

# Új mechanizmusok a gyomor nyálkahártya védelemben: az endocannabinoid rendszer szerepének vizsgálata

Doktori értekezés  
**Dr. Tóth Viktória Éva**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezetők: Dr. Gyires Klára, DSc., egyetemi tanár  
Dr. Zádori Zoltán, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Szökő Éva, DSc., egyetemi tanár  
Dr. Czimmer József, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóthfalusi László, Ph.D., egyetemi docens,  
Dr. Zelena Dóra, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest  
2018

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>6</b>
<b>2. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR) .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. A gyomor nyálkahártya integritását szabályozó mechanizmusok.....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.1. A peptikus fekélybetegség .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1.2. Perifériás nyálkahártya védelem.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.3. Centrálisan indukált nyálkahártya védelem és neurohormonális szabályozás .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Cannabinoidok.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.1. A cannabinoid kutatás történetének rövid áttekintése .....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.2. Az endocannabinoid rendszer (<i>Endocannabinoid system, ECS</i>).....</b>	<b>22</b>
2.2.2.1. Az endogén cannabinoidok .....	23
2.2.2.1.1. Az endocannabinoidok szintézise .....	24
2.2.2.1.2. Az endocannabinoidok metabolizmusa .....	25
2.2.2.2. A cannabinoid receptorok .....	28
2.2.2.2.1. A cannabinoid receptorok szignál transzdukciója .....	29
2.2.2.2.2. A cannabinoid receptorok lokalizációja .....	31
2.2.2.3. Az endogén cannabinoid szint emelő vegyületek .....	33
2.2.2.3.1. FAAH-gátlók .....	33
2.2.2.3.2. MAGL-gátlók .....	34
2.2.2.3.3. Anandamid visszavétel gátlók .....	34
2.2.2.3.4. Az endogén szint emelők farmakológiai hatásai .....	34
2.2.2.4. Az endocannabinoid rendszer kölcsönhatása más neurotranszmitter családokkal .....	36
<b>2.2.3. A cannabinoidok gasztrointesztinális farmakológiája .....</b>	<b>38</b>

2.2.3.1. A cannabinoidek hatása a gyomorsav szekrécióra.....	39
2.2.3.2. A cannabinoidek hatása a gyomor motoros aktivitására és a gyomorürülésre	39
2.2.3.3. A cannabinoidek hatása a gyomor nyálkahártya védelemre.....	40
<b>3. CÉLKITŰZÉS .....</b>	<b>44</b>
<b>4. MÓDSZEREK ÉS ALKALMAZOTT VEGYÜLETEK.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Kísérleti állatok .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. Alkalmazott vegyületek .....</b>	<b>45</b>
4.2.1. A vegyületek oldása .....	47
4.2.2. A vegyületek adagolásának módjai.....	47
4.2.2.1. Intracerebroventrikuláris (i.c.v.) adagolás .....	47
4.2.2.2. Szisztémás adagolási módok.....	47
<b>4.3. <i>In vivo</i> kísérletek .....</b>	<b>48</b>
4.3.1. Alkoholos fekélymodell .....	48
4.3.2. A gyomor motilitásának mérése <i>in vivo</i> .....	48
4.3.3. Bilaterális cervikális vagotómia.....	50
4.3.4. Katalepszia mérése.....	50
4.3.5. Hypothermia mérése .....	50
<b>4.4. Biokémiai mérések.....</b>	<b>50</b>
4.4.1. A gyomor nyálkahártya perifériás védő faktorainak vizsgálata.....	50
4.4.1.1. CGRP radioimmunoassay (RIA) .....	51
4.4.1.2. Szomatosztatin radioimmunoassay (RIA) .....	51
4.4.2. Antioxidáns enzim aktivitás mérések.....	51
4.4.2.1. Szuperoxid dizmutáz meghatározás.....	51
4.4.2.2. Kataláz meghatározás .....	52
<b>4.5. Statisztikai analízis .....</b>	<b>54</b>

<b>5. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>55</b>
<b>5.1. Az endogén cannabinoidok gasztroprotektív hatása</b> .....	<b>55</b>
5.1.1. Az anandamid és 2-AG védő hatása perifériás (i.v.) adagolásnál.....	<b>55</b>
5.1.2. Az anandamid és 2-AG gasztroprotektív hatása i.c.v. adagolás során.....	<b>55</b>
5.1.3. Az i.c.v. adagolt CB <sub>1</sub> -receptor inverz agonista AM 251 hatása az anandamid és 2-AG által kiváltott gyomorvédelemre .....	<b>56</b>
5.1.4. A TRPV1-receptor antagonistá capsazepin hatása az anandamid által kifejtett gyomorvédelemre.....	<b>58</b>
5.1.5. Az i.c.v. adagolt anandamid és 2-AG hatása a gyomor nyálkahártya CGRP szintjére .....	<b>59</b>
<b>5.2. A CB<sub>1</sub>-receptorok AT<sub>1</sub>-receptorok általi aktivációjának vizsgálata</b> .....	<b>59</b>
5.2.1. Az angiotenzin II (Ang II) gasztroprotektív hatása i.c.v. adagolás során .....	<b>59</b>
5.2.2. A szelektív AT <sub>1</sub> -receptor antagonistá candesartan hatása az Ang II gasztroprotektív hatására.....	<b>60</b>
5.2.3. A CB <sub>1</sub> -receptor inverz agonista AM 251 hatása az Ang II által kifejtett gyomorvédelemre.....	<b>61</b>
5.2.4. A DAG-lipáz (DAGL) gátló tetrahydrolipstatin (THL) hatása az Ang II gasztroprotektív hatására.....	<b>62</b>
5.2.5. Vagotómia hatása az Ang II által kiváltott gyomorvédelemre.....	<b>63</b>
5.2.6. Az atropin hatása az Ang II gasztroprotektív hatására.....	<b>64</b>
<b>5.3. Az endogén cannabinoid szint emelők gasztroprotektív hatásának vizsgálata</b>	<b>65</b>
5.3.1. A centrálisan adagolt endogén cannabinoid szint emelők: az URB 597, JZL 184 és AM 404 gasztroprotektív hatása .....	<b>65</b>
5.3.2. A CB <sub>1</sub> -receptor inverz agonista AM 251 hatása az endogén cannabinoid szint emelők gasztroprotektív hatására .....	<b>66</b>
5.3.3. A TRPV1-receptor antagonistá capsazepin hatása az URB 597 által kifejtett gasztroprotektíóra .....	<b>67</b>

5.3.4. Az URB 597, JZL 184, AM 404 és a perifériára szelektív URB 937 gasztroprotektív hatása perifériás adagolás során .....	68
5.3.5. A centrálisan adagolt AM 251 hatása a perifériásan adott endogén cannabinoid szint emelők gasztroprotektív hatására .....	69
5.3.6. Az URB 597, JZL 184 és AM 404 hatása a gyomor nyálkahártya CGRP és szomatosztatin (SOM) szintjeire .....	70
5.3.7. Az endogén cannabinoid szint emelők hatása a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és kataláz (CAT) enzim aktivitásra .....	72
5.3.8. Az URB 597, JZL 184 és AM 404 hatása a gyomormotilitásra .....	73
5.3.9. Az endogén cannabinoid szint emelők katalepsiát okozó hatásának vizsgálata .....	75
5.3.10. Az URB 597, JZL 184 és AM 404 hatása a hypothermiára.....	75
<b>6. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>77</b>
<b>6.1. Az endocannabinoidok gasztroprotektív hatása.....</b>	<b>77</b>
<b>6.2. A CB<sub>1</sub>-receptorok AT<sub>1</sub>-receptorok általi aktivációjának vizsgálata.....</b>	<b>81</b>
<b>6.3. Az endogén cannabinoid szint emelők hatása a gyomorvédelemre .....</b>	<b>90</b>
<b>7. KÖVETKEZTETÉSEK.....</b>	<b>100</b>
<b>8. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>101</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>102</b>
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>103</b>
<b>SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>133</b>
<b>11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>135</b>

## 1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

2- AG - 2-Arachidonoyl glycerol

ACE - Angiotenzin konvertáló enzim

AEA – Anandamid

Ang II - Angiotenzin II

CB - Cannabinoid

CBC - Cannabichromene

CBD - Cannabidiol

CBG - Cannabiregol

CGRP - Kalcitonin gén-rokon peptid (*Calcitonin-Related Peptide*)

COX - Ciklooxygenáz enzim

DAG - Diacylglycerol

DAGL - Diacylglycerol-lipáz

DMV - Dorzál motoros vágusmag (*Dorsal Motor Nucleus of the Vagus*)

DVC - Dorzális váguskomplex (*Dorsal vagal complex*)

ECS - Endocannabinoid rendszer (*Endocannabinoid System*)

ERK1/2 - Extracelluláris szignál-regulált kináz

FAAH - Zsír-sav amid hidroláz (*Fatty Acid Amide Hydrolase*)

HETE - Hydroxi-eikoza-tetraénsav

i.c.v. - Intracerebroventrikuláris

i.p. - Intraperitoneális

i.v. - Intravénás

IL - Interleukin

LOX - Lipoxigenáz enzim

MAGL - Monoacylglycerol-lipáz

MAPK - Mitogén-aktivált protein kináz

NAPE - *N*-arachidonoyl phosphatidylethanolamin

NKA, NKB - Neurokinin-A, neurokinin-B

NO - Nitrogén-monoxid

NOS - Nitrogén-monoxid szintáz

NSAID - Nem szteroid gyulladásgátlók (*Non-Steroidal Antiinflammatory Drugs*)

NTS - Nucleus Tractus Solitarii

OEA - *N*-oleoylethanolamin

PEA - *N*-palmitoylethanolamin

PG - Prostaglandin

PKA - cAMP-dependens protein kináz A

PLC - Fosfolipáz C enzim

PPAR - Peroxiszóma proliferátor aktivált receptor

PPI - Proton-pumpa gátlók (*Proton-pump inhibitors*)

PVN - Paraventrikuláris mag (*Paraventricular Nucleus*)

RIA - *Radioimmunoassay*

SOM - Szomatosztatin

SP - P anyag (*Substance P*)

THL - Tetrahydrolipstatin

TNF- $\alpha$  - Tumor-nekrózis faktor- $\alpha$

TRPV - Tranziens receptor potenciál csatorna

VEGF - Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (*Vascular endothelial growth factor*)

VIP - Vazoaktív intesztinális peptid (*Vasoactive intestinal peptide*)

VTA - Ventrális tegmentális area

$\Delta^9$ -THC -  $\Delta^9$  – tetrahydrocannabinol

## 2. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR)

### 2.1. A gyomor nyálkahártya integritását szabályozó mechanizmusok

#### 2.1.1. A peptikus fekélybetegség

A peptikus fekélyek kialakulásáért a gyomor agresszív és protektív faktori egyensúlyának felbomlását teszik felelőssé. Ilyen agresszív tényezők lehetnek a parietális sejtek által elválasztott 0,1 mol/l-es töménységű sósav (HCl), mely a gyomor 1,8-3,6-os pH-jáért felel, a fősejtek által termelt pepszinogén, mely a gyomorban a savas pH értéken pepszinné alakul, továbbá olyan exogén faktorok, mint a *Helicobacter pylori* infekció, vagy a nem szteroid gyulladásgátlók (*Non-steroidal antiinflammatory drugs*, NSAID) hosszú távú alkalmazása. A defenzív tényezők közé sorolunk olyan lokális védelmi mechanizmusokat, mint pl. a mucus, -és bikarbonátszekréciót, a mukozális mikrocirkulációt és a prosztaglandinokat, valamint olyan neuropeptideket, amelyek a primer szenzoros afferensek aktiválódásakor, vagy centrálisan, a központi idegrendszer gasztrointesztinális funkciók szabályozásában részt vevő központjainak (hypotalamikus paraventriculáris mag, dorzális váguszkomplex, Nucleus tractus solitarii) aktivációja révén a perifériás idegvégződésekből felszabadulnak (pl. CGRP, NO, szomatosztatin, CCK, VIP) (Gyires és mtsai., 2013; Gyires és mtsai., 2015).

Míg a duodenális és a prepilorikus csatorna fekélyei esetében a savszekréciót csökkentő szerek (a kiszorulóban lévő H<sub>2</sub>-receptor antagonisták és a korszerű proton pumpa gátlók (PPI)) terápiás hatása a legtöbb esetben kielégítő, azonban a magasabban elhelyezkedő gyomorfekélyek esetében sokszor nem elégséges. Ennek oka, hogy míg a lejjebb elhelyezkedő fekélyek az esetek nagy többségében fokozott sósavtermeléssel járnak, a gyomorfekélyek esetében sokszor normál, vagy hypoaciditás figyelhető meg (Davenport, 1965). A fekélybetegség felső gasztrointesztinális vérzéses komplikációjának rizikója igen magas, bár érdemes külön kezelni a nyelőcső varix miatt kialakult vérzéseket, annak a háttérben ugyanis krónikus májelégtelenség is állhat. A fejlett, nyugati országokban a nem-variceális vérzések kialakulásának aránya kb. 1%, azonban ez a fejlődő országokban a 28%-ot is elérheti. A kialakult felső gasztrointesztinális vérzések akut mortalitása egységesen ~10-14% (bár ebbe beletartoznak a nyelőcső varixos páciensek is, akiknél a legmagasabb a mortalitási ráta), de az össz mortalitás is 7-10% között mozog, az újrávérzések kialakulásának esélye pedig



5-12% (Arlt és Leyh, 2001; Beales, 2017; Hearnshaw és mtsai, 2011; Lanas és Chan, 2017). Míg a PPI-k placebo kontrollált kísérletekben ~15%-al csökkentették az újravérzések gyakoriságát, a mortalitással, és a sebészi beavatkozás (vagotómia) elkerülésével nem mutattak szignifikáns kapcsolatot. H<sub>2</sub>-receptor blokkolók adásával az újravérzések kialakulásának gyakorisága nem csökkent (Bardou és mtsai, 2005; Leontiadis és mtsai, 2006).

Érdekes megfigyelés továbbá, hogy míg duodenális fekélyrel kezelt páciensek 95%-a, és gyomorfekélyeknél is több, mint 80%-uk fertőzött *H. pylori*-val, a teljes *Helicobacter* fertőzött populáció csak mintegy 15-20%-ánál alakul ki gasztrointesztinális fekély (Walsh és Peterson, 1995). Ezt a jelenséget vizsgálva jutottak arra a megállapításra, hogy azon betegek esetében, akiknél duodenális fekély komplikáció lépett fel, nagyobb arányban fordul elő a bazális -és sósav indukálta bikarbonátelválasztás csökkenése (Isenberg és mtsai, 1987).

Az NSAID-ok napjainkban leggyakrabban alkalmazott fájdalom-és gyulladáscsökkentő szerek, amelyek mellékhatásaként sajnos már meglepően alacsony (bőven a vény nélküli tartományba eső) dózisban megjelennek az epitheliális bevérzések, szöveti erózió, amely nekrozishoz, fekélyek kialakulásához vezethet. Az aspirin esetében ez alacsony, akár napi 75-100 mg-os dózis hosszú távú szedését is jelentheti, amely még csak nem is a gyulladáscsökkentő tartomány, sokkal inkább trombocita aggregáció gátló hatása miatt szedik a kardiovaszkuláris kockázat csökkentésének érdekében. Már ebben a dózisban 2-4-szeresére növeli a felső GI traktus vérzéses komplikációinak rizikóját, és évente 1000 betegből 5-nél alakul ki fekélyperforáció (Casado-Arroyo és mtsai, 2012), nem is beszélve azon betegekről, akik rheumatoid arthritis, vagy osteoarthritis miatt kénytelenek sokkal nagyobb dózisban alkalmazni NSAID-okat. Egy 2007-ben készült angol tanulmányból (amely 6750 páciens adatait összegzi) látható, hogy a betegek 11%-a szedett krónikusan valamilyen NSAID-ot, 28%-uk pedig alacsony dózisú aspirint, és 36%-nál alakult ki a fekélybetegség valamely formája (Hearnshaw és mtsai, 2011). Egy ázsiai tanulmány kifejezetten rheumatoid arthritises és osteoarthritises, krónikusan NSAID-dal kezelt betegek (n=634) esetében vizsgálta a fekélybetegség és a vérzéses komplikáció kialakulásának kockázatát. A betegek 58.5%-a szelektív COX-2 gátló nemszteroid gyulladásgátlót szedett, míg 41.5%-uknál nemszelektív NSAID-ot alkalmaztak. A betegeket 3 évig követték, 37%-uk esetében alkalmaztak

profilaktikusan PPI-t vagy egyéb szekréciógátlót. A páciensek 20%-nál alakult ki dypepsia vagy fekély (a szelektív és nemszelektív COX-gátlót szedők esetében nagyjából azonos arányban), azonban felső gasztrointesztinális vérzést csak egy esetben jegyeztek fel. A PPI-k alkalmazása 13%-ra csökkentette a kedvezőtlen mellékhatások kialakulásának számát (Pok és mtsai, 2018). Az utóbbi években egyre több figyelem éri azonban a NSAID-ok okozta vékony-és vastagbél károsodásokat is (alsó GI vérzéses komplikációk, és a következetes fehérjevesztés, vashiányos anémia kialakulása, hypoalbuminaemia), amelyek kezelésében ráadásul a PPI-k hatástalannak bizonyulnak.

A nemszteroidok károsító hatása kettős: egyrészt savas karakterüknek köszönhetően lokálisan károsítják a nyálkahártyát (a gyomornedvben nem ionizáltak, majd a gyomor lumenbe jutva ionizálódnak, így visszafelé már átjárhatatlan számukra a membrán, ez a folyamat az „ion-trapping”, mely nagyban hozzájárul a NSAID-ok lokális károsító hatásához). Másrészt a ciklooxygenáz (COX)-enzimek gátlásával csökkentik a prosztaglandinok szintézisét, melyek a mukozális integritás kulcsvegyületei a periférián (Takeuchi, 2012). Ezen felül az utóbbi években leírták hypermotilitást okozó hatásukat is, mely fokozza a mukozális mikrocirkuláció zavarait, ez fokozott nyomást fejt ki a gyomorfalra, és növeli a vaszkuláris permeabilitást, fokozva a gyulladást és a szöveti károsodást. Továbbá az indomethacin fokozza a szabadgyök-képződést és a lipid-peroxidációt, mely utóbbi károsító faktorok kiküszöbölésére a proton-pumpa gátlók szintén nem alkalmasak (Takeuchi, 2012).

Szintén megoldatlan probléma az ún. stressz-fekély szindróma (*Stress-related mucosal disease*, SRMD), mely gyakran előfordul a kórházak intenzív osztályán, és a kórkép vérzéses komplikációi és mortalitása igen magas (akár az 50%-ot is elérheti) (Cook és mtsai, 1994). A proton-pumpa gátlók mérséklék ugyan a vérzések kialakulásának számát, azonban jelentősen növelik a fertőzések és az aspirációs tüdőgyulladás előfordulását. A gyomorsav csökkentése révén (amely fontos szerepet játszik a bakteriális kolonizáció megfékezésében) a Gram negatív és Gram pozitív baktériumok szaporodni kezdenek a lumenben, a baktérium-tartalmú gyomortartalom aspirációja pedig nagyon gyakran vezet akár letális kimenetelű tüdőgyulladáshoz. A sucralfat alkalmazása mellett ritkábban alakul ki bakteriális tüdőgyulladás (gyengébb antiszekretórikus hatása miatt), nem csökkenti azonban a vérzéses komplikációk gyakoriságát (Fohl és Regal, 2011; Szabo, 2014).

Láthatjuk tehát, hogy pusztán az agresszív faktorok csökkentésén alapuló terápiás mechanizmusok (gyomorsav közömbösítése, savszekréció gátlása, *H. pylori* eradikáció) nem feltétlenül elégségesek a peptikus fekélyben szenvedő betegek gyógyulásához. Doktori munkám során az endocannabinoid rendszer szerepét vizsgáltam a gasztrointesztinális nyálkahártya védelemben alkoholos fekélymodellen, amely modellben az alkohol direkt nyálkahártya károsító hatása a savelválasztástól független, így jól vizsgálhatók a mukozális védelmet fokozó szerek hatásai a nyálkahártya integritásra. A defenzív faktorok működésének fokozása fontos terápiás lehetőségeket biztosíthat pl. az egyre gyakrabban előforduló *H.pylori*-negatív fekélyek esetén, amelyek rezisztensnek tűnnek a hagyományos fekélygátló vegyületekkel szemben, valamint az SRMD-ben szenvedő páciensek esetében is.

A következőkben röviden összefoglalom a perifériás nyálkahártya védelemben részt vevő faktorokat, illetve a gasztrointesztinális funkciók szabályozásáért felelős centrális komponenseket, majd a továbbiakban az általunk vizsgált endocannabinoid rendszert ismertetem, különös tekintettel a gasztrointesztinális rendszerben betöltött szerepére.

### **2.1.2. Perifériás nyálkahártya védelem**

Az első védelmi vonalat az epithel sejtek által szekretált mucos gél, bikarbonát ( $\text{HCO}_3^-$ ), és a felületükön kötött foszfolipidek jelentik (mucus-bikarbonát-foszfolipid barrier), mely a sejtek felszínén neutrális mikrokörnyezetet ( $\text{pH} \sim 7$ ) biztosít és védi az epitheliumot a mikroszkopikus sérülésektől, ezáltal megelőzi, hogy a gyomorsav és pepszin a sejtekbe visszadiffundálva proteolitikus károsodást okozzon (Allen és Flemstrom, 2005). A mucos gél együtt választódik ki egy, a trefoil faktor családba (*Trefoil factor family*, TFF) tartozó peptiddel, a TFF2-vel, melynek funkciója a mucos nyák viszkozitásának növelése, és a gél állagának stabilizálása (Thim és mtsai, 2002).

A mucusréteg alatti szoros illeszkedésű felületi hámsejtek jelentik a következő védelmi faktort, melyek az imént említett mucoson és bikarbonáton kívül prosztoglandinokat, citoprotektív hősokk-fehérjéket, TFF peptideket és antimikrobiális peptideket (pl. cathelicidin,  $\beta$  defenzin) választanak el (Laine és mtsai, 2008). A felszínükön kötött foszfolipideknek köszönhetően hidrofób szerkezetűek, így taszítják a sav- és vízdékony károsító ágenseket (Lichtenberger, 1999). A mucoselválasztást fokozzák különböző gasztrointesztinális hormonok, mint a gasztrin, szekretin és a

prostaglandin- $E_2$  ( $PGE_2$ ). A  $HCO_3^-$  elválasztást serkenti a lumen savtartalma, a melatonin, az orexin A, és a gyomorban epitheliális  $EP_1$ -receptorokon keresztül a  $PGE_2$  (Allen és Flemstrom, 2005). A hőszokk-fehérjék olyan stressz hatásokra termelődnek, mint az oxidatív stressz, megemelkedett hőmérséklet, vagy citotoxikus ágensek jelenléte az epithel sejtek felszínén, és a fehérjék denaturációját hivatottak megelőzni (Oyake és mtsai, 2006; Tanaka és mtsai, 2007). A cathelicidin és  $\beta$  defenzinek olyan kationos peptidek, melyek a bakteriális kolonizációtól védik az epithel sejtek felszínét, illetve valószínűsíthető, hogy az erodált sejt felszín gyógyulásában is részt vesznek. Yang és munkatársai kísérleteiben egy cathelicidin analóg peptid (rCRAMP) patkány gyomor epithel sejteken serkentette a sejtproliferációt, mely folyamat gátolható volt mátrix metalloproteináz (MMP) gátlóval, epidermális növekedési faktor receptor (*Epidermal growth factor receptor*, EGF-R) tirozin-kinázzal gátlóval, és mitogén-aktivált protein kináz/extracelluláris jel által szabályozott kináz (*Mitogen-activated kinase/Extracellular signal-regulated kinase*, MAP/ERK1/2) kináz gátlóval. Az rCRAMP tehát MMP-függő mechanizmussal növeli az EGF-R és ERK1/2 foszforilációját (Yang és mtsai, 2006).

Az epithelium integritásának megőrzésében fontos szerepe van az epithel sejtek folyamatos és gyors megújulásának (~3-5 napos turnover) (Modlin és mtsai, 2003), mely folyamat szabályozását növekedési faktorok végzik (EGF (Tarnawski és mtsai, 1992), TGF- $\alpha$ , IGF-1 (Nguyen és mtsai, 2007)).  $PGE_2$  és a gasztrin szintén képes aktiválni az epidermális növekedési faktort az EGF-R foszforilációjával, mely MAP-kináz függő útvonalon serkenti a progenitor sejtek proliferációját a nyálkahártya sérülése esetén (Pai és mtsai, 2002). Szintén a progenitor sejtek működését befolyásolja egy survivin nevű antiapoptotikus fehérje, mely meggátolja ezen sejtek apoptózisát, és elősegíti a mitózist (Chiou és mtsai, 2005).

A mukozális mikrocirkuláció elengedhetetlen nemcsak a sejtek tápanyag-és oxigénszállításában, de hígítja és eltávolítja a szövetek közé diffundált savat és károsító ágenseket. Az epithelium károsodásakor a sav visszaáramlik a szövetekbe, ami egy gyors vérátáramlás növekedést hoz létre a mukozában. Ez a válasz a primer szenzoros afferensek által mediált mechanizmussal jön létre. A mukoza és a submukozális réteg gazdagon beidegzett ilyen intrinsic és extrinsic szenzoros afferens neuronokkal (Holzer, 2007). Az intrinsic neuronok a myentericus és submukozális plexusból erednek, a sejttestjük a gasztrointesztinális traktus falában található. Az extrinsic szenzoros

afferensek között megkülönböztetünk vagális és spinális afferenseket. A nervus vagus axonjainak 75-90%-a afferens idegrost, melyek a ganglion nodosa-ból és jugularis-ból erednek, és a nyúltagyba futnak. A spinális afferensek sejttestjei a hátsó gyöki ganglionokban találhatóak és a splanchnicus illetve mesentericus idegeken keresztül futnak a gyomorhoz (Berthoud és Neuhuber, 2000; Gyires, 2004). A szenzoros afferensek savérzékeny ioncsatornákon (*Acid-sensing ion channel*, ASIC) keresztül érzékelik a lumenális savkoncentráció változásait, aktiválásuk során különböző neuropeptidek szabadulnak fel, pl. calcitonin gén-rokon peptid (*Calcitonin-gene-related peptid*, CGRP), tachykininek (P anyag (*Substance P*, SP), neurokinin A, B (NKA, NKB)), vazóaktív intesztinális peptid (*Vasoactive intestinal peptide*, VIP) (Holzer, 2007; Stroff és mtsai, 1995), melyek következetesen a mukozális vérátáramlást növelik. A CGRP-tartalmú extrinsic primer afferens idegrostok capsaicinnel szelektíven aktiválhatóak, és mivel a CGRP felszabadulás nagymértékben csökkent vagotómia elvégzése után, valószínűsíthető, hogy nagyobb részt vagális afferensek tartalmaznak CGRP-t. Az SP felszabadulásra kevésbé volt hatással a vagotómia, és míg Suzuki és mtsai kísérleteiben az SP-t tartalmazó idegrostok capsaicinre nem voltak érzékenyek (Suzuki és mtsai, 1997), korábbi publikációkban mind tengerimalac, mind patkány gyomorban indukáltak SP-felszabadulást capsaicinnel (Kwok és McIntosh, 1990; Renzi és mtsai, 1988).

A CGRP-felszabadulás hatására markáns vazodilatáció következik be, mely a CGRP-1 receptorok által mediált nitrogén-monoxid (NO) szintézis következménye, és a mukozális vérátáramlás fokozódásával jár (Lambrecht és mtsai, 1993). A CGRP aktiválja az endothel indukálható NO-szintázát (*NO synthase*, NOS), mely L-argininből képez NO-t. A NO a simaizomsejteken lévő szolubilis guanilát-cikláz (sGC) aktivitásának fokozásával, és a következetes cGMP-szint emeléssel relaxálja az ereket (Moncada és mtsai, 1991). Nagyobb dózisban a CGRP a vaszkuláris simaizmok CGRP-1 receptorait aktiválva, Gs-fehérje kapcsolt útvonalon, a cAMP-szint növelésével direkt vazorelaxáns hatással is rendelkezik (Holzer, 1998; Holzer és mtsai, 1995). Érdekes megfigyelés, hogy a NOS aktiválásával fokozódik a sejtek felszíni mucinelválasztása, mely folyamat nagyban hozzájárulhat a CGRP nyálkahártya védő hatásához (Ichikawa és mtsai, 2000). Szintén CGRP-1 receptorokon keresztül gátolja a CGRP a gyomorsav elválasztást (Evangelista és mtsai, 1992), azáltal, hogy csökkenti a gasztrin-és acetilkolin (ACh) felszabadulást, és stimulálja a szomatosztatin szekréciót (Manela és mtsai, 1995). A

szomasztosztatin centrális (intracerebroventrikuláris, i.c.v.) és perifériás (intravénás, i.v.) adagolás mellett is gátolja a gyomorsav szekréciót, bár úgy tűnik a hatásokat különböző szomasztatin-receptor (sst-receptor) szubtypusok mediálják (centrálisan sst<sub>5</sub>-, míg perifériásan sst<sub>2</sub>-receptorok) (Aurang és mtsai, 1997; Martinez és mtsai, 1996). Továbbá Scheiman és munkacsoportja kísérleteiben a SOM-analóg octreotid gátolta a NSAID-ok indukálta mukozális léziók kialakulását a leukocita kitapadás gátlása révén (a kitapadó leukociták ugyanis fokozzák a nekrotizáló ágensek endothel-károsító hatását) (Scheiman és mtsai, 1997).

