

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományi Kar
Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet



**SIMAIZOM ELEKTROMIOGRÁFIÁS MÓDSZER FEJLESZTÉSE A
GASZTROINTESZTINÁLIS ÉS VEMHES UTERUSZ SIMAIZOMZAT LASSÚ
HULLÁMAINAK MÉRÉSÉRE ÉS ÉRTELMEZÉSÉRE**

Ph.D. tézis összefoglaló

SZŰCS KÁLMÁN FERENC

SZEGED

2018

Szegedi Tudományegyetem
Gyógyszerésztudományok Doktori Iskola

Ph.D. program: Gyógyszerhatástan, biofarmácia és klinikai gyógyszerészet

Programvezető: Dr. Zupkó István Ph.D.

Intézet: Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet

Témavezető: Dr. Gáspár Róbert Ph.D.

Szűcs Kálmán Ferenc

**SIMAIZOM ELEKTROMIOGRÁFIÁS MÓDSZER FEJLESZTÉSE A
GASZTROINTESZTINÁLIS ÉS VEMHES UTERUSZ SIMAIZOMZAT LASSÚ
HULLÁMAINAK MÉRÉSÉRE ÉS ÉRTELMEZÉSÉRE**

Szigorlati bizottság:

Elnök: Dr. Baczkó István Ph.D.

Tagok: Dr. Borsodi Anna MTA doktor

Dr. Benyhe Sándor MTA doktor

Bíráló bizottság:

Elnök: Dr. Révész Piroska MTA doktor

Opponensek: Dr. Kaszaki József Ph.D.

Dr. Izbéki Ferenc Ph.D.

Tag: Dr. Lengyel Csaba Ph.D.

Titkár: Dr. Vasas Andrea Ph.D.

1. BEVEZETÉS

A simaizom szervek motilitási rendellenességeinek diagnosztizálása és terápiája a megoldatlan klinikai kihívások közé tartozik. Jelenleg ezeket az elváltozásokat idiopátiás eredetűnek tekintik, kezelésük nem kielégítő.

A legtöbb simaizomból felépülő szervünk vegetatív beidegzésű, amelyért a szervek valamely intersticiális sejtje felelős. A gasztrointesztinális (GI) simaizomzatnak saját pacemaker sejtje van, az intersticiális Cajal sejt (ICC). Ezen sejtek kulcsszerepet játszanak a GI elektromos jel képzésében, a pacemaker aktivitás koordinálásában és a kontrakciós hullámok terjesztésében. Az ICC-k lassú hullámú impulzusokat generálnak a kontrakciók kiváltására és a jelek gyakoriságának meghatározására. Feltételezhetően a gastroparesis, a krónikus székrekedés és az irritábilis bél szindróma az ICC-k funkcióiban fellépő rendellenességek következménye.

Az ICC-ket immunhisztokémiai úton kimutatták különböző simaizom eredetű szövetekben is, beleértve a miometriumot. Ezek a sejtek szenzorokként viselkedhetnek, a miometrium kontraktilitását szabályozzák a szteroid hormon szintektől függően. A miometriális ICC-k spontán elektromos és pacemaker aktivitást mutatnak, feladatuk a lassú hullámok kialakítása. Feltételezték, hogy ezen sejtek az uterusz motilitási rendellenességekhez kötődnek, amelyek szerepet játszhatnak akár az endometriózis patogenezisében és a terhesség alatti kontrakciók szabályozásában.

A terhes méhösszehúzódnak fiziológiája nagyon összetett, és nem teljesen ismert. A miometriális kontrakciókat a nemi hormonok, az autonóm idegrendszer, az ionszatórnák és a különböző transzmitterek szabályozzák. A miometriális kontraktilitás dysregulációja akár koraszüléshez vagy elhúzódnó fájjástevékenységhez is vezethet.

A koraszülés a legfőbb kiváltó oka a perinatális megbetegedéseknek és elhalálozásnak. Incidenciája 10-12%-re tehető. Koraszülésnek definíció szerint a terhesség 37. hete előtt bekövetkezett szülést nevezzük. A klinikai gyakorlatban nagy jelentőséggel bírna egy érzékeny módszer kidolgozása, amellyel kimutathatóvá válnának a fenyegető koraszülés jelei vagy a korai fájjástevékenység, méhösszehúzódnak is. Ezen miometriális simaizom jelek jellemzése előfeltétele a kontraktilitási zavarok diagnózisának és a fenyegető koraszülés előrejelzésének.

Emellett a koraszülés kialakulása stresszes eseményekhez, szorongáshoz, depresszióhoz, pszichoszociális támogatás hiányához és fizikai bántalmazáshoz is kapcsolható. A szorongással és depresszióval járó betegeknél a gyakran nem ismert

aluldiagnosztizált funkcionális GI-rendellenességek is gyakrabban fordulnak elő, ezen szervek simaizom kontrakciók megváltozása révén reagálnak a pszichoszociális stresszre.

A különféle simaizom szervekből származó jelek azonosítása alapvető követelmény a nem invazív klinikai módszerek kifejlesztéséhez a GI-traktus motilitási rendellenességeinek diagnosztizálásához és a koraszülés előrejelzéséhez.

A mozgási artefaktumok nagy akadályt jelentenek az éber alanyokon végzett elektromiográfiai vizsgálatok során. A vázizomzat mozgása által indukált artefaktumok nagyobb amplitúdóval rendelkeznek az alapaktivitáshoz képest, ami a mérés során nagy torzulást okozhat, ezért ezeket a zavaró jeleket ki kell szűrni, azonban átfedő mioelektromos frekvenciák esetén a szűrés jelentős adatvesztést eredményezhet.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatunk célja a GI-traktus lassú hullámú frekvencia paramétereinek, továbbá a vemhes patkány miometrium elektromos aktivitásának azonosítása és jellemzése volt, illetve hogy ezeket a jeleket elkülönítsük egymástól. E cél elérése érdekében kifejlesztettünk egy olyan eljárást, amellyel a gasztrointesztinális traktus és az uterusz mioelektromos aktivitásának változásait az altatott patkányok mechanikai összehúzódásával párhuzamosan követhetjük egy *in vivo* mérési módszer kifejlesztésével. Ebben lényeges volt, hogy a rendkívül összetett elektromiográfias jelekből származó információkat pontosabban és specifikusabban tudjuk értelmezni az egyszerű görbe alatti terület számításnál.

