

A szenzoros neuron effektor működésének vizsgálata experimentális
neuropátiában

Horváth Péter

Egyetemi Doktori (PhD) Értekezés Tézisei

Témavezető: Dr. Szilvássy Zoltán

Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum

Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

2006

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

B2m	béta 2- mikroglobulin
CGRP	calcitonin gén-rokon peptid
CGRPR	calcitonin gén-rokon peptid receptor
Ct	a küszöb fluoreszcencia eléréséhez szükséges ciklusszám
DM	diabetes mellitus
DNS	dezoxi-ribonukleinsav
DRG	hátsó gyöki ganglionok
ENG	elektroneurográf
EPO	erythroprotein
FPG	éhgyomri vércukor koncentráció
FPI	éhgyomri inzulin koncentráció
HOMA	homeasztatikus modell kiértékelése
HOMA-IR	perifériális inzulin rezisztencia
HOMA-%B	B-sejt funkció vizsgálata
i.c	intracelluláris
i.p.	intraperitoneális
L-NAME	NG- nitro- L-arginin metil észter
n. saphenus	nervus saphenus
n.vagus	nervus vagus
NaCl	Nátrium-Klorid
NANC	non-adrenerg, non-kolinerg
NK1	Neurokinin 1 receptor
NK2	Neurokinin 2 receptor
PPT-A	Preprotachykinin-A
QRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RIA	radioimmunoassay
RNS	ribonukleinsav
S.D.	standard deviáció
S.E.M.	standard error of means
SOD	szuper-oxid dizmutáz
SOM	szomatosztatin

SP	P-anyag
SRIF I, II	szomatosztatin receptor alcshalád I, II
SSTR1, 2, 3, 4, 5	szomatosztatin receptor 1., 2., 3., 4., 5. altípusa
STZ	streptozotocin
TI	téringlerlés indukálta
TTX	tetrodototoxin

1 ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS

A szenzoros neuron farmakológiája néhány évvel ezelőtt még hiányzott a farmakológia tárgyú tankönyvekből. Az elmúlt fél évszázad kutatásai azonban jelentős eredményeket hoztak e területen és lassan körvonalazódnak látszik, hogy hogyan és milyen célból tudjuk majd befolyásolni az érző neuronok működését. Jelenleg még nem rendelkezünk szelektíven a szenzoros neuronon ható fájdalomcsillapítóval, de ennek megjelenése nem sokáig kell várasson magára. Fontos megemlíteni azt is, hogy a szenzoros neuron nem csak arra hivatottak, hogy a periféria felől a centrumba juttassák az információt (orthodrómos vezetés), hanem speciális effektor funkcióval is rendelkeznek (antidrómos vezetés), mivel az ingerületre belőlük felszabaduló neuropeptidek parakrín (de egyes esetekben endokrin) hatásokat hoz létre. Ezen effektor hatásnak szerepe lehet a gyulladási folyamatok mechanizmusában valamint a mikrocirkuláció szabályozásában. E rendszer kutatását jelentősen segítette, hogy David Julius munkacsoportjának sikerült a szenzoros neuronra jellemző capsaicin/vanilloid receptor klónjait előállítani (VR1 receptor). A capsaicin receptorokon való hatásának első leírása tisztán farmakológiai eszközökkel szerkezet-hatás összefüggések vizsgálatának következményeként került sor. A receptor klónozása ezeket a vizsgálatokat évtizedek elmúltával erősítették meg. Napjainkban számos gyógyszergyár (Novartis, SKB, Procter and Gamble stb.) intenzív kutatásokat folytat szenzoros neuronon szelektíven ható vegyületek kifejlesztése érdekében.

A szenzoros neuronok szerepet játszanak néhány betegség pathomechanizmusában vagy a betegség lefolyása a szenzoros neuronok funkcióját befolyásolja. Kísérleteink éppen ebből a szempontból vizsgálják a szenzoros neuron effektor működését. A daganat kemoterápia során sokszor merül fel a neurotoxicitás problémája és hasonló módon a cukorbetegség szövődményei közt is sok esetben problémát jelent mind a beteg, mind az orvos számára a hosszú lefolyás során fellépő neuropathia. Természetes, hogy ezek a behatások nem csak a szenzoros neuront érintik, hanem hatással vannak pl. a vegetatív neuronokra is. Mivel várható, hogy az érző neuronon kifejtett neurotoxikus mellékhatás vizsgálata számos új eredménnyel kecsegtet, vizsgálatainkat ezen neuroncsoport működésének vizsgálatára fókuszáltuk.

1.1 Experimentális neuropátia, mint vizsgálati módszer

Az idegkárosodás (neuropátia) számos betegség kísérő tünete, önálló kórképként is előfordul, ill. jelentkezhet gyógyszer mellékhatásként, valamint terápiás szövődményként. Szokás szenzoros, autonóm, illetve motoros neuropátiáról beszélni, aszerint, hogy a funkciózavar mely idegeken domináns. Munkánkban a szenzoros neuropátia, illetve a szenzoros idegkárosodás funkcionális következményeit vizsgáltuk experimentális körülmények között, elsősorban olyan állatkísérletes modellekben, amelyekből levonható következtetéseknek közvetlen klinikai vonatkozásai vannak. Ezért esett a választás a daganatos betegségek terápiájában gyakran használt cisplatin indukálta idegkárosítás experimentális vizsgálatára. A cisplatin választásához az is hozzájárult, hogy e farmakon indukálta szenzoros neuropátia, mely a cukorbetegség kapcsán szövődményként is jelentkezik, jól modellezhető ezzel a farmakkal.

1.2 A cisplatin felfedezése, hatásmechanizmusa, terápiás alkalmazása

Az 1960-as években észrevették, hogy a platina gátolni képes az *E. coli* osztódását. Bár e megfigyelés után számos platina tartalmú vegyületet állítottak elő (carboplatin, oxoplatin, cisplatin), közülük az egyik leggyakrabban használt szer a cisplatin maradt. A mai napig számos gyógyszergyár gyártja. Kísérleteinket a TEVA- BIOGAL GYÓGYSZERGYÁRTÓ RT. által forgalmazott „cisplatin-TEVA”-val végeztük. Elsősorban hererák és petefészekrák gyógyítására használják, alkalmazása során remisszió, esetleg teljes gyógyulás érhető el. Használják még hörgő-, méhnyak-, prosztatata- és urothelialis rákok, valamint kissejtes tüdőrák kezelésében sugárterápiával kombinálva. Terápiás potenciálját nagymértékben csökkentik mellékhatásai. A kezelés során kialakulhat myelo-, nephro-, oto- és neurotoxicitás.

