint férjemnek **Dr. Pálvölgyi Attilának** és kislányomnak **Petrának** szeretetükért és türelmükért.