A NO-hoz hasonlóan egy másik kis molekulatömegű vazorelaxáns gáztranszmitter is részt vesz a mukozális integritás fenntartásában, a hidrogén-szulfid (H<sub>2</sub>S) (Fiorucci és mtsai, 2006). *De novo* szintézise kéntartalmú aminosavból (cisztein) történik, melyben két pyridoxal-5'-phosphate-függő enzim vehet részt: a cystathionine β-szintáz (CBS) és a cystathionine γ-liáz (CSE) (Wang, 2002). A gyomor mukoza mind a CBS, mind a CSE enzimet expresszálja, de a CSE-nek (a többi nem-neuronális szövethez hasonlóan) nagyobb szerepe van a H<sub>2</sub>S-felszabadulás mediálásában. Ezt támasztják alá azok a megfigyelések is, miszerint a H<sub>2</sub>S-felszabadulás a mukozában függ a pyridoxal-5'-phosphate jelenlététől, gátolható DL-propargyl-glycinnel, (mely irreverzibilis gátlója a CSE-nek), azonban nem függ a calmodulintól, amely elengedhetetlen kofaktora a CBS-nek (Fiorucci és mtsai, 2005). A NO szintén mediátora a H<sub>2</sub>S felszabadulásnak, nitroprusszid nátriummal (NO-donor vegyület) kezelt sejtek esetében ugyanis kimutatták, hogy nőtt a vaszkuláris simaizmok CSE-expressziója, és a következményes L-cisztein-H<sub>2</sub>S átalakulás. Ez a hatás hozzájárul a NO hatására létrejött gyors, és erőteljes mukozális vérátáramlás fokozódáshoz (Zhao és mtsai, 2001). A H<sub>2</sub>S által okozott vazodilatáció mechanizmusa azonban a NO-étól eltérő. A vaszkuláris simaizmok ATP-függő K<sup>+</sup>-ion csatornáinak aktiválásával hiperpolarizálja a sejtmembránt, így gátolja az L-típusú feszültségfüggő Ca<sup>2+</sup>-csatornák működését, és intracelluláris szabad Ca<sup>2+</sup>-ion koncentráció csökkenést okoz, mely relaxálja a simaizmokat (Nelson és Quayle, 1995). 100 μmol/L H<sub>2</sub>S 25%-os növekedést okozott a mukozális vérátáramlásban, mely glibencamiddal gátolható volt (K<sub>ATP</sub>-csatorna gátló) (Fiorucci és mtsai, 2005). Az NSAID-ok nyálkahártya károsító hatásához is hozzájárul, hogy down-regulálják a CSE génexpresszióját, így csökkentve a H<sub>2</sub>S-szintézist. Ez a jelenség Fiorucci és mtsai

kísérleteiben indomethacin, aspirin, ketoprofen és diclofenac esetében is megfigyelhető volt (Fiorucci és mtsai, 2005).

A prosztaglandinok (PG) elengedhetetlen faktora a gyomor nyálkahártya védelemnek. A sejtmembrán foszfolipidjeiből a foszfolipáz-A<sub>2</sub> enzim segítségével felszabaduló arachidonsavból ciklooxygenáz enzimek (COX-1, COX-2) szintetizálják a prosztaglandinokat. A mukoza integritásának szempontjából a PGE<sub>2</sub> és a PGI<sub>2</sub> (prosztaciklin) kulcsvegyületek, hatásuk szerteágazó (összefoglalóért lsd. (Laine és mtsai, 2008; Wallace, 2008)). Az adenilát-cikláz gátlásával gátolják a savszekréciót (Barnett és mtsai, 2000), stimulálják a mucos- és bikarbonát-szekréciót, nemcsak a gyomor nyálkahártyában, hanem a teljes gasztrointesztinális rendszerben, valamint a nyálkahártya sérülésekor növelik a felületaktív foszfolipidek hatékonyságát a védelemben (Takahashi és mtsai, 1999; Takeuchi és mtsai, 2006). Továbbá fokozzák a mukozális vérátáramlást, amely vazodilatációt hoz létre (lsd. fent) (Araki és mtsai, 2000; Kotani és mtsai, 2006), csökkentik az epithelium permeabilitását, így a gyomorsav visszaáramlást a szövetekbe (Takezono és mtsai, 2004). A mukoza sérülése esetén gátolják a gyulladáshoz vezető mediátorok (hisztamin, *Tumor necrosis factor- $\alpha$*  – TNF- $\alpha$ , vérlemezke aktiváló faktor – *Platelet-activating factor* (PAF), interleukin-1, leukotrién-B<sub>4</sub>) felszabadulását a hízósejtekből, makrofágokból, neutrofilekből (Ham és mtsai, 1983; Hogaboam és mtsai, 1993). A savszekréció gátlása, a mucos- és bikarbonát-szekréció és a vérátáramlás fokozása elősegítik a már kialakult fekélyek gyógyulását, továbbá a prosztaglandinok növelik a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) szintjét is, amely az angiogenezis stimulálásával szintén gyorsítja a gyógyulási folyamatokat (Szabo és mtsai, 1998; Takahashi és mtsai, 1998; Takeuchi és mtsai, 2007).

Láthatjuk tehát a prosztaglandinok központi szerepét a nyálkahártya integritásának fenntartásában, melynek tükrében még súlyosabbnak tűnik a NSAID-ok által okozott PG-deficiencia. Sokáig tartotta magát az a teória, mely szerint a NSAID-ok ulcerogén hatása a COX-1, mint konstitutív enzim gátlásán alapul, és nem befolyásolja a COX-2-gátlás (minthogy COX-2 csak patofiziológiás állapotban keletkezik növekedési faktorok és citokinek indukálta szignálok hatására). Ezt az állítást azóta sokszor cáfolták, ugyanis a COX-1 mellett kisebb mértékben ugyan, de a COX-2 gátlása is szerepet játszik a fekélyek kialakulásában, és a sérült nyálkahártya gyógyulási folyamatainak gátlásában

(Wallace és mtsai, 2000). Sőt, a COX-1 gátlásakor kompenzatórikusan upregulálódik a COX-2-t kódoló mRNS, ami a csökkent PG-szint csekély mértékű növekedését okozza (Takeuchi, 2012). Továbbá a COX-2 gátlás következményeképpen lecsökkent prosztaciklin szint fokozott kardiovaszkuláris kockázatot jelent, emiatt két szelektív COX-2 gátló vegyületet (a rofecoxibot és valdecoxibot) is visszavontak a piacról.

### **2.1.3. Centrálisan indukált nyálkahártya védelem és neurohormonális szabályozás**

Régóta ismert, hogy a központi idegrendszernek (KIR) meghatározó szerepe van a gasztrointesztinális funkciók szabályozásában. Állatkísérletes modelleken bizonyították a KIR szerepét a stressz-fekélyek kialakulásában (Hernandez és Xue, 1989), illetve több GI megbetegedés patogenezisében, mint a gyulladásos bélbetegségek (Chron-betegség, colitis ulcerosa), a funkcionális dypepsia, vagy az irritábilis bélszindróma (Enck és mtsai, 2016; Quigley, 2015).

A gasztrointesztinális funkciók szabályozásában számos agyi régió érintett, melyek közül az egyik legjelentősebb a hypothalamus, amely kétirányú kapcsolatban áll az autonóm idegrendszerrel. A felszálló pályák révén a szabályozás szempontjából nélkülözhetetlen információkat kap a periféria felől. Ezek a pályák elsősorban zsigeri eredetű érző (visceroszenzoros) információkat szállítanak. A visceroszenzoros neuronok elsőként a nyúltvelőben található *Nucleus tractus solitarii* (NTS) idegsejtjeire vetülnek, majd innen az információ közvetlenül is eljuthat a hypothalamushoz a mediális előagyi köteg útján (Ter Horst és mtsai, 1989). Ezek részben közvetlenül a nucleus paraventriculáris (*Paraventricular nucleus*, PVN) neuronjaival szinaptizálnak, részben pedig a hypothalamus laterális területére vetülnek, és az ott található interneuronok axonjai kapcsolódnak a PVN neuronjaihoz. Másrészt multiszinaptikus pályák is szállítják az információt, melyekben a medulla oblongata ventrolaterális részének noradrenerg sejtjei (A1, A5 sejtcsoportok), másrészt adrenerg (C1 sejtcsoport) neuronok vesznek részt. A katecholaminerg rostok mellett jelentős arányban jelennek meg peptiderg rostok, melyek transzmitterként különböző neuropeptideket tartalmaznak (neuropeptid Y, neurotensin, dynorphinok, bombesin, szomatosztatin, inhibin  $\beta$ , enkefalinok) (Everitt és mtsai, 1984; Palkovits, 1999; Sawchenko és mtsai, 1990). A hypothalamusból eredő vegetatív pályák egy része közvetlenül a szimpatikus és a paraszimpatikus idegrendszer



preganglionáris vegetatív neuronjaira vetül. A leszálló pályák másik része a hypothalamusból az agytörzsi katecholaminerg idegsejtekre vetül, melyek azután a vegetatív idegrendszer preganglionáris neuronjait idegzik be. A harmadik összeköttetés típus egy feedback mechanizmus része: a viszceroszenzoros és szomatoszenzoros információkat fogadó idegsejtek, melyek a hypothalamus felé küldik a szenzoros információkat felszálló kapcsolataik útján, a hypothalamikus magok felől visszajelzést is kapnak leszálló rostösszeköttetések révén. Funkcionális anatómiai szempontból fontos, hogy a hypothalamus elülső régiói felől elsősorban a paraszimpatikus idegrendszer dorzál motoros vágusmagból (*Dorsal motor nucleus of the vagus*, DMV) eredő preganglionáris neuronjai kapnak beidegzést, míg a hypothalamus hátsó része főként a szimpatikus idegrendszer thoracolumbális intermediolaterális sejtszlopából eredő neuronjait befolyásolja (Gyires és mtsai, 2013; Palkovits, 1999). Több tanulmány is bizonyítja a laterális hypothalamus (LH) szerepét a nyálkahártya integritásában. Az LH stimulációja fokozza a mukozális vérátáramlást (Osumi és mtsai, 1977), míg léziója nagy amplitúdójú gyomor kontrakciókat (Garrick és mtsai, 1986), és akut savszekréció fokozódást okoz (Tache és mtsai, 1982), ami néhány órán belül a nyálkahártya eróziójához vezet. Vagotómiával, antikolinerg/antimuszkarin szerekkel, és savszekréció gátlókkal ez a hatás kivédhető, ami feltételezi a paraszimpatikus/vágusz-mediált hatásmechanizmust (Grijalva és mtsai, 1980). A hypothalamus más magjai, a PVN és a ventromediális hypothalamus (VMH) is befolyásolja a savszekréció szabályozását, bár az irodalomban a szerepük ellentmondásos. A PVN stimulációja mind a gyomorban, mind a duodenumban nekrozisokat hoz létre, mely vagotómiával gátolható (Ferguson és mtsai, 1988). A rostrális PVN léziója megnövekedett bazális savszekréciót okoz a gyomorban, melynek mechanizmusa a dorzál motoros vágusmagon keresztül valósul meg (Rogers és mtsai, 1980). Indirekt módon azonban a PVN aktiválja az LH neuronjait is, amely savszekréció csökkenéshez vezet, az előbbieken azonban láttuk, hogy a PVN elektromos stimulációja fokozza a stressz-fekélyek kialakulását, ezért valószínű, hogy a DMV-n keresztül megvalósuló károsító hatás fokozottabb, mint az LH védő hatása (Hierlihy és mtsai, 1994; Rogers és Hermann, 1985). A VMH szerepe is ellentmondásos a savszekréció szabályozásában. Míg a VMH léziója savszekréció fokozódást okozott patkányban (Weingarten és Powley, 1980), elektromos stimulációja esetében tapasztalták fokozó és csökkentő hatását is (Ishikawa és mtsai, 1983), sőt, a kísérletek egy részében

nem volt szignifikáns változás a savszekrécióban (Wywicka, 1978). Nikotin mikroinjektálása a VMH-ba növelte nemcsak a savszekréciót, de a mukozális vérátáramlást is, mely folyamat hexamethoniummal gátolható volt, ez valószínűsíti a nikotinergerg receptorok részvételét a VMH által modulált gasztrointesztinális folyamatokban (Ishikawa és mtsai, 1983).

Szintén nélkülözhetetlen szerepe van a gasztrointesztinális funkciók szabályozásában a dorzális vágusz komplexnek (*Dorsal vagal complex*, DVC), melynek magjai a nucleus tractus solitarii és a dorzál motoros váguszmag. A vagális afferensek a NTS-ba futnak, ahol főként glutamát neurotranszmitteren keresztül aktiválnak NMDA-és nem-NMDA receptorokat. A NTS és a DMV neuronjai között glutamáterg, GABAerg és katecholaminerg kapcsolat működik (Travagli és mtsai, 2006). A NTS elektromos stimulációja mind GABAerg gátló, mind glutamáterg ingerlő folyamatokat aktivál a DMV-ben, míg a katecholaminerg aktiváció az excitátoros és az inhibitoros szabályozásban is szerepet játszik (Travagli és Rogers, 2001). Glutamát injektálása a DMV mediális szegmensébe erős fokozódást okozott a gyomor motilitásban és tónusban, míg noradrenalin mikroinjektálása gátolta azt. Ugyanakkor glutamát és noradrenalin-antagonisták adagolása önmagában nem okozott változást a motilitásban és tónusban a GABAerg transzmisszió gátlása nélkül. Ebből következik, hogy a NTS GABAerg transzmisszió keresztül tónusos gátlást fejt ki a DMV neuronjaira, mely gátlásnak fontos szerepe lehet a vago-vagális reflex szabályozásában (Rogers és mtsai, 2003). A DMV-ben erednek azok a vagális efferensek, amelyek a vago-vagális reflex leszálló szárát képezve a gyomor paraszimpatikus motoros és szekréciós funkcióit szabályozzák. A különböző funkciókért felelős rostok a DMV különböző szegmenseiben lokalizálódnak. A gátló non-adrenerg non-kolinerg (NANK) rostok a DMV caudomediális és rosztrolaterális részén találhatók, míg az excitátoros neuronok főként rosztrálisabban és mediálisabban az előbbiektől (Rogers és mtsai, 1999). A neuronok sejttesteinek mérete is különbözik. A gyomor fundus beidegzéséért felelős neuronok sejtteste kisebb, kevesebb dendritet tartalmaz, mint a gasztrointesztinális traktus egyéb területeihez (pl. corpus, duodenum, coecum) projektáló neuronoké (Fogel és mtsai, 1996). A DMV neuronokon megfigyelhető továbbá egy lassú frekvenciájú (1-2 pulzus/sec), spontán pacemaker aktivitás. Ez a tónusos aktivitás és a kis sejttest okozza ezen neuronok hiperérzékenységét, a membrán potenciál néhány mV-os változása képes aktiválni a

vagális efferenseket (Travagli és Gillis, 1994). A vágusz szerepét a gasztrointesztinális szabályozásban egyértelműen bizonyítják az akut vagotómia hatásai: csökkent antrális kontrakciók és savszekréció, megnövekedett tónus a gyomor fundusban (Li és Owyang, 2003). A vagális efferensek ~95%-a kolinerg, a posztszinaptikus neurotranszmitter az acetil-kolin, amely a simaizmok, parietális és intersticiális Cahal-sejtek muszkarinos receptorain keresztül szabályozza a szekretomotorikus funkciókat. Az M<sub>2</sub>-receptorok aktivációja depolarizálja a simaizmok membránját, mely perisztaltika és tónusfokozódáshoz vezet. A vágusz NANK transzmittereken keresztül (főként NO és VIP, de adozinerg és szerotonerg neuronok jelenlétét is kimutatták) gátló hatásokat is közvetít: relaxálja a fundust, és csökkenti az antrum kontrakcióinak amplitúdóját (Abrahamsson, 1973; Armstrong és mtsai, 1990; Takahashi és Owyang, 1997).

A vágusz indukált gyomorvédelem a periférián a szenzoros afferensekből felszabaduló neuropeptideken keresztül valósul meg. A capsaicin-érzékeny idegvégződések a fentebb említett CGRP-n kívül VIP-et, és tachykinineket (NKA, NKB, SP) tartalmaznak. Míg a CGRP erős vazodilatátor (NO-felszabadításon keresztül), a VIP-nek, a tachykinineknek és a SP-nek nincs vazorelaxáns hatása, sőt az NKA és SP vazokonstriktiót idézett elő szubmukozális ereken (Matsumoto és mtsai, 1991) (bár az irodalom némileg megosztó ebben a témában, ugyanis *in vitro* kísérletekben NOS-inhibitorral gátolható vazodilatációt figyeltek meg (Brain és mtsai, 1985)). Ennek ellenére i.p. adagolt VIP védő hatását bizonyították stressz-indukálta fekélyeken, mely hatás valószínűleg a hízósejt degranuláció és a lipid peroxidáció gátlásával magyarázható (Tuncel és mtsai, 1998).

Számos irodalmi adat bizonyítja továbbá a gasztrointesztinális funkciók centrálisan indukált neurohormonális szabályozását, az utóbbi években több neuropeptidről (többek között az amylin, bombesin, CCK, enkefalinok, deltorfin II,  $\beta$ -endorfin, endomorfink, SP, nociceptin, nocistatin, agmatin) is kiderült, hogy i.c.v. injektálva gátolják a gyomorsav szekréciót és/vagy védő hatást fejtenek ki savfüggő és savfüggetlen fekélyeken (összefoglalóért lsd. (Gyires, 2004)). Ezen fekélymodellek különbözőségét azért fontos kiemelni, mert míg a savfüggő modellek (pylorus lekötés, NSAID-ok- vagy stressz-indukálta fekélyek), esetén a léziók kialakulásának hátterében a fokozott savszekréció áll, így a védő hatás savszekréció gátlással elérhető, a savelválasztástól független modellek esetén a fekélyeket nyálkahártya nekrotizáló

anyagokkal (pl. abszolút alkohol, savas alkohol, 0.2 N NaOH, 25% NaCl) idézzük elő, így az erózió kivédéséhez a mukozális védelem fokozására, citoprotekcióra van szükség (Gyires és mtsai, 2015). A periférián megvalósuló gasztroprotekciónak tehát centrálisan számos peptiden keresztül aktiválható, melyek egymással farmakológiailag csekély homológiát mutatnak. Az, hogy ezen hatások legtöbb esetben bilaterális cervikális vagotómiával és/vagy atropinnal felfüggeszthetők, szintén a DMV és a vágusz, illetve a kolinerg rostok elengedhetetlen szerepét jelzik a folyamatban, mely még nem teljesen tisztázott, aktív kutatások tárgya.

## 2.2. Cannabinoidok

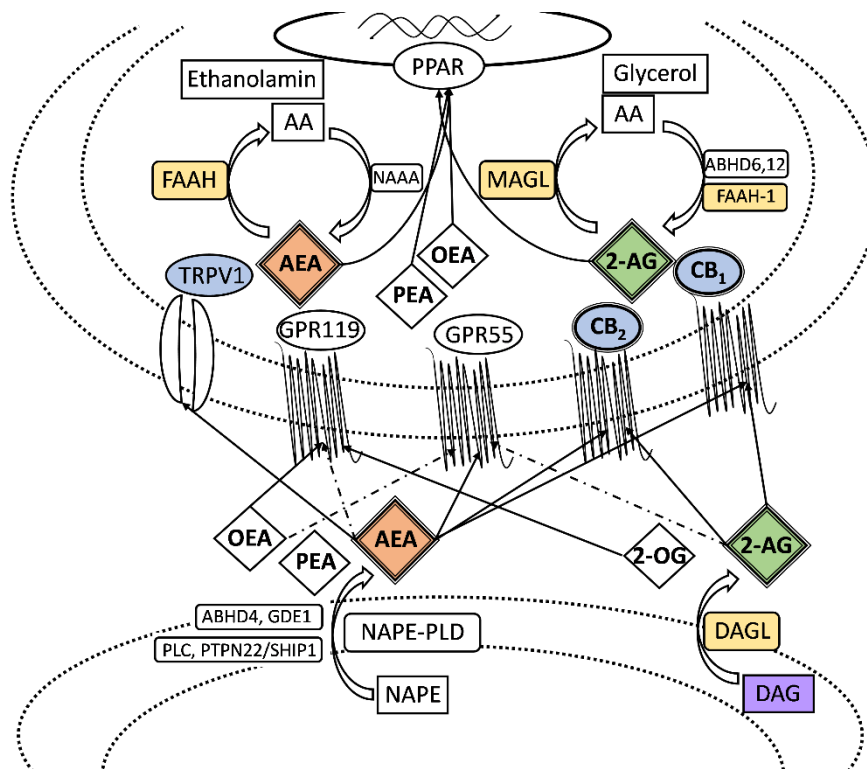
### 2.2.1. A cannabinoid kutatás történetének rövid áttekintése

A marihuana, vagyis a *Cannabis sativa* növény szárított termős virágzatának népgyógyászati felhasználása i.e. 3000-ig vezethető vissza Közép-és Dél-Ázsiába, de alkalmazására vonatkozó bizonyítékokat az egyiptomi múmiák esetében is találtak i. e. 950-ből. Az első hivatalos „nyugati” publikáció Sir William B. O’Shaughnessy-től, egy ír orvostól származik 1838-40-ből, aki a mai klinikai kísérleteknek megfelelően alkalmazta a növényt különböző dózistartományokban, az orvoslás számos területén, pl. kolera, ízületi betegségek, delirium tremens, gyermekbénulás kezelésében (O’Shaughnessy, 1838-40). Az aktív hatóanyagok izolálása a növényből ekkor azonban még problémát okozott, lipofil és sztereoszelektív szerkezetükből adódó instabilitásuk miatt. Csak 1940-ben sikerült Lord Toddnek Angliában, és Roger Adamsnek az USA-ban egymástól függetlenül izolálni egy gyenge pszichoaktív és egy inaktív komponenst, a cannabinolt és a cannabidiolt (Mechoulam, 1973). Az igazi áttörést 1964-ben a fő pszichoaktív hatóanyag, a  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) izolálása jelentette (Mechoulam és Gaoni, 1965). A hatásmechanizmusról ekkor még nem sokat tudtak, de már az 1970-es években kísérleteztek cannabinoid analógok terápiás alkalmazásával, ilyen volt a Pfizer (New York, USA) által gyártott levonantradol, egy, a  $\Delta^9$ -THC-nál potensebb szintetikus analóg. A levonantradolt hatékonyan alkalmazták posztoperatív fájdalmak és kemoterápiás kezelés következtében kialakult hányás csillapítására, de gyakori dózis-függő pszichoaktív mellékhatásai (hangulatzavarok, szédülés, nyugtalanság, aluszékonyság) limitálták alkalmazhatóságát és a kísérletek beszüntetéséhez vezettek (Porter és Felder, 2001). 1984-ben Howlett és Fleming neuroblastoma N18TG2 sejtvonalakon modellezték, hogy a cannabinoidok gátolják az adenilát-cikláz útvonalat, ezzel feltételezve, hogy a molekulák G-protein kapcsolt receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. További kísérletek kiderítették, hogy a pertussis toxin érzékeny Gi/o- protein továbbítja a jelátvitelt (Howlett, 1987; Howlett és mtsai, 1986). A sztereospecificitást szintén sikerült bizonyítani a szintetikus (-)-HU-210 és (+)-HU211 enantiomerekkel, melyek közül a (-)-HU-210 sokkal potensebbnek bizonyult a cAMP akkumulálódás- és adenilát-cikláz útvonal gátlásában (Howlett és mtsai, 1990). Ezen kutatások eredményezték 1988-ban egy specifikus, magas affinitású cannabinoid kötőhely leírását az agyban (Devane és mtsai, 1988). 1990-ben Matsuda

publikálta a CB<sub>1</sub>-receptor pontos szerkezetét (Matsuda és mtsai, 1990), 3 évvel később pedig, 1993-ban Munro és munkatársai izolálták a periférián a CB<sub>2</sub>-receptort a lépből (Munro és mtsai, 1993). Már a kötőhely leírásakor feltételezték, hogy a cannabinoid receptoroknak endogén ligandja is létezhet, melyet Devane és munkacsoportja igazolt 1992-ben, a molekulát, mely szerkezetileg arachidonoyl ethanolamin, anandamidnak nevezték el (Devane és mtsai, 1992). A későbbiekben az immunsejteken felfedezett CB<sub>2</sub>-receptor további aktív endogén ligand meglétére engedett következtetni, melyet 1995-ben Mechoulam kutya bélrendszeréből (Mechoulam és Fride, 1995), Sugiura pedig emberi agyból izolált (Sugiura és mtsai, 1995), ez volt a 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) (Di Marzo, 2006; Mechoulam és mtsai, 1998). Azóta több endogén lipidről bizonyították már, hogy endocannabinoid aktivitással bírnak (ilyenek az O-arachidonoyl ethanolamin vagy az N-arachidonoyl dopamin és egyéb eikozanoidok), de ezeknek biológiai funkciójáról, szintéziséről, lebomlásáról jóval kevesebb információnk van, mint a két fő vegyületéről.

### 2.2.2. Az endocannabinoid rendszer (*Endocannabinoid system, ECS*)

Endocannabinoid rendszer alatt a két fő endocannabinoidot (anandamid, 2-AG), az egyéb endocannabinoid aktivitással bíró vegyületeket, a keletkezésükért és lebontásukért felelős enzimeket és a cannabinoid receptorok összességét értjük (1. ábra).



**1. ábra.** Az endocannabinoid rendszer sematikus ábrája. Az ábrán feltüntetésre kerültek a főbb endocannabinoid aktivitással rendelkező vegyületek, a keletkezésükben és lebontásukban részt vevő főbb enzimek, a klasszikus cannabinoid receptorok (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>), valamint olyan egyéb receptorok, melyek cannabinoid vegyületekkel aktiválhatók. A rövidítések jelentése: 2-AG: 2-arachidonoylglycerol, 2-OG: 2-oleoylglycerol, AA: arachidonsav, ABHD4: szerin  $\alpha/\beta$ -hidroláz 4, ABHD6,12: szerin  $\alpha/\beta$ -hidroláz 6 és 12, AEA: N-arachidonoyl ethanolamin, anandamid, DAG: diacylglycerol, DAGL: diacylglycerol-lipáz, FAAH: zsírsav amid hidroláz, GDE1: glycerophospho-diészteráz 1, MAGL: monoacylglycerol-lipáz, NAPE: N-arachidonoyl phosphatidylethanolamin, NAPE-PLD: N-arachidonoyl phosphatidylethanolamin-phospholipáz-D, NAAA: N-acylethanolamin hidrolizáló zsírsav amidáz, OEA: N-oleoylethanolamin, PEA: N-palmitoylethanolamin, PLC: foszfolipáz C, PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivált receptor, PTPN22: tirozin foszfatáz, SHIP1: inozitol 5' foszfatáz, TRPV1: tranziens receptor potenciál csatorna 1.

### 2.2.2.1. Az endogén cannabinoidok

Az anandamidot, vagy N-arachidonoyl ethanolamint (AEA) 1992-ben sertés agyból izolálta Devane és munkacsoportja (Devane és mtsai, 1992). Szerkezetét tekintve N-tartalmú zsírsav-derivátum. A CB<sub>1</sub>-receptorokon parciális vagy full agonista, míg a CB<sub>2</sub>-receptorokhoz sokkal kisebb affinitással kötődik, gyenge agonista hatást fejt ki, néhány esetben antagonizmust is leírtak (Gonsiorek és mtsai, 2000). Alapvetően nagyobb affinitást mutat a CB<sub>1</sub>-receptorok felé. Patkány agyban alacsony a szöveti szintje (~ 30 pmol/g szövet), embernél mintegy ötször magasabb koncentrációban található az agyban (~ 150 pmol szövet grammonként), és a perifériás szövetekben is (vese, bőr, lép, vérplazma) pikomoláris mennyiségben lelhető fel (Felder és mtsai, 1996).

A 2-arachidonoylglycerolt (2-AG) (mely szerkezetileg egy arachidonsav-tartalmú monoacyl-glycerol) 1995-ben izolálta Mechoulam és munkacsoportja kutya bélrendszeréből, és már ekkor leírták hypothermiát, katalepsiát és analgéziát okozó hatását (Mechoulam és mtsai, 1995). A 2-AG nanomoláros koncentrációban található meg az emlős agy különböző régióiban (kéreg, agytörzs, striatum, hypothalamus, hippocampus, stb.), csakúgy, mint a perifériás szövetekben (máj, lép, tüdő, vese, gasztrointesztinális traktus, stb.) (Sugiura és Waku, 2000). Érdekes, hogy az agyi

szövetekben 170x magasabb a koncentrációja (~3.5 nmol/g szövet), mint az anandamidnak, noha a CB<sub>1</sub>-receptorokhoz kisebb affinitással kötődik, azonban a CB<sub>2</sub>-receptorokon is erőteljes agonista hatást figyelhetünk meg (Sugiura és mtsai, 1995).

