Az imidazolin receptorok gasztrointesztinális hatásainak farmakológiai analízise

Doktori tézisek

Dr. Fehér Ágnes

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Zádori Zoltán Sándor, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:
Dr. Pethő Gábor, Ph.D., egyetemi tanár
Dr. Török Tamás, D.Sc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke:
Dr. Tekes Kornélia, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai:
Dr. Müllner Katalin, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Zelena Dóra, Ph.D., egyetemi docens

Budapest

2018

1. BEVEZETÉS

Doktori munkám során az imidazolin receptor (IR) ligandok gasztrointesztinális (GI) traktusra kifejtett hatásait részletezem különböző állatmodellek (alkoholos fekély modell, kémiai úton indukált colitis modell, gyomorfundus kolinerg aktivitásának gátlása) segítségével. Az imidazolin hipotézis alapja, hogy az α_2 adrenerg receptor (AR) agonista clonidin centrális vérnyomáscsökkentő hatását nem az α_2-AR-k, hanem az imidazolin receptorok (IR) közvetítik. A kutatások során számos kórkép terápiájában merült fel az IR ligandok alkalmazása, viszont egyes vizsgálatok megkérdőjelezik az IR-k funkcionális szerepét. Továbbá az IR-kal folytatott kutatásokat jelentős mértékben megnehezíti, hogy az IR ligandok nagy affinitással kötődnek α_2-AR-khoz is, ezért hatás esetén mindig ki kell zárni az α_2-AR-k szerepét.

1.1. Az IR-k

A kutatások során három fő IR-t különítettek el először radioligand kötési vizsgálatokkal, majd specifikus IR elleni antitestek segítségével. Az I1R egy pertussis toxin szenzitív G-protein kapcsolt receptor, melynek aktiválódásakor a foszfatidilkolin-szenzitív foszfolipáz C a foszfatidilkolint foszfokolinná és diacilglicerollá hasítja. Az utóbbit a diglicerid lipáz hasítja, majd a monoglicerid lipáz hatására arachidonsav keletkezik belőle. Ebből prosztaglandin E2 (PGE2) vagy egyéb eicosanoidok is létrejöhetnek, továbbá a digliceridek aktiválhatják a protein kináz C (PKC) β-t is. Az I1R széleskörű központi idegrendszeri (KIR) (medulla oblongata, rostroventrolateralis medulla, cortex, striatum, globus pallidum, hypothalamus) és perifériás (mellékvese kromaffin sejtjei, trombociták, glomus caroticum, vesék proximális tubulusai) előfordulását egyaránt leírták. Sokrétű eloszlásának megfelelően számos hatásért felel, a hipotenzív hatásán kívül mérsékli a bal kamra hipertrófiát, a falfeszülést, kedvezően befolyásolja a kamrai szívizomzat sejtépítő folyamatait, emellett többek között fokozza a natriurezist, diurezist és csökkenti a koleszterinszintet.

Az I2R-kat is azonosították a periférián (hasnyálmirigy, máj, prosztata, trombociták, colon epitél sejtjei) és a KIR-ben (cortex, striatum, gliasejtek) egyaránt. Először az I2R-kat a monoamino-oxidáz (MAO) alloszterikus kötőhelyeként identifikálták (MAO-A és MAO-B egyaránt), később I2R-kat írtak le az agyi kreatin-kináz és a szemikarbazid szenzitív

amino-oxidáz kötőhelyeként is. Az I2R-k többek között antidepresszáns, analgetikus és orexigén hatást is közvetítenek.

Az I3R-kat eddig csupán a pancreas β-sejtjeiben azonosították, aktivációja során fokozódik az inzulin felszabadulás, részben az ATP függő K csatornák közvetítésével, részben attól független módon.

1.2. Endogén imidazolin ligandok

Az agmatin, az endogén poliamin bioszintézis egyik köztes terméke, az IR-k elsőként azonosított endogén ligandja. Az I1R és I2R-hoz való kötődése mellett aktiválja még pl. az α_2-AR-kat, NMDA-, neuronális nikotinos acetilkolin (ACh)-, 5-HT3 receptorokat, továbbá gátolja a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) működését, illetve nerotranszmitter/neuromodulátor szerepet is betölt. Szöveti előfordulását tekintve legnagyobb koncentrációban a gyomorban található, de a KIR-ben is leírták jelenlétét (pl.: cerebrális cortex, primer szomatoszenzoros és auditoros cortex, periaqueductalis area). Az agmatin számos hatását dokumentálták, mint pl. fokozza a morfin analgetikus hatását, gátolja a morfin toleranciát, emellett többek között gyulladáscsökkentő, vérnyomáscsökkentő, bradikardizáló vegyület, mely még antidepresszánsként és anxiolítikumként is viselkedhet.