A második cél az volt, hogy nyomon kövessük a stressz okozta változásokat a GI-traktusban, illetve monitorozzuk a központi idegrendszeri depresszánsok hatását simaizom elektromiográfiával éber patkányokban.

E célok elérése érdekében indítottunk *in vivo* kísérletek hím és nőstény patkányokon.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteink során Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A kísérletek követték mind az Európai Közösség Tanácsának ajánlását (86/609/ECC), mind az állatok védelméről és kíméletéről szóló magyar törvényt (XXVIII.tv.32.x) és elvégzésüket az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (eng. szám: IV/198/2013) engedélyezte.

Kísérleteink megkezdése előtt 2 órával egységesen megvontuk az állatoktól a táplálékot.

3.1 A gasztrointesztinális mioelektromos jelek detektálása

A mélyaltatásban lévő hím patkányok hasfalát felnyitottuk, majd a vizsgálni kívánt GI-szegmens kivételével a teljes gyomor-bél traktust eltávolítottuk. Egy bipoláris ezüst-szálelektrodot illesztettünk be a célszerv falába, míg egy bipoláris korong-elektrodpárt szubkután helyeztünk el a GI-traktus specifikus szegmense fölé. A mechanikus összehúzódások kimutatása érdekében implantálható nyúlásmérőt, úgynevezett strain gauge-t (SG) varrtunk az adott szakasz felszínére.

Az elektromos jeleket egy on-line számítógép és erősítő rendszerrel. A rögzített jeleket gyors Fourier transzformációval (fast Fourier transformation - FFT) analizáltuk. Az elektromos aktivitás frekvenciáját cpm-ben jellemeztük, és az aktivitás nagyságát teljesítményspektrum sűrűségként (power spectrum density - PsD) kaptuk meg. A mechanikai összehúzódásokat a primer kontraktilitási görbék görbe alatti területszámításával (AUC) értékeltük.

Narkózisban tartott, gasztrointesztinálisan nem rezektált patkányok esetében a bipoláris korong elektródot a hasi bőr alá helyeztük, és 3 SG-t varrtunk egyenként a gyomor, az ileum és a coecum felszínére. Mind a mechanikai, mind a mioelektromos jeleket a vizsgált gyógyszerek beadása előtt 30 perccel rögzítettük. Farmakológiai vizsgálataink során neosztigmint (20 µg/ttkg) adtunk, majd 30 perc regisztráció után egy dózis atropint (300 µg/ttkg) injektáltunk i.v. a patkányoknak.

Az egyes hatóanyagok beadását követően a 30 perces szakaszokat AUC és FFT segítségével értékeltük. A hatásokat a spontán, kontroll aktivitáshoz viszonyítva, százalékos arányban fejeztük ki. Az AUC, cpm és PsD_{max} értékeket statisztikailag hasonlítottuk össze.

3.2 Az uterusz mioelektromos jelek detektálása

A vemhes uteruszon végzett vizsgálataink során mély altatásban a nőstény patkányok teljes GI traktusát eltávolítottuk a hasüregből. Egy bipoláris ezüstsál elektród párt helyeztünk a miometrium falába, míg egy korong elektród párt szubkután a méh felett helyeztünk el. A mechanikus összehúzódások kimutatására egy implantálható SG-t varrtunk a méh bal szarvának felületére.

Az alapaktivitást 60 perccel detektáltuk ugyanazon online mérőrendszer segítségével, majd a regisztrátumainkat FFT és AUC analízissel kiértékeltek.

A vemhes uterusz farmakológiai vizsgálataink során az altatott patkányok esetében korong elektródot helyeztük a hasi bőr alá, és 1-1 SG-t varrtunk a méh és a coecum felszínére.

3.2.1 Farmakológiai vizsgálatok

A kontroll aktivitás regisztrálása után két alkalommal, 15 perces időközzel oxitocint (1 $\mu\text{g}/\text{tkg}$) adtunk, majd 30 perc elteltével terbutalint (50 $\mu\text{g}/\text{tkg}$) injektáltunk i.v. mind a vemhes állatoknak. Egy dózis neosztigmint (20 $\mu\text{g}/\text{tkg}$), majd 30 perc múlva egy dózis atropint (300 $\mu\text{g} / \text{kg}$) adtunk az intakt, nem GI rezezált vemhes patkányoknak i.v. Az egyes hatóanyagok beadását követően a 30 perces szakaszokat AUC és FFT segítségével értékeltük. A hatásokat a spontán, kontroll aktivitáshoz viszonyítva, százalékos arányban fejeztük ki. Az AUC, cpm és PsD_{max} értékeket statisztikailag hasonlítottuk össze.

3.3 Stressz vizsgálatok

A hím patkányok bőre alá egy bipoláris korong elektródpárt helyeztünk a gyomor-bél traktus fölé mély altatásban. A szubkután elvezetett szenzor csatlakozó kábelét a mérőegységhez az állat nyakbőréhez rögzítettük.

A kontroll gasztrointesztinális jelek regisztrálása során az állatok a ketrecükben 30 percig szabadon mozoghattak, ezután a patkányokat narkotizáltuk és üveglemezre rögzítve immobilizáltuk őket. A teljes ébredés után a GI aktivitást 30 percen keresztül regisztráltuk ebben a stressz állapotban. A patkányok adott csoportjait diazepammal (5 mg / kg) vagy haloperidollal (1 mg / kg) kezeltük a bazális aktivitás detektálása után, majd további 30 perces felvételt végeztünk, hogy meghatározzuk a stresszre kifejtett hatásukat.

A mioelektromos jeleket ugyanazon számítógépes rendszerrel rögzítettük. A 30 perces regisztrátumokat FFT-vel értékeltük. Az értékelés során a bazális aktivitás EMG spektrumát hasonlítottuk össze a gyógyszeres kezelés vagy a stressz időszak alatti aktivitásváltozással. A stressz által kiváltott változásokat a spontán alap aktivitás százalékában fejezzük ki.

A mozgási artefaktumok eltávolításához egy digitális vágó eszköz került a szoftverbe. A vágó szélsőértékét a mozgás nélküli EMG aktivitáshoz állítottuk be, így a nyilvánvalóan magas, szélsőséges amplitúdójú jeleket ki tudtuk szűrni.

Minden egyes 30 perces mérés végén 0,5 ml vérmintát gyűjtöttünk a farokvénából a plazma stresszhormon vizsgálathoz és a HPLC analízishez. A haloperidol HPLC-vel történő meghatározására szolgáló szervmintákat CO₂-os terminálás után gyűjtöttük össze.