1.3 A szenzoros neuron duális funkciójának károsodása cisplatin neurotoxicitás következtében

Barajon neuromorfológiai tanulmányai szerint a cisplatin- indukálta változások alapja az, hogy a szenzoros neuropeptidok calcitonin-génrokon peptid, P-anyag, szomatosztatin (CGRP, SP, és SOM) hátsó gyöki ganglionok (dorsal root ganglion (DRG)) szómájában akkumulálódnak. Az akkumuláció során a ganglion sejtjeinek hisztokémiai elváltozásai arányosak perifériás rostok károsodásának mértékével. A cisplatin kezelés indukálta

szenzoros-effektor funkciók károsodását a felszabaduló szenzoros neuropeptidek hatásain keresztül vizsgáltuk.

1.4 Diabetes mellitus és az astma bronchiale kapcsolata

Az I-es típusú diabetes mellitus (DM) inzulin hiány miatt alakul ki, és megfelelő kezelés nélkül hiperglikémiához, polidipsziához, poliuriához, súlyvesztéshez valamint súlyos szervi szövödményekhez vezet. A nem megfelelően kezelt DM szövödményei pl. a fájdalmas perifériás idegkárosodás, a gyulladás indukálta válaszok gyengülése, a vaszkuláris permeabilitás megváltozása, mely számos kardiovaszkuláris megbetegedést okoz. Ilyenek lehetnek pl. a stroke és a hipertenzió. Streptozotocin (STZ) indukálta diabétesz patkányban az I. típusú cukorbetegséghez hasonló tüneteket okoz, beleértve a krónikus fájdalmat, megnövekedett vaszkuláris permeabilitást, és a gyulladást.

Az egyes típusú cukorbetegség és az asztma egyszerre ritkán fordul elő. Az irodalom szerint a vagus reflexek központi szerepet játszanak a bronchiális hiperreaktivitás kialakulásában, melyet az epithelium károsodása okoz. A hiperreaktivitás kialakulásával a légutak érzékenysége spazmogénekkel szemben nem változik meg *in vivo*. Mindazonáltal a hiperreaktivitás némely formája a n. vagus átmetszésével megakadályozható. Mivel a nervus vagus rostjainak 90%-a szenzoros rost, nem meglepő, hogy capsaicin előkezeléssel a légutak hiperreaktivitásának némely formája megelőzhető. A szenzoros neuropeptidek infúziója viszont légúti hiperreaktivitást okoz tengerimalacban. Korábbi kísérletek azt mutatták, hogy diabéteszben téringerlés hatására patkány tracheából a szenzoros neuropeptidek (SP, CGRP, SOM) felszabadulása szignifikánsan csökken. Azonos körülmények között megfigyelt két jelenség, azaz a téringerlés indukálta (TI) szenzoros neuropeptid felszabadulás csökkenés, valamint a bronchusgyűrű-kontrakció gyengülés alapján feltételeztük, hogy a jelenségek között ok-okozati kapcsolat van, azaz a téringerlés hatására csökkent szenzoros neuropeptid felszabadulás okozza a TI bronchokonstrikció gyengülést.

1.5 Cisplatin indukálta szenzoros neuropátia és a diabétesz során létrejövő szenzoros neuropátia közös vonásai

Diabétesz hatására a polyol anyagcsereút károsodik, a szorbitol és fruktóz felhalmozódása endoneurális ödémát és idegi iszkémiát okoz. A gerincvelő lumbális L4-L6-os szakaszában a DRG sejtekben a preproCGRP, preproSP és a preproSOM mRNSeinek transzkripciója

szignifikánsan csökken. Végző soron mind a diabétesz, mind a cisplatin indukálta neuropátiában csökken az axonterminálisokból felszabaduló szenzoros neuropeptid mennyiség. A szenzoros neuropeptid felszabadulása – ugyan különböző okok miatt – mind a cisplatin indukálta, mind a diabétesz során létrejövő neuropátiában csökken, ezért indokolt mindkét modellben megvizsgálni a szenzoros effektor funkcióváltozásokat.

1.6 Az experimentális szenzoros neuropátia vizsgálatához alkalmazott módszerek

A cisplatin és a diabétesz indukálta szenzoros neuropátia vizsgálatát legkönnyebben izolált bronchuspreparátumokon lehet vizsgálni. Ismert ugyanis, hogy a bronchus preparátumok gazdagon innerváltak CGRP, SP, neurokinin-A (NK-A) és SOM tartalmú myelinizálatlan afferens rostokkal, melyek a felszín közelében, a mukóza alatt húzódnak. Ismert továbbá az is, hogy a bronchusokban a felszín közelében, a mukóza alatti szövetekben expresszálódnak a szenzoros neuropeptid receptorai is. Ilyen neuropeptid receptorok az alfa- és a béta- CGRP receptor, neurokinin-1, neurokinin-2, és a nagy mennyiségben expresszálódó 4-es valamint a kis mennyiségben expresszálódó 1-es típusú szomatosztatin receptor. (CGRP, NK1, NK2, SSTR4, SSTR1). A neurotranszmitterek koncentrációváltozását radioimmunoassay (RIA) módszerrel, a bronchomotilitás vizsgálatokat elektromos impulzusokkal vagy kémiai vegyületekkel kiváltott bronchomotilitásra kifejtett hatások tanulmányozásával vizsgáltuk. A receptorok mRNS-ei tőből könnyen, és nagy mennyiségben izolálhatóak, így a neuropeptid receptorok transzkripció mintázata quantitative real-time polymerase chain reaction- nel (QRT –PCR) vizsgálható.