A β-carbolinok az indolaminok és a rövid szénláncú karboxilsavak/aldehidek kondenzációjával keletkeznek, legfőbb képviselőjük a harman, harmalan és norharman. A vegyületek erősen lipofilek, ezért főleg a KIR-ben találhatók. Széles receptoriális kötődéssel rendelkeznek, a harman jelentős affinitással köt az I1R/I2R-hoz (kismértékben az I3R-hoz), de emellett pl. benzodiazepin kötőhelyhez, μ- és δ-opioid-, 5-HT- és muszkarinos ACh receptorhoz is kötődik, aktiválja a NOS-t, illetve gátolja a MAO enzim működését (főleg MAO-A gátló). Az általa közvetített hatások közül kiemelendő a hipotenzív, hipotermizáló, anorexigén, anxiolítikus, antidepresszáns és antikonvulzív hatása.

1.3. Az imidazolin ligandok szerepe a GI rendszerben

Az IR-kat először radioligand kötési vizsgálatokkal igazolták tengerimalac, nyúl, patkány és ember gyomor-bél rendszerében. Ezt követően a nischarint, egy nemrégiben leírt intracelluláris fehérjét, mely az α5β1 integrinhez kötődve a sejtek migrációját szabályozza, de emellett feltehetően szoros funkcionális kapcsolatban áll az I1R-okkal is, szintén

kimutatták a patkány GI rendszerében, ezáltal többszörösen bizonyítva az IR-k GI előfordulását.

Az IR-k és a gasztroprotekció kapcsolatában ellentmondásos irodalmi adatok állnak rendelkezésre. Bizonyos adatok szerint az agmatin ulceratív hatást mediál, míg a kevert α_2-AR/I1R agonista moxonidin gyomorvédőnek bizonyult. Agmatin esetében a gyomornyálkahártya léziók szignifikánsan csökkentek ischemia-reperfúziós modellen a PI3K/Akt jelátviteli útvonalon keresztül ip. adagolást követően. Mivel az irodalmi eredmények ellentmondásosak, célunk volt annak tisztázása, hogyan befolyásolják az IR-k a gyomorvédelmet. A gasztroprotekció fokozásával a peptikus fekélyek kezelésének további lehetősége nyílna meg, elvégre bizonyos esetekben (pl. stresszfekély) a savelválasztás gátlása nem hozza létre a megfelelő gyógyulást. A gyomornyálkahártya integritásának centrális komponensében kiemelendő a dorzális vagus komplex (DVC), a hypothalamus, míg perifériás faktorként a NO, PGE2, PGI2 és a CGRP szerepe jelentős.

A kutatásom második nagy kérdéskörében a szintetikus és az endogén IR ligandok szerepét vizsgáltam a DSS-colitis lefolyására, mely témakör gyakorlatilag felfedezetlen az irodalomban. Az IR-k szerepének bizonyítása a gyulladásos folyamatokra kutatások sorát képezi. Erre példa, hogy a kevert α_2-AR/I1R agonista clonidin és rilmenidin anti-inflammatorikus hatást fejtett ki patkány talpödémájára, viszont a hatást az α_2-AR-hoz kötötték. Ezt követően felvetették, hogy az I1R az S1P receptor homo- vagy heterodimerje, az S1P1-3 receptorok pedig esszenciális szereppel bírnak az immunrendszer szabályozásában. Erre példa, hogy az S1P receptor modulátorok csökkentik a gyulladás súlyosságát különböző modellek esetében, mint colitis esetében is. Ezek alapján felvethető, hogy az I1R-k az S1P rendszer modulálása révén gyulladáscsökkentő hatásúak, ezáltal alkalmasak lehetnek a gyulladásos bélbetegségek kezelésére.

A bél-idegrendszer zavarai (disorders of gut-brain interaction: DGBI) a GI rendszer krónikus megbetegedései, melynek egyik megjelenési formája a funkcionális diszpepszia (FD). A betegség posztprandiálisan a gyomor antrumának hipomotilitásával, a migrációs motoros komplex csökkent működésével, ritka esetben a gyomor fundusának fokozott kontrakcióival jár. A kórkép kezelésében terápiás lehetőséget nyújthatnak a gyomor fundusának relaxációját előidéző szerek, amit egyrészt NO tartalmú

nitriterg rostok aktivációjával, a másrészt az excitatorikus motoros neuronok (főleg kolinerg neuronok) gátlásával érhetünk el. A preszinaptikus IR-k gátolhatják a neurotranszmitterek felszabadulását, ezáltal az excitatorikus motoros neuronok működését is. Ezt támasztja alá, hogy a preszinaptikus IR-k gátolják a NA felszabadulását humán pitvarral végzett kutatásokban. Mindemellett felmerül, hogy az I1R-k és az I2R-k is szerepet játszhatnak a kolinerg kontrakciók gátlásában. A clonidin javulást hozott létre a gyomor akkomodációs zavaraiban, továbbá a vegyület jelentős affinitással köt az IR-khoz is, így felmerül az IR-k lehetséges szerepe a hatás közvetítésében. Emellett az irodalomban leírtak még posztszinaptikus relaxáló I2R-kat, habár ez a megfigyelés a publikációk többségének ellent mond, kísérleteinkben vizsgáltuk az I2R-k potenciális kontrakciógátló hatását is.