A kortikoszteron plazmakoncentrációját az összegyűjtött mintákból enzimkapcsolt immunoszorbens vizsgálattal (ELISA) határoztuk meg. A kortikoszteron mennyiségi meghatározásához egér/patkány kortikoszteron ELISA kitet használtunk.

A plazma vagy szöveti homogenizátumok hatóanyag-koncentrációját HPLC-analízissel határoztuk meg. A kromatográfiás elválasztásokat Kromasil Eternity C18 analitikai oszlopon végeztük 35 ° C-on. A detektálási hullámhossz 245 nm volt.

Az izolált szervfürdőben végzett ex vivo összehúzóási vizsgálatok során az állatokat CO₂-inhalációval termináltuk. Az eltávolított gyomrot, az ileumot és a coecumot Tyrode-oldatba helyeztük. A kimetszett szervmintákat 60 percig inkubáltuk, majd a simaizom kontroll összehúzóásait KCl-val (25 mM) váltottuk ki, és 10⁻⁴-10⁻⁹ M diazepam vagy haloperidol kumulatív dózis-hatás görbét mértünk. A gyomor-, az ileum és a coecum gyűrűk összehúzóását egy erőmérővel regisztráltuk. A haloperidol vagy diazepam hatásait a kiváltott összehúzóások AUC értékeinek százalékos arányával jellemztük, a kontroll aktivitáshoz hasonlítva.

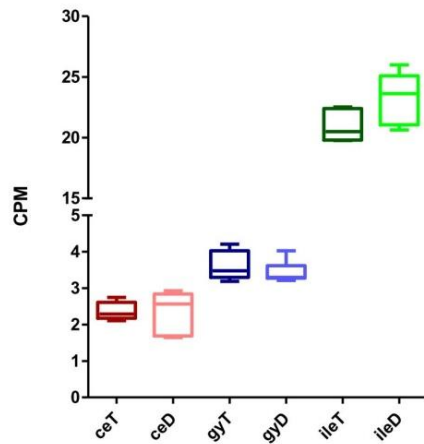
4. EREDMÉNYEK

4.1 A gasztrointesztinális simaizomzat mioelektromos aktivitása

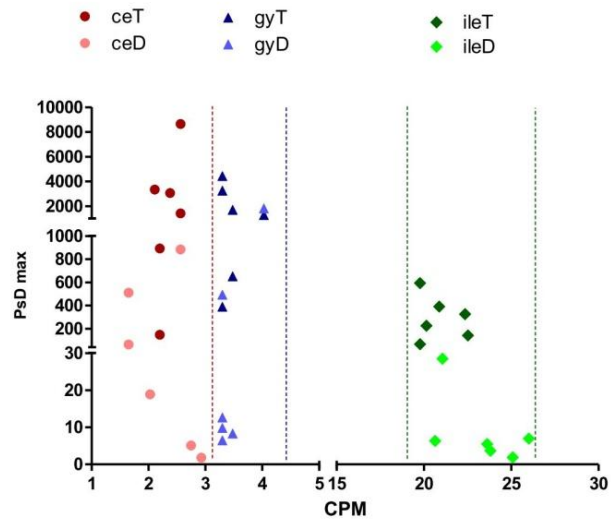
A primer EMG görbék és mechanikai összehúzóások különböző karakterisztikájúnak bizonyultak a gyomor, az ileum és a coecum esetében. Amikor az elsődleges EMG görbéket FFT-vel transzformáltuk, a kapott cpm értékek minden egyes GI traktus szegmens esetében különböztek.

A gyomorra, az ileumra és a coecumra jellemző cpm értékek 3-5, 20-25 és 1-3 cpm-nek adódtak (**1/A ábra**). A jelek maximális intenzitása (PsD_{max}) magasabb volt a százelektrodokkal mérve az adott cpm tartományban (**1/B ábra**).

A.

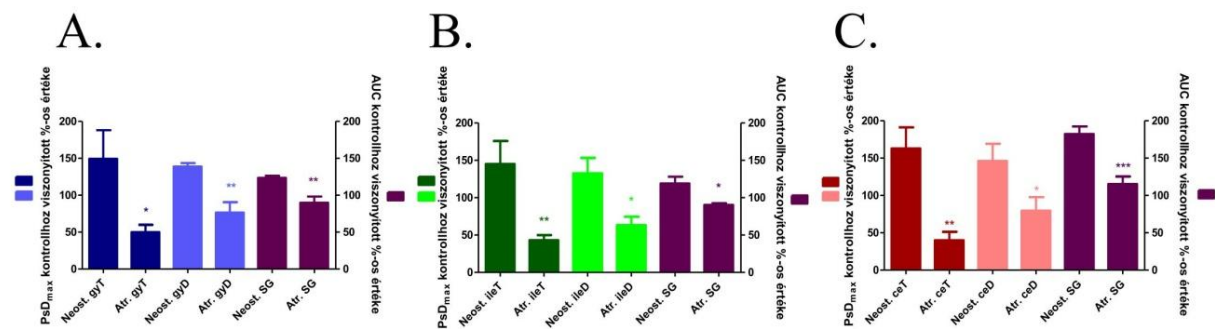


B.



1. ábra: A gyomor (gy), az ileum (ile) és a coecum (ce) gyors Fourier-transzformációjával kapott spektrumok frekvencia értékei (cpm) a szál (T) és a korong (D) elektródokkal mérve. A jelek intenzitását a teljesítményspektrum-sűrűség (PsD_{max}) maximális értékeként fejezzük ki.