2 Célkitűzés

1. Befolyásolja-e a ciszplatin indukálta szenzoros neuropátia
 - a) a téringerlés következtében létrejövő bronchomotilitást?
 - b) a tracheából téringerlés hatására felszabaduló szenzoros neuropeptidek mennyiségét?
 - c) a plazma neuropeptideinek (VIP, SP, CGRP, SOM) szintjét?
 - d) a neuropeptid receptorok (NK1, NK2, CGRPR, SSTR4) mRNS-ének transzkripcióját?
2. A diabétesz következményeként létrejövő szenzoros neuropátiában kimutatható-e összefüggés a TI bronchomotilitás változás és a tracheából téringerlés hatására felszabaduló szenzoros neuropeptidek csökkenése között?
 - a) Befolyásolja-e az STZ-kezelés a plazma SOM szintet?
 - b) Megváltoztatják-e diabéteszben a TI bronchokonstriktív válaszokat az exogén szenzoros neuropeptidek (CGRP, SP és SOM)?
 - c) Megváltozik-e az antigén indukálta bronchokonstriktív antigénnel szenzitivált diabéteszes tengerimalacban?

3 MÓDSZEREK

3.1 Etikai engedélyek

A szükséges kísérleteket az Európai Unió laboratóriumi állatok használatáról és gondozásáról szóló, jelenleg érvényben lévő jogszabályok betartásával végeztük el. A kísérleti protokollt mind a Debreceni Egyetem, mind a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága elfogadta.

3.2 A felhasznált anyagok és eszközök

3.2.1 Felhasznált vegyszerek

Anyag neve	Gyártó	Telephely
[Tyr1]- szomatosztatint	Bachem	Budapest
125-Ival jelzett tracerek	Farmakológiai Int.	Pécs, PTE
Atropin	Sigma-Aldrich KFT.	Budapest
B2M, CGRPR, NK1, NK2, SSTR4 Primerek	Sigma-Aldrich KFT.	Budapest
Capsaicin	Fluka	Buchs
CGRP	Sigma-Aldrich KFT.	Budapest
CGRP, szom antiszérum	Dr. Görcs T. ajándéka	SOTE, Budapest
cisplatin	TEVA- Biogal	Debrecen
EDTA	Sigma-Aldrich KFT.	Budapest
Guanetidine	Sigma-Aldrich KFT.	Budapest
Inzulin RIA KIT	Izinta KFT	Budapest
Inzulin inplantatum	Linplant	Dánia
ovalbumin	Sigma-Aldrich KFT.	Budapest
LightCycler RNA Master SYBR Green I Kit	Rosche Applied Science	Budapest
L-NAME	Sigma-Aldrich KFT.	Budapest
Metanol	Carlo Erba	Limito

Na ₂ HPO ₄	Reanal	Budapest
NaCl	Fluka	Budapest
Piperin	Fluka	Budapest
Polipropilén csövek (RIA)	Merck	Darmstadt
Rneasy Mini Kit (Quiagene Inc.)	Kasztel Med. KFT (forgalmazó)	Budapest
SP	Sigma-Aldrich KFT.	Budapest
SP antiszérum	Prof. G.J. Dockray ajándéka	
SP-tracer	Bachem	Budapest
STZ (Zanosar)	Upjohn	Kalamazoo
Trasyolol	Bayer	Budapest
TTX	Sigma-Aldrich KFT.	Budapest
Tween 80	Reanal	Budapest
Tyr- α -CGRP	Bachem	Budapest

3.2.2 Felhasznált eszközök

Eszközök	Cég neve	Telephely
CWB – 20 water thermostat with circulatory pump	Experimetria Kft.	Budapest
TSZ – 04 multi chamber modular tissue bath system	Experimetria Kft.	Budapest
CRS – SG bridge amplifier for force measurement	Experimetria Kft.	Budapest
Accu Check	Roche- Diagnostic	Budapest
LightCycler 1.5	Roche (Magyarország) Kft.	Budapest
Nanodrop	BIO-SCIENCE Ltd.	Budapest

3.2.3 Az ingerületvezetési sebesség (*Nerve Conduction Velocity, NCV*) mérése

A vizsgálatokat a szenzoros neuropátia kizárása vagy megerősítése miatt végeztük el. Az ingerlés paraméterei a következők voltak: „A” rostokon 0,5 V, 5Hz és a „C” rostokon 3V, 5Hz.

3.3 Az izometriás feszülés változásának mérése

Az állatok kivéreztetése után gyűrűket metszettünk a főhörgőkből. Az így kilakított gyűrűket függőlegesen 2 kis L-alakú platinahorogra helyeztük, melyek közül az egyiket a tönkhöz stabilan rögzítettük, míg a másikat az izometrius tenziókat regisztráló transducerrel kötöttük össze. A szegmensek kontraktilis aktivitását téringérléssel (20 V, 100 stimulus, 0.1 ms, 20 Hz, és 15 mN előfeszítés) tanulmányoztuk. Vizsgáltuk az alkalmazott téringérlési protokoll szelektivitását. Némely bronchusgyűrűt 10 percen keresztül tetrodotoxinnal (TTX) előkezeltünk. 1 μ M TTX jelenlétében a fenti téringérlési paraméterek alkalmazásakor nem kaptunk választ.

3.4 A neuropeptid receptorok transzkripciós mintázatának vizsgálata

3.4.1 RNS izolálás

Patkány tüdőt homogenizáltunk majd totál RNSt izoláltunk a gyártó (RNeasy Mini Kit Quiagene Inc.) utasításának megfelelően. A kvantitatív mérésekhez 200 μ g RNS-t használtunk fel. A tiszta RNS minták OD260/OD280 arányai nagyobbak voltak, mint 1.9. A vizsgált receptorokhoz primereket a primer3 internetes oldal segítségével terveztük (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (2006. április 19.-én elérhető). A vizsgált gének a következők voltak: nk1, nk2, cgrpr, sstr4. Belső standardnak a béta-2-mikroglobulint b2m-t használtuk.

A felhasznált primerek szekvenciái a következők voltak:

nk1 receptor forward: tgggcaacgtagtgggtgata, reverse: cacggctgcatggagtaga;

nk2 receptor forward: ggagagtcaaccgggtgcat, reverse: ccgagcaccattctgtttt;

cgrpr receptor forward: agaacttgaacgccatcacc, reverse: ggatctcaacagcggtcatt;

sstr4 forward gccactgtcaacatgtgtc, reverse: tcttctcagcacctccagt;

b2m forward: acttctcaactgctacg, reverse: tgggtgctcattgctat

3.4.2 *Quantitative real-time polymerase chain reaction (QRT-PCR)*

A QRT-PCR módszer elméleti alapjai jól ismertek. Röviden: reverz transzkripció során a DNS amplifikálódik. Az amplifikáció során a SyberGreenI festék a DNS kis árkába reverzibilisen kötődik. A festék UV fényel gerjeszhető. A detektor minden ciklus után vizsgálja a fluoreszcencia növekedését. A beállított küszöb eléréséhez szükséges ciklusszámot (Ct) a számítógép kijelzi. A LightCycler beállításait a gyártó által előírt módon végeztük el. Az RNS minták vizsgálatát a gyártó által forgalomba hozott kit segítségével, a gyártó által ajánlott módon használtuk fel.