Az endocannabinoidok közé sorolható továbbá több N-tartalmú zsírsav-derivátum, mint az *N*-palmitoylethanolamin (PEA) és az *N*-oleoylethanolamin (OEA, virodhamin), *N*-arachidonoyldopamin és *N*-oleoyldopamin, illetve a 2-arachidonoylglycerol-analóg 2-oleoylglycerol (2-OG). Ezen vegyületek nem kötődnek a klasszikus CB<sub>1</sub>-és CB<sub>2</sub>-receptorokhoz, az OEA és PEA szubsztrátjai azonban az anandamid és 2-AG által is aktiválható peroxiszóma proliferátor aktivált receptoroknak, valamint az OEA és a 2-OG G-fehérje kapcsolt GPR119-es receptorkötését is leírták (Godlewski és mtsai, 2009).

#### 2.2.2.1.1. Az endocannabinoidok szintézise

Az endocannabinoidok szintézise a prekursor molekulákból *de novo* történik a sejttestben, nem raktározódnak vezikulákban (Ohno-Shosaku és Kano, 2014).

Az anandamid *in vivo* bioszintézise a sejtmembránt alkotó lipid prekursorból, az *N*-arachidonoyl phosphatidylethanolamin (NAPE)-ből enzimatisz hidrolízissel történik, melyben a foszfolipáz D (NAPE-PLD) enzim játszik kulcsszerepet. A NAPE molekula a foszfatidil-etanolamin Ca<sup>2+</sup>-dependens *N*-arachidonoylációjával keletkezik, az arachidonsav enzimatisz transzferével *sn*-1 pozícióba (az *sn* pozíció megjelölése a molekula sztereospecifitását jellemzi) (Di Marzo és mtsai, 1996a). A membrán depolarizációjakor tehát a centrális neuronokban anandamid és más nem-endocannabinoid típusú acylethanolaminok (pl. *N*-acyl-phosphatidylethanolamin) felszabadulása figyelhető meg a posztszinaptikus neuronokból, mely a szinaptikus résbe kerülve a preszinaptikus cannabinoid receptorokon fejt ki hatását (Di Marzo és mtsai, 1994).

Noha a NAPE-PLD katalizálta reakció a legfontosabb az *N*-acylethanolaminok szintézisének szempontjából, más alternatív keletkezési útvonalak meglétét valószínűsíti az a megfigyelés, hogy NAPE-PLD knockout egerek szöveti anandamid szintje megegyezik a vad típusú egerekével, és az OEA és PEA szintek is csak minimálisan mutatnak csökkent értékeket (Leung és mtsai, 2006). Ilyen alternatív útvonal a szerin  $\alpha/\beta$ -



hidroláz 4 (ABHD 4) katalizálta reakció, melyben 2 hidrolizációs lépésben glycerofoszfoarachidonoyl ethanolamin (GP-AEA) keletkezik köztiterméként, melyet a glycerofoszfo-diészteráz 1 (GDE1) alakít tovább anandamiddá (Simon és Cravatt, 2006). Az agyi neuronokon kívül anandamid keletkezik a makrofágokban is, mely folyamat bakteriális endotoxinnal (lipopoliszacharidok, LPS) indukálható, és mind a periférián, mind az agyi szövetekben hozzájárul az anandamid gyulladáscsökkentő hatásához (Liu és mtsai, 2006). Mivel a LPS down-regulálja a NAPE-PLD enzimet, a szintézis első lépéseként a foszfolipáz C (PLC) enzim hasítja a prekursor NAPE molekulát fosfoanandamiddá (pAEA), majd további foszfatáz aktivitással bíró enzimek (mint a tirozin foszfatáz PTPN22, és az inozitol 5' foszfatáz SHIP1) defoszforilálják anandamiddá (Liu és mtsai, 2008; Liu és mtsai, 2006).

A 2-arachidonoylglycerol bioszintézise is függ a  $Ca^{2+}$ -beáramlástól. Egér neuroblasztóma sejteken kimutatták, hogy a diacylglycerol-lipáz (DAGL) enzim katalizálja a 2-AG keletkezését az *sn*-2 pozícióban arachidonát csoportot tartalmazó diacylglycerolból (DAG) (Bisogno és mtsai, 1997). Azonban valószínűleg egy foszfolipáz C enzim indukálta folyamat is szerepet játszik a 2-AG szintézisében, a membrán prekursor foszfatidil-kolin és foszfatidil-inozitol enzimatis hidrolízisével. A PLC aktiválásakor a foszfatidil-inozitol (4,5)-biszfoszfátot (PIP2) hasítja inozitol-trifoszfátra (IP3) és DAG-ra, mely a 2-AG keletkezési molekulája (Di Marzo és mtsai, 1996b). A 2-arachidonoylglycerol szintézise azonban nem csak az agyi neuronokban lehetséges. Patkány vérlemezkében is kimutatták 2-AG szintézisét, amely folyamatot a bakteriális lipopoliszacharidok katalizálták (Varga és mtsai, 1998), valamint Sugiura és munkacsoportjának kísérleteiben humán köldökvéna endotheliális sejteket és aorta simaizom sejtjeit thrombinnal inkubálva szintén 2-AG felszabadulást észleltek (Sugiura és mtsai, 1998).

#### **2.2.2.1.2. Az endocannabinoidok metabolizmusa**

Az anandamid eltávolítása a szinaptikus résből kétféleképpen történhet: enzimatis hidrolízissel, és egy speciális „uptake”-mechanizmussal. Ez a posztzinaptikus neuronba való visszavétel egy gyors, az anandamidra (és más acylethanolamin struktúrákra) szelektív, facilitált transzport folyamat, amely az intra-és extracelluláris anandamid koncentráció grádiens kiegyenlítésének irányába működik

egy transzmembrán karrier fehérje segítségével (Di Marzo és mtsai, 1994). Több tanulmány ír erről a specifikus transzportról, melynek jelenlétét kimutatták kisagyi granula sejteken (Hillard és mtsai, 1997), kortikális neuronokon és asztrocitákon is (Beltramo és mtsai, 1997). A transzport folyamat még nem tisztázott, és több hipotézis is létezik a magyarázatára. Az egyik egy eddig még nem ismert speciális karrier fehérje létezését valószínűsíti, amely extracellulárisan köti az anandamidot, és átviszi a sejtmembránon. Mivel az anandamid erősen kötődik az albuminhoz, elképzelhető, hogy egy egyszerű albuminkötésről van szó (Bojesen és Hansen, 2003; Lambert és Fowler, 2005). Egy másik teória szerint a karrier fehérje nem a plazma membránban, vagy extracellulárisan, hanem intracellulárisan lokalizált, és az intracelluláris szabad anandamid koncentrációját növeli. Mivel a szabad és kötött molekulák is egyensúlyra törekszenek, ebben az esetben passzív diffúzió során jutnak be további szabad anandamid molekulák az extracelluláris oldalról (Fowler és mtsai, 2004). Ez a lehetőség azonban kevésbé valószínű, mert bár a facilitált diffúzió mellett az anandamid (és a 2-AG is) képes kis mértékben passzív diffúzióra, ez a mechanizmus nem számottevő, és csak alacsony hőmérsékleten (0-4 °C) valósul meg (Di Marzo és mtsai, 1994). Egy harmadik lehetőség, hogy transzport fehérje nélkül, kaveola/lipid raft közvetítette endocitózissal jut a sejt belsejébe (McFarland és mtsai, 2004). Természetesen az is elképzelhető, hogy mindhárom teóriában van igazság, és az anandamid koncentrációjától, illetve sejttípustól függően akár egymás mellett is megvalósulhatnak.

Az anandamid hidrolíziséért felelős enzimet eleinte az anandamidra szelektívnek vélték, és ennek megfelelően „anandamid amidohidroláznak”, vagy röviden „amidáz”-nak nevezték el. Csak a későbbi kutatások során derült ki, hogy az említett enzim egy szerin hidroláz, amely azonban a hidrolázokra jellemző klasszikus Ser-His-Asp katalitikus triád helyett egy atipikus Ser-Ser-Liz aminosav csoportot tartalmaz, így amidázként is funkcionál és több bioaktív észter és zsírsav amid szubsztrátja van (többek között az N-palmitoylethanolamin (PEA) és az N-oleoylethanolamin (OEA)) (Blankman és Cravatt, 2013; Patricelli és Cravatt, 1999). A mai nevezéktanban ezért már mint zsírsav amid hidroláz (*Fatty Acid Amide Hydrolase*, FAAH) szerepel (Cravatt és mtsai, 1996; Maurelli és mtsai, 1995). A FAAH enzimnek két izoformáját különböztetjük meg: FAAH-1, és FAAH-2. Míg a FAAH-1 az agy különböző területein (neokortex, hippocampus, kisagykéreg) Purkinje-sejtek sejttestjeiben expresszálódik,

preszinaptikusan a CB<sub>1</sub>-receptort expresszáló granulasejtektől, addig FAAH-2 enzimet a periférián különböző szövetekben (pl. vese, máj, tüdő, prosztata) találhatunk (Egertova és mtsai, 1998; Wei és mtsai, 2006). A két enzim nagyjából 20%-os homológiát mutat, a FAAH-2 egy klasszikus amidáz, így preferált szubsztrátjai is zsírsav amidok, mint az oleamid. További különbség, hogy a FAAH-1 megtalálható számos emlős szervezetben, a FAAH-2 azonban csak emberben expresszálódik. Az anandamid metabolizmusában (az enzimek lokalizációjából következően) a FAAH-1 enzim vesz részt elsősorban, az anandamidot arachidonsavra és ethanolaminra bontja (Cravatt és mtsai, 2001). Kis mértékben bár, de egy további enzim is érintett az anandamid metabolizmusában: az *N*-acylethanolamin hidrolizáló zsírsav amidáz (NAAA). Az NAAA egy nonspecifikus *N*-acylethanolamin hidroláz, melynek szubsztrátjai között szerepel többek között a PEA és az OEA is (Feledziak és mtsai, 2012).

A 2-AG hidrolízisét a monoacylglycerol-lipáz enzim (MAGL) katalizálja arachidonsavvá és glicerollá. A MAGL enzim szintén a szerin hidrolázok közé sorolható, azonban a FAAH-al ellentétben az enzimatikusan aktív végen a klasszikus Ser-His-Asp katalitikus aminosav triádot tartalmazza. Ezen felül az enzimen négy cisztein molekula is potenciális szubsztrátja bizonyos enzim inhibitoroknak (pl. *N*-arachidonoylmaleimid, disulfiram) (King és mtsai, 2009; Saario és mtsai, 2005). Jelentős szelektivitást mutat a monoacylglycerolok felé, alacsony affinitással a diacylglycerolok, triacylglycerolok és foszfolipidek iránt (Tornqvist és Belfrage, 1976).

A MAG-lipáz nagyjából a 2-AG 85%-ának hidrolíziséért felelős, azonban kis mértékben más nonspecifikus enzimek is részt vehetnek benne, például az anandamid lebontását végző FAAH-1, a szerin  $\alpha/\beta$ -hidroláz 6 és 12 (ABHD6, ABHD12), vagy a karboxylészteráz 1 és 2 (Blankman és mtsai, 2007).

Az endocannabinoidok lebontása továbbá enzimatis oxidációval is megvalósulhat az arachidonsav kaszkád enzimjeinek segítségével, mint a lipoxigenázok, ciklooxygenázok, és a citokróm P450 enzimcsaládba tartozó enzimek, pl. CYP2D6 és CYP3A4 (összefoglalóért lsd. (Rouzer és Marnett, 2011).

### 2.2.2.2. A cannabinoid receptorok

Cannabinoid receptorokat számos fajban leírtak, megtalálhatóak egérben, patkányban, kutyában, majomban, emberben (bár érdekes módon rovarokban nincs). A CB<sub>1</sub>-receptor szekvenciája azonosnak tűnik a fajok között, míg a CB<sub>2</sub>-receptor szerkezete és farmakológiai tulajdonságai különböző fajokban némileg eltérőek (Griffin és mtsai, 2000). Alapvetően a CB<sub>1</sub>-receptor főként az agyban található („centrális cannabinoid receptor”), sőt, ez az emlősök agyában legnagyobb denzitásban megtalálható receptor (Munro és mtsai, 1993), míg a CB<sub>2</sub>-receptor dominánsan a perifériás sejteken és szöveteken, főként immunsejteken („perifériás cannabinoid receptor”). Ez nem jelenti azt, hogy CB<sub>1</sub>-receptor nem található meg perifériás sejteken, pl. a kardiovaszkuláris vagy gasztrointesztinális régióban, és CB<sub>2</sub>-receptorokat is találunk az agy területén, pl. a mikroglia sejteken (Svizenska és mtsai, 2008).

A két receptor igen kicsi homológiát mutat, az aminosav szekvenciára nézve mindössze 44%-ot, míg a transzmembrán doménben 68%-ot (Munro és mtsai, 1993). Ez ellentétben áll a többi G-protein-kapcsolt receptorról ismertekkel, ahol akár egyetlen aminosav megváltoztatása a kötőhely régiójában a receptor szignifikáns változását eredményezi a farmakológiai tulajdonságaiban (Porter és Felder, 2001).

A CB<sub>1</sub>-receptor cDNS-ét először patkány cerebrális cortexéből izolálta Matsuda és munkacsoportja 1990-ben, az addig ismert G-protein kapcsolt receptorok szekvenciái alapján (Matsuda és mtsai, 1990). A humán gén lókusza a 6-os kromoszómán található, a 6q14-q15-ös pozícióban (Caenazzo és mtsai, 1991). A CB<sub>2</sub>-receptor gén lókusza az 1-es kromoszómán, 1p36-os pozícióban található (Raitio és mtsai, 2005).

Az endocannabinoid hatásokat főként a két cannabinoid receptor modulálja, de az utóbbi évek kutatásai arra engednek következtetni, hogy további receptorok (pl. tranziens receptor potenciál csatornák [TRPV], peroxiszóma proliferátor aktivált receptorok [PPAR]) is felelősek bizonyos endocannabinoid hatásokért, sőt, egy 1999-ben izolált, eddig „árva”, ligand nélküli ún. GPR55-ös receptorral kapcsolatban is felmerült, hogy cannabinoid receptorként funkcionálhat, az eddigi kísérletek azonban meglehetősen ellentmondásosak (Ryberg és mtsai, 2007).

A cannabinoid receptorokkal mutat szerkezeti hasonlóságot a GPR119-es receptor is, mely emberben és rágcsálókban főként a hasnyálmirigy  $\beta$ -sejtjein és a bélnyálkahártya

L-sejtjein expresszáldók, de rágcslók bizonyos agyi régióiban is megtalálható (Overton és mtsai, 2008). A receptor lokalizációja miatt felmerül a lehetősége, hogy a cannabinoid rendszer GPR119-es receptoron keresztül befolyásolja a szervezet glükóz homeosztázisát és következésképpen az elhízás folyamatát (Hansen és mtsai, 2011).

Az endogén cannabinoid anandamid jelentős hatású vazodilátor, mely hatás mind CB<sub>1</sub> knockout, mind CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> dupla knockout egereken eltűnik, és nem gátolható szelektív CB<sub>1</sub>-receptor antagonistával (mint az SR141716A) (Járai és mtsai, 1999), gátolható azonban a szelektív vanilloid receptor antagonista capsazepinnel. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy az anandamid vazorelaxáns hatása nem, vagy nem kizárólag cannabinoid receptorokon valósul meg, hanem a capsaicin aktivált vanilloid receptor (VR1, vagy TRPV1), egy nemszelektív kation-csatorna aktivációján keresztül, melynek az anandamid szintén ligandja. Noha az irodalom az anandamid vazodilátor hatását alapvetően a TRPV1-receptor mediálta hatásnak tekinti, elég gyakori, hogy CB<sub>1</sub> knockout rágcslókon eltűnik, így elképzelhető, hogy a hatásmechanizmus komplexebb, és mindkét receptor szükséges a kiváltásához. Járai és munkacsoportja szerint létezik egy CB<sub>1</sub>-dependens mechanizmus, amely azonban csak ép endothél esetén jelentkezik (in vitro egér mesenchimális artérián vizsgálva). Ez gátolható szelektív CB<sub>1</sub>-receptor antagonistával, azonban az endothélium károsodása esetén eltűnik. Így valószínűsíthető egy endothéliális faktor közrejátszása a folyamatban. Emellett van egy CB<sub>1</sub>-független hatásmechanizmus (ez utóbbi a jelentősebb), melyet TRPV1-receptorok mediálnak (Járai és mtsai, 1999). Az anandamid TRPV1 receptorokon keresztül CGRP-felszabadulást okoz, ami vazodilatációhoz vezet. Ez a hatás eleinte sem más endogén cannabinoidokkal (2-AG, palmitoylethanolamin), sem egyéb szintetikus cannabinoid agonistákkal (HU-210; WIN 55212-2) nem volt reprodukálható (Zygmunt és mtsai, 1999), az utóbbi években azonban több olyan tanulmány jelent meg, amely patch-clamp technikával HEK 293 sejteken bizonyította a 2-AG és a TRPV1-receptorok kölcsönhatását is (Petrosino és mtsai, 2016; Zygmunt és mtsai, 2013).

#### **2.2.2.2.1. A cannabinoid receptorok szignál transzdukciója**

Amint már említettem, az endocannabinoidok a posztzinaptikus neuronok sejtestjében a membrán depolarizációjakor *de novo* szintetizálódnak, majd a szinaptikus

résbe kerülve retrográd módon a preszinaptikus cannabinoid receptorokon fejtik ki hatásukat (Ohno-Shosaku és Kano, 2014).

A CB<sub>1</sub> és CB<sub>2</sub> receptorok a G-protein kapcsolt receptorok családjába tartoznak. A Gi/o fehérje kapcsolt útvonalon gátolják az adenilát-cikláz aktivitást. A cAMP akkumulálódásának gátlásával csökkentik a cAMP-dependens protein kináz A (PKA) aktivitását. A PKA foszforilálja a K<sup>+</sup>-csatorna fehérjét, ezáltal csökkentve a kifelé irányuló K<sup>+</sup>-áramot. A PKA gátlásával tehát növekszik a kifelé irányuló K<sup>+</sup>-áram. Ezzel a mechanizmussal regulálják a neurotranszmitter felszabadulást a CB<sub>1</sub> receptort expresszáló idegvégződéseken (Svizenska és mtsai, 2008). A preszinaptikus neurotranszmitterek, mint a glutamát (Shen et al., 1996), acetilkolin (Gifford és mtsai, 1997), noradrenalin (Schlicker és mtsai, 1997) felszabadulásának gátlása magyarázhatja a cannabinoidok neuronális hatásainak nagy részét.

Érdekes megfigyelés, hogy pertussis toxinnal kezelt sejteken a CB<sub>1</sub>-receptor aktiváció cAMP szint növekedést hoz létre, amely arra enged következtetni, hogy ilyen körülmények között a CB<sub>1</sub>-receptor Gs fehérjéhez is kötődni tud (Glass és Felder, 1997).

A cannabinoidok gátolják a feszültségfüggő L- típusú Ca<sup>2+</sup>-ion csatornákat a cerebrális ereken (Gebremedhin és mtsai, 1999), és az N-és P/Q-típusú Ca<sup>2+</sup>-ion csatorna gátlást is többen bizonyították az elmúlt években hibrid neuroblasztoma-glioma sejteken (Mackie és Hille, 1992) és patkány hippocampális neuronokon (Twitchell és mtsai, 1997). A cannabinoid receptorok aktiválják továbbá a befelé egyenirányító K<sup>+</sup>-csatornákat, amelyek növelik a feszültség-függő A-és D-típusú K<sup>+</sup>-ion csatornák aktivitását (Deadwyler és mtsai, 1993; Mu és mtsai, 1999). Ezek a folyamatok szintén szerepet játszhatnak a cannabinoidok preszinaptikus gátló hatásában (Turu és Hunyady, 2010).

A cannabinoidok Gi/o-protein aktiváláson, vagy egyéb mechanizmusokon (mint a Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pumpa stimulálása (Bouaboula és mtsai, 1999); foszfatidilinozitol-3 kináz (PI3K) aktiválása (Galve-Roperh és mtsai, 2002); vagy a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) receptorok transzaktiválása (Korzh és mtsai, 2008)) keresztül mitogén-aktivált protein kinázokat (MAP kinázok) is aktiválnak. A MAP kinázok aztán foszforilációs kaszkádokat indítanak el, melynek eredménye lehet többek között az ERK1/2, c-Jun N-terminális kináz (JNK) és p38 MAPK aktiválása (Liu és mtsai, 2000). Ezek a folyamatok a celluláris pH megváltozásához vezethetnek, amely egyes

feltételezések szerint befolyásolhatja a neuronális sejtek ingerelhetőségét (Bouaboula és mtsai, 1999). Főként a CB<sub>2</sub>-receptor esetében merült fel, hogy szerepet játszhat mind neuronális mind nem-neuronális sejtek proliferálásában, differenciálódásában, emelkedett CB<sub>2</sub>-receptor expressziót írtak le ugyanis glioma (Sanchez és mtsai, 2001) és emlődaganatok (Caffarel és mtsai, 2006) esetében is. A protein kináz B/Akt stimulálása a glikogén szintáz aktivitást fokozza, amelynek megnövekedett glikogén szintézis lesz az eredménye. Ez a folyamat szerepet játszhat a sejtproliferációban (Gomez del Pulgar és mtsai, 2000). Ezzel ellentétben a CB<sub>2</sub>-receptorok aktiválása apoptózist indukált, és csökkentette a tumornövekedést a glioma- és asztrocytoma sejteken (Sanchez és mtsai, 2001), és egyéb nem-neuronális tumorok esetében (Caffarel és mtsai, 2006).

A cannabinoid receptorok olyan G-protein független útvonalakat is aktiválhatnak, mint a  $\beta$ -arrestin 2, amely a G-protein kapcsolt receptorok deszenzitizációs folyamatában vesz részt, és szerepet játszhat a cannabinoid tolerancia létrejöttében. A receptor aktivációja és a következő G-protein-kapcsolt-receptor kinázok (CB<sub>1</sub>-receptor esetében általában a GRK3) által létrejött foszforiláció után a  $\beta$ -arrestin 2 kötődik a receptorhoz, és előidézi annak internalizációját (Jin és mtsai, 1999; Turu és Hunyady, 2010). A hippocampális neuronok magas  $\beta$ -arrestin 2 és GRK3 expressziója valószínűleg kapcsolatban áll a CB<sub>1</sub>-receptorok nagyfokú deszenzitizálásával (Kouznetsova és mtsai, 2002).

Szintén befolyásolják a foszfatázok aktivitását, például stimulálják a calcineurin (protein-foszfatáz-2b) vagy a MAP-kináz foszfatáz-1 működését, amely fontos szerepet játszhat az anandamid gyulladásgátló hatásának kialakításában (Eljaschewitsch és mtsai, 2006).

#### **2.2.2.2. A cannabinoid receptorok lokalizációja**

Magas denzitásban fordulnak elő CB<sub>1</sub>-receptorok a hippocampusban, a nucleus accumbensben, a substantia nigra területén, a dorzál motoros vágusmagban és a globus pallidusban (Herkenham és mtsai, 1990). A hippocampális területen való nagyfokú prezentálódásból egyértelműen következtethetünk arra, hogy az endogén cannabinoidok hatással vannak a memória és a kognitív funkciók állapotára. Krónikus alkalmazása a  $\Delta^9$ -THC-nek tartós strukturális és funkcionális változásokat idéz elő a hippocampusban, mely rontja a tanulási folyamatokat és az emlékezést mind patkány, mind ember esetében

(Scallet, 1991). A bazális ganglionokon való expresszáció magyarázhatja a cannabinoid vegyületek hatását a motoros funkciókra. Az endogén cannabinoidok szerepét bizonyítja a fiziológiai szabályozásban, hogy néhány neurodegeneratív betegség (mint a Parkinson vagy Huntington kór) esetében alacsonyabb a CB<sub>1</sub>-receptorok denzitása ezen a területen (Richfield és Herkenham, 1994). Magas a CB<sub>1</sub>-receptorok előfordulása továbbá a kisagy területén patkányok esetében.  $\Delta^9$ -THC akut adagolása után ezért figyelhető meg ataxia, mozdulatlanság és katalepszia patkányon (Martin-Calderon és mtsai, 1998), amely mellékhatások emberen elmaradnak, ugyanis emberben a kisagy területén relatív alacsony a CB<sub>1</sub>-receptorok száma (Herkenham és mtsai, 1990). Szintén magas denzitással fordulnak elő CB<sub>1</sub>-receptorok a fájdalom modulálásáért felelős területeken, mint a periaqueductális szürkeállomány (*Periaqueductal gray*, PAG) (Tsu és mtsai, 1998) vagy a gerincvelő hátsó szarva (Farquhar-Smith és mtsai, 2000). A CB<sub>1</sub>-receptorok fontos szerepet játszanak a táplálék felvétel, zsír és glükóz anyagcsere centrális és perifériás szabályozásában, ennek megfelelően mind a központi idegrendszer, mind a periféria vonatkozó területein megtalálhatóak, mint a hypothalamus, nucleus accumbens, ventrális tegmentális area (*Ventral tegmental area*, VTA), az adipociták, májsejtek és a gasztrointesztinális traktus (például a vékonybélben a myentericus és submukozális plexusban) (Buckley és mtsai, 1998). A hypothalamikus CB<sub>1</sub>-receptorok stimulálása például növeli az éhségérzetet és a lipogenezist, és megnöveli a leptin felszabadulását a zsírszövetekből (Pagotto és Pasquali, 2005). A nucleus accumbens CB<sub>1</sub>-receptorainak aktiválása felerősíti a dopaminerg „reward”-jelenséget, így motiválva az evést. A VTA-ban a CB<sub>1</sub>-receptorok a preszinaptikus glutamát-és GABAerg neuronokon helyezkednek el, aktiválásuk retrograd módon gátolja a neurotranszmitter visszavételt a dopaminerg neuronokon, így erősítve a „reward” hatást (Maldonado és mtsai, 2013).

A CB<sub>2</sub>-receptorok leginkább a periférián, az immunsejteken találhatóak, főként a lépben, mandulákban, csecsemőmirigyben, hízósejteken és vérsejteken expresszációval (Munro és mtsai, 1993; Wilson és Nicoll, 2001). Szintén megtalálhatók az enterális neuronokon, illetve a gasztrointesztinális rendszer immun- és epithel sejteiben (Trautmann és Sharkey, 2015; Wright és mtsai, 2005). A központi idegrendszerben a perivaszkuláris mikroglia sejteken és a kisagy granula sejteiben találhatóak meg. Míg a CB<sub>1</sub>-receptorok főként preszinaptikus elhelyezkedésűek, a CB<sub>2</sub>-receptorok posztzinaptikus lokalizációjúak. Alacsonyabb denzitással találhatóak CB<sub>2</sub>-receptorok még a



periaqueductális szürkeállomány, a substantia nigra és az agytörzs egyes részein is (Gong és mtsai, 2006).

### **2.2.2.3. Az endogén cannabinoid szint emelő vegyületek**

Az utóbbi években számtalan kutatás igazolta a cannabinoid receptor agonisták jótékony hatásait a legkülönbözőbb terápiás területeken, úgy, mint fájdalomcsillapítás, neurodegeneratív kórképek, mentális betegségek terápiája, metabolikus szindróma, epilepszia, asztma kezelése, stb. (összefoglalóért lsd. (Pacher és mtsai, 2006)). Azonban a cannabinoid receptorok direkt aktiválásának több hátránya is lehet, mint a központi idegrendszeri mellékhatások kialakulása (pl. hypothermia, depresszió, öngyilkossági hajlam növekedése) vagy a receptor deszenzitizáció. Az endogén cannabinoidok szintjének növelése a lebontásukért felelős enzimek (FAAH, MAGL) gátlásával jó alternatíva lehet az exogén módon adagolt cannabinoid receptor agonistákkal szemben és jelentősen limitálhatja a megjelenő mellékhatások számát.

#### **2.2.2.3.1. FAAH gátlók**

A FAAH, amint azt korábban említettem, szerkezetét tekintve egy szerin hidroláz, melynek enzimatikusan aktív része egy Ser-Ser-Liz csoportot tartalmaz.

A karbamát típusú FAAH-gátlók irreverzibilisen gátolják az enzimet, egy stabil acil-enzim komplex kialakításával (Mileni és mtsai, 2010). Egyik legfontosabb képviselőjük, a farmakológiai kutatásokban széleskörűen alkalmazott URB 597, mely nanomoláris koncentrációban gátolja a FAAH enzimet ( $IC_{50}$  4,6 nM). Az URB 597 azonban nem szelektív a FAAH enzimre, szubsztrátja egyéb karboxil-észterázoknak is (Zhang és mtsai, 2007). Ennek elkerülésére Clapper és munkatársai a fenil gyűrűt jó elektron donor csoportokkal szubsztituálták, így csökkentve a karbonil csoport elektrofilitását. Ezáltal az URB 694 és származéka, az URB 937, magasabb szelektivitást mutatnak a FAAH enzimhez, ezen felül az URB 937 szelektív a perifériára (Clapper és mtsai, 2010; Clapper és mtsai, 2009).

### 2.2.2.3.2. MAGL gátlók

A MAGL enzim szintén a szerin hidrolázok közé sorolható, azonban a FAAH-al ellentétben az enzimatikusan aktív végen a klasszikus Ser-His-Asp katalitikus aminosav triádot tartalmazza.

Karbamát alapú MAGL inhibitor a JZL 184, amely nanomoláros mennyiségben gátolja az enzim aktivitást ( $IC_{50}$  10 nM), és (ellentétben néhány korábbi származékkal) 400-szoros szelektivitást mutat a MAGL-hoz a FAAH enzimmel összehasonlítva (Long és mtsai, 2010).