2. CÉLKITŰZÉS

- Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a centrális gasztroprotekcióban. Perifériás faktorok azonosítása az endogén IR ligand agmatin által indukált centrális gyomorvédelemben
- Az I1R-k és az α_2-AR-k szerepének elemzése a DSS-colitis modellben
- Az I1R-k és az I2R-k funkciójának vizsgálata a fundus kontraktilitásának szabályozásában

3. MÓDSZEREK

A kísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága által felállított etikai irányelvek által szabályozottan történtek, melyek a Helsinki Deklaráción alapulnak (EC Directive 86/609/EEC). A kísérleteket jóváhagyta a Nemzeti Kormányhivatal Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága (engedélyek száma: [PEI/001/1493-4/2015]; [22.1/606/001/2010]).

3.1. Alkalmazott vegyületek

A doktori munkám során egyaránt alkalmaztam szelektív α_2-AR, kevert α_2-AR/IR, illetve szelektív IR ligandokat. Az alkalmazott vegyületek szubtípus specificitással és a forgalmazó megjelölésével a következők:

Szelektív α_2-AR antagonisták: yohimbin [α_2-AR], BRL 44408 [α_{2A}-AR] és ARC 239 [$\alpha_{2B/C}$-AR] (Tocris Bioscience)

Kevert α_2-AR/IR ligandok: clonidin (Sigma-Aldrich), moxonidin és rilmenidin (Tocris Bioscience) [α_2-AR/I1R agonisták], efaroxan [α_2-AR/I1R antagonista] és idazoxan [α_2-AR/I2R antagonista] (Sigma-Aldrich), agmatin [I1R, I2R, α_2-AR ligand] és harman [I1R, I2R, I3R, α_2-AR ligand] (Sigma-Aldrich/Tocris Bioscience)

Az alkalmazott vegyületek közül a clonidin, moxonidin és rilmenidin egyaránt kevert α_2-AR/IR ligand, viszont a clonidin az α_2-AR-hoz, míg a moxonidin és rilmenidin az I1R-hoz kötődik erősebben.

Szelektív IR ligandok: AGN 192403 [I1R ligand], 2-BFI [I2R ligand], BU-224 [I2R antagonista] (Tocris Bioscience)

A vegyületek oldása fiziológiás sóoldatban történt, ez alól kivétel a vízben oldhatatlan harman, amit 1.7%-os ecetsav oldatban (DSS kísérletek: per os adagolva), illetve etanolban (EFS kísérletek) oldottunk fel.

3.2. A vegyületek adagolása

A vegyületeket intracerebroventrikulárisan (i.c.v.; 10 µl/állat), intraperitoneálisan (i.p.; patkány: 0.5 ml/100g, egér: 0.1 ml/10 g) és orálisan (p.os; egér: 0.1 ml/10g) adagoltam.

3.3. Alkoholos fekély-modell

A savas-alkohollal indukált fekély modell egy sav-független fekély modell, mely a gasztroprotekció, a gyomornyálkahártya épségét és integritását fenntartó faktorok működésének vizsgálatára alkalmas. A kísérleteket 140-170 g-os Wistar patkányokon végeztem, a mukózális léziókat savas alkohol (98 ml abszolút etanol + 2 ml koncentrált sósav) intragasztrikus adásával váltottam ki 24 órás éhezést követően. Az alkohol beadása után 60 perccel az állatokat CO_2-l túlaltattam, a gyomrukat a nagygörbület mentén felvágtam, majd a léziókat hosszúságuk alapján egy 0-tól 4-ig terjedő pontrendszer segítségével értékeltem ki. A fekélyek pontértékeinek összege adta meg az adott gyomor lézió indexét. Az agonisták gasztroprotektív hatását a százalékos gátlás értékével fejeztem ki, amihez a következő képletet alkalmaztam: 100 - [kezelt csoport fekély indexe / kontroll csoport fekély indexe] x 100. A kontroll csoport az adott vegyület vivőanyagát kapta. A kísérletek során alkalmazott vegyületeket i.c.v. 10 perccel, i.p. 20 perccel a savas alkohol beadása előtt adagoltam, az antagonisták az agonistákkal egy időben kerültek beadásra. A bilateralis

cervikális vagotomián átesett állatok esetében a kísérleteket a műtét után három órával kezdtem el. A kísérlet végén gyomornyálkahártya mintákat tettem el a mukózális CGRP és szomatosztatin szintjének meghatározására.

3.4. DSS-indukálta colitis modell

A kémiai úton indukált colitis modellek közül az egyik leggyakrabban publikált modell a DSS-indukálta colitis modell, melyben a károsító ágens egy szulfatált poliszacharid polimer, a dextrán-szulfát-nátrium [dextran sulphat sodium]. A vegyület az epithelialis sejtek direkt hiperozmotikus károsodását idézi elő és a colitis ulcerosahoz hasonló szövettani (neutrofil granulocita infiltráció, aberráns kripták megjelenése, enterociták pusztulása) és citokinprofilú (főleg Th2 aktiváció; IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, TNF-α, TGF-β) képet ad.