Csak azokat az eredményeket fogadtuk el, amelyben az olvadási görbe analízisekor határozott csúcsot, valamint a gélelektroforézis során jól látható produktumot láttunk. A cisplatin kezelés a vizsgált gének transzkripció mintázatára gyakorolt hatását relatív analízissel vizsgáltuk

3.4.3 *Relatív analízis ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)*

Cisplatinnal kezelt, valamint a kontroll csoportokból származó mintákból izolált mRNS segítségével A $2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszer segítségével vizsgáltuk a cisplatinnak a vizsgált gének expressziójára gyakorolt hatását. A kezelés után kapott transzkripció mintázatot a kontroll állatokban megfigyelt transzkripció mintázathoz hasonlítottuk.

Első lépésben a kontroll csoport mintáit vizsgáltuk. A receptorok Ct értékeiből kivontuk a b2m Ct értékeit. Második lépésben a kezelt állatok csoportjait vizsgáltuk. Harmadik lépésben kivontuk a kezelt állatok ΔC_t értékekből a kontroll értékeket.

$$\Delta\Delta C_{t11nap} = (C_{t\text{receptor}} - C_{t\text{b2m}})_{11nap} - (C_{t\text{receptor}} - C_{t\text{b2m}})_{\text{kontroll}}$$

$$\Delta\Delta C_{t22nap} = (C_{t\text{receptor}} - C_{t\text{b2m}})_{22nap} - (C_{t\text{receptor}} - C_{t\text{b2m}})_{\text{kontroll}}$$

A számításokat mindkét kezelt csoport esetén elvégeztük. A $\Delta\Delta C_t$ értékek változása az expresszió mértékét jelzi. Pozitív $\Delta\Delta C_t$ értéknél downregulációt tapasztalunk, negatív $\Delta\Delta C_t$ értéknél pedig upregulációt. A kapott értékeket a

$2^{-\Delta\Delta C_t}$ módszerrel normalizáljuk. Minden csoportból négy állatot vizsgáltunk meg, az ezekből származó adatok egymás ismétlésének feleltek meg.

3.5 Radioimmunoassay (RIA) tanulmányok

A tracheából téringerlés hatására felszabaduló szenzoros neuropeptidok (CGRP, SP, SOM) koncentrációjának változását szervfürdőben, valamint az éhgyomri plazma CGRP, SP, SOM szint meghatározása RIA módszerrel vizsgáltuk. Az alkalmazott RIA módszereket Dr. Németh József fejlesztette ki a Pécsi Tudományegyetemen.

3.6 Perifériális inzulin rezisztencia (HOMA-IR) és β -sejt funkció vizsgálata (HOMA-%B)

Az éhgyomri vércukorszintet (FPG) Accu-Chek segítségével, glükóz oxidáz módszerrel végeztük, míg a plazma inzulin szinteket (FPI) RIA módszerrel határoztuk meg. A β -sejtek funkcióvizsgálata valamint az inzulin rezisztencia változását a homeosztázis modell (HOMA) kiértékelésével vizsgáltuk. Az FPG (mmol/l) és inzulin koncentrációk (FPI) (μ U/ml) ismertében a következő képletek segítségével számítottuk ki a perifériális inzulin rezisztencia (HOMA-IR) és a β -sejt funkció változását (HOMA-%B).

$$\text{HOMA-IR} = (\text{FPI} \times \text{FPG}) / 22.5$$

$$\text{HOMA-\%B} = (20 \times \text{FPI}) / (\text{FPG} - 3.5)$$

3.7 Statisztika

A bronchomotilitás vizsgálatokból származó eredmények átlagait a szórással (\pm S.D.) fejeztük ki, melyeket Bonferonni módszere alapján kidolgozott ismételt méréseket követő módosított t-teszttel ANOVA után vizsgáltunk. A tracheából téringerlés hatására felszabadult neuropeptid mennyiségek változásait párosítatlan Student-t-teszttel vizsgáltuk, az adatok átlagait \pm S.D. -vel fejeztük ki, a plazma neuropeptid szintek mennyiségének változásait módosított ANOVA-val majd Student-t teszttel vizsgáltuk. Az adatok normalizációjából fakadó hibákat Man-Whitney U-teszt segítségével küszöböltük ki. Az adatok átlagait a szórási hibájával (\pm S.E.M.) fejeztük ki. A kapott eredmények közül azokat tekintettük szignifikánsnak, ahol a $p \leq 0,05$. A QRT-PCR vizsgálatok átlagait \pm S.E.M-el fejeztük ki. Szignifikánsnak tekintettük az expresszió növekedését, ha az expresszió mértéke kétszerese volt a kontrollnak.

4 VIZSGÁLATOK

4.1 Cisplatin kezelés bronchomotilitásra gyakorolt hatása

4.1.1 Kísérleti prtokoll

Cisplatin kezelés bronchomotilitásra gyakorolt hatását 16 hím tengerimalacon vizsgáltuk. Az állatokat véletlenszerűen két csoportra osztottuk. Az első csoportnak (kontroll) a cisplatin oldószerét (1 ml izotóniás NaCl-t) és 75 mg/kg mannitolt adtunk i.p. naponta egyszer, 6 napon keresztül. A második csoportnak (kezelt csoportnak) 3 mg/kg cisplatint adtunk 75mg/kg mannitollal i.p. naponta egyszer, 6 napon keresztül. Mindkét csoportból 8 állatot a kezelés után 24 órával tiopentallal (Trapanal) (50 mg/kg i.p.) elaltattunk. Miután meghatároztuk az állatok n. saphenusán az ingervezetési sebességet, elvégeztük a bronchomotilitás vizsgálatokat.