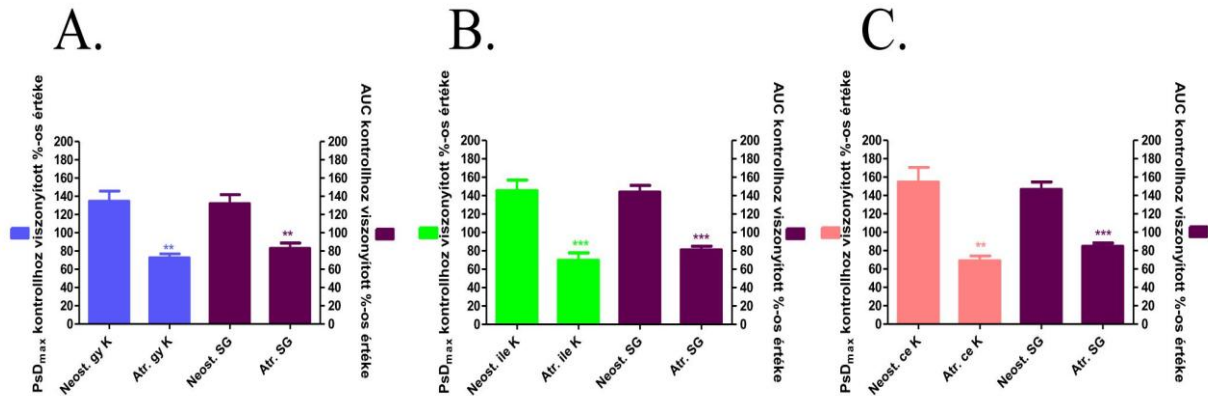
A neosztigmin fokozta, míg az atropin csökkentette mind a mioelektromos, mind a mechanikai jeleket a patkányokban. Az FFT analízis szignifikáns különbséget mutatott ki a PsD_{max} értékekben, amivel párhuzamosan az AUC analízis hasonló változásokat mutatott a kontrakciókban mindegyik vizsgált GI szegmensben (**2. A-C ábra**).



2. ábra: A mioelektromos és mechanikai gasztrointesztinális (GI) aktivitás változása neosztigmin (Neost.) és atropin (Atr.) kezelés után patkányokban. Az elektromos jeleket szál (T) és a korongelektródokkal (D) detektáltuk, és gyors Fourier-transzformációval elemeztük GI traktus szegmens-specifikus szűréssel. A mechanikai összehúzódást SG-vel mértük. ($p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***).

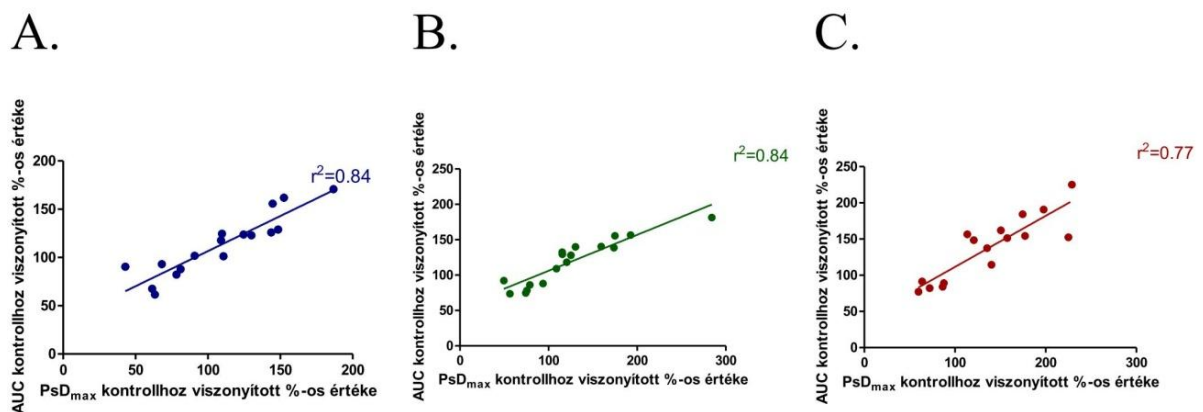
Meghatároztuk a farmakonokra adott választ is a GI traktusban nem rezekált patkányok esetében. A neosztigmin fokozta, míg az atropin csökkentette az elektromos és

mechanikai jeleket az összes GI szegmensben. A stimuláció vagy gátlás mértéke hasonló volt a gyomorban, az ileumban és a coecumban (**3 A-C ábra**).



3. ábra: A mioelektromos és mechanikai gasztrointesztinális (GI) aktivitások változása a neosztigmin (Neost.) és atropin (Atr.) kezelés után patkányokban. Az elektromos jeleket korongelektrodákkal (K) detektáltuk, és gyors Fourier transzformációval elemeztük szegmens-specifikus szűréssel. A mechanikai összehúzódást SG-vel mértük. A gyomorban (A), az ileumban (B) és a coecumban (C) neosztigmin fokozta, míg az atropin csökkentette a simaizmok elektromos és mechanikai aktivitását az alapaktivitáshoz viszonyítva ($p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***).

Szoros összefüggést találtunk a PsD_{max} és az AUC értékek változásai között a GI-traktusokban (**4 A-C ábra**).

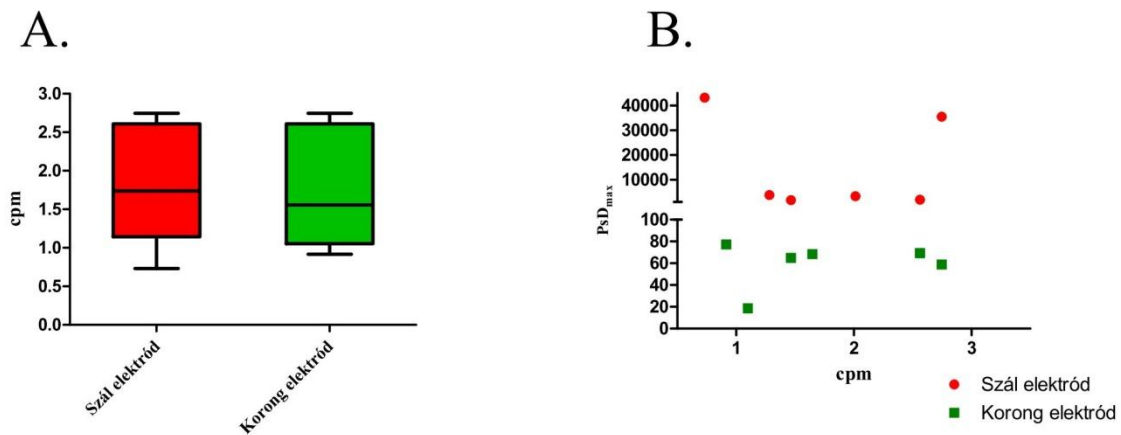


4. ábra: Neosztigmin és atropin kezelése által kiváltott mioelektromos és mechanikai válaszok közötti összefüggések. A lineáris regressziós analízis szoros összefüggést mutatott a gyomor (A), az ileum (B) és a coecum (C) PsD_{max} és AUC értékeinek változásai között.