### 2.2.2.3.3. Anandamid visszavétel („uptake”) gátlók

Az anandamid transzportjának mechanizmusa nem pontosan ismert, az esetleges transzportfehérje szerkezete sem felderített, így az uptake gátlók szintetizálásakor az anandamid szerkezetéből indultak ki. Az első ilyen vegyület az anandamid-analóg AM 404 volt, amely mikromólos nagyságrendben ( $IC_{50}$  ~10  $\mu$ M) gátolja az anandamid visszavételét (Beltramo és mtsai, 1997). A későbbiekben megállapították, hogy nemcsak az anandamid transzportját gátolja, de szubsztrátja a FAAH enzimnek (Hillard és mtsai, 1997), és közvetlen agonista hatást fejt ki TRPV1 receptorokon is (De Petrocellis és mtsai, 2000), sőt az irodalom mint multitarget molekulát ún. „dirty drug”-ként említi, szubsztrátjai között szerepel ugyanis a COX is, és gyenge agonistája a CB<sub>1</sub>-receptoroknak (Piscitelli és Di Marzo, 2012). További uptake gátlók az anandamid visszavételre szelektívebb hatású VDM11 és OMDM-1 (Lopez-Rodriguez és mtsai, 2003).

### 2.2.2.3.4. Az endogén szint emelők farmakológiai hatásai

Az utóbbi években az endogén szint emelők terápiás célokra való felhasználása intenzíven kutatott téma (összefoglalóért lsd. (Fowler, 2015)). Rágcsálókban számos különböző fájdalom modellen (lipopoliszacharid (LPS)- és karragén-indukált thermális hyperalgézia, neuropátiás fájdalom modellek - Streptozotocin-indukált, illetve CCI modell (*Chronic constriction injury*), mely a jobboldali ülőideg sérülését modellezi, ecetsav-indukálta viscerális fájdalom modell, hőmérsékleti ingerre adott fájdalom reakció (*Increasing hot plate test*) bizonyult hatékonynak több FAAH-gátló (URB 597, URB 937, OL-135), és MAGL-gátló (JZL 184, JZL 195) vegyület, mely hatások legtöbbször CB<sub>1</sub>-mediált folyamatok voltak (Fowler, 2015). Ennek kissé ellentmond egy

2012-es humán kísérlet, melyben osteoarthritis-es betegeken vizsgálták egy FAAH-gátló vegyület (PF-04457845) hatékonyságát naproxenhez hasonlítva, amely azonban hatástalannak bizonyult (Huggins és mtsai, 2012).

LPS- és karragén modellen vizsgálva szisztémás adagolásnál az URB 597, URB 937 és JZL 184 nemcsak a fájdalmat, de a kialakuló ödémát is gátolta, ez a hatás azonban lokális adagolás során nem volt megfigyelhető (Ghosh és mtsai, 2013; Naidu és mtsai, 2010; Sasso és mtsai, 2012). URB 597, JZL 184 és VDM11 (anandamid visszavétel gátló) szintén csökkentette a gyulladást TNBS-indukálta colitis modellen egérben, a hatás gátolható volt AM 251-el (szelektív CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonista), azonban AM 630 (szelektív CB<sub>2</sub>-receptor antagonist) nem befolyásolta, és mind CB<sub>1</sub> (-/-), mind CB<sub>2</sub> (-/-) egereken felfüggesztődött (Alhouayek és mtsai, 2011; Storr és mtsai, 2008). FAAH- és MAGL-gátlók szintén gátolták NSAID-ok indukálta fekélymodellen a gyomor haemorrhágiás és fekélyes elváltozásainak kialakulását (bővebben lsd. 3.3. fejezet, A cannabinoidok hatása a gyomor nyálkahártya védelemre) (Kinsey és mtsai, 2011; Naidu és mtsai, 2010; Sasso és mtsai, 2012).

Fontos vonatkozása volt az endogén cannabinoid szint emelésnek az a teória, hogy nem jelentkeznek a  $\Delta^9$ -THC-re jellemző cannabimimetikus mellékhatások. Szelektív FAAH-gátlókkal végzett kísérletek során valóban nem okoztak szedációt, katalepsiát, a lokomotor aktivitás csökkenését vagy immobilitást patkányon (Kathuria és mtsai, 2003), és egy PF-04457845-el végzett humán kísérlet is bizonyította, hogy nincs hatásuk a kognitív funkciókra, pl. a probléma megoldó képességre, a koncentrációra és a tanulási folyamatokra (Li és mtsai, 2012). A JZL 184 azonban noha nem okozott katalepsiát és hypothermiát, szignifikánsan csökkentette a lokomotor aktivitást, míg a MAGL enzim iránt szelektívebb ligand (KML29) esetében ez a jelenség nem volt megfigyelhető. Mindkét vegyületnél megjelentek viszont a cannabimimetikus mellékhatások FAAH (-/-) egereken, és szelektív FAAH gátló PF-3845-el való előkezelés esetén, valamint kevert FAAH/MAGL-gátló JZL 195 alkalmazása után, ez arra enged következtetni, hogy érdekes módon míg a FAAH és MAGL szelektív gátlásával valóban elkerülhetők a nem kívánt hatások, addig a két enzim együttes kiütésekor megjelennek (Ignatowska-Jankowska és mtsai, 2014; Long és mtsai, 2009).

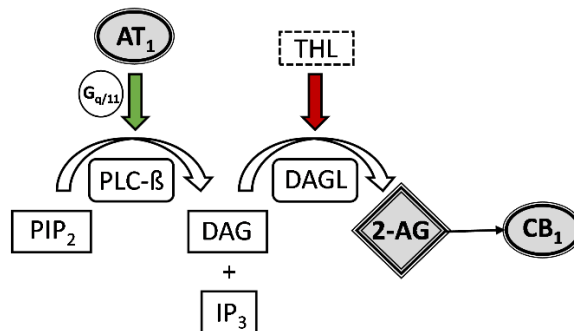
#### **2.2.2.4. Az endocannabinoid rendszer kölcsönhatása más neurotranszmitter családokkal**

A cannabinoid- és egyéb receptorcsaládok kölcsönhatása bekövetkezhet a receptorok heterodimerizációjával. Fluoreszcens és biolumineszcens rezonancia energia transzfer (FRET, BRET) kísérletekkel is bizonyították a CB<sub>1</sub>-receptorok dopamin D<sub>2</sub>, adenozin A<sub>2A</sub> (Carriba és mtsai, 2008) és opiát (Rios és mtsai, 2006) receptorokkal való heterodimerizációját. A másik bizonyíték kölcsönhatásukra, a koexpressziójukkor bekövetkező változások a szignál transzdukcióban. CB<sub>1</sub>- és  $\mu$ -opioid receptor együttes kifejeződésekor a CB<sub>1</sub>-receptor által kiváltott jelátvitel gyengítette a  $\mu$ -receptorét (Rios és mtsai, 2006).

Egy másik érdekes kölcsönhatás a CB<sub>1</sub>- és D<sub>2</sub> receptorok között valósul meg. Amennyiben egyszerre aktiváljuk a két receptort, cAMP-szint csökkenést tapasztalunk, ami Gi/o-fehérje aktiváció következménye. A két receptor koexpresszációkor, a CB<sub>1</sub>-receptor aktivációja gátolja a D<sub>2</sub>-receptorok aktivációját, és összeségében cAMP-szint növekedést látunk. Az előbbieken láttunk rá példát, hogy bizonyos körülmények között (pl. pertussis toxin kezelés) a CB<sub>1</sub>-receptorok Gs-fehérje kapcsolt útvonalat is elindíthatnak, lehetséges, hogy ez a jelenség magyarázata (Glass és Felder, 1997).

A 2-AG szintézisében fontos szerepet játszik a foszfolipáz C enzim, amelynek stimulálása többek között a G<sub>q/11</sub> protein kapcsolt transzmembrán receptorok aktiválásának eredménye. Tágabb értelemben tehát minden olyan neurotranszmitter, amely G<sub>q/11</sub> protein kapcsolt receptoron fejti ki hatását (noradrenalin  $\alpha_1$  adrenerg, acetilkolin M<sub>1,3,5</sub>ACh, angiotenzin AT<sub>1</sub>, bradykinin B<sub>2</sub>, vazopresszin V<sub>1</sub> receptorokon) képes a cannabinoid receptorok parakrin transzaktiválására (Turu és mtsai, 2009). Turu kísérleteiben kínai hörcsög ovárium (*Chinese hamster ovary*, CHO) sejteken bizonyította az AT<sub>1</sub>- és CB<sub>1</sub>-receptorok transzaktivációját. Az aktivált AT<sub>1</sub>-receptor stimulálja a PLC aktivitását, amely a PIP<sub>2</sub> átalakulást katalizálja IP<sub>3</sub>-ra és DAG-ra. A DAG a 2-AG keletkezési molekulája, a folyamat a DAG-lipáz (DAGL) enzim aktiválásával játszódik le (ld. még, Az endocannabinoidok szintézise, 2.1.1.-es fejezet). Összeségében tehát az AT<sub>1</sub>-receptor aktiválásával megnő a 2-AG in vivo bioszintézise, amely a cannabinoid receptorok aktivációjával jár (2. ábra). CHO sejteken az AT<sub>1</sub>-receptor által kiváltott CB<sub>1</sub>-

receptor aktiváció következtében gátlható volt tetrahydrolipstatin (THL), egy DAGL antagonistájaként (Turu és mtsai, 2007).



**2. ábra.** Az  $CB_1$ -receptor  $AT_1$ -receptor általi aktivációjának mechanizmusa. A rövidítések jelölése: 2-AG: 2-arachidonoylglycerol, DAG: diacylglycerol, DAGL: diacylglycerol-lipáz,  $IP_3$ : inozitol-trifoszfát,  $PIP_2$ : foszfatidil-inozitol (4,5)-biszfoszfát, PLC- $\beta$ : foszfolipáz C- $\beta$ , THL: tetrahydrolipstatin.

Számos kísérleti adat bizonyítja az endocannabinoidok és az az opioid rendszer kölcsönhatását. Valverde és munkacsoportja kísérleteiben csökkent a stressz-indukálta endogén opioidok felszabadulása  $CB_1$  knockout egereken (Valverde és mtsai, 2000). Egy másik bizonyíték a cannabinoid és opioid rendszer kölcsönhatására munkacsoportunk korábbi eredményei, melyben a nemszelektív opioid antagonistá naloxon gátolta az anandamid, methanandamid és a szintetikus cannabinoid analóg WIN55,212-2 gastroprotektív hatását. További kísérleteinkben a cannabinoidok által kiváltott gastroprotektív hatás endomorphin-2 antiszérummal, norbinaltorphiminnel ( $\kappa$ -opioid receptor antagonistá) és naltrindollal ( $\delta$ -opioid receptor antagonistá) is gátlható volt, valószínűsítve, hogy a két rendszer közötti kapcsolat a cannabinoidok endogén opioid (endomorphin-1 és 2, dynorphin és [Met5]enkephalin) felszabadító hatásában lehet (Shujaa és mtsai, 2009). Továbbá Mascia kísérleteiben  $CB_1$  knockout egereken nem jött létre a morfin dopamin-felszabadító hatása a nucleus accumbensben, amely a „reward” mechanizmus létrejöttében játszik szerepet (Mascia és mtsai, 1999).

A  $D_2$ -receptorok aktiválása szintén hatással lehet az endogén cannabinoidok felszabadulására: Giuffrida kísérleteiben a  $D_2$  agonista quinpirol növelte az anandamid szintjét a striatumban (Giuffrida és mtsai, 1999).

### 2.2.3. A cannabinoidok gasztrointesztinális farmakológiája

Az endocannabinoid rendszer szerepe a gasztrointesztinális rendszer fiziológiás és patofiziológiás folyamataiban széleskörűen körbejárt és tanulmányozott kérdés. Mind az anandamid, mind a 2-AG, illetve a szintézisükért és lebontásukért felelős enzimek, csak úgy, mint a CB<sub>1</sub>- és CB<sub>2</sub>-receptorok megtalálhatóak a gasztrointesztinális traktusban (Di Marzo és mtsai, 1994; Izzo és Coutts, 2005). A cannabinoid receptorok lokalizációját immunreaktivitással vizsgálva CB<sub>1</sub>-receptorokat leírtak mind a gyomor fundusban, corpusban és az antrális területeken, míg CB<sub>2</sub>-receptorokat nem találtak ebben a régióban. Mindkét receptor megtalálható ugyanakkor az epithel sejteken. A fundusban, az epitheliumot és a simaizmot beidegző submukozális plexusból eredő idegeken is jellemző a CB<sub>1</sub>-receptorok együttes lokalizációja a kolinerg marker kolin-acetil-transzferázzal, további CB<sub>1</sub>-receptorokat találhatunk a myentericus és submukozális plexusban (Adami és mtsai, 2002; Di Marzo és mtsai, 1994). Több patológiás állapotban is megfigyelték az endocannabinoid rendszer változásait, emelkedett anandamid szintet mértek többek között diverticulitisben (Guagnini és mtsai, 2006), illetve végbél karcinómák esetén (Ligresti és mtsai, 2003), míg gyulladásos bélbetegségekben (Crohn betegség, colitis ulcerosa) éppen ellenkezőleg, csökkent az anandamid szintje, amely összefügghet a szintéziséért felelős enzim (NAPE-PLD) csökkent, és a metabolizmusáért felelős FAAH-enzim fokozott aktivitásával (Di Sabatino és mtsai, 2011; Lee és mtsai, 2016). Szintén emelkedett a 2-AG szöveti koncentrációja kolorektális karcinómában és irritábilis bélszindróma D-típusánál (IBS-D), mely hasmenéssel jár, azonban csökkent értéket mértek diverticulitisben (Guagnini és mtsai, 2006; Lee és mtsai, 2016). Mind a CB<sub>1</sub>-receptorokat kódoló gén (CNR1), mind a FAAH enzim genetikai polimorfizmusát leírták továbbá a relatív gyakori, a lakosság 10-20%-át érintő betegségben, az IBS-ben. A tudomány mai állása szerint ezen betegség egyértelmű diagnosztizálása a változatosan megjelenő tünetek miatt (abdominális diszkomfort, inkomplett székletürítés, székrekedés (IBS-C), hasmenés (IBS-D), vagy mindkettő (IBS-M)) rendkívül nehézkes, melyet ezeknek a faktoroknak biomarkerként való alkalmazása leegyszerűsíthetne (Camilleri és mtsai, 2008; Park és mtsai, 2011). Érdekes megfigyelés továbbá, hogy egereknél krónikus stressz, vagy antibiotikumok okozta diszbakteriózisban up-regulálódik a CB<sub>2</sub>-receptor kódoló mRNS (CNR2) a gasztrointesztinális traktusban (Aguilera és mtsai, 2013), valamint emberben *Lactobacillus acidophilus* okozta csökkent CB<sub>2</sub>-receptor expressziót

is leírtak, amely felveti a mikrobiom szerepét az ECS gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatásának indirekt mediálásában a gasztrointesztinális traktusban (Ringel-Kulka és mtsai, 2014).

### **2.2.3.1. A cannabinoidok hatása a gyomorsav szekrécióna**

Több irodalmi adat is alátámasztja, hogy a cannabinoidok befolyásolják a gyomorsav szekrécióna. Izolált patkány gyomor preparátumon a  $\Delta^9$ -THC gátolta a hisztamin indukált savszekrécióna, nem befolyásolta azonban a bazális savválasztást (Pertwee és mtsai, 2001). I.v. adagolt nemszelektív CB-receptor agonista WIN 55,212-2 szintén nem gátolta a bazális savválasztást, de markánsan csökkentette a pentagastrin stimulált savszekrécióna (Coruzzi és mtsai, 1999). Továbbá szelektív CB<sub>1</sub>-receptor agonista HU-210 szintén gátolta a stimulált gyomorsav szekrécióna, mely hatás részben gátolható volt bilaterális cervikális vagotómiával, azonban atropin nem befolyásolta. Ez alapján valószínűsíthető, hogy a savszekrécióna csökkentő hatást CB<sub>1</sub>-receptorok mediálják, amelyek pre- és posztzinaptikus kolinerg neuronokon helyezkednek el, azonban nonadrenerg-nonkolinerg neurotranszmitterek is részt vesznek aktivációjukban (Adami és mtsai, 2002). Mindkét agonista könnyen penetrál a vér-agy gáton, ezért felmerült a kérdés, hogy centrálisan, a vagális efferensek aktiválásáról, vagy perifériás hatásról van szó, azonban patkányban i.c.v. adminisztrációja a WIN 55,212-2-nek és a HU-210-nek nem befolyásolta a gyomorsav szekrécióna, így valószínűsíthető, hogy főként perifériás hatásról beszélhetünk (Adami és mtsai, 2004).

Az endocannabinoid 2-AG i.c.v. injektálása nem befolyásolta a savválasztást, azonban anandamid i.c.v. adagolva érdekes módon stimulálta a szekrécióna, mely folyamatot nem befolyásolta a szelektív CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonista AM 251, de gátolható volt a TRPV1-receptor antagonistá capsazepinnel, ez alapján valószínűsíthető, hogy az anandamid savszekrécióna fokozó hatása TRPV1-receptorokon keresztül valósul meg (Minowa és mtsai, 2005).

### **2.2.3.2. Cannabinoidok hatása a gyomor motoros aktivitására és a gyomorürülésre**

Intravénásan adagolt  $\Delta^9$ -THC, és pszichoaktív szintetikus analógjai, mint a WIN 55,212-2, a CP 55,940, a cannabinal és a nabilon is lassították a gyomorürülést egérben

és patkányban. A  $\Delta^9$ -THC és a WIN 55,212-2 i.c.v. adagolás mellett is aktív volt. Szintén csökkentette i.v. adagolt  $\Delta^9$ -THC a gyomor kontrakciókat és az intragasztrikus nyomást, amely hatás ezen vegyületek hányáscsillapítóként való alkalmazását indokolja (Shook és Burks, 1989). Ugyanakkor sem CB<sub>1</sub>-, sem CB<sub>2</sub>-receptor antagonisták önmagukban nem befolyásolták a gyomorürülést, amelyből arra következtethetünk, hogy a cannabinoid rendszernek nincs tónusos hatása a gyomor motoros funkcióira (Izzo és mtsai, 1999). A cannabinoidok gyomorürülésre és motoros aktivitására való hatásait CB<sub>1</sub>-receptor mediálja, gátolhatók voltak ugyanis SR141716A-val (szelektív CB<sub>1</sub>-receptor antagonist), SR144528 (szelektív CB<sub>2</sub>-receptor antagonist) azonban nem befolyásolta őket (Izzo és mtsai, 1999).

Az endocannabinoidok szintén csökkentik a gyomorürülést. Intraperitoneális adagolásnál az anandamid dózis-függően gátolta a gyomorürülést, a hatás gátolható volt CB<sub>1</sub>-receptor antagonistával (SR141716A), de sem CB<sub>2</sub>-receptor antagonist (SR144528), sem TRPV1-receptor antagonist (I-RTX) nem befolyásolta (Di Marzo és mtsai, 2008). A 2-AG esetében ilyen hatást nem írtak le, szintén lassította az ürülést azonban az OEA (érdekes módon szaturált származéka, a PEA nem). Az OEA által kifejttet hatás ráadásul nemcsak CB<sub>1</sub>-receptor antagonistával (SR141716A), de CB<sub>2</sub>-receptor antagonistával (SR144528), TRPV1-receptor antagonistával (I-RTX), és PPAR- $\alpha$ -receptor antagonistával (MK886) is gátolható volt (Aviello és mtsai, 2008).

### **2.2.3.3. A cannabinoidok hatása a gyomor nyálkahártya védelemre**

A cannabinoidok több savfüggő és savfüggetlen fekélymodellen bizonyultak védő hatásúnak. CB<sub>1</sub>-receptoron keresztül gátolták a savszekréciót (Izd. fentebb), ezáltal védő hatást fejttettek ki savfüggő fekélymodelleken. Éhezttett patkányok pylorusának lekötése után 6 órával jelentősen csökkent a léziók kialakulásának száma azon csoportnál, akik a lekötés előtt 30 perccel s.c. vagy orális adagolással 100 mg/kg  $\Delta^9$ -THC-t kaptak (Sofia és mtsai, 1978). I.p. adagolt WIN 55,212-2 és anandamid is védő hatásúnak bizonyult stressz-fekélyekkel szemben, mely léziók kialakulását az állatok hideg helyen való kikötésével (*cold-restraint stress model*, CRS), vagy vízbe merítésével (*water immersion stress model*) érték el (Germano és mtsai, 2001). Míg a WIN 55,212-2 védő hatása a CB<sub>1</sub>-receptorokon keresztül megvalósuló savszekréció gátlásnak köszönhető, az anandamid hatása sokrétűbb: fokozza a mukozális vérátáramlást, a sejtproliferációt és DNS szintézist



az epitheliumban, és csökkenti a gyulladási faktorok, pl. interleukin-1 $\beta$  szintjét (Dembinski és mtsai, 2006). NSAID-ok (aspirin, diclofenac) okozta sav-dependens fekélyek kialakulása megelőzhető volt i.p. adott  $\Delta^9$ -THC, illetve ACEA (szelektív CB<sub>1</sub>-receptor agonista) adásával (Kinsey és Cole, 2013; Rutkowska és Fereniec-Goltbiewska, 2006).

Szintén savfüggő, NSAID indukálta fekélyeken bizonyították az endogén cannabinoid szint emelő védő hatását. A FAAH-gátló URB 597 (mely az anandamid endogén szintjét emeli az annak metabolizmusát végző enzim gátlásával, lsd. Az endocannabinoidok metabolizmusa fejezet) szignifikánsan gátolta a léziók kialakulását 6 órával orális diclofenac (30-100 mg/kg p.os) beadása után, intraperitoneális adagolás során (az URB 597 adagolása 1 órával a diclofenac beadása előtt történt). Ez a hatás megfigyelhető volt mind CB<sub>1</sub> (+/+), mind CB<sub>2</sub> (+/+) és CB<sub>2</sub> (-/-) knockout egerek esetében, azonban eltűnt CB<sub>1</sub> (-/-) egereknél, mely a gátlás CB<sub>1</sub>-mediált folyamatát bizonyítja (Naidu és mtsai, 2009). Ugyanezen metodikával dolgozott Kinsey és munkacsoportja, akik a MAGL-gátló (a 2-AG lebontásáért felelős enzim) JZL 184 gastroprotektív hatását vizsgálták. A JZL 184 (0.25-40 mg/kg i.p.) gátolta a diclofenac-indukált fekélyek kialakulását, valamint csökkentette a diclofenac hatására megnövekedett gyulladási mediátorok (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) szintjét. Nem befolyásolta azonban a diclofenac hatására lecsökkent prosztaglandin (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>) szinteket. Szintén knockout egerekkel bizonyították a CB<sub>1</sub>-receptor dominanciáját a hatásban, mely nem jelentkezett CB<sub>1</sub> (-/-) egerek esetében (Kinsey és mtsai, 2011). Továbbá indomethacin (3-10 mg/kg p.os) indukált fekélymodellen mutatott védő hatást az URB 937-es vegyület. Az URB 937 szintén FAAH-gátló, amely azonban szelektív a perifériára, nem penetrál a vér-agy gáton. Szignifikánsan csökkentette az indomethacin okozta léziók súlyosságát, így elmondhatjuk, hogy az anandamid savfüggő modellen perifériás CB<sub>1</sub>-receptorokon keresztül csökkenti a savszekréciót, így a fekélyek kialakulását (Sasso és mtsai, 2012).

Az előbbieken leírtak szerint is láthattuk, hogy mind a nemszteroidok, mind a stressz-indukálta fekélyek esetén a léziók kialakulásának hátterében a fokozott savszekréció áll, érthető tehát, hogy a cannabinoidok szekréciógátló hatásuk révén gátolják a léziók kialakulását. Savelválasztástól független modellekkel azonban kevés adat áll rendelkezésre. Ezen modellek esetében a fekélyeket nyálkahártya nekrotizáló

anyagokkal (pl. abszolút alkohol, savas alkohol, 0.2 N NaOH, 25% NaCl) idézzük elő, így az erózió kivédéséhez mindenképpen a mukozális védelem fokozására, citoprotekcióra van szükség. Munkacsoportunk korábbi kísérleteiben vizsgálta az anandamid, a methanandamid és a WIN 55,212-2 hatását i.v. és i.c.v. adagolás mellett, alkoholos fekélymodellen. Mindhárom vegyület gátolta a savas alkohol okozta léziók kialakulását, a hatás gátolható volt i.c.v. injektált szelektív CB<sub>1</sub>-receptor antagonistával (SR141716A), mely a centrális CB<sub>1</sub>-receptorok részvételét jelzi a folyamatban. Szintén gasztroprotektívnek bizonyult az i.c.v. adagolt CB<sub>1</sub>-receptor agonista ACEA (Shujaa és mtsai, 2009).

Noha az anandamid az elsőként leírt endogén cannabinoid a 2-AG által mediált hatásokról is egyre több ismerettel rendelkezünk. Mindenképpen szembetűnő, hogy míg az anandamid szintje az agyban és a szövetekben is pikomoláros nagyságrendű, addig a 2-AG nanomólos koncentrációban van jelen. Valamint, hogy míg az emlősök agyában a CB<sub>1</sub>-receptor a legnagyobb denzitásban megtalálható receptor, a periférián főként CB<sub>2</sub>-receptorokkal találkozhatunk (természetesen ez nem kizárólagos, ugyanúgy található CB<sub>2</sub>-receptor az agyban, illetve CB<sub>1</sub>-receptorok a perifériás szövetekben), melynek az anandamid nem szubsztrátja, a 2-AG ellenben erős agonista a receptoron. Továbbá az előbbieken ismertetett G<sub>q/11</sub>-protein kapcsolt receptorokon keresztül megvalósuló aktiváció is 2-AG mediálta folyamat, a PLC aktiválásakor keletkező DAG ugyanis a 2-AG keletkezési molekulája. Ezen tények ismeretében vizsgáltuk az anandamid mellett a 2-AG gasztroprotekcióna kifejtett hatásait, illetve azt, hogy az angiotenzin II az AT<sub>1</sub>-receptor (G<sub>q/11</sub>-protein kapcsolt receptor) aktiválásával valóban képes e kiváltani 2-AG által mediált hatást.

A cannabinoidok terápiás alkalmazásának egy sajnálatos limitációja a pszichoaktív mellékhatások megjelenésének kockázata. Az endogén cannabinoidok szintjének emelése a metabolizáló enzimeik gátlásával erre nyújthat kézenfekvő megoldást, az endogén cannabinoid szint emelése ugyanis nem váltja ki a cannabimimetikus mellékhatásokat. Kísérleteinkben így három szintemelő vegyület (URB 597, JZL 184, AM 404) hatását vizsgáltuk a gasztroprotekcióna.

A gyomor nyálkahártya védelem centrális és perifériás faktorok komplex, összehangolt működésével valósul meg. Ezen faktorok vizsgálata közelebb hozhat minket

a mukozális védelem pontos hatásmechanizmusának és a központi idegrendszeri szabályozás perifériás kapcsolódási pontjainak felderítéséhez. Ezért vizsgáltuk a hatásban résztvevő centrális és perifériás receptorokat, továbbá olyan neuropeptidek (CGRP, SOM) és antioxidáns enzimrendszerek (CAT, SOD) szintjének változásait is, melyek a nyálkahártya lokális, citoprotektív folyamatait serkentik (mukozális vérátáramlás fokozása, ROS elimináció, stb.).

### **3. CÉLKITŰZÉS**

Munkám során a következő kérdéseket vizsgáltam:

#### **3.1. Az endogén cannabinoidok gasztroprotektív hatása**

- 3.1.1. Az anandamidhoz hasonlóan a 2-AG-nak is van-e gasztroprotektív hatása centrális és perifériás adagolás során?**
- 3.1.2. Mely receptorok vesznek részt az endogén cannabinoidok gasztroprotektív hatásának mediálásában?**
- 3.1.3. Mely perifériás faktorok mediálják a hatást?**

#### **3.2. A CB<sub>1</sub>-receptorok AT<sub>1</sub>-receptorok általi aktivációjának vizsgálata**

- 3.2.1. Van-e a centrálisan adagolt angiotenzin II-nek gasztroprotektív hatása?**
- 3.2.2. Amennyiben van, megvalósul-e az AT<sub>1</sub>-receptorok általi aktiváció CB<sub>1</sub>-receptorokon?**

#### **3.3. Az endogén cannabinoid szint emelők gasztroprotektív hatásának vizsgálata**

- 3.3.1. Kiváltható-e gasztroprotekciónem csak a cannabinoid receptotok direkt aktiválásával, hanem a szöveti szintjük emelésével is?**
- 3.3.2. Amennyiben igen, milyen centrális és perifériás receptorok vesznek részt a folyamatban?**
- 3.3.3. A periférián, a gyomornyálkahártyában, mely faktorok és mechanizmusok mediálják a hatást?**
- 3.3.4. Befolyásolják-e a szint emelő vegyületek a gyomormotilitást?**
- 3.3.5. Okoznak-e az általunk vizsgált vegyületek katalapsziát és hypothermiát (centrális cannabimimetikus hatásokat)?**

## 4. MÓDSZEREK ÉS ALKALMAZOTT VEGYÜLETEK

### 4.1. Kísérleti állatok

Kísérleteinkhez a Semmelweis Egyetem által tenyésztett hím Wistar patkányokat alkalmaztunk, az alkoholos fekélymodellhez 140-170 g, míg az in vivo motilitás méréshez 200-300 g súlyúakat. Az állatokat a fiziológiásnak megfelelő 12-12 órás fényciklusú, légkondicionált szobában tartottuk, kontrollált ( $22\pm 2$  °C hőmérséklet; ~30% páratartalom) körülmények között, a US National Institute of Health (NIH) által kiadott *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*-ban lefektetett irányelveknek megfelelően. A kísérleteket megelőzően az állatokat 24 órán keresztül éhezettük, míg vizet igény szerint fogyaszthattak. A kísérletek a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága által felállított etikai irányelveknek megfelelően történtek (engedély szám: 22.1/606/001/2010), melyek az Európai Unió útmutatásán alapulnak (EU Directive 2010/63/EU).