4.1.2 Eredmények

4.1.2.1 Kizárás

A cisplatinnal kezelt csoport 4 állatát ki kellett zárni a kísérletből. Kettő állatot azért, mert cisplatin kezelés hatására sem az „A”, sem a „C” rostokon sem csökkent az NCV. A harmadikat pedig azért, mert a kezelés hatására kialakuló tüdőkárosodás (feltételezhetően pneumónia) légzési elégtelenséghez vezetett. A negyedik állatban kiterjedt bőrléziók alakultak ki.

4.1.2.2 A testtömeg és rektális hőmérséklet

A cisplatinnal kezelt állatok testtömege a 381 ± 41 g -ról 308 ± 31 g -ra csökkent ($p \leq 0.05$). A kontroll csoport testtömege a kezelés alatt nem változott szignifikánsan (394 ± 25 g -ról 415 ± 31 g -ra). A rektális hőmérséklet egyik csoportban sem változott.

4.1.2.3 Az ingerületvezetési sebesség mérésének eredményei

A cisplatin kezelés hatására az NCV a kontrollhoz képest mind az „A” mind a „C” rostokon szignifikánsan csökkent.

4.1.2.4 Téringerlés hatására kialakult izometriás tenzióváltozások

A kontroll csoportból származó bronchusgyűrűk Krebs-oldatban téringerlés hatására kétfázisú választ adtak. Az első, kontraktilis válasz magában foglalt egy kezdeti gyors, majd egy lassú választ. A kétfázisú kontrakciót egy lassú relaxációs válasz követte. A gyors kontrakciós komponens $4\mu\text{M}$ guanetidint $1\mu\text{M}$ atropint tartalmazó Krebs-oldatban a (NANC-oldatban) eltűnt. A NANC relaxáció 30 perces $30\mu\text{M}$ L-NAME inkubációval gátolható. $100\mu\text{M}$ -os, 30 percig tartó capsaicin hatására viszont eltűntek a lassú válaszok, csak a tüskeszerű, gyors kontrakciós fázis maradt.

Cisplatinnal kezelt állatok bronchusgyűrűi téringerlés hatására szintén kétfázisú választ adtak. A kezdeti kontraktilis fázis amplitúdója és hossza is szignifikánsan gyengült a kontrollhoz képest. Fokozódott viszont a relaxáció amplitúdója és hossza. A relaxáció amplitúdójának L-NAME-val szembeni érzékenysége szignifikánsan megnövekedett. A capsaicin hatására kialakuló kontrakció azonban a cisplatinnal kezelt csoport esetén is tüske alakú maradt.

A kontroll csoportból származó bronchuspreparátumok TI NANC kontraktilis válaszait a SOD nem befolyásolta. A cisplatinnal kezelt csoportok preparátumainak relaxációját azonban a SOD jelenléte szignifikánsan gyengítette.

4.2 Cisplatin kezelés hatása a tracheából téringerlés hatására felszabaduló szenzoros neuropeptidek mennyiségére

4.2.1 Kísérleti protokoll

A kísérlet során 20 hím Wistar patkányt használtunk fel. Az állatokat véletlenszerűen két csoportra osztottuk. A kontroll csoportnak a cisplatin oldószerét (1ml izotónikus NaCl-t) és 75 mg/kg mannitolt adtunk i.p. naponta egyszer, 5 napon keresztül. A kezelt csoportnak 1.5 mg/kg cisplatinot adtunk 75 mg/kg mannitollal i.p. naponta egyszer, 5 napon keresztül (Bardos és mtsai 2003). A kezelés után a cisplatin hatásának kialakulásáig 11 napot vártunk.

Mindkét csoportból 8 állatot elaltatunk tiopentallal (Trapanal) (50 mg/kg i.p.) a kezelés után 11 nappal. Miután megmértük az állatok n. saphenusának ingerületvezetési sebességét, eltávolítottuk a tracheákat és a főbronchusokat. Az izometriás feszítés változásokat 2 mm vastagságú szegmenseken végeztük. A tracheák többi részét a szenzoros neuropeptidok vizsgálatára használtuk fel.

4.2.2 *Eredmények*

4.2.2.1 Állatok kizárása

Két cisplatinnal kezelt állatot zártunk ki a kísérletből. Az egyik állatot azért kellett kizárni, mert elpusztult, a másik állatot pedig azért, mert cisplatin kezelés hatására sem az „A”, sem a „C” rostokon sem csökkent az NCV.

4.2.2.2 Ingerületvezetési sebesség mérésének eredményei

Cisplatin kezelés hatására mind az „A” rostok, mind a „C” rostok ingerületvezetési sebessége a kontrollhoz képest csökkent.

4.2.2.3 Izometriás tenzióváltozások vizsgálata

A cisplatinnal kezelt állatok bronchusainak TI bronchokonstriktója a kontrollhoz képest csökkent. Az alkalmazott kezelés mellett a kontrollhoz képest a relaxáció időtartama csökkent, amplitúdója pedig nőtt. TTX előinkubáció után téringelés hatására nem alakult ki bronchokonstriktó.

4.2.2.4 Szenzoros neuropeptidok (CGRP, SOM, SP) vizsgálata

A kontroll csoport tracheáiból téringelés hatására felszabaduló SOM, CGRP és SP a kezdeti 0.18 ± 0.01 ; 0.17 ± 0.01 és 0.86 ± 0.02 -ről 0.59 ± 0.02 ; 1.77 ± 0.04 és 5.96 ± 0.03 fmol/mg nedves tömegre változott. A cisplatinnal kezelt csoport tracheáiból téringelés hatására

felszabaduló SOM, CGRP és SP 0.36 ± 0.02 ; 0.45 ± 0.02 és 4.68 ± 0.24 fmol/mg nedves tömegre csökkent.

4.3 A cisplatin kezelés hatása a plazma szenzoros neuropeptidek szintjére, vércukorszintre, és neuropeptid receptorok transzkripciós mintázatára

4.3.1 *Kísérleti protokoll*

Ötvenkét hím Wistar patkányt használtunk fel a kísérlethez. Az állatokat véletlenszerűen két csoportra osztottuk. Az első csoportnak (kontroll) a cisplatin oldószerét (1 ml fiziológiás sóoldatot) és 75 mg/kg mannitolt adtunk i.p. naponta egyszer 5 napon keresztül. A második csoportnak (kezelt csoportnak) 1.5 mg/kg cisplatinot adtunk 75 mg/kg mannitollal i.p. naponta egyszer, 5 napon keresztül. Mindkét csoportból 16-16 állatot véletlenszerűen kiválasztottunk, és két csoportba osztottunk a RIA és QRT-PCR vizsgálatokhoz.