A DSS-colitist a DSS-oldat itatásával váltottam ki, kísérleteimben 8 hetes vad típusú (WT) és különböző szubtípusú α_2-AR génkiütött (KO) C57Bl/6-s egereket alkalmaztam. Doktori munkám során két különböző DSS-colitis protokollt vezettem be, egyikben 2,5%-os DSS-oldatot itattam az egerekkel 7 napon keresztül (középsúlyos DSS-colitis modell, az IR-k lehetséges védő hatásának analizálására), a fennmaradó napokban az állatok csapvizet ittak. A következő protokoll során egy enyhébb colitist szerettem volna létrehozni (tekintettel a későbbiekben részletezett α_2-AR lehetséges colitist súlyosbító hatására), itt 2%-os DSS-oldatot kaptak az egerek 7 napig. Az állatok testtömegét, táp- és vízfogyasztását a kísérletek időtartama alatt minden nap ellenőriztem. Az állatok colitisét a betegségindex-el (DAI: disease activity index) jellemeztem (összpontszám 8 [2.5%-os DSS modell], illetve 5 [2%-os DSS-modell], mely az állatok általános állapotából [2, illetve 1 pont], a széklet konzisztenciájából [3, ill. 2 pont] és vértartalmából [3, ill. 2 pont] tevődött össze). A vegyületeket p.os, ill. i.p. adagoltam napi egyszer, illetve kétszer. A kontroll csoport csapvizet, illetve az adott vegyület vivőanyagát kapta. A DSS-kontroll csoport DSS-oldatot ivott, valamint az adott vegyület vivőanyagát kapta. A kísérlet kezdetét követő 7, illetve 9. napon az állatokat CO_2-l túlaltattam, majd a colonjukat eltávolítottam. A colon hosszának rövidülését a kontroll csoporthoz viszonyított százalékos értékben fejeztem ki. A disztális colonból teljes bélszegmenseket távolítottam el a szövetek myeloperoxidáz (MPO) szintjének és citokin profiljának analízisére. Emellett egyes kísérleteknél sor került a szérum IL-6 szintjének meghatározására is.

Egy kiegészítő kísérletben vizsgáltam az egerek lokomotoros aktivitását a clonidin szedatív hatásának számszerűsítése céljából. A kísérleteket a CONDUCTA viselkedés és aktivitásvizsgáló, felvevő és analizáló rendszer segítségével rögzítettem, mely alkalmas a rágcsálók motilitásának monitorizálására. A lokomotoros aktivitást 3 egymást követő napon mértem (a DSS kezelés 5., 6. és 7. napján) 3 különböző időpontban (30 perccel, 3 órával és 6 órával a clonidin injekciója után).

3.5. Elektromos téringerléssel indukált gyomormotilitás mérés

A kísérleteket WT és különböző szubtípusú α_2-AR KO C57BL/6-s egereken (20-25 g, mindkét nemből) végeztem. A leölt állat gyomrát eltávolítottam, majd a kipreparált fundus stripet 37°C–os 5 mL-es, karbogénnel dúsított, Krebs-oldatot tartalmazó (összetétele [mM]: 118.0 NaCl, 25.0 $NaHCO_3$, 4.7 KCl, 1.2 KH_2PO_4, 11.0 glükóz, 2.5 $CaCl_2$, 1.2 $MgSO_4$) szervfürdőben függesztettem fel két elektróda közé, majd 0.5 g-s előfeszítést alkalmaztam. A kolinerg kontrakciókat elektromos téringerléssel (EFS) indukáltam, melynek paraméterei a következők: 1 ms pulzus szélesség, 200 ms pulzus távolság, 5 Hz szupramaximális feszültség percenként ismételve. A kontrakciókat az ISOSYS 8 csatornás in vitro assay segítségével rögzítettem. A 25-35 perces equilibrációs idő letelte után az agonistákat 5 perces időközönként kumulatív módon adagoltam a szervfürdőhöz, majd az agonista dózis-hatás görbéjének felvétele után egyszeri, 10µM-os dózisban adtam a szervfürdőhöz a vizsgált antagonistát. Ez után 20 perces equilibrációs idő következett.

3.6. In vitro metodikák

A szöveti CGRP és a szomatosztatin koncentráció mérése radioimmunoassay (RIA) technikával történt. Kontrollnak szintetikus peptideket alkalmaztunk, a mérési limit 2 fmol/ml volt a szomatosztatin és 0,2 fmol/ml volt a CGRP esetében. A két peptid koncentrációját a szövet tömegéhez viszonyítottam, értékét fmol/mg-ban fejeztem ki.

A teljes bélszegmenst tartalmazó disztális colon mintákból készített metszetekről kvalitatív (imidazolin ligandokkal végzett kísérletek), illetve kvantitatív (clonidines kísérletek) elemzések készültek. A kvantitatív elemzésnél a gyulladás mértékét (max. 3 pont), mélységét (max. 3 pont), a kriptakárosodás mértékét (max. 4 pont) és a mukózaterület érintettségét

(max. 4 pont) vettem figyelembe. A teljes szövettani pontszám (0-14 pontig) az egyes paraméterek pontjainak összegéből adódott össze.