### 4.2. Alkalmazott vegyületek

1. Táblázat – Az alkalmazott vegyületek tulajdonságainak összefoglalása

Név	Kémiai szerkezet	Hatás	Forgalmazó
<b>Anandamid</b>	<i>N</i> -Arachidonoyl ethanolamide	endogén cannabinoid	Ascent Scientific Ltd., Bristol, UK
<b>2-AG</b>	2-arachidonoylglycerol	endogén cannabinoid	Ascent Scientific Ltd., Bristol, UK
<b>AM 251</b>	<i>N</i> -(Piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide	CB <sub>1</sub> -receptor inverz agonista	Tocris Bioscience, Bristol, UK
<b>AM 404</b>	<i>N</i> -(4-Hydroxyphenyl)-5Z,8Z,11Z,14Z-eicosatetraenamide	anandamid uptake-gátló	Tocris Bioscience, Bristol, UK

<b>URB 597</b>	Cyclohexylcarbamic acid 3'-(Aminocarbonyl)-[1,1'- biphenyl]-3-yl ester	FAAH gátló	Ascent Scientific Ltd., Bristol, UK
<b>JZL 184</b>	4-[Bis(1,3-benzodioxol-5- yl)hydroxymethyl]-1- piperidinecarboxylic acid 4-nitrophenyl ester	MAGL gátló	Ascent Scientific Ltd., Bristol, UK
<b>URB 937</b>	Cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoyl-6- hydroxybiphenyl-3-yl ester	perifériás FAAH gátló	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
<b>Ang II</b>	Angiotenzin II (humán)	endogén AT <sub>1</sub> -rec. agonista	Ascent Scientific Ltd., Bristol, UK
<b>Tetrahydro- lipstatin (THL)</b>	<i>N</i> -Formyl-L-leucine(1 <i>S</i> )- 1-[[ <i>(2S,3S)</i> ]-3-hexyl-4- oxo-2- oxetanyl)methyl]dodecyl ester	DAGL gátló	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
<b>Candesartan</b>	2-Ethoxy-1-[[2'-(1 <i>H</i> - tetrazol-5-yl)[1,1'- biphenyl]-4-yl]methyl]- 1 <i>H</i> -benzimidazole-7- carboxylic acid	AT <sub>1</sub> -receptor antagonista	Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada
<b>Capsazepin</b>	<i>N</i> -[2-(4- Chlorophenyl)ethyl]- 1,3,4,5-tetrahydro-7,8- dihydroxy-2 <i>H</i> -2- benzazepine-2- carbothioamide	TRPV1- antagonista	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA

Atropin-szulfát, Nátrium-pentobarbitál, Uretán (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

#### **4.2.1. A vegyületek oldása**

A vegyületek törzsoldatai az alábbi oldószerekkel készültek:

Anandamid – abs. etanol; 2-AG – acetonitril/abs. etanol; AM 251, AM 404, URB 597, JZL 184 – 70% DMSO; URB 937 – 20% DMSO; Ang II, THL, candesartan, capsazepin – 0.9%-os fiziológiás sóoldat.

A törzsoldatokból a különböző koncentrációjú oldatok hígítása 0.9%-os fiziológiás sóoldattal készült. A kontroll állatok a megfelelő oldószert kapták.

#### **4.2.2. A vegyületek adagolásának módjai**

##### **4.2.2.1. Intracerebroventrikuláris (i.c.v.) adagolás**

Az alkoholos fekélykísérletek során a vegyületek i.c.v. injekcióját éber állatokon végeztük Noble és mtsai (1967) leírása alapján. Az állatok fejét stabilan tartva, a szúrás 4 mm mélységig, a bregmától 1.5 mm-re caudálisan és laterálisan történt egy mikroinjektorhoz csatlakoztatott 27G-s tű segítségével. A koordináták meghatározása Paxinos és Watson „*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*” atlasza alapján történt (Paxinos és Watson, 1986). A vegyületek oldatait 10 µl-es volumenben alkalmaztuk.

A gyomor motilitásának mérésekor urethannal (1.25 g/kg i.p.) altatott állatokon dolgoztunk. A patkány fejét stabilan befogtuk a sztereotaxiás készülékbe, az állat koponyáján az izmoktól szabaddá tettük a lambda és bregma képleteket, majd a fenti koordináták szerint intracerebroventrikulárisan implantáltunk egy vezető kanült, amelyet fogászati cementtel rögzítettünk. A kísérletek során ebbe a vezető kanülbe illesztettük a CMA/100-as mikroinjektorhoz csatlakoztatott 26G-s tűt, amelyen keresztül a vegyületek beadása szintén 10 µl-es volumenben történt.

##### **4.2.2.2. Szisztémás adagolási módok**

Intravénás (i.v.) adagolást az alkoholos fekélykísérletek során éber állatokon, farokvénán keresztül végeztünk, 0.5 ml/100 g volumenben.

A vegyületek per os beadása egy speciális szonda segítségével történt, míg intraperitoneális (i.p.) beadásukhoz, 21G-s injekciós tűt alkalmaztunk. Mindkét esetben éber állatokon, 0.5 ml/100 g volumennel dolgoztunk.

### 4.3. *In vivo* kísérletek

#### 4.3.1. Alkoholos fekélymodell

A vegyületek gasztroprotektív hatásának igazolására alkoholos fekélymodellt alkalmaztunk. Kísérleteinkhez 6-8 hetes, 140-170 g súlyú hím Wistar patkányokat használtunk. A gyomor nyálkahártya léziók kialakulását per os adagolt savas alkohollal (98 ml abszolút alkohol + 2 ml koncentrált sósav) indukáltuk 0.5 ml volumenben, 24 órás éhezést követően. A fiatal patkányok használatát az indokolta, hogy munkacsoportunk korábbi kísérleteiben bizonyította a gyomor nyálkahártya érzékenységének fokozódását idősebb állatok esetében az általunk alkalmazott alkohollal szemben, illetve, hogy a mukozális védelmi mechanizmusok hatékonysága fiatalabb példányoknál kifejezettebb, mint az időseknél (Gyires és Barna, 2002). 60 perccel az alkohol adagolása után az állatokat dekapitáltuk, a gyomrokat kimetszettük, a nagy görbület mentén felvagtuk és fiziológiás sóoldattal megtisztítottuk a szennyeződésektől.

A mukozális léziók kiértékelése fekély index számolásával, egy 0-4-ig terjedő pontrendszer segítségével történt. A léziók a mm-ben kifejezett hosszuknak megfelelő pontot kapnak, vastagságukat is figyelembe véve, a vastagabb fekélyek 2x szorzóval szerepeltek. Egy gyomor fekély indexét a fekélyek pontszámainak összege határozta meg. Az agonisták gasztroprotektív hatását a százalékos gátlás értékével fejeztük ki. Ez az érték a vegyület gátló hatását jellemzi a fekélyek kialakulására a csak alkoholt kapott kontrollhoz viszonyítva, kiszámítása a következő képlet alapján történik:

$$100 - \left[ \frac{\text{A kezelt csoport fekély indexe}}{\text{A kontroll csoport fekély indexe}} * 100 \right]$$

A kísérletek ábrázolásakor amennyiben egy kísérlet adatai kerültek feltüntetésre fekély indexet alkalmaztunk, ha azonban több kísérlet adatait összegeztük, az y-tengelyen a százalékos gátlás szerepel. Ennek oka, hogy egy-egy kísérletben ugyan nagyságrendileg nagyjából megegyezik, de számszerűleg eltér a kontroll csoportok fekély indexe, így több kísérlet összegzéséhez relativizálni kell az eredményeket. Statisztikai analízist ebben az esetben is minden kísérlet adataiból külön végeztünk.



Az agonisták i.c.v. adagolása 10 perccel, i.p. 20 perccel az alkohol beadása előtt történt. Az antagonisták i.c.v. az agonistákkal együtt lettek injektálva.

#### **4.3.2. A gyomor motilitásának mérése *in vivo***

A gyomor motilitásának *in vivo* mérése a gumiballon technikával történt (Zadori és Gyires, 2013). A kísérlethez 200-300 g-os hím, Wistar patkányokat alkalmaztunk. Az állatokat a kísérlet előtt 24 óráig éhezettük, majd urethannal (1.25 g/kg i.p.) altattuk. Az állandó testhőmérséklet fenntartásának érdekében az állatokat melegítőpadon tartottuk, az átjárható légutakat trachea kanül behelyezésével biztosítottuk. Az állatok vérnyomását egy, az arteria carotisba helyezett kanül segítségével detektáltuk. Az intragasztrikus nyomást egy 10 mm \* 30 mm nagyságú vékony latex gumiballon segítségével mértük, melyet egy flexibilis szilikon csőhöz rögzítve szájon át juttattunk a gyomorba. A ballont 2 ml 37 °C-os vízzel töltöttük fel, ezzel biztosítva a kezdeti  $10 \pm 0,5$  cmH<sub>2</sub>O intragasztrikus nyomást. A ballon pontos elhelyezkedését a gyomorban minden kísérlet után ellenőriztük. A szilikon cső disztális vége egy nyomásmérő fejen keresztül egy híderősítőhöz és egy Power Lab készülékhez volt csatlakoztatva, mely a Chart 5 Program segítségével lehetővé tette a gyomor intragasztrikus nyomásváltozásainak regisztrációját.

A kísérletek kezdetén egy 30-40 perces equilibrium periódust regisztráltunk, a gyomor alap motilitásának mérésére. A cannabinoid vegyületek beadása 10 µl-es volumenben történt 5 perces időintervallumban, egy CMA/100-as mikroinjektorhoz csatlakoztatott 26G-s tűn és az állatok fejébe előzetesen i.c.v. implantált vezető kanülon keresztül.

A kiértékelés során 2 paramétert határoztunk meg: egyrészt a tónusos intragasztrikus nyomást (cmH<sub>2</sub>O-ben), amely jól korrelál a gyomorfundus motoros aktivitásával, a fázisos nyomásgörbe minimumértékeinek átlagolásával kaptuk meg. Másrészt a tónusos nyomásra rátevődő fázikus gyomorkontrakciók amplitúdójának átlagos nagyságát, amely az antrum tevékenységéből adódik (Referencia). Mindkét paramétert 5 perces időintervallumokban vizsgáltuk: a vegyületek beadása előtt, alatt és után. A kiértékeléskor a beadást megelőző értéket tekintettük a bazális értéknek, és a teljes volumen injektálása utáni 5 perces intervallumot ábrázoltuk a bazális értékhez viszonyított százalékban.

A kísérlet végeztével az állatokat dekapitáltuk.

#### **4.3.3. Bilaterális cervikális vagotómia**

Pentobarbitálos altatásban (35 mg/kg i.p.) az állatok mindkét oldali váguszának cervikális szakaszát kipreparáltuk és átvágtuk. Az álműtött állatoknál a vágusz ugyanezen szakasza izolálva lett a szomszédos képletektől, de nem került átvágásra. A beavatkozás végeztével a nyaki bemetszést összevarrtuk, a további kísérletekre a műtét után 3 órával került sor.

#### **4.3.4. Katalepszia mérése**

A katalepszia mérését a gyakran alkalmazott „rúd-technikával” végeztük (Antoniou és mtsai, 2005). Az állatok mellső végtagjait óvatosan egy 10 cm magasan elhelyezett rúdra helyeztük, és mértük a mozdulatlansággal eltöltött időt. A teszt akkor ért véget, ha az állat mindkét lábát elmozdította a rúdról, megkísérelt felmászni a rúdra, vagy a fejével végzett intenzív „kutató-jellegű” mozgást. Minden állatot háromszor mértünk egymás után, ha egy állat 60 másodpercig nem reagált a tesztet befejezettek tekintettük, és 60 másodperces értéket rögzítettünk az adott állathoz. Az immobilitást másodpercben mértük közvetlenül az i.c.v. szúrás előtt, majd 40 percig 10 percenként.

#### **4.3.5. Hypothermia mérése**

Az állatok testhőmérsékletét rektálisan, digitális hőmérővel mértük, ~2 cm-re a végbélbe felhelyezve, közvetlenül az i.c.v. injektálás előtt, majd 40 perc időintervallum alatt 10 percenként.

### **4.4. Biokémiai mérések**

#### **4.4.1. A gyomor nyálkahártya perifériás védő faktorainak vizsgálata**

Az állatok dekapitálása után a gyomrokat kivágtuk és a gyomor nyálkahártyát leválasztottuk egy hűtött lemezen, szonikáltuk, és feldolgozásig -80 °C-on tároltuk. A RIA mérések kollaborációs munka keretében Debrecenben készültek (Dr. Németh József és munkatársai, Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet).

#### **4.4.1.1. CGRP (calcitonin gene-related peptide) radioimmunoassay (RIA)**

A C1012 számú CGRP antiszérumot az  $\alpha$ -CGRP-marha thyroglobulin antigén ellen termeltették nyúlban (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA). A RIA méréseket 1 ml végtérfogatú 0.02 mol/l koncentrációjú (pH 7.4) foszfát pufferben végezték. Az assay puffer 0.75 % (v/v) marha szérum albumin-t (BSA), 0.1 mol/l nátrium-kloridot (NaCl), 0.1 % EDTA-t és 0.05 % nátrium-azidot (NaN<sub>3</sub>) tartalmazott. A <sup>125</sup>I izotóppal jelölt patkány Tyr- $\alpha$ -CGRP (23-37) (Bachem) peptidet iodogénnel készítették, majd a monojódozott peptidet elválasztották a többi származéktól HPLC oszlopon (Merck). Az antiszérumot 1:350.000 hígításban alkalmazták. Patkány Tyr- $\alpha$ -CGRP (23-37) (Bachem) peptidet alkalmaztak standardként a RIA-hoz 0-100 fmol/ml tartományban (az assay érzékelési határa 0.2 fmol/ml volt) (Nemeth és mtsai, 1996; 1998; 2002).

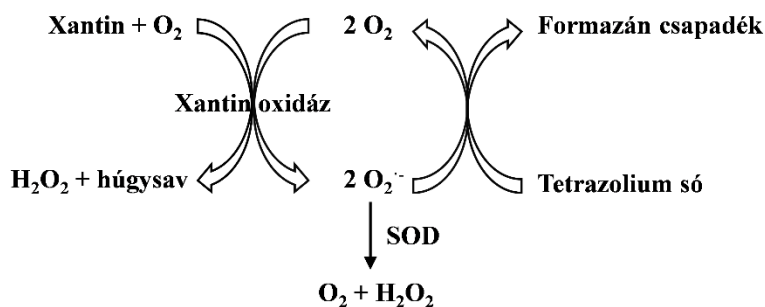
#### **4.4.1.2. Szomatostatatin (SOM) radioimmunoassay (RIA)**

A 775/7-es SOM antiszérumot SOM14-marha thyroglobulin antigén ellen termeltették birkában, a mérés során 1:600.000 hígításban alkalmazták. Jellemzője, hogy C-terminális érzékenységgű, azaz mind az SOM-28, mind az SOM-14 C-terminálisához kötődik, és mivel ez a régió megegyezik mindkettőben, így teljes plazma SOM koncentráció mérést tesz lehetővé. A <sup>125</sup>I izotóppal jelölt Tyr(1)-somatostatatin-14 (Sigma) előállítása iodogén felhasználásával történt, majd a monojódozott peptidet reverz fázisú HPLC oszlopon (Merck) választották el a többi fragmenstől. A RIA mérés során SOM-14 (Sigma) peptidet használtak standardként 0-1000 fmol/ml tartományban (a detektálás határa 2 fmol/ml volt) (Nemeth és mtsai, 1996; 1998; 2002).

### **4.4.2. Antioxidáns enzimaktivitás mérések**

#### **4.4.2.1. Szuperoxid dizmutáz enzimaktivitás meghatározás**

A szuperoxid dizmutáz enzim aktivitás kvalitatív meghatározása az alábbi reakció alapján történik:



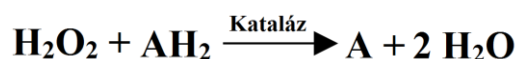
A xantin-oxidáz katalizálta enzimátikus reakció során a vízben oldható tetrazolium só oxigén jelenlétében vízben oldhatatlan formazán csapadékká alakul, melynek abszorbanciája 440-460 nm-es hullámhosszon detektálható. A meghatározással mindhárom típusú SOD enzim (Cu/Zn-, Mn-, és Fe-SOD) mérhető.

Az állatok dekapitálása után a gyomrokat kivágtuk és egy hűtött lemezen a gyomornyálkahártyát leválasztottuk, folyékony nitrogénben a mintákat azonnal fagyasztottuk, és feldolgozásig -80 °C-on tároltuk.

A homogenizáláshoz a mintákat folyékony nitrogénben porítottuk, és abból ~40-80 mg-ot homogenizáló csövekbe mértünk. 1 mg mintához 10 µl homogenizáló folyadékot adtunk, amely a következő anyagokat tartalmazta: 20 mM HEPES puffer, pH 7.2, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, 70 mM szukróz (a koncentrációk szövet grammonként értendők). A homogenizálást 2 x 3 percig golyósmalomban végeztük 50/sec rezgésszámon, majd a mintákat 5 percig 4 °C-on 1500 rcf-en centrifugáltuk. A felülúszókból 200-200 µl-es aliquot-okat vettünk, és a meghatározásig -80 °C-on tároltuk.

A meghatározáshoz a *Cayman Chemical Company* által gyártott *assay kit*-et alkalmaztuk. A protokoll szerint standard sort készítettünk a SOD törzsoldat meghatározott hígításaiból, majd az előre elkészített beosztás szerint duplikátumokban vittük fel a mintákat a plate-re. Hozzáadtuk a tetrazolium sót, végül a xantin-oxidázzal beindítottuk a reakciót. 20 perc múlva leolvastuk az egyes minták abszorbanciáját 450 nm-es hullámhosszon, a törzsoldat abszorbanciáira standard görbét illesztettünk lineáris regresszióval, mely alapján könnyen kiszámítható volt a minták SOD-aktivitása (U/ml).

#### 4.4.2.2. A kataláz enzimaktivitás meghatározása



A kataláz enzim meghatározás a fenti reakció szerint zajlott azt kihasználva, hogy a metanolból (CH<sub>3</sub>-OH) keletkező formaldehid (CH<sub>2</sub>O) a Purpald-reagenssel (4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol) kromogént képez, és kolorimetriásan detektálható (Johansson és Borg, 1988).

A minták levétele és homogenizálása a szuperoxid dizmutáznál leírtaknak megfelelően zajlott a homogenizáló puffer összetételétől eltekintve, mely a következő komponenseket tartalmazta: 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 1 mM EDTA (szövet grammonként).

A meghatározáshoz szintén a *Cayman Chemical Company* által gyártott *assay kit*-et alkalmaztuk. A keletkező formaldehid mennyiségéből számítjuk a CAT enzimaktivitást az alábbiak szerint:

$$\text{CAT aktivitás} = \frac{\text{a minta formaldehid tartalma}(\mu\text{M})}{20 \text{ perc}} \times \text{a minta hígítása}$$

A folyamat validálása szempontjából szükség van pozitív kontroll alkalmazására, mely liofilizált szarvasmarha májból extrahált porított CAT volt. A formaldehid törzsoldatból a protokoll szerint standard sort készítettünk, majd feltöltöttük a plate-t, a mintákat duplikátumokban vittük fel rá. 30 µl metanol és 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hozzáadásával beindítottuk a reakciót, majd 20 perc szobahőmérsékleten való inkubáció után KOH-al leállítottuk a hidrolízist, és az elegyhez hozzáadtuk a Purpald-reagenst. Újabb 15 perc inkubáció után a minták abszorbanciája 540 nm-es hullámhosszon leolvasható, a törzsoldat abszorbanciáira lineáris regresszióval illesztett standard görbe megadja a keletkezett formaldehid mennyiségét (µM), melyből a fenti egyenlet szerint számíthatjuk a minták CAT aktivitását (nmol/perc/ml). Ez az érték azt adja meg, hogy a mintánkban található mennyiségű CAT enzim 1 perc alatt mennyi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eliminálását katalizálja. Mivel mérésünk folyamán 20 perces inkubációs időt alkalmaztunk, a kapott értéket 20-al osztottuk (az egyenlet nevezőjében), hogy megkapjuk az egy percre vonatkozó enzimaktivitást.

#### **4.5. Statisztikai analízis**

A kísérleti eredményekben bemutatott értékek az átlagoknak felelnek meg és az átlag szórásával (standard error of mean, S.E.M.) együtt kerültek feltüntetésre. A statisztikai analízis egyutas ANOVA módszerrel Newman-Keuls post hoc teszttel történt.

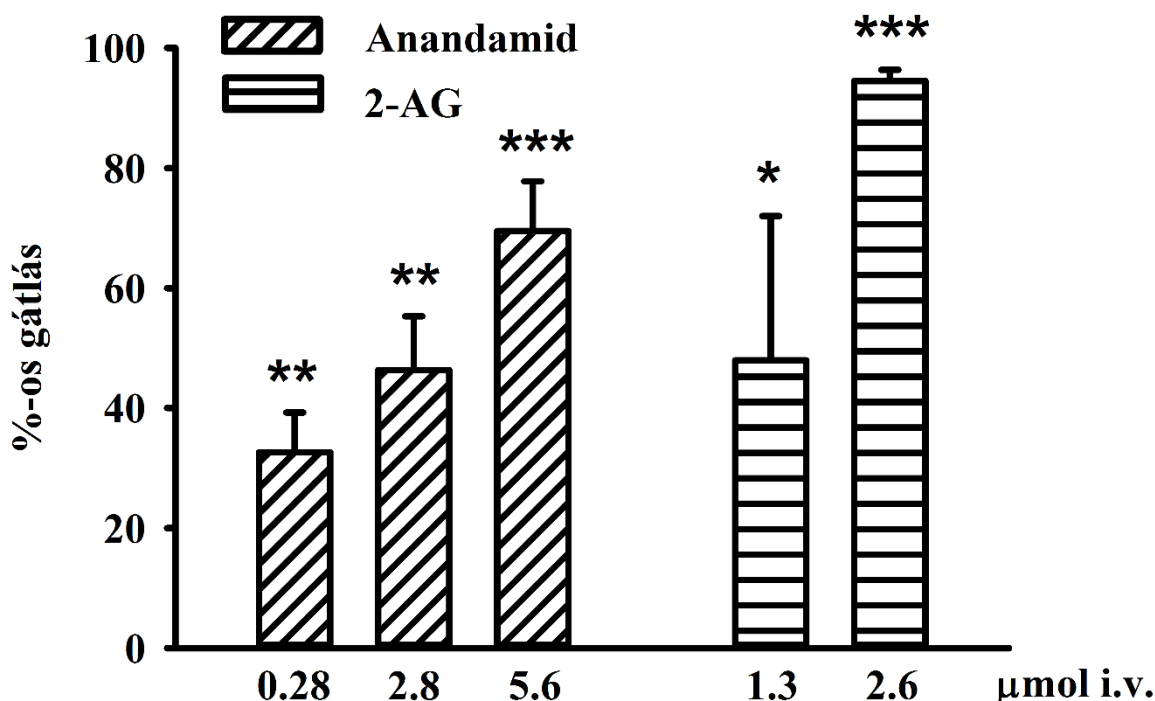
A motilitás kísérletek során az injektálás előtti és utáni értékek Student-féle párosított t-próbával lettek összehasonlítva. A különböző csoportok immobilitás és a hőmérséklet változásainak összehasonlítása az idő függvényében kétmintás varianciaanalízissel és Friedman próbával történt. Szignifikáns eltérésnek a  $p < 0.05$ -t tekintettük.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Az endogén cannabinoidok gasztroprotektív hatása

#### 5.1.1. Az anandamid és 2-AG védő hatása perifériás (i.v.) adagolásnál

Az anandamid (0.28-5.6  $\mu\text{mol}$  i.v.) és a 2-AG (1.3-2.6  $\mu\text{mol}$  i.v.) is dózisfüggő, szignifikáns (69.5, illetve 94.5%-os) gátlást fejtett ki az alkoholos léziók kialakulására perifériás adagolás mellett (3. ábra).

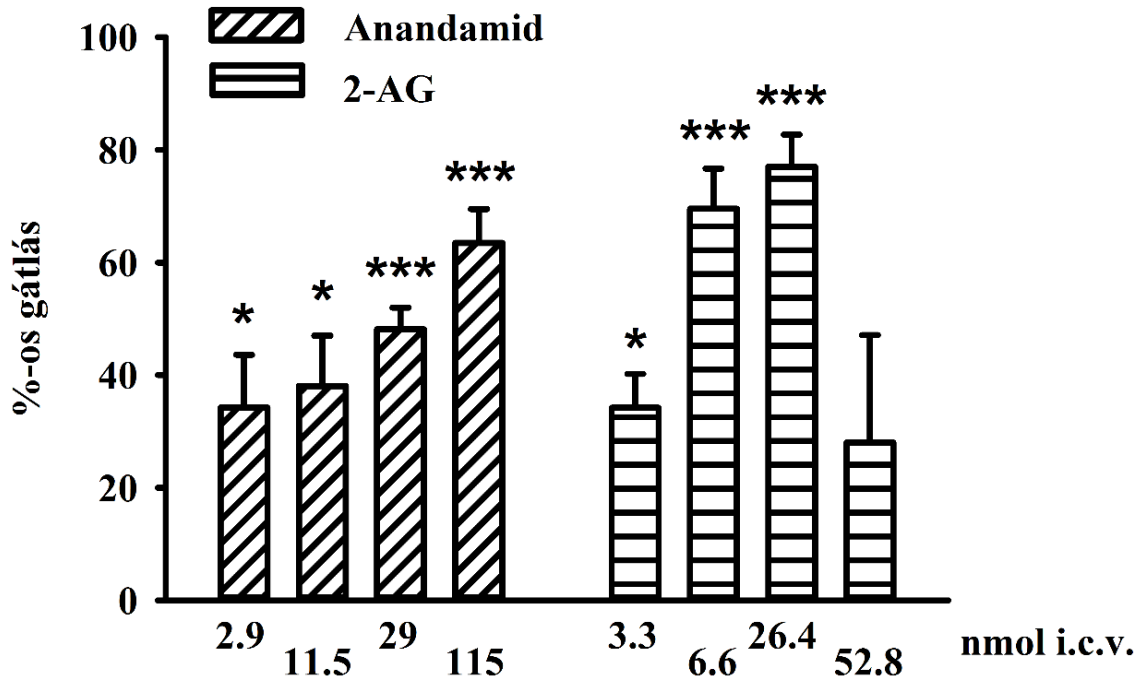


3. ábra. Az anandamid (0.28-5.6  $\mu\text{mol}$  i.v.) és a 2-AG (1.3-2.6  $\mu\text{mol}$  i.v.) gasztroprotektív hatása. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják, \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  a kontroll csoporthoz képest, (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

#### 5.1.2. Az anandamid és 2-AG gasztroprotektív hatása i.c.v. adagolás során

Szintén dózisfüggően gátolta mind az anandamid (2.9-115 nmol), mind a 2-AG (3.3-52.8 nmol) az alkoholos fekélyek kialakulását intracerebroventrikuláris adagolás során. A maximális gátló hatás az anandamidnál 63.5%, míg a 2-AG esetében 77% volt, az  $\text{ED}_{50}$

érték az anandamid esetében 38 nmol. A 2-AG nagyobb dóziséknél (52.8 nmol) a védő hatás csökkenését figyelhetjük meg, a dózis-hatás görbe harang alakú (4. ábra).