A kezelés után mindkét csoportot véletlenszerűen kettéosztottuk. Az állatok felét 11 nappal, míg a másik felét 22 nappal az utolsó kezelés után dolgoztuk fel.

A kísérlet 16. és 27. napján vizsgáltuk a plazma neuropeptideinek változását. Vérvétel után izoláltuk a tüdőket. A csoportokból kiválasztottunk 4-4 állat mintáját, hogy megvizsgáljuk a neuropeptid receptorok transzkripciós mintázatát. A kezelés után 11 és 22 nappal izoláltunk totál RNS-t. Az ingerületvezetési sebesség méréséhez 36 állatot használtunk fel.

4.3.2 *Eredmények*

4.3.2.1 Az ingerületvezetési sebesség mérésének eredményei

Cisplatin kezelés hatására mind az „A” rostok, mind a „C” rostok ingerületvezetési sebessége a kontrollhoz képest csökkent mind kezelés után 11, mind 22 nap után.

4.3.2.2 Plazma SOM, CGRP és SP meghatározása

Plazma SOM immunoreaktivitás szignifikánsan növekedett a ciszplatín kezelés után mind a 11. mind a 22. napon 8.28 ± 0.44 -ról 11.25 ± 2.16 és 11.71 ± 2.33 fmol/ml-ra. A plazma CGRP szint tranziensen növekedett, 8.03 ± 0.79 -ról 23.11 ± 6.43 és 10.55 ± 1.58 fmol/ml-ra. Az SP koncentrációja 5.81 ± 0.55 -ről 6.23 ± 0.85 és 6.48 ± 1.05 fmol/ml-ra változott.

4.3.2.3 Plazma inzulin és glükóz szint meghatározása

A kontroll és a ciszplatinnal kezelt állatokban az utolsó kezelést követő 11. és 22. napon a kezelés nem befolyásolta sem a plazma inzulin, sem az éhezési vércukorszintet. Ezen eredményekkel párhuzamosan sem a HOMA-IR, sem a HOMA-%B sem változott szignifikánsan.

4.3.2.4 QRT-PCR mérések

A kísérlet 16. napján az NK1, NK2, CGRP receptorok mRNS-einek expressziója a kontrollhoz képest 3.22 ± 1.29 -, 2.78 ± 1.14 -, és 1.31 ± 0.14 -szeresére növekedett. A kísérlet 27. napján viszont a kontrollhoz képest az NK1 receptor mRNA 0.69 ± 0.28 -ra csökkent, az NK2 receptor mRNA 0.91 ± 0.24 szeresére, míg a CGRPR mRNA 0.62 ± 0.07 -ére. Az SSTR4 mRNA viszont a kontrollhoz képest 4.41 ± 2.48 szorosára növekedett a 16. napon, míg 7.72 ± 2.66 szorosára növekedett a 27. napon.

4.4 Szenzoros effektor funkciók károsodása diabéteszben

4.4.1 Kísérleti protokoll

A kísérlet során 48 hím, 200-210 g-os Wistar patkányt és 12 hím Dunkin-Harley tengerimalacot (400-420 g-t) használtunk fel. Wistar patkányokat véletlenszerűen két csoportra osztottuk. A kontroll csoport állatait az STZ oldószerével kezeltük, míg a kezelteteket intravénásan 50 mg/kg streptozotocin (STZ) kezeléssel tettük cukorbeteggé. A 4. hét után az STZ kezelt állatokat két további másik csoportra osztottuk, melyek közül az egyik csoport a

kísérlet 4. hetétől kezdve 4 héten keresztül inzulin inplantátumos kezelésben részesült (4 IU/nap). 8 héttel az STZ/ oldószer kezelés után, az állatok egy részét kivéztettük és felhasználtuk in vitro kísérletekhez, laboratóriumi meghatározásokhoz, a többi állaton elvégeztük az NCV vizsgálatokat. 12 órával a vércukor, plazma inzulin és SOM vizsgálatok előtt megvontuk a takarmányt. A plazma inzulin és SOM szintet RIA segítségével határoztuk meg. A tracheák alsó harmadát TI izometriás feszülésváltozások vizsgálatokhoz és TI szenzoros neuropeptidok felszabadulásának vizsgálatához használtuk fel. NCV méréseket csoportonként 6 állaton végeztük el.

A szenzoros „C” rostok jelentős részét capszaicin kezeléssel funkcionálisan károsítottuk. Mind a kontroll, mind a diabéteszes állatok közül 6-6 darabot véletlenszerűen kiválasztottunk. Három egymást követő napon 10, 30 és 50 mg/kg capszaicint ill. oldószerét adtuk s.c. naponta egyszer a kezelés 8. hetét követően. A capszaicin oldatot a következő módon készítettük el: 1 rész capszaicinhez adtunk 1 rész abszolút alkoholt, majd ehhez adtunk 1 rész Tween 80-t. Az így kapott oldathoz adtunk 8 rész fiziológiás sóoldatot. Az állatokat az utolsó kezelést követő 3 nap után használtuk fel, hogy elkerüljük a capszaicin kezelés aspecifikus szisztémás hatását. 12 hím Dunkin-Hurtley tengerimalacot (400-420 g) véletlenszerűen 2 csoportra osztottuk. A kontroll állatok az STZ oldószerét kapták, míg a kezelt állatok 180 mg/kg STZ-t, (egyszer, i.p.). Az állatokat a kezelés után 4 héttel kétszer, két egymást követő napon i.p. ovalbuminnal (1 ml/kg 5 (%))m/V) aktívan szenzitivizáltuk. A 4 hét elteltével az állatokat a tracheakísérletek elvégzéséhez használtuk fel.

4.4.2 *Eredmények*

4.4.2.1 Diabétesz hatása a testtömegre, plazma SOM- és vércukorszintre

A megfigyelt kontroll és inzulin kezelésben részesített cukorbeteg állatok testsúlya fokozatosan növekedett a 8 hetes vizsgálati idő alatt 62 ± 4.1 g-al ill. 58 ± 6.1 g-al. A diabéteszes állatok testsúlya ugyanakkor csökkent 5 ± 2.1 g-al. Azon állatok testsúlya, melyek a 4. héttől inzulin inplantátumot kaptak, a kontrollhoz hasonlóan növekedett.