A teljes bélszegmenst tartalmazó disztális colon szöveti MPO szintjének meghatározásához a mintákat lízis pufferben homogenizáltam, fehérjetartalmukat BCA módszer segítségével megmértem, MPO tartalmukat egér fehérjére specifikus ELISA segítségével határoztam meg. Az MPO szinteket ng/mg szöveti fehérje értékben fejeztem ki (az MPO tartalom korrelál a neutrofil granulocita infiltráció mértékével).

A szérum IL-6 szintjének meghatározásához az állatok vérét lecentrifugáltam, majd a szérum fehérjetartalmát BCA módszer segítségével meghatároztam. A minták IL-6 szintjét egér fehérjére specifikus ELISA kit segítségével határoztam meg.

A disztális colonból származó teljes bélszegmens szöveti citokinszintjének meghatározása egér citokin panel segítségével történt. A minták lízispufferben történő homogenizálása, lecentrifugálása, fehérjetartalmuk BCA-val történő meghatározása után a 600 µg fehérjét tartalmazó mintákat különböző anti-citokin antitest tartalmú nitrocellulóz membránon inkubáltam. A membránhoz kötött citokineket kemolumineszcens technikával kimutattam, a minták által az adott pontokban kibocsátott fény intenzitását denzitometriás módszerrel megmértem, amit a referenciapontok pixel denzitás értékére (10000) normalizáltam.

3.7. Statisztika

Statisztikailag szignifikáns eltérésnek a $p<0.05$ értéket tekintettem. A statisztikai analízishez Student's t-tesztet, egyutas ANOVA módszert (Newman-Keuls, illetve Holm-Sidak post hoc teszt), Mann–Whitney, Kruskal–Wallis tesztet (Holm–Sidak post hoc teszt), Friedman tesztet, illetve kétutas ismételt méréses ANOVA módszert (Newman-Keuls post hoc teszt) alkalmaztam. A túlélési rátát Kaplan-Meier teszttel elemeztem. A gyomormotilitási vizsgálatoknál az agonisták 50%-os effektív koncentrációjának (EC50), valamint a maximális gátló hatásának (Emax) meghatározása a kapott mérési értékekre Hill 4 egyenlettel illesztett sigmoid koncentráció-hatás görbékből történt.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Imidazolin ligandok gasztroprotektív hatásának vizsgálata

Az IR-k gasztroprotektív hatásának vizsgálatához először az irodalomban leggyakrabban alkalmazott endogén IR ligand agmatint választottam, mely mind i.c.v. (0.044-220 nmol/patkány; haranggörbe hatást mutat), mind i.p (0.01-50 mg/kg) injektálva gátolta az alkoholos fekélyek kialakulását. A haranggörbe effektus hátterében felmerül magasabb dózisok alkalmazásakor a gyomorvédelem ellen játszó receptorok aktiválódása (pl. NMDA receptor). További magyarázatot adhat, hogy az agmatin nagy dózisban növeli a gyomorsav termelését, ezáltal fokozza az alkohol direkt károsító hatását és mérsékli a gasztroprotekciót.

Tekintettel arra, hogy a centrális védelem erősebbnek bizonyult, ezért a továbbiakban az I1R-k és az I2R-k centrális gyomorvédő hatását vizsgáltam először az agmatin esetében nem szelektív antagonistákkal, majd szelektív IR ligandokkal. Végül a védelemben szerepet játszó perifériás faktorokat azonosítottam.

Az agmatin védőhatásának receptoriális analízise céljából különböző antagonisták gátló hatását vizsgáltam. Kísérleteimben az i.c.v. injektált agmatin gasztroprotektív hatását teljes mértékben felfüggesztette az α_2-AR/I1R antagonista efaroxan (4 nmol/patkány), az α_2-AR/I2R antagonista idazoxan (160 nmol/patkány), a szelektív I1R ligand AGN 192403 (0.52 nmol/patkány). Viszont a szelektív α_2-AR antagonista yohimbin (50 nmol/patkány) a védelmet csak részlegesen gátolta.

Ezt követően szelektív I1R és I2R ligandokkal is igazoltam mindkét receptor szerepét a centrális gasztroprotekcióban. Mind a szelektív I1R ligand AGN 192403 (0.52 - 52.7 nmol alkalmazott dózisban), mind a szelektív I2R ligand 2-BFI (0.45 – 4.5 nmol) dózisfüggően gyomorvédőnek bizonyult i.c.v. adagolást követően.

Végezetül bizonyítottam, hogy az endogén IR ligand agmatin esetében a kiváltott nyálkahártyavédelmet felfüggesztette a bilaterális cervikális vagotomia. Az I1R-k és I2R-k centrális gyomorvédelmét közvetítő perifériás faktorokat az agmatin segítségével vizsgáltam. Kísérleteimben látható, hogy az indometacinnal (PG szintézis gátló; 20 mg/kg per os) és a

NG-nitro-l-argininnal (NO szintézis gátló; L-NNA) (3 mg/kg i.v.) történő előkezelés egyaránt gátolta az agmatin gasztroprotektív hatását.

Emellett a szövetek CGRP és szomatosztatin szintje a savas alkoholos kezelés hatására jelentősen csökkent, viszont ez a hatás nem alakult ki az agmatinnal kezelt csoportban.