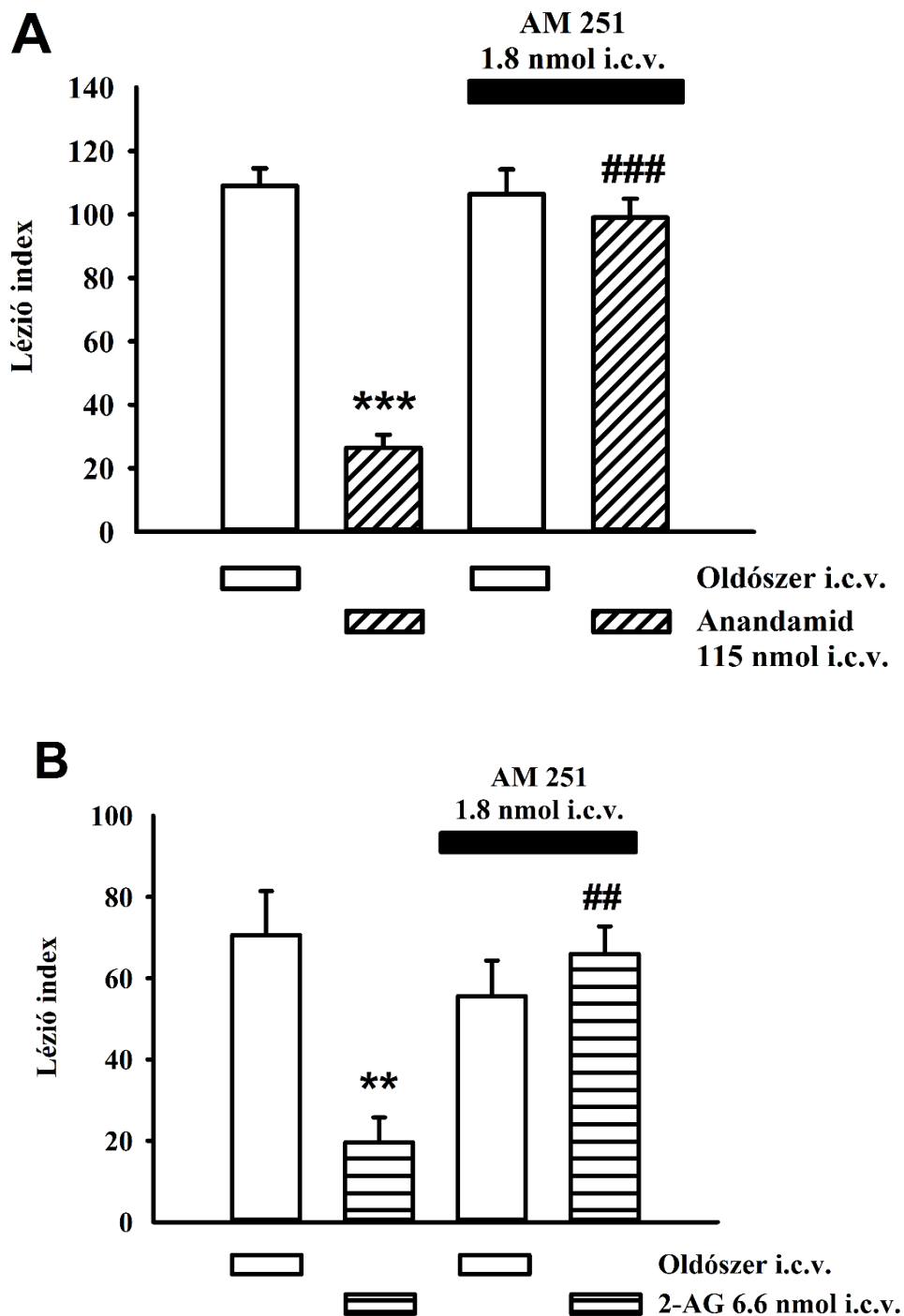


**4. ábra.** Az anandamid (2.9-115 nmol i.c.v.) és a 2-AG (3.3-52.8 nmol i.c.v.) gátló hatása az alkoholos fekélyek kialakulására. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják, \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószerral kezelt csoporttal összehasonlítva, (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.1.3. Az i.c.v. adagolt CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonista AM 251 hatása az anandamid és 2-AG által kiváltott gyomorvédelemre

Az önmagában i.c.v. adagolt CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonista AM 251 (1.8 nmol) nem befolyásolta az alkoholos léziók kialakulását, azonban felfüggesztette mind az anandamid (115 nmol i.c.v.), mind a 2-AG (6.6 nmol i.c.v.) protektív hatását (5. ábra).



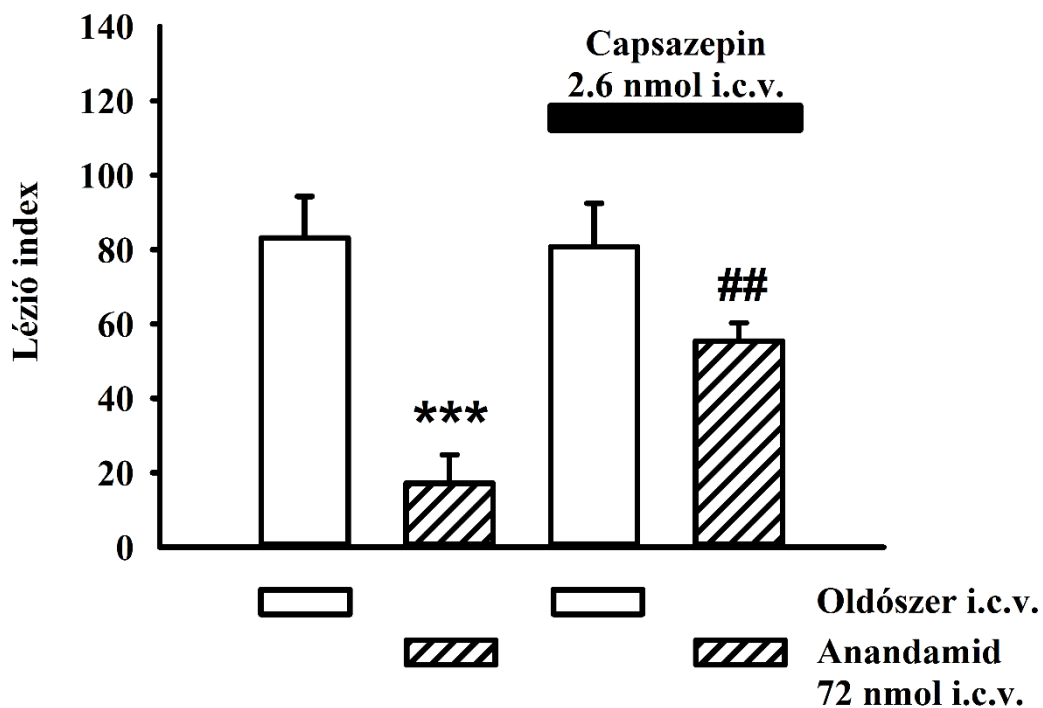


**5. ábra.** Az inverz agonista AM 251 (1.8 nmol i.c.v.) hatása az anandamid (115 nmol i.c.v.; **A**) és a 2-AG (6.6 nmol i.c.v.; **B**) gastroprotektív hatására. Az AM 251 adagolása az agonistákkal együtt történt, 10 perccel az alkohol beadása előtt. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószerrel (70%-os DMSO) kezelt csoporthoz

képest (1. oszlop); ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  az agonistával (anandamid 5A; 2-AG 5B) kezelt csoporthoz képest (2. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

#### 5.1.4. A TRPV1-receptor antagonistá capsazepin hatása az anandamid által kifejtett gyomorvédelemre

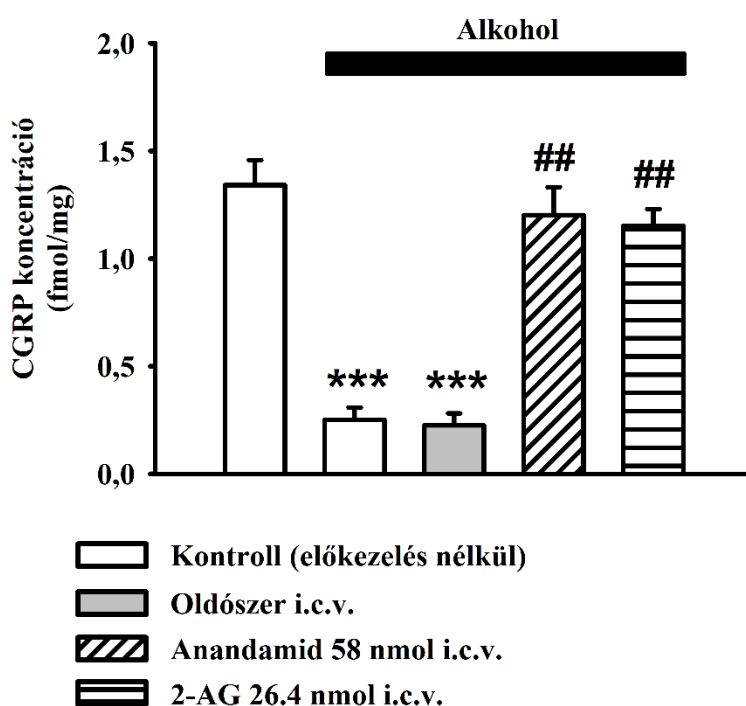
A TRPV1-receptor antagonistá capsazepin (2.6 nmol i.c.v.) önmagában nem befolyásolta az alkoholos léziók kialakulását, azonban szignifikánsan felfüggesztette az anandamid (72 nmol i.c.v.) által kifejtett védő hatást (6. ábra).



6. ábra. A capsazepin (2.6 nmol i.c.v.) hatása az anandamid (72 nmol i.c.v.) gasztroprotektív hatására alkoholos fekélymodellen. A capsazepin i.c.v. adagolása az anandamiddal együtt történt az alkohol beadása előtt 10 perccel. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószert kapott csoporthoz viszonyítva (1. oszlop), ##  $p < 0.01$ , az agonistával kezelt csoporthoz képest (2. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc test,  $n=5$ ).

### 5.1.5. Az i.c.v. adagolt anandamid és 2-AG hatása a gyomor nyálkahártya CGRP szintjére

Orálisan adagolt alkohol jelentősen ( $1.34 \pm 0.1$  fmol/mg-ról  $0.25 \pm 0.1$  fmol/mg-ra) csökkentette a mukozális CGRP koncentrációt 60 perccel az adagolás után. I.c.v. adagolt oldószer önmagában nem befolyásolta a csökkent CGRP értéket, azonban anandamid (58 nmol i.c.v.) és 2-AG (26.4 nmol i.c.v.) injektálása 10 perccel az alkohol beadása után szignifikánsan gátolta az alkohol CGRP-szint csökkentő hatását ( $1.2 \pm 0.1$ , illetve  $1.15 \pm 0.1$  fmol/mg-ra) (7. ábra).

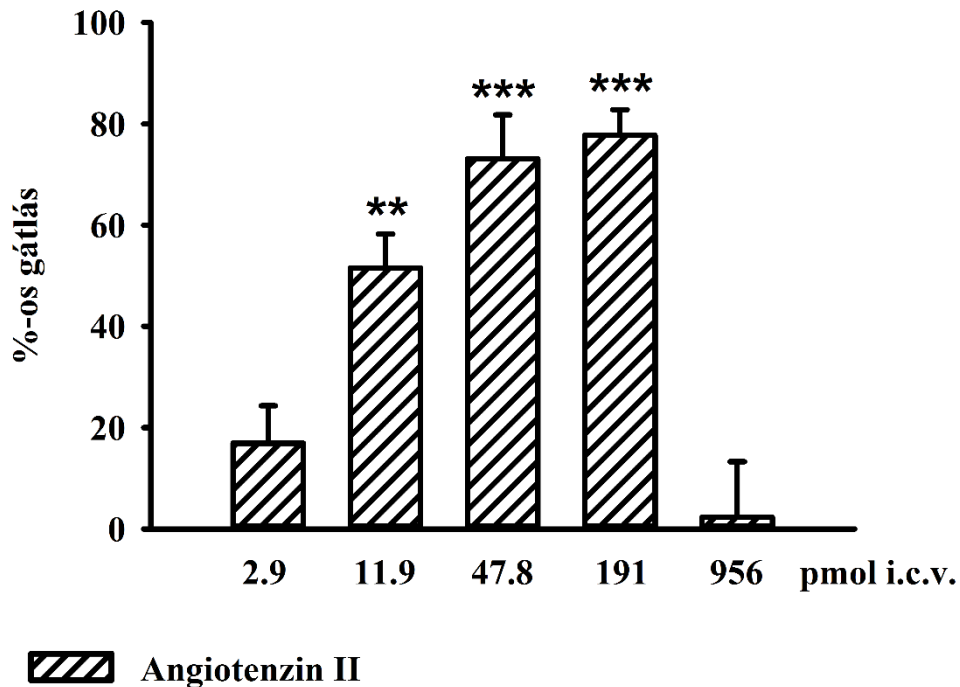


**7. ábra.** Az anandamid (58 nmol i.c.v.) és 2-AG (26.4 nmol i.c.v.) hatása a gyomor nyálkahártya CGRP szintjére 1 órával az orális alkohol beadása után. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*\*  $p < 0.001$  a kontroll csoporthoz viszonyítva (1. oszlop), ##  $p < 0.01$  az oldószerrel kezelt csoporthoz képest (3. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

## 5.2. Az AT<sub>1</sub>-és CB<sub>1</sub>-receptorok aktivációjának vizsgálata

### 5.2.1. Az angiotenzin II (Ang II) gastroprotektív hatása i.c.v. adagolás során

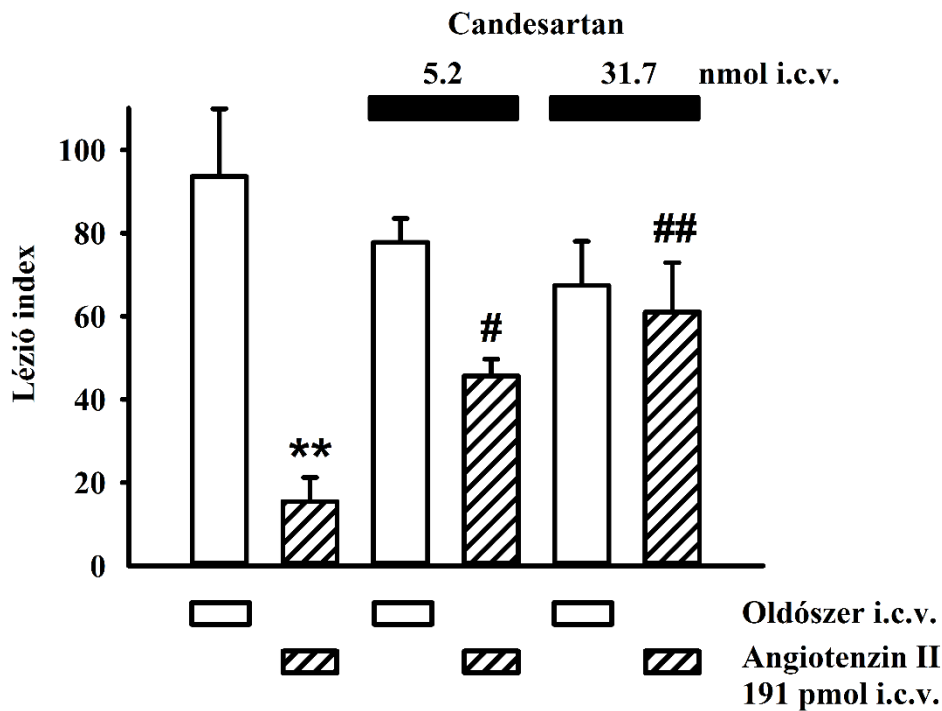
Az angiotenzin II dózisfüggően gátolta az alkoholos léziók kialakulását intracerebroventrikuláris injektálás során 11.9-191 pmol-os tartományban, nagyobb dózisa (956 pmol) azonban nem fejtett ki védőhatást, a dózis-hatás görbe harang alakú. A maximális védő hatás 78%-os volt (8. ábra).



**8. ábra.** Az i.c.v. injektált angiotenzin II (2.9-956 pmol) hatása az alkoholos léziók kialakulására. Az Ang II i.c.v. injektálása 10 perccel az alkohol beadása előtt történt. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják, \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  a kontroll csoporthoz viszonyítva, (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.2.2. A szelektív AT<sub>1</sub>-receptor antagonistá candesartan hatása az Ang II gasztroprotektív hatására

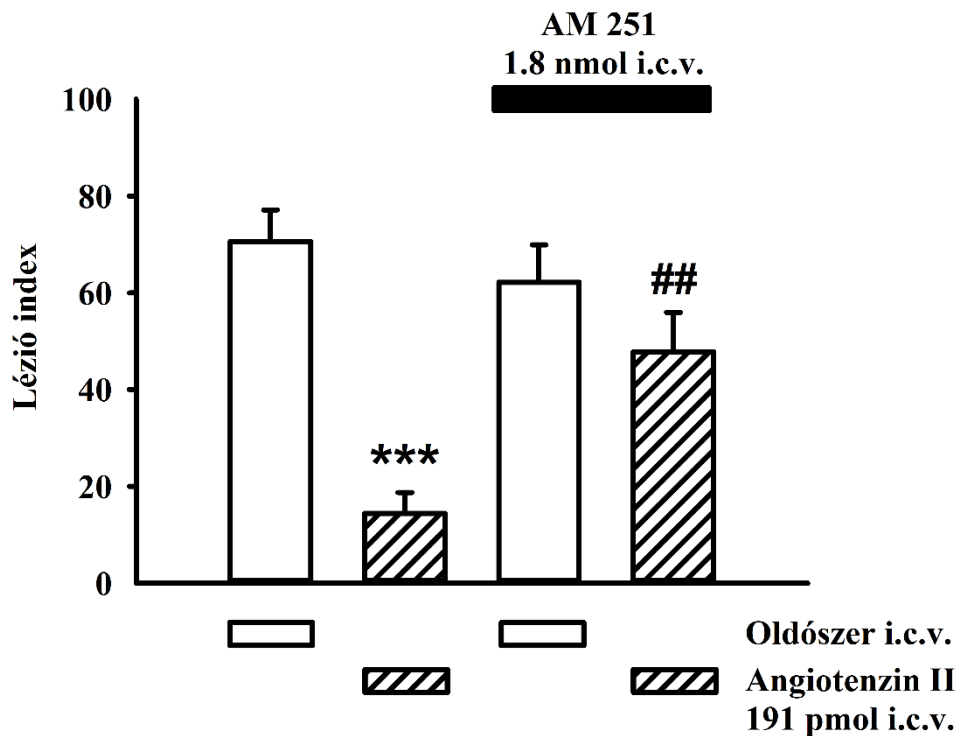
Intracerebroventrikulárisan adagolt szelektív AT<sub>1</sub>-receptor antagonistá candesartan (5.2 nmol és 31.7 nmol) dózisfüggően csökkentette az i.c.v. injektált angiotenzin (191 pmol) gasztroprotektív hatását (9. ábra).



**9. ábra.** A candesartan (5.2 és 31.7 nmol i.c.v.) hatása az angiotenzin II (191 pmol i.c.v.) gasztroprotektív hatására alkoholos fekélymodellen. Az antagonistát az Ang II-vel együtt lett beadva, 10 perccel az alkohol beadása előtt. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\* $p < 0.01$  az oldószerrel kezelt csoporthoz viszonyítva (1. oszlop), #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  az Ang II-vel kezelt csoporthoz képest (2. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.2.3. A CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonista AM 251 hatása az Ang II által kifejtett gyomorvédelemre

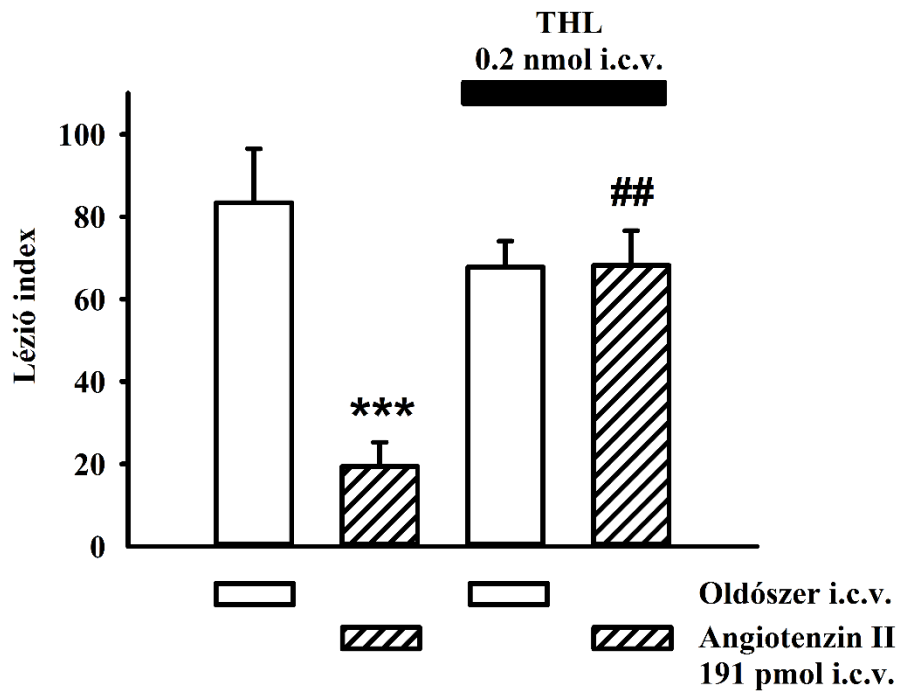
Az AM 251 (1.8 nmol) szignifikánsan gátolta az angiotenzin gasztroprotektív hatását i.c.v. adagolás mellett alkoholos fekélymodellen (10. ábra).



**10. ábra.** A  $CB_1$ -receptor inverz agonista AM 251 (1.8 nmol i.c.v.) gátló hatása az angiotenzin (191 pmol i.c.v.) gyomorvédő hatására. Az AM 251 az Ang II-vel együtt lett injektálva, 10 perccel az alkohol beadása előtt. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószerrel kezelt csoporthoz képest (1. oszlop), ##  $p < 0.01$  az Ang II-vel kezelt csoporthoz képest (2. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

#### 5.2.4. A DAG-lipáz (DAGL) gátló tetrahydrolipstatin (THL) hatása az Ang II gasztroprotektív hatására

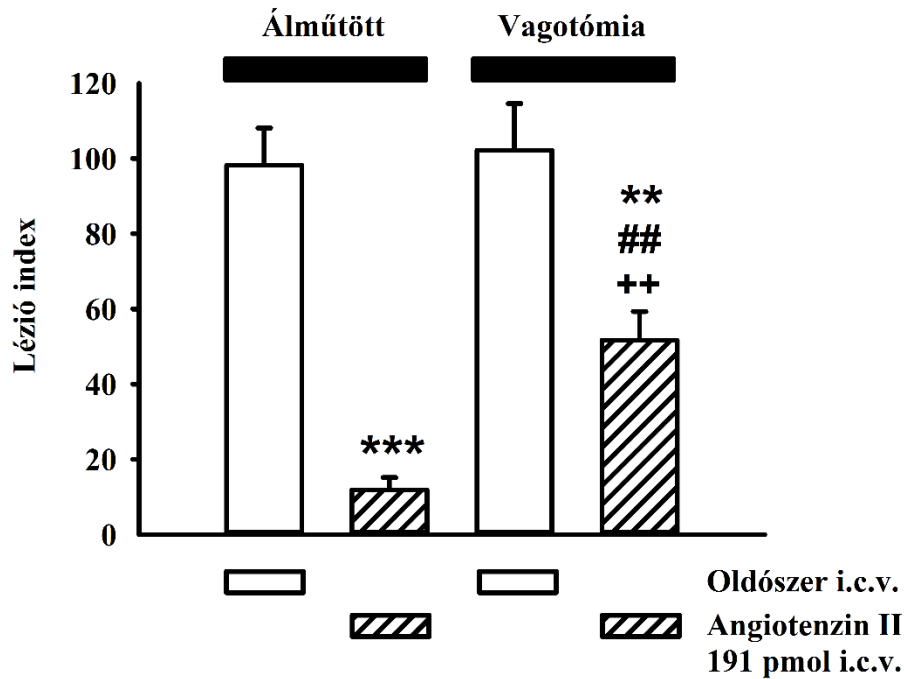
I.c.v. adott THL (0.2 nmol) csaknem teljesen felfüggesztette az Ang II gasztroprotektív hatását (11. ábra).



**11. ábra.** A DAG-lipáz gátló tetrahydrolipstatin (0.2 nmol i.c.v.) hatása az Ang II (191 pmol i.c.v.) gasztroprotektív hatására. Az antagonista az Ang II-vel együtt lett injektálva, 10 perccel az alkohol beadása előtt. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószerrel kezelt csoporthoz képest (1. oszlop), ##  $p < 0.01$  az Ang II-vel kezelt csoporthoz képest (2. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.2.5. Vagotómia hatása az Ang II által kiváltott gyomorvédelemre

Bilaterális cervikális vagotómia önmagában nem befolyásolta a fekélyek kialakulását. A vagotómián átesett állatok esetében az Ang II (191 pmol i.c.v.) védő hatása a kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent, de a vagotómia nem függesztette fel teljesen. A vagotómiát 3 órával a további kísérletek előtt végeztük, az Ang II adagolása 10 perccel az alkohol beadása előtt történt (12. ábra).

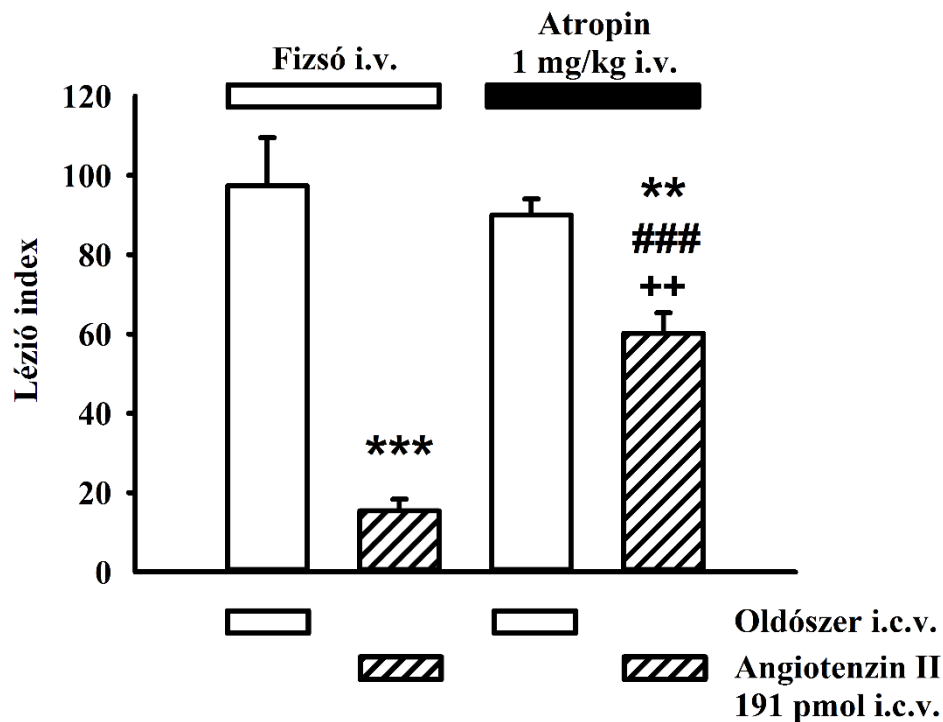


**12. ábra.** A bilaterális cervikális vagotómia hatása az angiotenzin II (191 pmol i.c.v.) gasztroprotektív hatására. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószerrel kezelt csoporthoz képest (1. oszlop), ##  $p < 0.01$  az Ang II-vel kezelt csoporthoz képest (2. oszlop), ++  $p < 0.01$  a vagotomizált csoporthoz képest (3. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.2.6. Az atropin hatása az Ang II gasztroprotektív hatására

Az atropin (1 mg/kg i.v.) önmagában nem befolyásolta az alkoholos léziók kialakulását, azonban szignifikánsan gátolta (de nem függesztette fel) az i.c.v. adagolt angiotenzin II (191 pmol) által kifejtett protektív hatást. Az atropin adagolása 15 perccel az Ang II beadása előtt történt (13. ábra).