4.2 Vemhes uterusz mioelektromos aktivitása

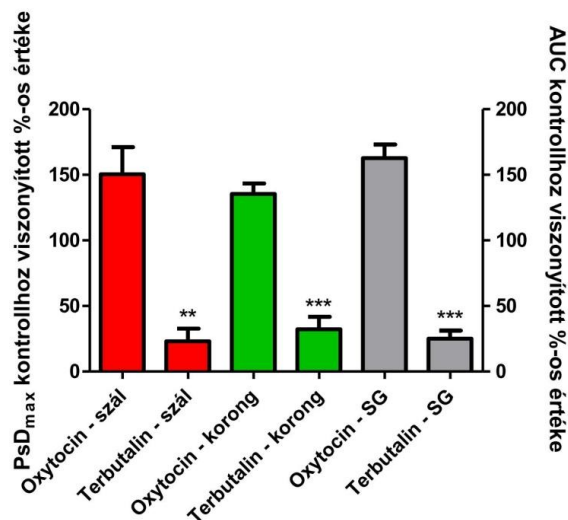
Az uterusz spektrumok éles és domináns csúcsokat (PsD_{max}) mutattak alacsony cpm értékek mellett, amit a terbutalin kezelés csökkentett.

Az uterusz jellemző cpm értékeit 1-2,5 cpm között találtuk mind szál- mind korongelektrodákkal mérve (5/A ábra). A jelek maximális intenzitását jelző PsD_{max} érték nagyobb volt a szálelektrodáknál az adott 1-2,5 cpm tartományban (5/B ábra).



5. ábra: Az uterusz frekvencia értékei szál- és korongelektrodákkal mérve. A szálelektrodák jelei általában nagyobb intenzitásúak voltak, mint a korongelektrodák esetében (B).

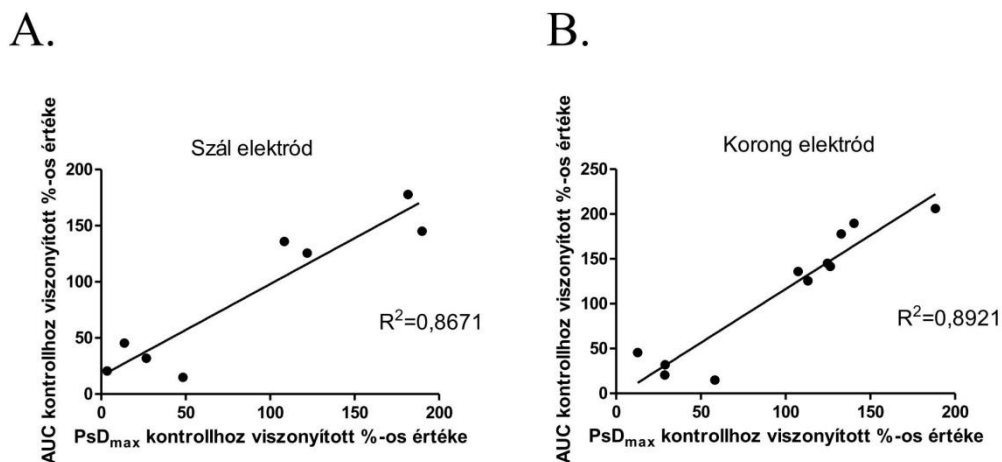
Farmakológiai vizsgálataink során az oxitocin fokozta, míg a terbutalin csökkentette az uterusz mioelektromos és mechanikai jeleit a patkányokban (6. ábra).



6. ábra: Az uterusz aktivitás megváltozása az oxitocin és a terbutalin kezelés után patkányokban. Az elektromos jelek intenzitását a teljesítményspektrum sűrűségének maximális (PsD_{max}) értékeként

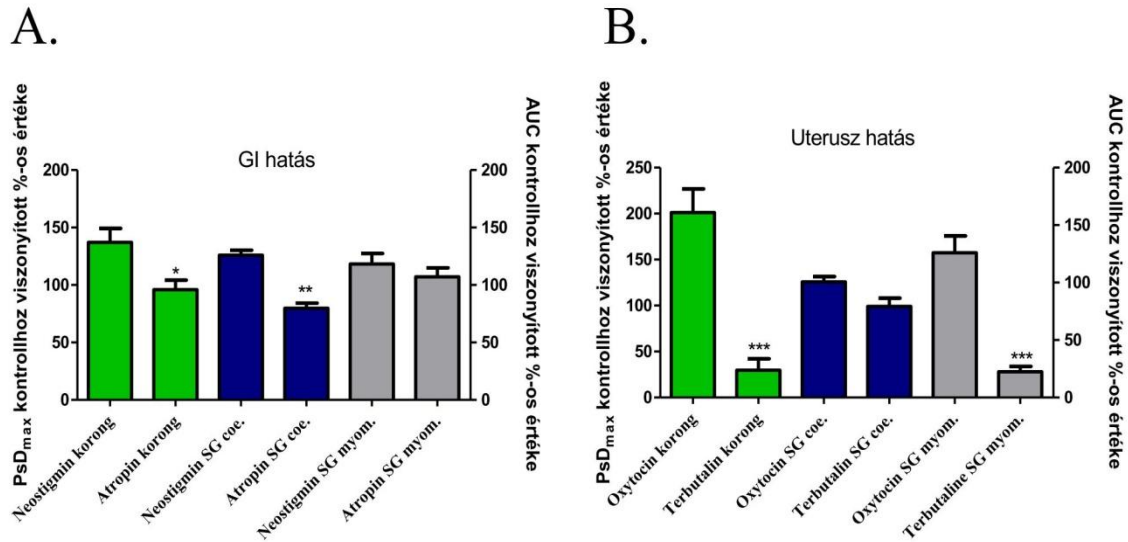
fejezzük ki, míg a mechanikai összehúzódást a görbe alatti terület (AUC) elemzéssel értékeljük. Az oxitocin fokozta, míg a terbutalin csökkentette a simaizmok elektromos és mechanikai aktivitását az alapaktivitáshoz viszonyítva ($p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***).

Az FFT analízissel kapott PsD_{max} értékekben szignifikáns változásokat kaptunk a mioelektromos jelek tekintetében, ezzel egyidejűleg az AUC analízis hasonló változásokat mutatott a mechanikai összehúzódásokban. A stimuláció vagy gátlás mértéke mind mechanikai, mind elektromos változásoknál hasonló volt. Erős korrelációt tapasztaltunk a szál- (7/A ábra) vagy a korongelektrodon (7/B ábra) mért PsD_{max} értékek és az SG-vel detektált mechanikai jelek AUC értékeinek változásai között.