4.2. Az I1R-k és az α_2-AR-k szerepének vizsgálata DSS-indukálta colitis modellen

Az I1R-k szerepének vizsgálatához először a DSS-indukálta colitis modellt karakterizáltam, az első protokollban 2.5%-s DSS-oldatot alkalmaztam 7 napig, a kísérletek a 9. napig folytatódtak.

Kísérleteimben az I1R iránt nagyobb szelektivitással rendelkező kevert α_2-AR/I1R agonista moxonidin és rilmenidin (0.01-1 mg/kg i.p.), a szelektív I1R ligand AGN 192403 (0.1-10 mg/kg i.p.), a kevert α_2-AR/I1R antagonista efaroxan (0.1-10 mg/kg i.p.) egyaránt nem fejtettek ki érdemi hatást a gyulladás paramétereire (DAI, testsúlycsökenés, colonrövidülés), illetve nem befolyásolták a DSS-colitis szövettani képét. A DSS expozíció hatására a szöveti neutrofil granulocita infiltrációval korreláló MPO szint jelentősen megemelkedett, viszont ezt egyik IR ligand sem befolyásolta. A vérszérum IL-6 szintje a DSS-oldat hatására szintén megnövekedett, viszont az IL-6 szint egyforma maradt a fiziológiás sóoldattal, az α_2-AR/I1R agonista rilmenidinnel (0.1 mg/kg) és I1R ligand AGN 192403-mal (0.1 mg/kg) kezelt csoportokban.

Az endogén IR ligandokkal végzett kísérletekben sem az agmatin (10-100 mg/kg i.p.) sem a harman (2.5-10 mg/kg per os) nem befolyásolta a DSS-colitis lefolyását. A kísérletek során felmerült, hogy esetleg a napi 1x-s adagolás nem elégséges érdemi hatás kiváltásához, ezért a kísérleteket a szintetikus vegyületek napi 2x adásával folytattam. A moxonidin, rilmenidin, AGN 192403 (0.1 mg/kg) és efaroxan (1 mg/kg) napi 2x adagolása esetében egyedül a moxonidinnél volt látható a súlyvesztés szignifikáns fokozódása.

Az IR ligandokkal végzett eredmények alapján (napi 2x-es adagolású moxonidinnel kapott eredmények) felmerült, hogy a DSS-colitis súlyosbítását az α_2-AR-k közvetíthetik, elvégre az IR-k nagy affinitással kötnek az α_2-AR-khoz. Ezek alapján egy kevésbé súlyos gyulladást kiváltó

protokoll létrehozása volt a cél, ezért az α_2-AR ligandokkal végzett kísérleteimben az egerek 7 napig itták a 2%-s DSS oldatot.

Az α_2-AR-k szerepét a GI traktusban publikációk sora tárgyalja. Az α_2-AR-k pre-, illetve posztszinaptikus receptorként megtalálhatók az enterális neuronokon, az enterocytákon, valamint a simaizomsejteken is. Szerepet játszanak a bélrendszer neurotranszmissziójában, az elektrolit transzport és a visceralis érzékelés szabályozásában, a motilitásban, emellett az α_2-AR agonisták centrális gasztroprotekciót váltanak ki. Az α_2-AR-k és a gyulladásos bélbetegségek állatmodelljeiben kapott eredmények, illetve a humán adatok sem egyértelműek. Az α_2-AR mediálta lehetséges gyulladáscsökkentő hatást támasztja alá, hogy az α_2-AR agonista dexmedetomidin esetében a TNBS-indukálta colitis súlyossága mérséklődött. Továbbá a kevert α_2-AR/I1R agonista clonidin krónikus alkalmazása javította a colitis ulcerosa endoszkópos és a szövettani képét. Mindezeknek azonban ellentmond az a megfigyelés, mely szerint a makrofágokon és neutrofil granulocitákon is megtalálható α_2-AR-k fokozzák azokból a pro-inflammatorikus citokinek felszabadulását, ezáltal az α_2-AR agonisták súlyosbítják a gyulladásos folyamatokat.

Kísérleteimben az α_2-AR-k iránt nagyobb szelektivitással rendelkező kevert α_2-AR/I1R agonista clonidin (0.3-3 mg/kg i.p.) napi adagolása enyhén súlyosbította a DSS-indukálta colitis tüneteit (DAI érték hamarabb növekedett, szignifikánsan nőtt a súlyvesztés). A DSS expozíció hatására szignifikánsan nőtt a colon MPO tartalma, de ezt nem befolyásolta a clonidin, ahogyan a szövettani képben sem hozott létre érdemi változást. Felmerült, hogy a clonidin testsúlycsökkentő hatását direkt/indirekt (szedatív) mechanizmuson keresztül közvetíti. A lokomotoros aktivitás a legmagasabb clonidin dózissal kezelt (3 mg/kg i.p.) állatok esetében csökkent, viszont ez relatíve rövid ideig tartott és 6 óra múlva a hatás teljesen megszűnt. Ebből kifolyólag valószínűleg nem a szedatív hatás (következményes csökkent ételfogyasztás) a felelős a súlycsökkenésért.