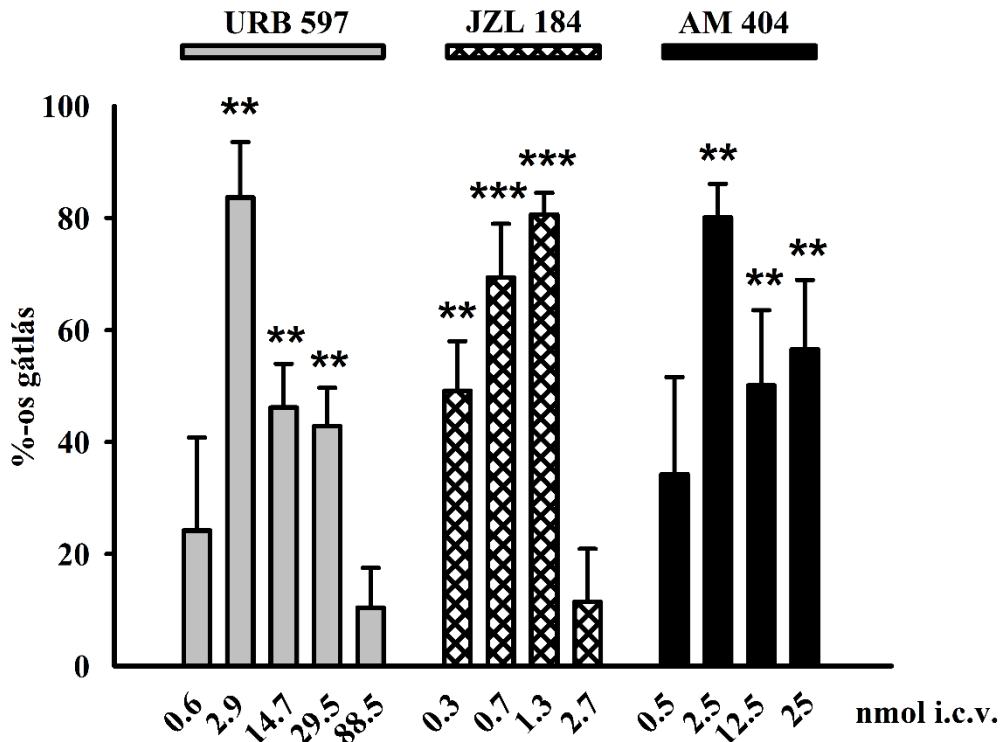
**13. ábra.** Az atropin (1 mg/kg i.v.) hatása az Ang II (191 pmol i.c.v.) által kifejtett gyomorvédelemre. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószerrel kezelt csoporthoz képest (1. oszlop), ###  $p < 0.001$  az agonistával kezelt csoporthoz képest (2. oszlop), ++  $p < 0.01$  az atropinnal kezelt csoporthoz képest (3. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.3. Az endogén cannabinoid szint emelők gasztroprotektív hatásának vizsgálata

#### 5.3.1. A centrálisan adagolt endogén cannabinoid szint emelők: az URB 597, JZL 184 és AM 404 gasztroprotektív hatása

Mind a FAAH gátló URB 597 (0.6-88.5 nmol i.c.v.), mind a MAGL gátló JZL 184 (0.3-2.7 nmol i.c.v.), valamint az anandamid-uptake gátló AM 404 (0.5-25 nmol i.c.v.) dózisfüggően, közel azonos hatáserősséggel gátolta az alkoholos léziók kialakulását intracerebroventrikuláris adagolás során. A maximális gátló hatás az URB 597 esetében 83.6%, a JZL 184-nél 80.6%, míg az AM 404-nél 80%-os volt. Nagyobb dózisoknál a

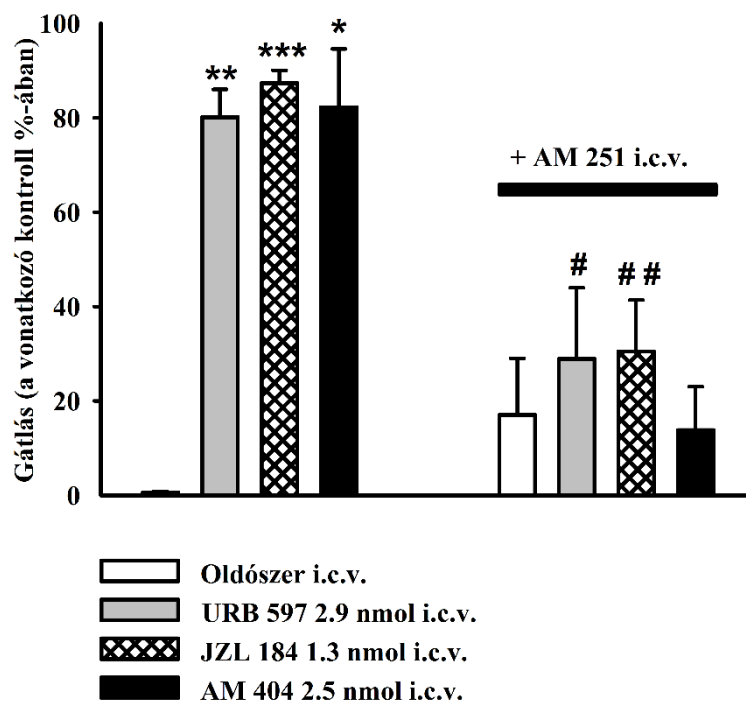
védő hatás szignifikáns csökkenését figyelhetjük meg, a dózis-hatás görbe minden esetben harang alakú (14. ábra).



**14. ábra.** A centrálisan adagolt URB 597 (0.6-88.5 nmol), JZL 184 (0.3-2.7 nmol) és AM 404 (0.5-25 nmol) hatása a savas alkohol indukálta gyomor nyálkahártya léziók kialakulására. Az agonisták adagolása 10 perccel az alkohol beadása előtt történt. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  a kontroll csoporttal összehasonlítva, (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.3.2. A CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonista AM 251 hatása az endogén cannabinoid szint emelők gasztroprotektív hatására

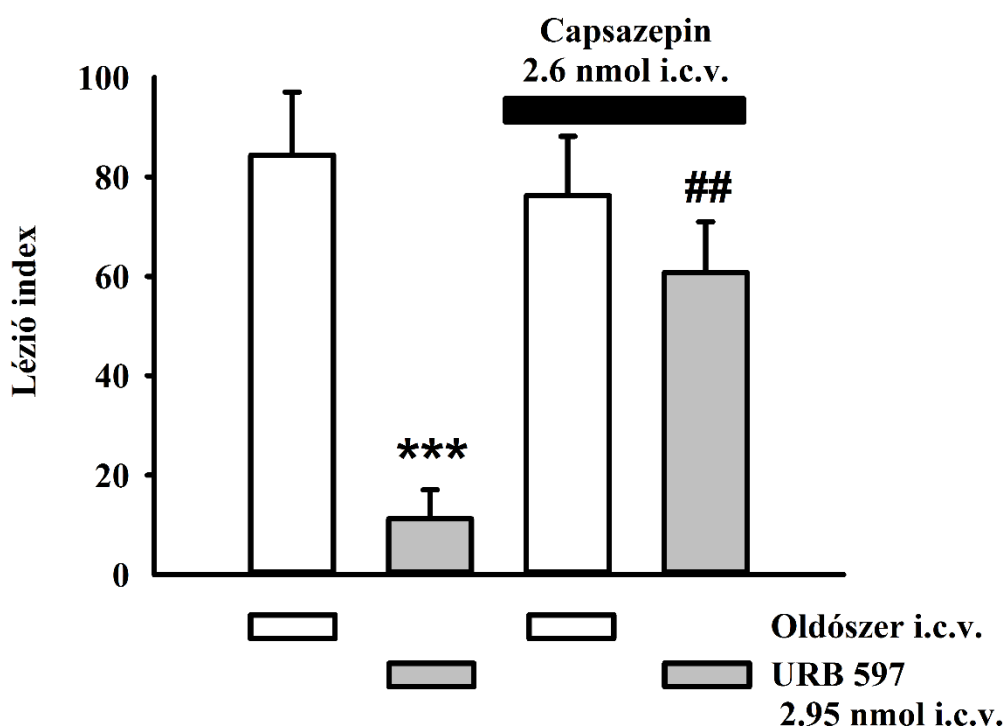
A centrálisan adagolt CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonista AM 251 (1.8 nmol) önmagában nem befolyásolta az alkoholos léziók kialakulását, azonban gátolta az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.) és a JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.) és az AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) által kifejtett védelmet (15. ábra).



**15. ábra.** A centrálisan adott AM 251 (1.8 nmol i.c.v.) hatása az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.), a JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.) és az AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) gyomornyálkahártyán kifejtett protektív hatására. A vegyületek adagolása 10 perccel az alkohol beadása előtt történt önmagukban, vagy az AM 251-el kombinálva. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószerrel (70%-os DMSO) kezelt csoporttal szemben (1. oszlop); #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  az oldószerrel + a megfelelő agonistával (URB 597 2. oszlop, JZL 184 3. oszlop, AM 404 4. oszlop) kezelt csoporthoz képest (ANOVA, Newman-Keuls post hoc test,  $n=5$ ).

### 5.3.3. A TRPV1-receptor antagonistá capsazepin hatása az URB 597 által kifejtett gasztroprotekcióna

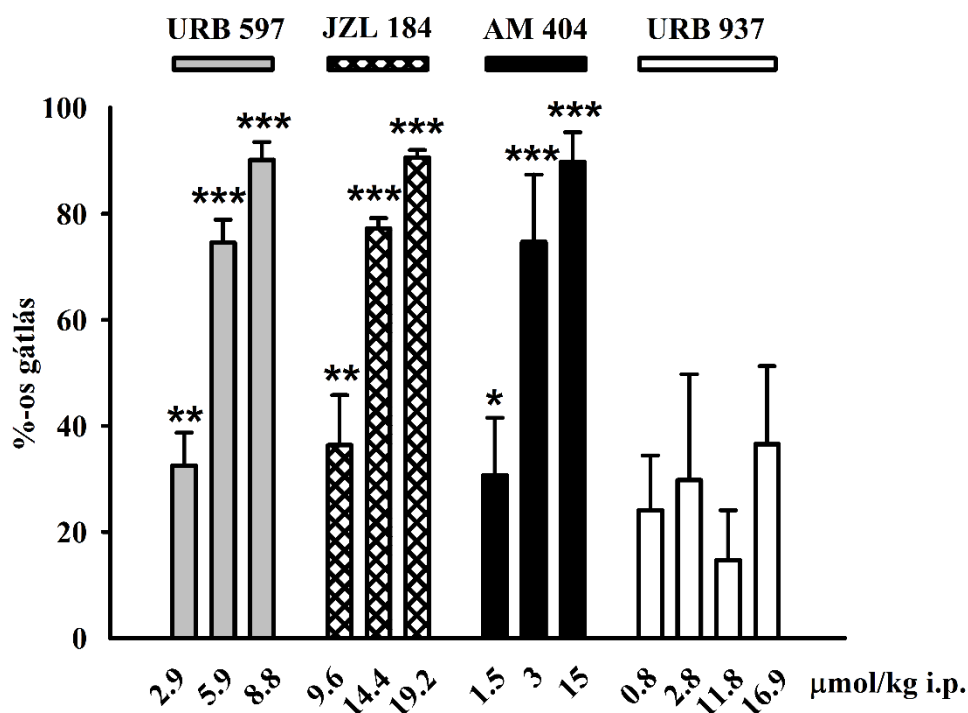
A TRPV1-receptor antagonistá capsazepin (2.6 nmol i.c.v.) szignifikánsan gátolta az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.) által kifejtett gasztroprotektív hatást (16. ábra).



**16. ábra.** A capsazepin (2.6 nmol i.c.v.) hatása az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.) által kifejtett gasztroprotekcíóra. Az antagonista beadása az URB 597-el együtt történt 10 perccel az alkohol beadása előtt. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószerrel (70%-os DMSO) kezelt csoporthoz képest (1. oszlop); ##  $p < 0.01$  a capsazepinnel kezelt csoporthoz viszonyítva (3. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc test,  $n=5$ ).

#### 5.3.4. Az URB 597, JZL 184, AM 404 és a perifériára szelektív URB 937 gasztroprotektív hatása perifériás adagolás során

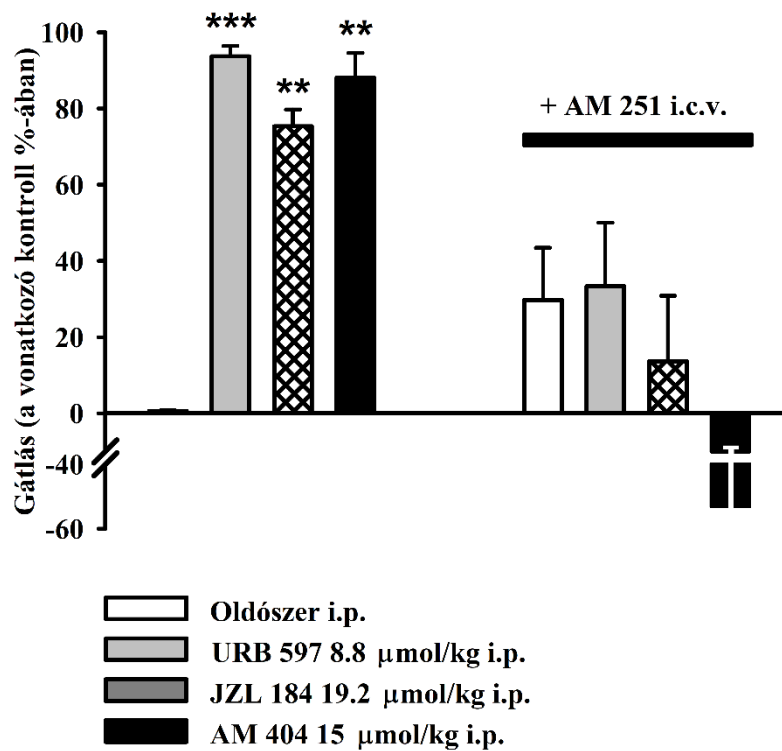
Mind a FAAH gátló URB 597 (2.9-11.8  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.), mind a MAGL gátló JZL 184 (9.6-19.2  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) és a visszavétel gátló AM 404 (1.5-15  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) dózisfüggően, szignifikánsan gátolta az alkoholos léziók kialakulását perifériás (i.p.) adagolás során. A maximális gátló hatások közel azonosak voltak a három vegyület esetében, 90-90 és 88% ( $\text{ED}_{50}$  értékek: 3.85, 9.7 és 2.9  $\mu\text{mol/kg}$ ). Ezzel szemben a központi idegrendszerbe nem penetráló, a perifériára szelektív vegyület, az URB 937 (0.8-16.9  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) nem fejtett ki védő hatást (17. ábra).



**17. ábra.** Az URB 597 (2.9-11.8  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.), a JZL 184 (9.6-19.2  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.), az AM 404 (1.5-15  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) és az URB 937 (0.8-16.9  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) hatása a gyomorvédelemre perifériás adagolásnál. A vegyületek intraperitoneális adagolása 20 perccel az alkohol beadása előtt történt. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  a csak oldószert (70% DMSO) kapott csoporthoz viszonyítva, (ANOVA, Newman-Keuls post hoc test,  $n=5$ ).

### 5.3.5. A centrálisan adagolt AM 251 hatása a perifériásan adott endogén cannabinoid szint emelők gasztroprotektív hatására

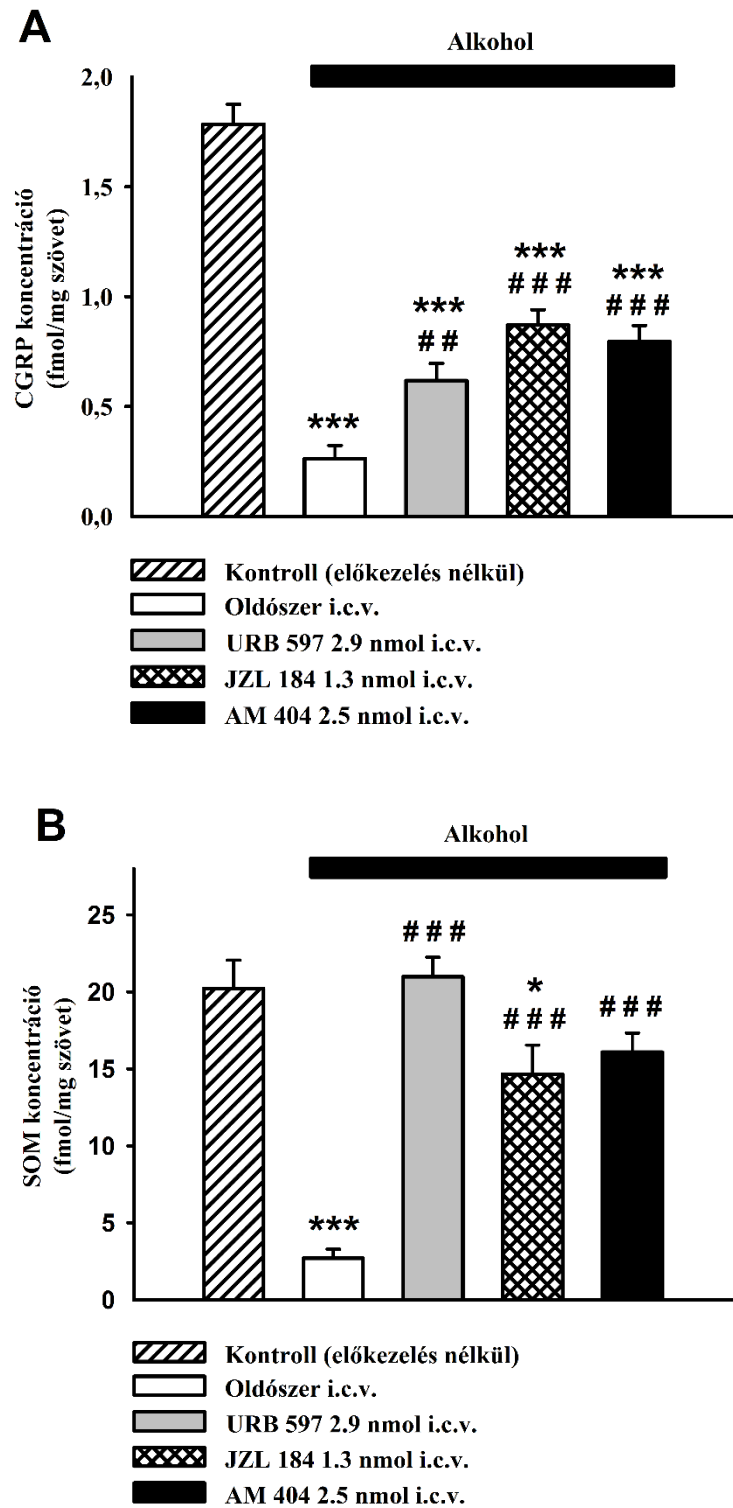
A centrálisan adott AM 251 (3.6 nmol i.c.v.) önmagában nem befolyásolta az alkoholos fekélyek kialakulását, azonban szignifikánsan csökkentette a perifériásan adagolt endogén cannabinoid szint emelők, az URB 597 (8.8  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.), JZL 184 (19.2  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) és AM 404 (15  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) gasztroprotektív (93.7%, 75.3% és 88.1%-os védelmet kifejtő) hatását (18. ábra).



**18. ábra.** A centrálisan adagolt szelektív  $CB_1$ -receptor inverz agonista AM 251 (3.6 nmol i.c.v.) hatása a perifériásan adagolt URB 597 (8.8 µmol/kg i.p.), JZL 184 (19.2 µmol/kg i.p.) és AM 404 (15 µmol/kg i.p.) által kifejtett gyomorvédelemre. A szint emelők adagolása perifériásan 20 perccel, az AM 251 centrális injektálása 10 perccel az alkohol beadása előtt történt. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  az oldószerrel (70%-os DMSO) kezelt csoporthoz viszonyítva, (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.3.6. Az URB 597, JZL 184 és AM 404 hatása a gyomor nyálkahártya CGRP és szomatosztatin (SOM) szintjeire

Per os adagolt alkohol markánsan csökkentette a gyomor nyálkahártya CGRP-és szomatosztatin szintjét. Mind az URB 597-el (2.9 nmol i.c.v.), mind a JZL 184-el (1.3 nmol i.c.v.), mind pedig az AM 404-el (2.5 nmol i.c.v.) történő intracerebroventrikuláris előkezelés esetén a CGRP és SOM szintek mérsékeltebb csökkenését figyelhettük meg a csak oldószerrel kezelt csoporthoz képest (19. ábra).

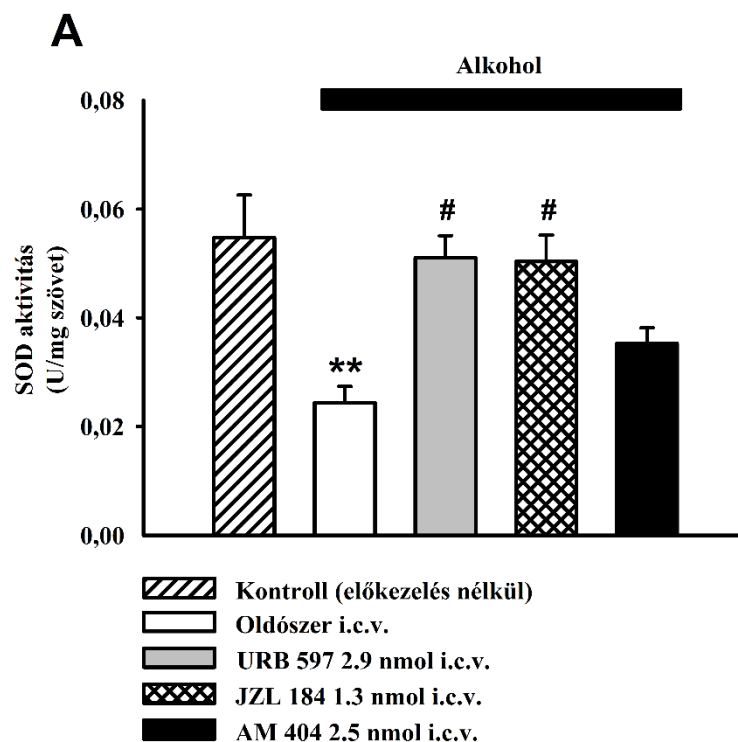


**19. ábra.** A centrálisan adagolt URB 597 (2.9 nmol i.c.v.), JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.) és AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) hatása a gyomor nyálkahártya CGRP (19A) és SOM (19B) szintjeire, 1 órával a savas alkohol beadása után mérve. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*

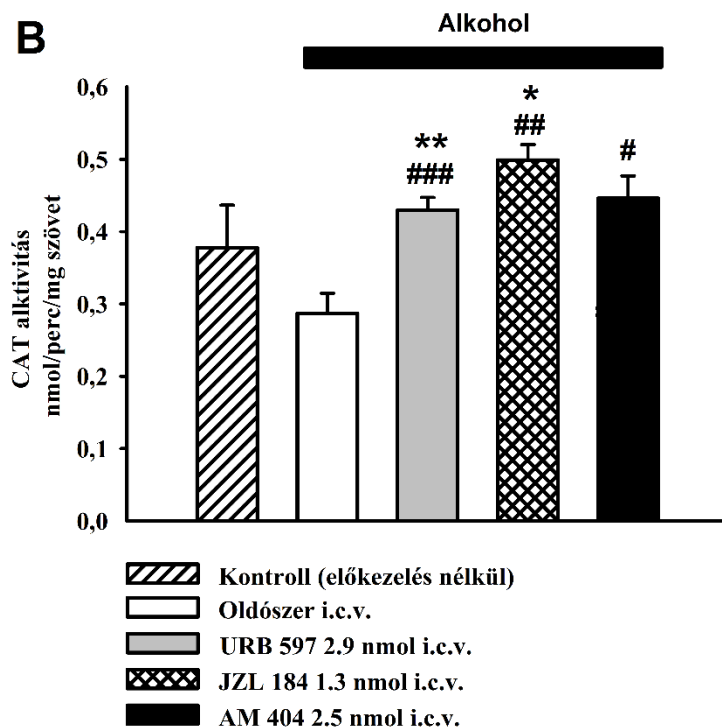
$p < 0.001$  az előkezelés nélküli kontroll csoporthoz képest (1. oszlop); ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  az oldószert (70% DMSO i.c.v.) és alkoholt kapott csoporthoz képest (2. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.3.7. Az endogén cannabinoid szint emelők hatása a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és kataláz (CAT) enzim aktivitásra

Orális alkohol adagolása szignifikánsan csökkentette a nyálkahártya szuperoxid-dizmutáz aktivitását (0.055-ről 0.024 U/mg szövet értékre). Míg a csökkent SOD aktivitás értékeit az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.) és a JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.) is közel a kontroll értékre emelte (0.051 illetve 0.05 U/mg szövet értékekre), addig az AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) nem befolyásolta szignifikánsan. A CAT enzimaktivásban nem mutatkozott szignifikáns eltérés az abszolút kontroll és az alkoholos kontroll között, azonban mindhárom általunk vizsgált vegyület szignifikáns enzimaktivitás növekedést okozott (20. ábra).



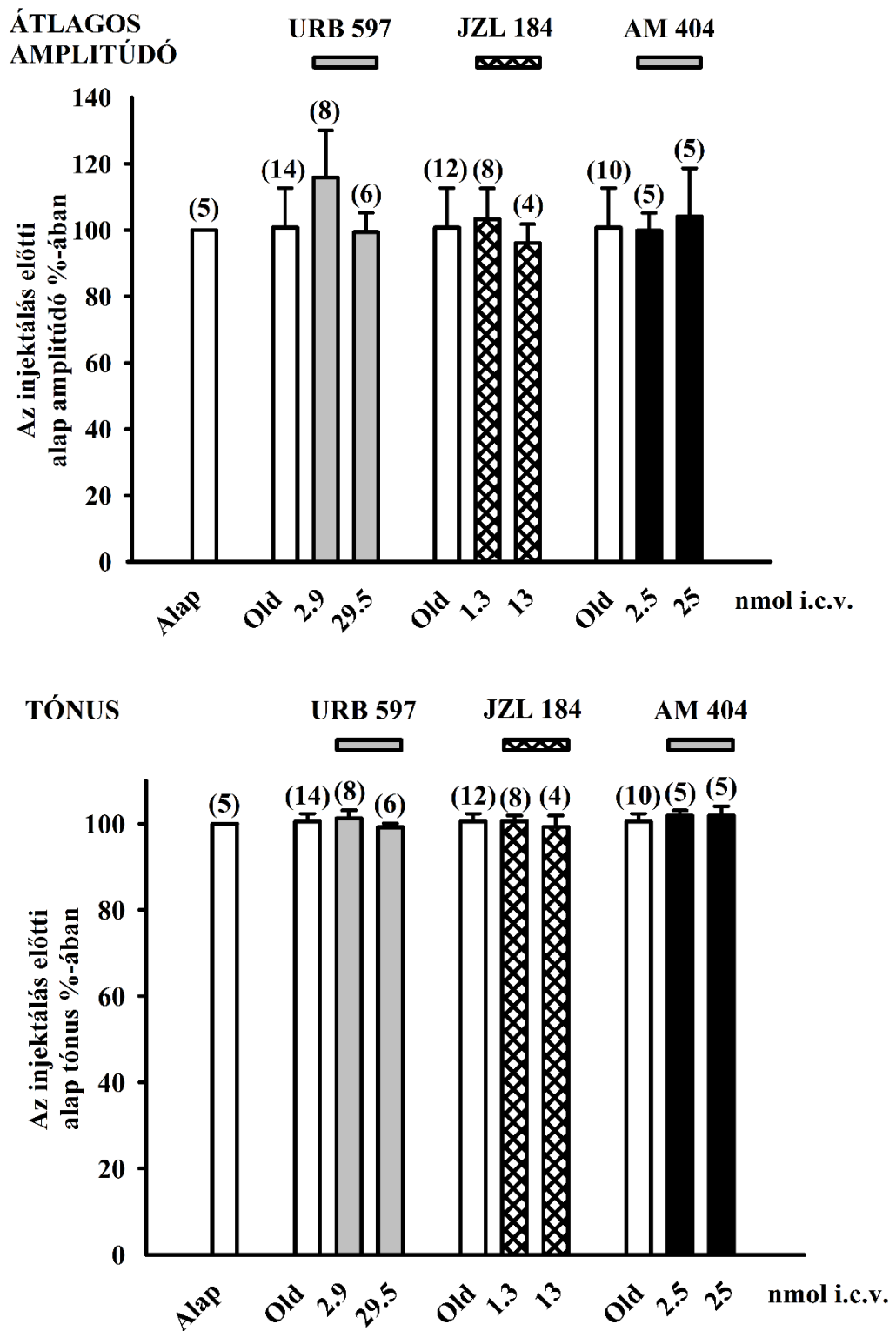




**20. ábra.** Az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.), a JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.) és az AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) hatása a SOD (A) és CAT (B) enzimek aktivitására alkoholos fekélymodellen, 1 órával az alkohol adagolása után. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  az előkezelés nélküli kontroll csoporthoz viszonyítva (1. oszlop); #  $p < 0.05$ ; ##  $p < 0.01$ ; ###  $p < 0.001$  az oldószerrel (70%-os DMSO i.c.v.) és p.os alkohollal kezelt csoporthoz képest (2. oszlop), (ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=5$ ).

### 5.3.8. Az URB 597, JZL 184 és AM 404 hatása a gyomormotilitásra

Sem a FAAH-gátló URB 597 (2.9; 29.5 nmol i.c.v.), sem a MAGL-gátló JZL 184 (1.3; 13 nmol i.c.v.), sem az anandamid visszavételét gátló AM 404 (2.5; 25 nmol i.c.v.) nem befolyásolta a gyomor motoros aktivitását (a gyomor bazális kontrakcióinak átlagos amplitúdóját, valamint az intragasztrikus tónust). A vegyületeket a gasztroprotektív dózisban, illetve annak 10x-esében injektáltuk az állatoknak egy min. 30 perces equilibrium intervallum után 10  $\mu$ l-es volumenben, 5 percen keresztül. Az eredmények kiértékeléséhez az injektálást követő 5 perces időintervallumot vettük alapul (21. ábra).

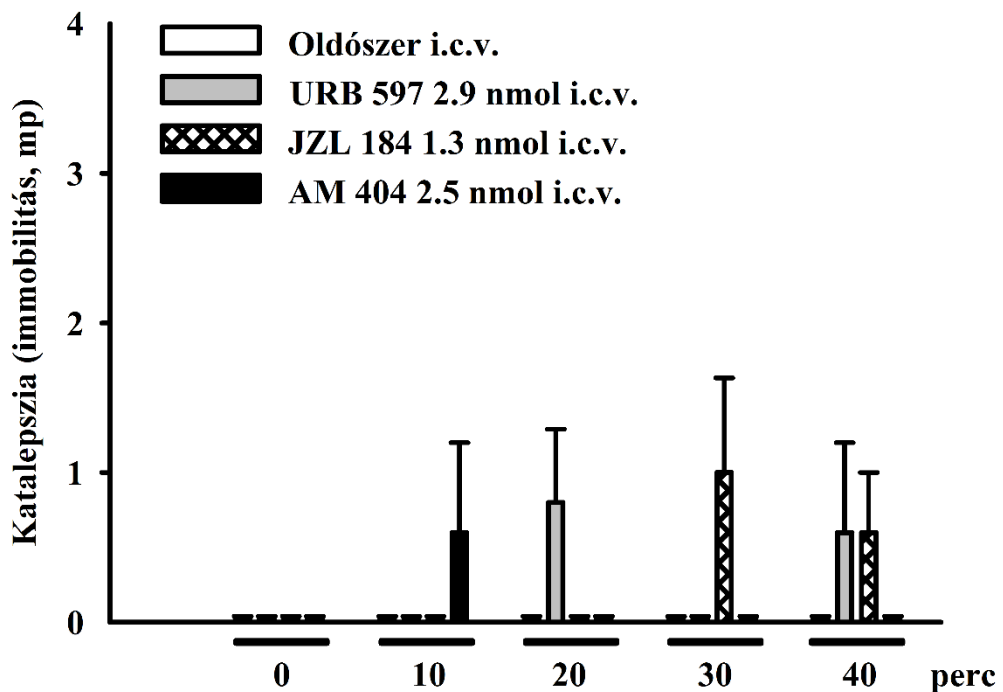


**21. ábra.** Az URB 597 (2.9; 29.5 nmol i.c.v.), a JZL 184 (1.3; 13 nmol i.c.v.) és az AM 404 (2.5; 25 nmol i.c.v.) hatása a gyomor motoros aktivitására és tónusára gumiballon technikával mérve. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és

az átlag szórását (S.E.M.), az oszlopok feletti zárójelekben az állatok száma látható. (Az injektálás előtti és utáni értékek Student-féle párosított t-próbával lettek összehasonlítva.)