7. ábra: Az oxitocin és terbutalin kezelések által kiváltott mioelektromos és mechanikai válaszok közötti összefüggések a GI-traktustól rezeált állatokban. A szál- (A) vagy a korongelektrodon (B) által rögzített mioelektromos válasz a teljesítményspektrum-sűrűség maximális (PsD_{max}) értékeként fejeződik ki, míg a mechanikai válasz a simaizom kontrakciók regisztrátumának görbe alatti területéből (AUC) adódik.

A coecum és a vemhes miometrium mioelektromos és kontraktilis válaszait párhuzamosan regisztráltuk különböző hatóanyagok adása mellett. Neosztigmin és atropint adtunk be, amelyek főként a GI-traktuson fejtették ki hatásukat, illetve oxitocint és terbutalint, amelyek hatással vannak a miometrium működésére. A neosztigmin és az atropin kezelés jelentősen megváltoztatta a vastagbél mioelektromos jelét (8/A ábra), míg az oxitocin és a terbutalin kezelés csak az uterusz elektromos és mechanikai jeleit befolyásolta (8/B ábra).

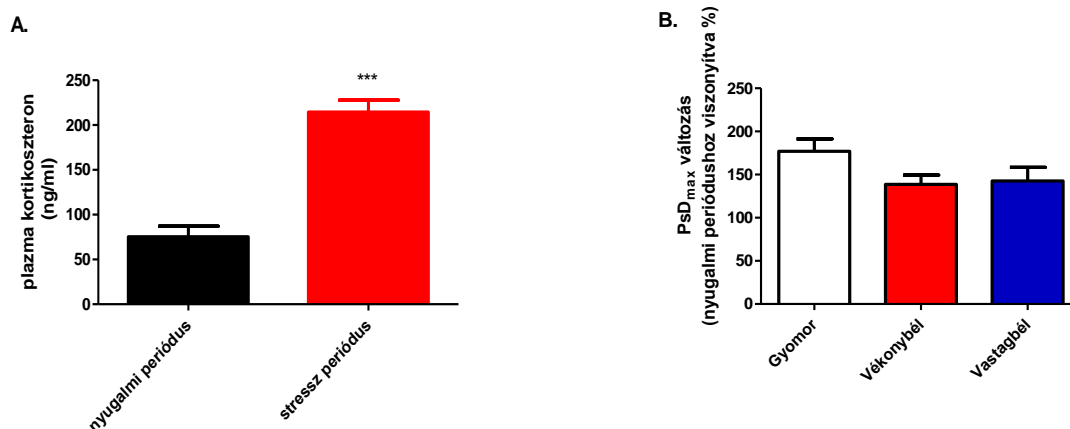


8. ábra: A gasztrointesztinális (GI) rendszer és a miometrium aktivitása a neostigmin és az atropin (A) kezelés, illetve az oxitocin és a terbutalin (B) kezelés után patkányokon. ($p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: ***).

4.3 A stresszhatás mérése éber állatokon

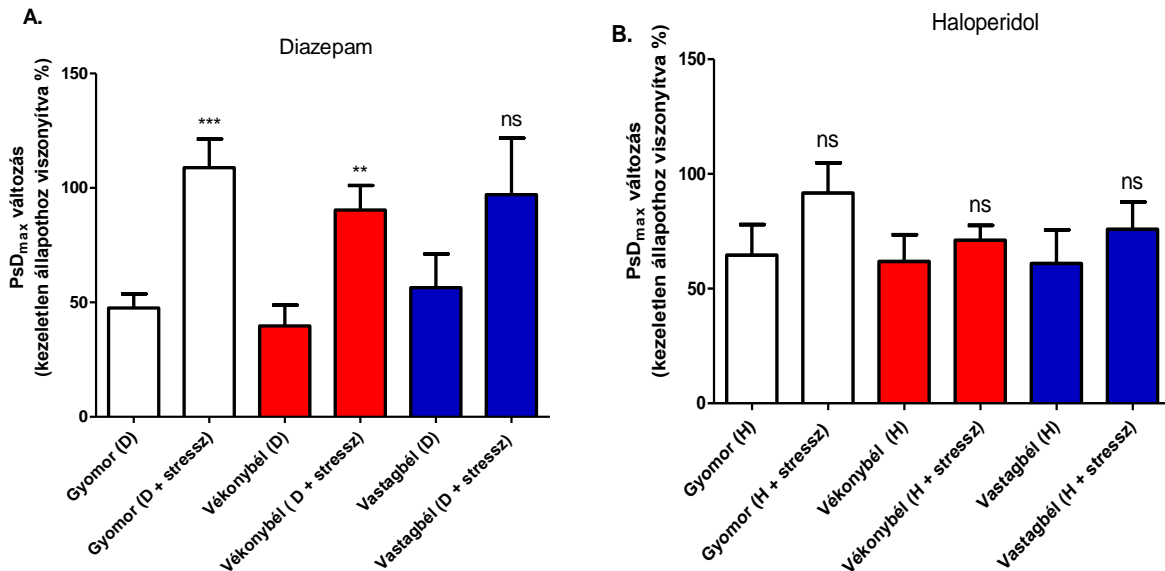
A mozgási artefaktumokat sikeresen elválasztottuk a GI simaizom elektromos aktivitásától a szoftverbe épített eszközzel. A digitális vágás lecsökkentette az artefaktumok által generált kiugró PsD_{max} értékeket az altatott patkányokon regisztrált alap jelintenzitásra.

Az immobilizációs stressz jelentősen megnövelte a mind kortikoszteron plazmaszintjét mind pedig a PsD_{max} értékeket az egész GI-traktusban. A legnagyobb növekedést a gyomor esetén mértük (**9. ábra**).



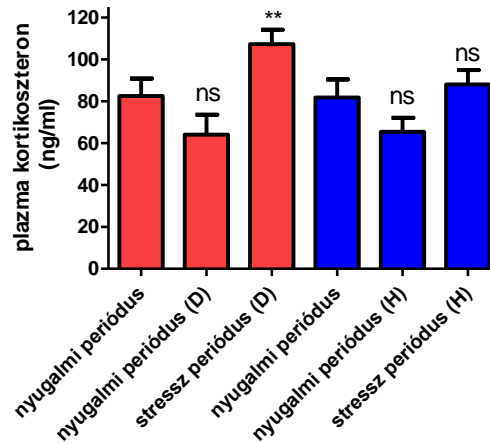
9. ábra: Az immobilizációs stressz jelentősen megnövelte a patkány plazmakortikoszteronszintjét (***: $p < 0,001$) (A). A stresszállapot emelte az FFT spektrumok teljesítményspektrum-sűrűségét (PsD_{max}) is a gyomor, a vékonybél és a vastagbél esetén is a nyugalmi periódushoz képest. (B).