Kísérleteim további részében a clonidin hatását közvetítő α_2-AR szubtípus azonosítása céljából különböző α_2-AR szubtípus KO egerekkel folytattam vizsgálataimat. A kapott eredményeim alapján az α_{2A}-AR KO egereknél a clonidin súlyosbító hatása nem érvényesült, míg az α_{2B}- és α_{2C}-AR KO állatoknál a clonidin hasonló hatást hozott létre, mint WT egereknél. A kísérleteimet az α_{2A}-AR antagonist BRL 44408 (3 mg/kg i.p.) adásával is

alátámasztottam, az α_{2A}-AR gátlása szignifikánsan csökkentette bélgyulladás tüneteit és a súlyvesztést. A védőhatás elűnt, ha a vegyületet a clonidinnel kombináltam.

Végezetül az α_{2A}-AR antagonista BRL 44408 anti-inflammatorikus hatását a citokinek és kemokinek szintjén is kimutattam. A BRL 44408 (3 mg/kg ip.) hatására szignifikánsan lecsökkent a CXCL13 szint, mely a CXCR5 kemokinreceptorral organizálja a B-sejteket a nyirokcsomókban és a lymphoid szövetekben, továbbá szabályozzák a T és a B lymphocyták szegregációját. Emellett enyhén csökkent a CCL3 szint, amely az akut gyulladásos állapotokban játszik szerepet a polimorphonuklearis leukocyták felhalmozásában és aktiválásában. Továbbá a BRL 44408 mérsékelte a CXCL2 citokin szintjét is, mely kemotaktikus a polimorfonukleáris leukocitákra és a hemopoetikus őssejtekre nézve. A DSS-oldat hatására megnövekedett GCS-F szint lecsökkent az α_{2A}-AR antagonista hatására, melynek valószínűleg indirekt oka van, vagyis a BRL 44408 hatására a colitis súlyossága csökkent, ezáltal csökkent a vérveszteség, így mérséklődött a hematopoesis üteme is. Továbbá a BRL 44408 hatására lecsökkent a szöveti MPO szint is. A kapott eredményeim mellett szól az az érdekesség, hogy a DSS oldat indukálta metalloproteináz szöveti gátlója 1 (TIMP1) emelkedés tovább növekedett a BRL 44408 hatására. A mátrix metalloproteinázok (MMP) fő résztvevői az extracelluláris mátrix komponensek lebontásának mind élettani, mind kórélettani körülmények között (beleértve a colitist is). Az MMP-k funkciójának egyik gátlója a TIMP1, ezáltal elképzelhető, hogy a BRL44408 által megnövekedett TIMP-1 aktivitás az egyensúlyt a TIMP javára mozdítja el, ezáltal javítva a gyógyulási folyamatot és csökkentve a szöveti károsodást. Hasonló TIMP-1 mediálta védelmet írtak le infliximab kezelés esetén Crohn betegségben is.

4.3. Az I1R-k és az I2R-k szerepének vizsgálata a fundus kontraktilitásának szabályozásában

Kutatásom harmadik nagy témakörében az I1R-k és az I2R-k szerepét vizsgáltam az elektromos téringerléssel indukált kontrakciók gátlására izolált egérfundus esetében. A jelen kísérletekben alkalmazott ingerlési paraméterekkel a kolinerg végkészülékeket aktiváltam. A célom az az excitatorikus motoros neuronok gátlása, ezáltal a fundus relaxációjának előidézése, az akkomodáció javítása volt.

Az α_2-AR/I1R agonista clonidin, moxonidin és rilmenidin is dózisfüggően (1 nM-tól 1 μM/10 μM-ig) gátolta az EFS-indukálta gyomorkontrakciókat mind WT, α_{2B}- és α_{2C}-AR KO egérben. A vizsgált agonisták közül a clonidin hatáserőssége volt a legnagyobb, amit a moxonidin, majd a rilmenidin követett. α_{2A}-AR KO egérben a kolinerg kontrakciókra kifejtett gátlás csupán a legmagasabb alkalmazott koncentrációban érvényesült a clonidin (1 μM) és a moxonidin (10 μM) esetében.

A három kevert α_2-AR/I1R agonista vegyület gyomorkontrakciókra kifejtett gátló hatását WT egérben az α_2-AR/I2R antagonista idazoxan és a szelektív α_{2A}-AR antagonista BRL 44408 csökkentette. A szelektív I1R ligand AGN 192403, a szelektív I2R antagonista BU-224 valamint az $\alpha_{2B/C}$-AR antagonista ARC 239 sem befolyásolta a clonidin, moxonidin és a rilmenidin hatását.