Az STZ oldószerével kezelt tengerimalacoknak megnőtt a testsúlyuk: 45 ± 6.4 g-al a 8 hetes kezelés alatt. Az STZ kezelés után a tengerimalacok a testsúlya nem változott szignifikánsan.

4.4.2.2 Éhgyomri vércukor és inzulin szintek

A kísérlet 8. hetén az egészséges kontroll, a diabéteszes és az inzulin-inplantátummal ellátott cukorbeteg állatok éhgyomri vércukorszintjei a következők voltak (mmol/l): 4.4 ± 0.6 , 17.4 ± 5.5 és 5.0 ± 0.6 ($p \leq 0.001$ cukorbeteg állatok eredményei az egészséges és az inzulin implantátummal kezelt állatok eredményeihez képest). Az inzulinszintek a következők voltak: 11.4 ± 3.2 , 2.0 ± 0.4 és 12.9 ± 3.8 $\mu\text{IU/ml}$ ($p \leq 0.001$ cukorbeteg állatok eredményei az egészséges és az inzulin implantátummal kezelt állatok eredményeihez képest).

4.4.2.3 Plazma SOM szintek

A kontroll patkányokhoz képest az éhgyomri plazma SOM szintje szignifikánsan megnövekedett a cukorbeteg állatokban. A 8. hét végére a 4. héttől adott inzulin implantáció hatására a plazma SOM szint normalizálódik. A mintavételek a 8. hét végén történtek.

4.4.2.4 Ingerületvezetési sebesség mérés eredményei

Diabétesz hatására mindkét rost ingerületvezetési sebessége csökkent. Az inzulin implantációs kezelésben részesült állatok n. saphenusán mért NCV normalizálódott, és szignifikánsan nem különbözött a kontroll állatok „A” és „C” rostjain mért NCV értékeitől.

4.4.2.5 Téringerléssel kiváltott izometriás tenzióváltozások

A kontroll állatokból származó bronchusgyűrűk TI bronchokonstriktója bifázikus, azaz a kontrakciót relaxáció követi. A diabéteszes állatok téringerlés indukálta kontrakciója a kontrollhoz képest megváltozott. A TI kontrakció csökken, a relaxáció fokozódik. 10 perces TTX-el való előkezelés után a bronchusgyűrűk téringerlés hatására nem reagáltak.

Téringerlés hatására kialakult kontrakciók mind atropin ($1\mu\text{M}$), mind capsaicin inkubáció hatására csökkent mértékben jöttek létre. Diabéteszes patkányokból származó gyűrűk téringerlés hatására gyengébben kontraháltak a normálhoz képest. Capsaicin előkezelés számottevően nem befolyásolja a TI bronchokonstriktót. Atropin kezelés hatására diabéteszben a TI bronchorelaxáció gyengül. Az inzulin implantátumot kapott állatok bronchuspreparátumai téringerlés hatására a kontroll állatok mintáihoz hasonlóan reagáltak.

4.4.2.6 Tracheából téringerlés hatására felszabaduló szenzoros neuropeptidek vizsgálata diabéteszben

A kontroll csoport tracheáiból téringerlés hatására felszabaduló SOM CGRP és SP a kezdeti 0.17 ± 0.0022 , 0.15 ± 0.0022 és 1.65 ± 0.093 -ról 0.58 ± 0.032 , 0.74 ± 0.122 és 5.34 ± 0.0295 fmol/mg nedves tömegre változott. A diabéteszes csoport tracheáiból téringerlés hatására felszabaduló SOM, CGRP és SP 0.19 ± 0.016 , 0.11 ± 0.019 , és 0.98 ± 0.116 -ról 0.22 ± 0.076 , 0.34 ± 0.099 és 1.84 ± 0.316 fmol/mg nedves tömegre csökkent. Az inzulin inplantátumot kapott állatok tracheáiból felszabaduló szenzoros neuropeptidek koncentrációváltozása a kontrollhoz volt hasonló.

4.4.2.7 A szenzoros neuropeptidek hatása a TI bronchokonstrikcióra

Mechanikusan előfeszítettük a kontroll és a diabéteszes állatokból származó bronchusgyűrűket. Megvizsgáltuk az exogén neuropeptidek (SOM, CGRP, SP) bronchokonstrikcióra gyakorolt hatását. Az egészséges és a diabéteszes állatok bronchusainak bronchokonstrikcióját sem a SOM, sem a CGRP nem befolyásolta, viszont az SP koncentrációfüggő módon növelte. Az exogén SP által kiváltott maximális bronchokonstrikciók értékei a következők voltak: kontrol állatoknál: 12.3 ± 2.7 mN $-\log EC_{50}$ 7.1 ± 0.2 -el, míg diabéteszes állatoknál: 13.6 ± 3.4 mN $-\log EC_{50}$ 7.0 ± 0.1 -el. Amikor az exogén SP TI bronchomotilitásváltozásra gyakorolt hatását vizsgáltuk a bronchusok előfeszülését mindig vissza kellett állítani 12 mN-ra. A CGRP (0.1 μ M-ig) és a P-anyag (1 μ M-ig) növeli mind a normál, mind a diabéteszes állatokból származó gyűrűk TI bronchokonstrikcióját. A neuropeptidek potenciózó hatása a TI indukálta bronchokonstrikcióra kifejezettebb a diabéteszes állatokból származó bronchusgyűrűkön, mint a kontrolloknál. Az exogén SOM mind a kontroll, mind a diabéteszes csoportban gyengítette a TI bronchokonstrikciót, de diabéteszben a gyengülés a kontrollhoz képest kifejezettebb volt.

4.4.2.8 Antigen indukálta trachea kontrakció ovalbuminnal szenitizált tengerimalacban

Az ovalbuminnal szenitizált nem-diabéteszes tengerimalacokból származó trachea gyűrűk ovalbumin hatására, ovalbumin koncentrációjától függően kontrahálódnak. Az ovalbumin koncentrációját logaritmikus egységenként növeltük. Az ovalbuminnal kiváltott maximális kontrakciók értékei $\approx 70\%$ -a az 1 mM carbacholnak. Az ovalbumin kezelés hatására létrejövő bronchokontrakciós válaszok mértéke fokozódott, a kapott koncentráció- hatás görbe jobbra tolódott. Az ovalbumin indukálta kontrakciók EC₅₀ értékei a következők voltak: kontroll állatok esetén 4×10^{-10} és diabéteszes állatok esetén 6×10^{-9} g/ml. Az ovalbumin indukálta bronchokonstrikció maximuma diabéteszes állatokban szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest.