A diazepam kezelés 40-60% -kal csökkentette a nyugalmi EMG aktivitást, míg a kezelés után a stressz által kiváltott PsD_{max} értékek visszaálltak az alap, 100%-os szintre mindhárom gasztrointesztinális szakaszban. A haloperidol kezelés 40% -kal csökkentette a nyugalmi EMG aktivitást, de az immobilizációs stressz nem tudott szignifikáns mértékű mioelektromos aktivitásfokozódást okozni (**10. ábra**).



10. ábra: A diazepam (A) vagy a haloperidol (B) kezelés hatására bekövetkező teljesítményspektrumsűrűség (PsD_{max}) értékek változása éber patkányokban immobilizáció által kiváltott stressz alatt. (ns: nem szignifikáns, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***)

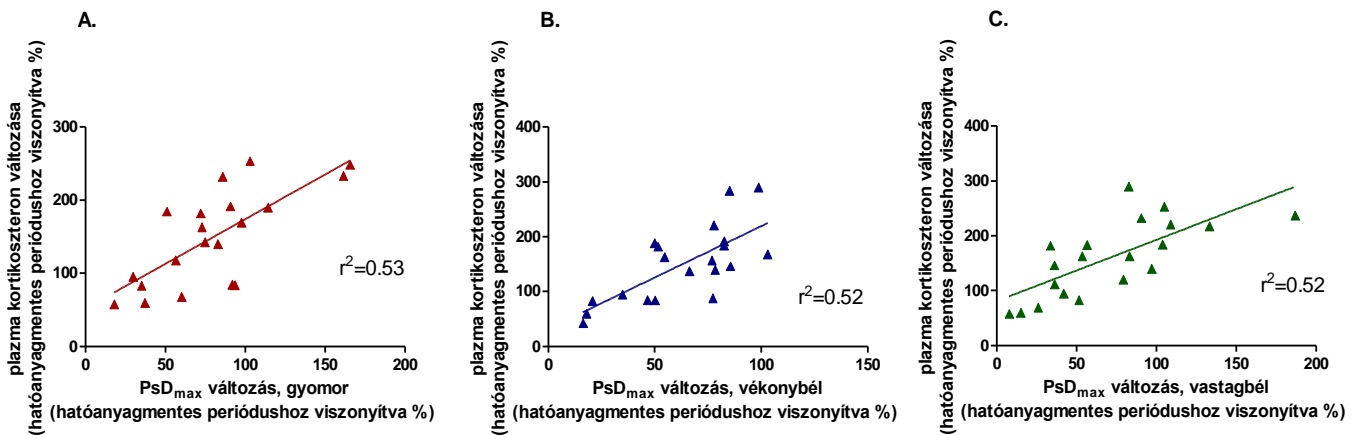
Mind a diazepam, mind a haloperidol kezelés kb. 30% -kal csökkentette a plazma kortikoszteronszinteket a nyugalmi fázis esetében, azonban ezek a változások nem voltak szignifikánsak. Az immobilizációs stressz hormonszint növelő hatását csak a haloperidol szüntette meg (**11. ábra**).



11. ábra: A plazma kortikoszteron szintjének változása gyógyszeres kezeléssel és immobilizációs stressz során patkányokban (D: diazepam; H: haloperidol; ns: nem szignifikáns; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$)

A diazepam plazmaszintje a nyugalmi periódus végén $0,42 \mu\text{g/ml}$ volt, ami a stressz időszak végére $0,13 \mu\text{g/ml}$ -re csökkent. A haloperidol nem volt kimutatható a plazmában a nyugalmi fázis végén, csak az agyban, a májban és a tüdőben. A stressz periódus végén a haloperidol szintje még mindig emelkedett volt ezen szervekben.

Jelentős összefüggést találtunk a gyomor, a vékonybél és a vastagbél PsD_{max} értékeinek változása, valamint a kortikoszteron plazmaszintjének változásai között. A korrelációk mértéke ugyanakkora volt a három GI traktus szegmensben (**12. ábra**).



12. ábra: A gasztrointesztinális rendszer adott szakaszainak (A: gyomor, B: vékonybél, C: vastagbél) PsD_{max} változása és a kortikoszteron plazmaszintjének megváltozása közötti arányok közötti összehasonlítás patkányokon. A lineáris regressziós analízis szignifikáns összefüggést mutatott a PsD_{max} és a kortikoszteronváltozás között.

Sem a diazepam, sem a haloperidol nem okozott szignifikáns relaxáló hatást a gyomor-, az ileum- vagy a coecum preparátumok esetében sem izolált szervvizsgálatain során.

5. DISZKUSSZIÓ

Számos kísérlet történt már *in vivo* mérőmódszer kifejlesztésére a GI traktus és a vemhes miometrium motilitásának detektálására. A simaizmok elektromos jeleiről ismert, hogy szignifikánsan alacsonyabb frekvenciákat mutatnak az agy-, a szív- vagy a vázizmok mioelektromos jeléhez képest.

Kísérleti módszerünk fejlesztése során elsősorban egy simaizom elektromiográfiai eszköz létrehozása volt a cél a gasztrointesztinális traktus és vemhes uterusz egyszerű és megbízható mérésére. Elektródpárok használatával mioelektromos impulzusok kimutatását végeztük. Az alkalmazott szoftver széles skálájú szűrőket tartalmaz, hogy szinte zajmentes regisztrátumot biztosítson a 0-30 cpm frekvenciatartományban.

A GI és uterusz simaizom frekvenciája jóval alacsonyabb, mint 1 Hz, ezért általában cpm-ben fejezzük ki (1 Hz = 60 cpm). A gyomor FFT tartománya (3-5 cpm) összhangban van a korábbi humán eredményekkel. A coecum esetén kapott frekvencia tartomány (1-3 cpm) alacsonyabb volt, míg az ileum esetén (20-25 cpm) magasabb volt, mint korábban leírt irodalmi adatok.

A részlegesen rezekált állatokon végzett kísérletek azt mutatták, hogy a gyomor, az ileum és a coecum különböző mechanikai és mioelektromos aktivitásokkal rendelkeznek, amelyek jól megkülönböztethetők egymástól. Ugyanakkor a vemhes méh simaizom frekvencia tartományát 1-3 cpm között találtuk, így a átfedést mutat a coecum mioelektromos frekvenciájával.