További kísérleteket végeztem az endogén IR ligandokkal. A kapott eredmények alapján az agmatin nem fejtett ki érdemi hatást a kolinerg gyomorkontrakciókra. Ezzel szemben a harman WT, illetve α_{2A}-AR KO egérben is létrehozott egy enyhe, de szignifikáns kontrakció gátlást, viszont a két görbe lefutása különbözött a két egértörzs esetében. A harman által kifejtett gátló hatást az általam vizsgált antagonisták közül sem az I1R ligand AGN 192403, sem az I2R antagonista BU 224, sem az α_2-AR/I2R antagonista idazoxan nem függesztette fel. Ezt követően vizsgáltam a szelektív I2R ligand 2-BFI hatását, ami a harmanhoz hasonló eredményt hozott (mind WT, mind α_{2A}-AR KO egérben gátolta a gyomorkontrakciókat). Alacsonyabb (10 nM - 1000 nM) koncentrációkban a gátló hatás szignifikánsan eltért a két törzs esetében, viszont a legmagasabb dózis alkalmazásakor (10 μM) ez a különbség eltűnt. A vizsgált antagonisták közül (AGN 192403, BU-224, idazoxan, BRL 44408, ARC 239) egyik sem függesztette fel a 2-BFI hatását WT egérben.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

- Az endogén IR ligand agmatin elsősorban centrális támadásponttal fokozza a gyomorvédelmet, melyben mind az I1R-k, az I2R-k, illetve az α_2-AR-k is szerepet játszanak. A centrális I1R-k illetve I2R-k szelektív aktivációjával önmagában is gyomorvédő hatás érhető el. Az agmatin indukálta gasztroprotektív hatást a nervus vagus közvetíti, a perifériás faktorok közül a

NO felszabadulás, a PG szintézis, illetve a CGRP és a szomatosztatin szerepe emelendő ki.

- Az I1R-k nem vesznek részt a DSS-colitis lefolyásának szabályozásában (makroszkópos, mikroszkópos képet, MPO és IL-6 szintet is figyelembe véve). Az α_2–AR-k aktivációja enyhén súlyosbítja a DSS által indukált gyulladás kezdeti fázisát, gátlásuk pedig jelentős gyulladáscsökkentő hatással bír (farmakológiai analízis és KO egerek felhasználása alapján). Az α_2-AR-k közül az α_{2A}-AR szubtípus aktivációja felelős a proinflammatorikus hatásért.

- A kevert α_2-AR/I1R agonisták kontrakciógátló hatását egérfundusban az α_{2A}-AR-k közvetítik, a hatásban sem az I1R-k, sem az I2R-k nem vesznek részt. Az endogén IR ligand harman és a szelektív I2R ligand 2-BFI esetében az enyhe kontrakciógátlást feltehetően nem az IR-k, hanem egyéb receptorok mediálják.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A tézishez felhasznált publikációk:

Feher A, Toth VE, Al-Khrasani M, Balogh M, Lazar B, Helyes Z, Gyires K, Zadori ZS. Analysing the effect of I1 imidazoline receptor ligands on DSS-induced acute colitis in mice. Inflammopharmacology, 2017; 25: 107-118. [IF: 3.304]

Gyires K, Feher A. Stress, Neuropeptides and Gastric Mucosa. Curr Pharm Des, 2017; 23: 3928-3940. [IF: 2.757]

Zadori ZS, Toth VE, Feher A, Al-Khrasani M, Puskar Z, Kozsurek M, Timar J, Tabi T, Helyes Z, Hein L, Holzer P, Gyires K. Inhibition of alpha2A-Adrenoceptors Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Acute Intestinal Inflammation in Mice. J Pharmacol Exp Ther, 2016; 358: 483-91.201 [IF: 3.867]

Zadori ZS, Toth VE, Feher A, Philipp K, Nemeth J, Gyires K. Evidence for the gastric cytoprotective effect of centrally injected agmatine. Brain Res Bull, 2014; 108: 51-9. [IF: 2.718]

Zadori ZS, Feher A, Al-Khrasani M, Lacko E, Toth VE, Brancati SB, Hein L, Matyus P, Gyires K. Imidazoline versus alpha(2)-adrenoceptors in the

control of gastric motility in mice. Eur J Pharmacol, 2013; 705: 61-7. [IF: 2.684]

A tézishez fel nem használt publikációk:

Toth VE, Feher A, Nemeth J, Gyertyan I, Zadori ZS, Gyires K. Modulation of central endocannabinoid system results in gastric mucosal protection in the rat. Brain Res Bull, 2018; 139: 224-234. [IF: 3.44]

Zador F, Kiraly K, Varadi A, Balogh M, Feher A, Kocsis D, Erdei AI, Lacko E, Zadori ZS, Hosztafi S, Noszal B, Riba P, Benyhe S, Furst S, Al-Khrasani M. New opioid receptor antagonist: Naltrexone-14-O-sulfate synthesis and pharmacology. Eur J Pharmacol, 2017; 809: 111-121. [IF: 3.04]

Gyires K, Feher A. Brain–Gut Relationship on Mucosal Inflammation in the Gastrointestinal Tract. Therapeutic Targets for Inflammation and Cancer: Novel Therapies for Digestive Diseases. 460 p. Singapore: World Scientific, 2017. pp. 7-32.

Zadori ZS, Feher A, Toth VE, Al-Khrasani M, Koles L, Sipos S, Del Bello F, Pigini M, Gyires K. Dual Alpha2C/5HT1A Receptor Agonist Allyphenyline Induces Gastroprotection and Inhibits Fundic and Colonic Contractility. Dig Dis Sci, 2016; 61: 1512-23. [IF: 2.875]