5 EREDMÉNYEK RÖVID MEGBESZÉLÉSE

Megfigyeléseink szerint a cisplatin ill. STZ kezelés indukálta experimentális szenzoros neuropátiában megváltozott a bronchusokat innerváló szenzoros rostok szenzoro-effektor funkciói.

Mindkét általunk alkalmazott experimentális szenzoros neuropátia modellben a téringerlés indukálta NANC bronchokonstrikció csökkent, míg a NANC bronchorelaxáció amplitúdója nőtt. A jelenség hátterében a szenzoros idegek szenzoros effektor funkcióváltozása áll. Cisplatin indukálta szenzoros neuropátiában fokozódik a szabadgyökök és a nitrogén – monoxid termelése, ami peroxi-nitrit képződésen keresztül növeli a téringerlés indukálta NANC bronchorelaxáció amplitúdóját, és hosszát. RIA tanulmányok szerint cisplatin-, valamint STZ- indukálta szenzoros neuropátiában a téringerlés indukálta NANC bronchokonstrikció csökkenés együtt jár a tracheából téringerlés hatására felszabaduló szenzoros neuropeptid (CGRP, SP és SOM) felszabadulásának csökkenésével. Inszulin implantátum hatására a tracheából téringerlés indukálta szenzoros neuropeptid felszabadulás normalizálódik. E szenzoros neuropátiában megfigyelt mechanizmus, azaz a szenzoros neuropeptid felszabadulásának csökkenése terápiás előnyökkel járhat olyan betegségeknél, mint pl. az asztma bronchiale.

A RIA vizsgálatok szerint mind cisplatin, mind STZ kezelés hatására krónikusan növekszik a plazma SOM szint. A szenzoros neuropátiában a plazma SOM szintjének változása – legalábbis a fenti eredmények ismeretében- központi jelentőségű.

A cisplatin indukálta szenzoros neuropátiában megfigyelt plazma SOM krónikus SSTR4 mRNS overexpressziót okoz a bronchus mukóza alatti szöveteiben. A cisplatin kezelés ezért előnyös lehet bizonyos endogén SSTR-t expresszáló tumorok gyógyításában.

Diabéteszben az exogén CGRP, SP a kontrollhoz képest fokozta a bronchokonstrikciót, míg a SOM bronchokonstrikciót kevésbé gyengítette. Ovalbuminnal szenzitizált állatokban az ovalbumin indukálta bronchokonstrikció a kontrollhoz képest diabéteszben szintén csökkent.

Diabéteszben a plazma SOM koncentráció növekedése deszenzibilizálja a bronchusokat, csökkentve a bronchusok hiperreaktivitását. A bronchusok hiperreaktivitásának ezen feltételezett mechanizmuson keresztüli csökkenése az asztma bronchiale gyógyításában szintén terápiás értékű.

6 KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Munkám elkészülésében sokat segített témavezetőm, dr. Szilvássy Zoltán professzor úr, akitől mind szakmailag, mind emberileg sokat tanultam. A kísérletek egy részét a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápia Intézetében végeztem. Szeretném megköszönni dr. Szolcsányi János akadémikus úrnak, hogy lehetőséget adott arra, hogy munkám jelentős részét intézetében végezhessem el. Szeretnék köszönetet mondani dr. Sándor Zoltánnak, akitől az alapvető molekuláris biológiai módszereket sajátítottam el, valamint dr. Német József tudományos főmunkatárs úrnak, akitől az alapvető radioimmunoassay módszert sajátítottam el, továbbá szeretnék köszönetet mondani munkám, ötleteim messzemenő támogatásáért. Dr. Helyes Zsuzsannának, a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségéért, dr. Peitl Barnának és dr. Porszász Róbertnek disszertációm írása közben tett észrevételeikért és disszertációm előzetes átnézéséért szeretnék köszönetet mondani.

7 DISSZERTÁCIÓHOZ FELHASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Szilvassy, J., Sziklai, I., Racz, T., Horvath, P., Rabloczky, G., Szilvassy, Z., Impaired bronchomotor responses to field stimulation in guinea-pigs with cisplatin-induced neuropathy. *Eur. J. Pharmacol* (3), 259-65. 2000. **IF: 2,432**

Szilvassy, J., Sziklai, I., Horvath, P., Szilasi, M., Nemeth, J., Kovacs, P., Szilvassy, Z., Feeble bronchomotor responses in diabetic rats in association with decreased sensory neuropeptide release. *Am. J. Physiol Lung. Cell. Mol. Physiol* (5) 1023-30. 2002. **IF: 4,051**

Horvath, P., Szilvassy, J., Nemeth, J., Peitl, B., Szilasi, M., Szilvassy, Z., Decrease sensorial neuropeptide release in isolated bronchi of rats. *Eur. J. Pharmacol.* (1-3) 247-52. 2005. **IF: 2,432**

Horváth P., Szilvássy Z., Peitl B., Szilvássy J., Helyes Zs., Szolcsányi J., Németh, J., Changes in tracheo-bronchial sensory neuropeptide receptor gene expression pattern in rats with cisplatin-induced sensory neuropathy *Neuropeptides.* (1) 77-83. 2006. 2,494 **IF: 2,494**

8 DISSZERTÁCIÓHOZ FEL NEM HASZNÁLT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Sandor, Z., Varga, A., Horvath, P., Nagy, B., Szolcsányi, J., Construction of a stable cell line uniformly expressing the rat TRPV1 receptor. *Cell Mol Biol Lett.* (3) 499-514. 2005. **IF: 0,495**

Sari, R., Nemeth, J., Porszasz, R., Horvath, P., Blasig, I., E., Ferdinandy, P., Nagy, I., Lonovics, J., Szilvassy, Z., Impairment by lovastatin of neural relaxation of the rabbit sphincter of Oddi. *Eur J Pharmacol.* (1) 91-7. 2001.

IF: 2,432