A PsD_{max} értékek általában kifejezik a mioelektromos jelek intenzitását. Nagyon jó összefüggést tapasztaltunk a mechanikai kontraktilis változások és a mioelektromos PsD_{max} értékek változásai között. Ez azt jelenti, hogy a PsD_{max} értékek még a hasfalról rögzített változása is tökéletesen tükrözi a GI-traktus és a méh simaizom kontrakcióinak valódi változását.

A vemhes méh és a coecum mioelektromos jelei átfedést mutatnak egymással. Ismeretes, hogy a coecum és a miometrium különbözőképpen reagál a gyógyszerekre. A coecum sokkal érzékenyebb a neosztigminre és az atropinra, míg a vemhes uterusz nagyon intenzív reakciót mutat az oxitocin és a terbutalin kezelésre. Vemhesség vége felé a méh tömege jelentősen megnövekedett, és aktivitása dominánssá vált a coecum aktivitásához

képeket, tehát úgy tűnik, hogy módszerünk az átfedés ellenére mégis alkalmas a méhaktivitás kimutatására terminális vemhességi időszakban.

A stressz-állapot fiziológiai paraméterekkel történő nem invazív és megbízható mérése még mindig megoldatlan klinikai probléma. Bár a stressz állapot és a szervrendszerek közötti összefüggések, például a szív- és érrendszeri, dermális vagy GI rendszerek stresszválaszai nyilvánvalóak, a stressz szintjét főként pszichológiai vizsgálatokkal mérik.

Az akut stresszválasz fokozza a GI-traktus motilitását, amelyet perifériás neuropeptidek és a CRH szabályoz. Feltételeztük, hogy az EMG módszerünk alkalmazható lehet éber patkányokon a GI traktus motilitás és a stressz állapot közötti összefüggés mérésére.

Sikerült azonosítanunk a mozgási artefaktumok EMG jeleit, és egy digitális vágóeszköz segítségével, eltávolítottuk ezeket a regisztrátumból anélkül, hogy a valódi simaizom adatok jelentős veszteséget szenvedtek volna.

Az immobilizáció meglehetősen rövid idő alatt növelheti a stresszállapotot patkányokban, 30-60 perc elegendő lehet a stresszhormon szintjének jelentős növekedéséhez. Mind a kortikoszteron, mind a PsD_{max} értékek megnövekedtek az immobilizálás során, és a két paraméter között talált szoros korreláció azt jelzi, hogy az akut stressz súlyosságát előre jelezhetjük az éber patkányok GI simaizomzat EMG mérésével.

Mind a diazepam, mind a haloperidol plazmaszintjét a nyugalmi időszak végén és a stressz időszak végén is ellenőriztük. A plazmaszintek kimutatása fontos volt ahhoz, hogy kísérleteink során igazoljuk a hatékony koncentráció jelenlétét.

A haloperidol gátolta az akut stressz során a kortikoszteron emelkedését, míg a diazepam csak csökkenteni képes a stressz hormon szintjének növekedését. Ez a kétféle gyógyszer hatása közötti különbség egyértelműen kimutatható a GI-traktus simaizom-EMG válaszában. Az izoláltszervi vizsgálatok igazolták, hogy sem a diazepam, sem a haloperidol nincs közvetlen simaizom-relaxációs hatással a GI-traktusra, ezért az ébren lévő patkányokban tapasztalt válaszok központi idegrendszeri hatásaiból eredtek, esetleg az agy-bél tengelyen keresztül közvetítettek.

6. KONKLÚZIÓ

Eredményeink alapján kijelenthető, hogy sikeresen kidolgoztunk egy módszert a GI-aktivitás *in vivo* kimutatására, amely alapul szolgál egy nem invazív, megbízható és specifikus simaizom elektromiográfiás mérési módszerhez. Tisztáztuk a gyomor, az ileum

és a coecum különböző mioelektromos aktivitásait. Továbbá, preklinikai módszereink képesek a vemhes uterusz aktivitást *in vivo* monitorozni, és alkalmasak GI-traktusra vagy méhösszehúzóásra ható szerek farmakológiai vizsgálatára.

Emellett simaizom EMG eszközünk képes mérni az akut stressz okozta GI mioelektromos változásokat éber patkányokon, melyek összefüggést mutatnak a stressz hormon plazmaszintjével. Ezek az eredmények további bizonyítékot szolgáltatnak az agy-bél tengely funkciójára. Technikánk alkalmazható a központi idegrendszer érintő különböző gyógyszerek vizsgálatára a GI-traktus mioelektromos válaszában keresztül.

Mindez lehetővé teszi egy új klinikai eszköz kifejlesztését a GI-traktus patofiziológiai folyamatainak vagy a terhes uterusz kontraktilitásának vizsgálatára, valamint a különböző pszichés betegségekben szenvedő betegek stressz- és szorongásos szintjének felmérésére és a farmakonokra adott terápiás válasz mérése.

Publikációs lista

Az értekezés alapját képező közlemények:

- I. Szucs KF, Nagy A, Grosz G, Tiszai Z, Gaspar R: **Correlation between slow-wave myoelectric signals and mechanical contractions in the gastrointestinal tract: Advanced electromyographic method in rats.** *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2016, **82**:37-44.

[IF: 2.238]

- II. Szucs KF, Grosz G, Sule M, Nagy A, Tiszai Z, Samavati R, Gaspar R: **Identification of myoelectric signals of pregnant rat uterus: new method to detect myometrial contraction.** *Croatian Medical Journal* 2017, **58**(2):141-148.

[IF: 1.619]

- III. Szucs KF, Grosz G, Sule M, Sztojkov-Ivanov A, Ducza E, Marki A, Kothencz A, Balogh L, Gaspar R: **Detection of stress and the effects of central nervous system depressants by gastrointestinal smooth muscle electromyography in wakeful rats.** *Life Sciences* 2018, **205**:1-8.

[IF: 2.936]

Egyéb közlemény:

- I. Berko S, Szucs KF, Balazs B, Csanyi E, Varju G, Sztojkov-Ivanov A, Budai-Szucs M, Bota J, Gaspar R: **Electroporation-delivered transdermal neostigmine in rats: equivalent action to intravenous administration.** *Drug Design, Development and Therapy* 2016, **10**:1695-1701.

[IF: 2.822]