### 5.3.9. Az endogén szint emelők katalepsiát okozó hatásának vizsgálata

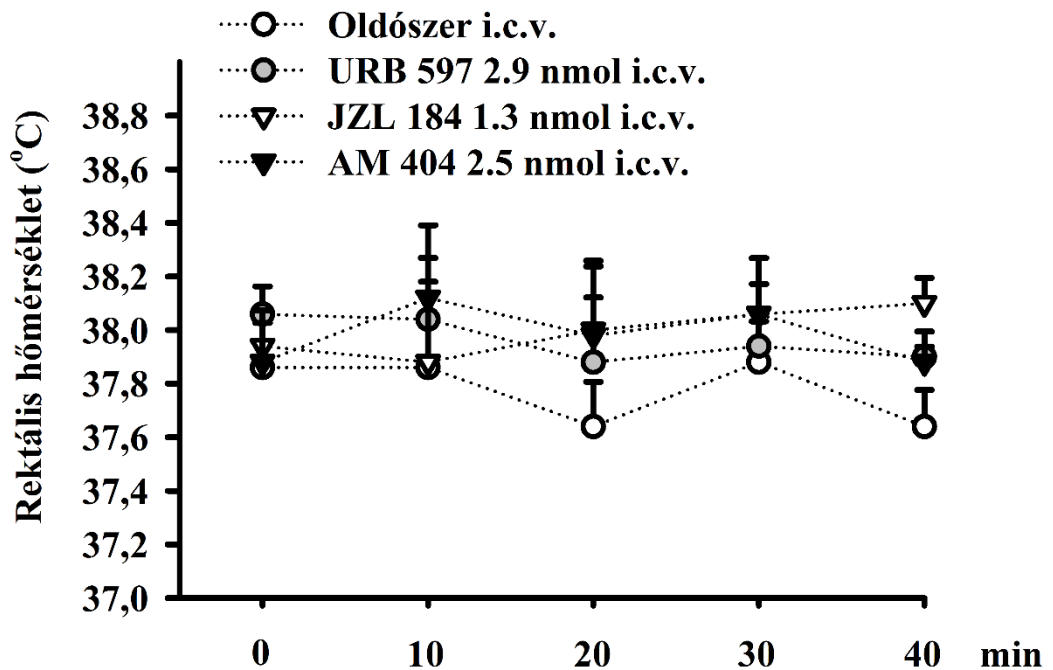
Önmagában i.c.v. adagolt oldószer (70%-os DMSO) nem növelte az állatok immobilitását katalepszia teszten. Centrálisan injektált URB 597 (2.9 nmol i.c.v.), JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.) és AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) gastroprotektív dózisa szintén nem nyújtotta meg szignifikánsan a látenciaidőt (22. ábra).



**22. ábra.** Az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.), a JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.) és az AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) hatása az állatok magatartására. A méréseket 10 percenként végeztük 40 perces időintervallumban. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják, (kétmintás ANOVA, Friedmann-próba, n=5).

### 5.3.10. Az URB 597, JZL 184 és AM 404 hypothermiás hatása

Sem az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.), sem a JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.), sem az AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) nem befolyásolta az állatok rektális hőmérsékletét az i.c.v. injekciót követő 40 percen (23. ábra).



**23. ábra.** Az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.), a JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.) és az AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) hatása az állatok rektális hőmérsékletére. A méréseket 10 perces időközönként végeztük az i.c.v. injekciót követő 40 perces időintervallumban. Az oszlopok a kísérletek során kapott értékek átlagát, és az átlag szórását (S.E.M.) ábrázolják, (kétmintás ANOVA, Friedman próba,  $n=5$ ).

## 6. MEGBESZÉLÉS

### 6.1. Az endocannabinoidok gasztroprotektív hatása

A cannabinoidok savszekréció gátló hatása már régóta ismert. Savfüggő fekélymodelleken bizonyították a  $\Delta^9$ -THC, több szintetikus analóg és endogén ligand gátló hatását a pylorus lekötés, NSAID-ok és stressz-indukálta fekélyek kialakulására perifériás (i.p., p. os, s.c.) adagolás mellett (Dembinski és mtsai, 2006; Germano és mtsai, 2001; Kinsey és Cole, 2013; Rutkowska és Fereniec-Goltbiewska, 2006; Sofia és mtsai, 1978). A hatás mediálásában a perifériás CB<sub>1</sub>-receptorok aktiválásán, és a savszekréció gátlásán kívül valószínűleg részt vesz a mukozális vérátáramlás fokozódása, a sejtproliferáció és DNS szintézis növekedése az epitheliumban és bizonyos proinflammatorikus citokinek, mint az interleukin 1- $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) szintjének csökkentése is (Dembinski és mtsai, 2006). Amint már említettem, az anandamid gasztroprotektív hatását savfüggetlen alkoholos fekélymodellel munkacsoportunk előzetesen bizonyította mind i.v., mind i.c.v. adagolás mellett, mely hatás gátolható volt CB<sub>1</sub>-receptor antagonistával (SR141716A – rimonabant) (Shujaa és mtsai, 2009), nem vizsgálták azonban a hatást mediáló további receptorokat, és perifériás faktorokat.

A 2-AG gasztrointesztinális hatásairól meglehetősen kevés adat áll rendelkezésre, i.c.v. injektálva nem befolyásolta a savszekréciót (Minowa és mtsai, 2005), továbbá intraperitoneálisan adagolva nem gátolta a diclofenac-indukálta fekélyek kialakulását (Kinsey és mtsai, 2011). Ebből mindössze annyi következik, hogy a 2-AG nem rendelkezik savszekréció gátló hatással (mely a cannabinoidok esetében CB<sub>1</sub>-receptor mediált folyamat), ugyanis a NSAID-indukálta fekélyek esetében a léziók kialakulását a fokozott savtermelés okozza. Ugyanakkor a 2-AG szöveti szintje az agyban két, míg a periférián majdnem öt nagyságrenddel nagyobb, mint az anandamidé (Sugiura és mtsai, 1995), ami felvetheti a 2-AG szerepét is a centrálisan indukált mukozális nyálkahártya védelem létrejöttének mediálásában.

Doktori munkám során tehát elsősorban céлом volt bizonyítani a perifériásan (i.v.) és centrálisan (i.c.v.) adagolt 2-AG gyomorvédő hatását savas alkohollal indukált fekélymodellel. Ismét hangsúlyoznám, hogy ezen modell esetében a savas abszolút alkohol direkt nyálkahártyakárosító hatással rendelkezik, mely független a savelválasztástól. Így azon vegyületek esetében, amelyek alkoholos fekélymodellel

bizonyulnak védő hatásúnak, biztosak lehetünk benne, hogy a vegyületeink valamely módon fokozzák a nyálkahártya integritását.

Kísérleteinkben mindkét endocannabinoid, az anandamid (0.28-5.6  $\mu\text{mol}$  i.v. és 2.9-115 nmol i.c.v.) és a 2-AG (1.3-2.6  $\mu\text{mol}$  i.v. és 3.3-52.8 nmol i.c.v.) is markáns gasztroprotektív hatást fejtett ki mind i.v. (69 és 94%), mind i.c.v. (63 és 77%) adagolás során. I.c.v. adagolásnál közel egy nagyságrenddel kisebb dózisok is elegendők voltak ugyanazon mértékű gátlás kiváltásához, noha a 2-AG magasabb dóziséknél (52.8 nmol) a védő hatás eltűnik, a görbe harang alakot vesz fel. I.c.v. adott vegyületek esetében a harang alakú dózis-hatás görbe nem szokatlan, korábbi kísérleteink során is megfigyelhető volt pl. clonidin (Gyires és mtsai, 2000), nociceptin és nocistatin (Zadori és mtsai, 2008) és substance P (Brancati és mtsai, 2013) esetében is. A pontos hatásmechanizmus nem ismert, de elképzelhető, hogy mivel vegyületeinket széles dózistartományban adagoljuk, a nagyobb dózisok (mely a kezdő dózishoz nem ritkán 100- vagy 1000-szerese) elvesztik a szelektivitásukat a gasztroprotektív hatást okozó receptor iránt, és azzal ellentétes folyamatokat indítanak be. Szintén lehetséges magyarázat a cannabinoidok nagyobb dóziséknél megjelenő gátló hatása a gyomor motilitásra (Izzo és mtsai, 1999). Bár az irodalom némiképp megosztó ebben a kérdésben, több prokinetikus szerről kimutatták (pl. metoclopramid), hogy csökkentette a fekélyek kialakulását savfüggő fekélymodellen, mely összefüggésben volt gyomorürülést fokozó hatásával (Gupta és mtsai, 1989). Ezzel ellentétes hatás tehát károsíthatja a mukozális védelmet. Továbbra is kérdéses azonban, hogy míg a 2-AG esetében megfigyelhető a jelenség, az anandamidnál miért nem találkozunk vele? Noha a két endocannabinoid vegyület főbb hatásait a CB<sub>1</sub>- és CB<sub>2</sub>-receptoron fejtik ki, a receptorok iránt mutatott affinitásuk, és komplexebb receptorprofiljuk különböző. Míg az anandamid erős agonista CB<sub>1</sub>-receptoron, és a CB<sub>2</sub>-receptorokhoz csak gyenge kötődést figyelhetünk meg, addig a 2-AG éppen fordítva, kisebb affinitást mutat a CB<sub>1</sub>-receptorokhoz, szemben a markáns CB<sub>2</sub>-agonista hatással. Az anandamid továbbá aktiválja a TRPV1-receptort, és allosztérikusan valószínűleg olyan nemcannabinoid típusú receptorokhoz is kötődhet, mint a glutamát receptorok (GLU<sub>A1</sub> és GLU<sub>A3</sub>), a muszkarinerg M<sub>1</sub>- és M<sub>4</sub> receptor, vagy a szerotonin 5-HT<sub>3</sub> (Pertwee, 2005). Ezen receptoriális hatások, ha kis mértékben is, de befolyásolhatják az anandamid dózis-hatás görbéjét, és okozhatják a harang-görbe elmaradását.

A továbbiakban a két endocannabinoid vegyület gasztroprotektív hatását mediáló receptorokat, és perifériás faktorokat vizsgáltam.

A cannabinoid hatásokat nagyrészt a két cannabinoid receptor (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>) mediálja. A CB<sub>1</sub>-receptor főként az agyban található meg (többek között a gasztrointesztinális traktus szabályozásában legfőbb szerepet játszó dorzál motoros váguszmag és NTS területén) (Munro és mtsai, 1993), a CB<sub>2</sub> pedig perifériásan (Svizenska és mtsai, 2008), legnagyobb részt az immunsejteken, de mindkét receptor megtalálható a gasztrointesztinális traktusban, sőt a gyomor fundusban, corpusban és az antrális területeken nagyobb számban CB<sub>1</sub>-receptorokat írtak le, és limitált a CB<sub>2</sub> prezentációja (Adami és mtsai, 2002; Di Marzo és mtsai, 1994). Ennek megfelelően a cannabinoidok gasztrointesztinális hatásai (savszekréció gátlás, gyomorürülés lassítása, intragasztrikus nyomáscsökkentés) a periférián CB<sub>1</sub>-receptor mediált folyamatok (Adami és mtsai, 2002; Izzo és mtsai, 1999). Az anandamid ezen felül TRPV1-receptorok aktiválásán keresztül is közvetít hatásokat (pl. vazorelaxáció) (Smart és mtsai, 2000; Zygmunt és mtsai, 1999).

Munkám során ezért először a szelektív CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonista AM 251 (1.8 nmol i.c.v.) hatását vizsgáltam a centrálisan injektált anandamid (115 nmol i.c.v.) és 2-AG (6.6 nmol i.c.v.) által indukált gyomorvédelemre. Az AM 251 önmagában adagolva nem befolyásolta az alkoholos fekélyek kialakulását, szignifikánsan gátolta azonban mind az anandamid, mind a 2-AG által kifejtett védő hatást. Az AM 251-től, mint inverz agonistától joggal várhattuk volna, hogy a kontroll csoporthoz képest súlyosbítja a fekélyes elváltozások megjelenését. Itt fontos megmagyaráznunk, hogy inverz agonista aktivitás csak olyan esetekben értelmezhető, amikor az adott receptor fiziológiásan konstitutív aktivitással rendelkezik. A cannabinoid rendszernek például nincs tónusos hatása a gyomor motoros funkcióira, sem CB<sub>1</sub>- sem CB<sub>2</sub>-receptor inverz agonisták nem befolyásolták ugyanis a gyomorürülést (Izzo és mtsai, 1999). Az utóbbi években azonban számos cannabinoid receptor antagonistának leírt vegyületről derült ki, hogy valójában inverz agonista aktivitással rendelkezik (pl. AM 281, AM 1387, SR141716A) (Tallett és mtsai, 2007). Amennyiben a receptor agonista jelenléte nélkül nem képes aktív konformációt felvenni, az inverz agonista neutrális antagonistaként fog viselkedni, így érthető, hogy az AM 251 önmagában nem súlyosbítja a fekélyek kialakulását.

Az anandamid esetében az irodalmi adatoknak megfelelően a TRPV1-receptor antagonistá capsazepin (2.6 nmol i.c.v.) hatását is vizsgáltam. Az AM 251 és a capsazepin is szignifikánsan felfüggesztette az anandamid védő hatását, valamint az AM 251 a 2-AG által kifejtett védelmet is gátolta, mely alapján elmondhatjuk, hogy az anandamid védő hatását centrálisan CB<sub>1</sub>- és TRPV1-receptorokon fejté ki, míg a 2-AG hatását főként CB<sub>1</sub>-receptorok mediálják. Alapvetően az irodalom nem tulajdonít TRPV1-receptor mediált hatásokat a 2-AG-nek, de az utóbbi években több olyan tanulmány jelent meg, amely sejtvonalakon bizonyította a 2-AG és a TRPV1-receptorok kölcsönhatását is (Petrosino és mtsai, 2016; Zygmunt és mtsai, 2013), ezért további kísérletek szükségesek, melyek kizárják ezen receptorok részvételét a 2-AG által mediált hatásban.

A CB<sub>2</sub>-receptorok szerepe a gasztrointesztinális nyálkahártya védelemben még nem teljeskörűen tisztázott. Salaga és mtsai kísérleteiben perifériásan (p. os) adagolt szelektív CB<sub>2</sub>-receptor ligand (A 836339) szignifikánsan gátolta mind alkoholos fekély, mind NSAID (diclofenac) indukálta fekélyek kialakulását, mely hatás gátolható volt szelektív CB<sub>2</sub>-receptor antagonistá (AM 630) ip. adagolásával (Salaga és mtsai, 2017). Ez az eredmény igazolja a CB<sub>2</sub>-receptorok szerepét a gyomor nyálkahártya védelemben, nem válaszolja meg azonban, hogy centrális és/vagy perifériás receptorok aktiválása vesz-e részt a folyamatban. Előzetes kísérleteink i.c.v. adagolt szelektív CB<sub>2</sub>-receptor antagonistával (AM 630) a centrális receptorok szerepét valószínűsítik, de ennek egyértelműsítéséhez mindenképpen további vizsgálatokra van szükség.

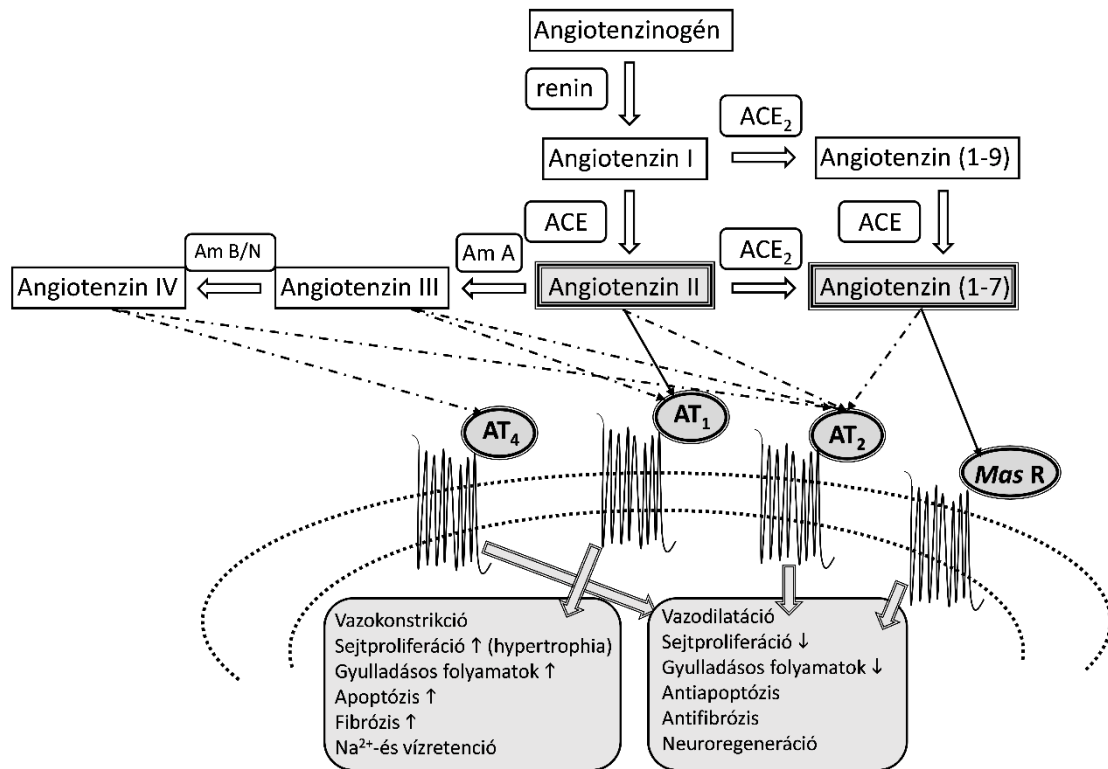
A mukozális védelem perifériás kulcsvegyülete a CGRP, amely NO-felszabadításon keresztül erőteljesen fokozza a mukozális mikrocirkulációt és a mucinelválasztást, valamint csökkenti a savszekréciót (Holzer és mtsai, 1991; Lambrecht és mtsai, 1993). Savas alkohol radikálisan csökkentette a nyálkahártya CGRP-szintjét (1.35 fmol/mg-ról 0.25 fmol/mg-ra), mely oka és következménye is lehet a léziók kialakulásának. Az erodált szövetben ugyanis sérül a mikrocirkuláció, mely elengedhetetlen a károsító ágens eltávolításához, és hígításához, valamint az oxigén, tápanyagok és védő faktorok (mint a CGRP) szállításához, amely a szövet regenerálódását elősegítené. Mind az anandamid (58 nmol i.c.v.), mind a 2-AG (26.4 nmol) szignifikánsan, közel a kontroll értékre emelte a csökkent CGRP-szintet (1.2 és 1.15 fmol/mg-ra), mely folyamat biztosan szerepet játszik a vegyületek védőhatásában. Több irodalmi adat leírja továbbá az anandamid vazorelaxáns hatását, ami nem befolyásolható CB<sub>1</sub>-receptor antagonistával, gátolható



azonban a TRPV1-receptor gátló capsazepinnel, az anandamid CGRP-felszabadító hatásában tehát valószínűsíthetően részt vesz a TRPV1-receptor aktiváció is (Jarai és mtsai, 1999; Zygmunt és mtsai, 1999).

## **6.2. A CB<sub>1</sub>-receptorok AT<sub>1</sub>-receptorok általi aktivációjának vizsgálata**

Doktori munkám során szintén vizsgáltam a CB<sub>1</sub>-receptorok parakrin transzaktivációját Ang II-vel, mely a renin-angiotenzin rendszer kulcsvegyülete, hatását AT<sub>1</sub>-receptorokon keresztül fejti ki. A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) a szervezetben alapvető szerepet tölt be a vérnyomás, só-és folyadékháztartás szabályozásában. Röviden összefoglalva a vese juxtaglomeruláris apparátusából felszabaduló renin az angiotenzinogént hasítja angiotenzin I-re, amelyből az angiotenzin konvertáló enzim (ACE) katalizálta folyamat során angiotenzin II (Ang II) keletkezik. Az ACE másik szubtypusa, az ACE<sub>2</sub> más végtermékeket eredményez, az Ang I-ből angiotenzin (1-9), míg az Ang II-ből angiotenzin (1-7) keletkezik. Az Ang II erős vazokonstriktor, mely hatást a G<sub>q/11</sub>-fehérje kapcsolt angiotenzin 1-receptoron (AT<sub>1</sub>) keresztül fejti ki. Szintén AT<sub>1</sub>-receptoron keresztül növeli az aldoszteron elválasztást, mely folyadék-és só retencióhoz vezet a vesében (Garg és mtsai, 2012) (a RAAS hatásai természetesen ennél szerteágazóbbak, további bomlástermékek (pl. angiotenzin III, IV), és további receptorok (AT<sub>2</sub>, AT<sub>4</sub>, Mas receptor) közvetítenek szervrendszertől függően egymásnak akár ellentmondó hatásokat is (vazokonstriktió/dilatáció, gyulladásgátló/gyulladásos folyamatokat serkentő hatás, stb.) (lsd. 24. ábra).



**24. ábra.** A renin-angiotenzin rendszer sematikus ábrája. Az ábrán található rövidítések: ACE: angiotenzin konvertáló enzim,  $AT_{1,2,4}$ : Angiotenzin II receptor 1,2 és 4-es szubtypus, Am A, B/N: Aminopeptidáz enzim A és B/N szubtypus.

A RAAS komponensei nem csak a vesében találhatóak meg, a szív, a máj, a hasnyálmirigy is expresszálják a renint, az Ang II-t és az ACE-t, sőt az utóbbi évek kutatásai arra engednek következtetni, hogy a bőr és nyálkahártyák felületén egy ún. lokális RAAS is megtalálható, mely az adott szerv szöveti homeosztázisáért felel (Garg és mtsai, 2012). Az agyban szintén expresszálódik a renin, angiotenzinogén, Ang II, Ang III, Ang IV, Ang (1-7),  $AT_1$ ,  $AT_2$ , és  $AT_4$  receptorok, melyek összeségében az ún. centrális renin-angiotenzin-aldoszteron rendszert alkotják. A centrális RAAS részt vesz a szimpatikus tónus, a baroreflex aktiváció és a stresszválasz szabályozásában, így közrejátszik több stressz indukálta kardiovaszkuláris rendellenesség, mint a neurogén hipertenzió, cerebrovaszkuláris ischémia, szív megnagyobbodással járó kórképek (pl. bal kamra hypertrophia) kialakulásában (Mascolo és mtsai, 2017; Phillips és de Oliveira, 2008), valamint valószínűleg szerepet játszhat egyes központi idegrendszeri folyamatok (kognitív funkciók, tanulási folyamatok), illetve rendellenességek (Alzheimer kór, Parkinson kór, szorongásos kórképek, depresszió) patofiziológiájában (Mascolo és mtsai,

2017). A tartós stressz háttérében a hypothalamus-hipofízis-mellékvese tengely fokozott aktivitása, és a szimpatikus-szenzoros idegrendszeri aktivitás áll, mely emelkedett kortizol és catecholamin (noradrenalin, adrenalin) szintekkel jár. Ebben a folyamatban fontos szerep jut a centrális RAAS-nak, illetve az Ang II-nek, amely AT<sub>1</sub>-receptorokon keresztül sejtkárosító folyamatokat indít el, upregulálja az adhézis molekulák (P-selectin, intracelluláris adhézis molekula-1 ICAM-1, vaszkuláris sejtadhézis molekula-1 VCAM-1) és gyulladáscsökkentő citokinek (interleukinek, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B) expresszióját, fokozza a kemotaxis (Ruiz-Ortega és mtsai, 2001). Az előbbieken leírtak szerint láthatjuk, hogy a stressz nem csupán kardiovaszkuláris rendellenességeket indukálhat, de gátolja a gyomor nyálkahártya mikrocirkulációját, fokozza a hízósejt degranulációt, a leukocita aktivációt, a szabadgyök képződést, ezáltal csökkenti a gyomor nyálkahártya integritását, amely léziók, fekélyek kialakulásához vezet (Brzozowski, 2014). A gyomorban is megtalálhatóak a RAAS komponensei, a renin, az angiotenzinogén, és az AT<sub>1</sub>-és AT<sub>2</sub> receptorok a lamina propria mesenchymalis őssejtein és az érendothelsejteken, a 2 receptor továbbá a gyomor nyálkahártya endothelsejtjein is. ACE enzimet az érendothelsejteken, és a gyomor antrális részén található mucin elválasztásért felelős sejteken találhatunk (Hallersund és mtsai, 2011). A gyomor gyulladáscsökkentő kórképeinek patofiziológiájában a lokális RAAS részvétele is valószínűsíthető, emelkedett AT<sub>1</sub> expressziót mutattak ki ugyanis *H. pylori* pozitív páciensek esetében (Hallersund és mtsai, 2011). Érdekes megfigyelés, hogy alacsony dózisu (100 mg) aspirinnel kezelt betegeket vizsgálva szignifikánsan magasabb számban fordul elő vérzéses komplikáció azoknál, akik az angiotenzinogén (AGT) egy bizonyos génmutációját (AGT-20CC genotípus) hordozzák (Shiotani és mtsai, 2011). Továbbá candesartannal (AT<sub>1</sub>-receptor blokkoló) előkezelt patkányokon végzett ischemia-reperfúziós (I/R) kísérletekben csökkent a gyomor nyálkahártya I/R okozta indukálható NOS aktivitása és a neutrofil infiltráció (Gemici és mtsai, 2010). Szintén candesartannal előkezelt, hideg helyen immobilizált (cold restraint stress model) spontán hipertenzív patkányok gyomor nyálkahártyáját vizsgálták Bregonzio és mtsai, az AT<sub>1</sub> gátlása növelte a gyomor nyálkahártya mikrocirkulációját, markánsan csökkentette a stressz okozta fekélyek kialakulását, a TNF- $\alpha$  és ICAM-1 szöveti szintjét, nem befolyásolta azonban a megnövekedett mellékvese kortizol-szintet, ezáltal valószínűsítve, hogy az Ang II nyálkahártya károsító hatása sejt szintű folyamat (Bregonzio és mtsai, 2004). Nem csak

az AT<sub>1</sub>-receptor blokkolók, de a renin antagonisták aliskiren is gasztroprotektív hatásúnak bizonyult indomethacin okozta fekély-modellen. Csökkentette az indomethacin hatására megnövekedett TNF- $\alpha$ , COX-1 és COX-2 szöveti szinteket, és növelte a PGE<sub>2</sub>-szintet (Haliczky és mtsai, 2016).

Az Ang II-nek azonban nem csak gyomornyálkahártya károsító, de gasztroprotektív hatását is leírták I/R modellen. Centrálisan, közvetlenül a PVN-ba mikroinjektálva (3-300 ng) szignifikánsan növelte a mikrocirkulációt, és csökkentette a nyálkahártya NF- $\kappa$ B szintjét, mely folyamat az AT<sub>1</sub>-receptor blokkoló losartannal gátolható volt (Zhang és mtsai, 2008). A nukleáris faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) egy transzkripciós faktor, mely fontos szerepet tölt be a stressz által kiváltott gyulladás patomechanizmusában, az apoptotikus folyamatok elindításában. Az inaktív NF- $\kappa$ B egy gátló fehérjéhez, az I $\kappa$ B-hoz köt, melynek expressziója a mukozában Ang II PVN mikroinjektálásának következtében megnő, így csökken a szabad NF- $\kappa$ B szöveti koncentrációja (Zhang és mtsai, 2008). Ez az eredmény felveti a centrális AT<sub>1</sub>-receptorok szerepét a perifériás gasztroprotektívban.

Kísérleteinkben centrálisan injektált angiotenzin II (Ang II) (2.9-956 pmol i.c.v.) szignifikáns védelmet hozott létre alkoholos fekélymodellen. A hatás maximuma (78%-os védelem) már rendkívül alacsony, pikomoláris nagyságrendnél jelentkezett, azonban nagyobb dózisoknál a védőhatás megszűnt (a dózis-hatás görbe harang alakú). Könnyen elképzelhető tehát, hogy az Ang II magasabb dóziséknél az előbbieken leírt nyálkahártya károsító hatás lép életbe.

Teóriánk, miszerint az Ang II gasztroprotektív hatásában részt vesz a cannabinoid rendszer aktiválása irodalmi adatokon alapult. Több G<sub>q/11</sub>-fehérje kapcsolt receptor kapcsán leírták ugyanis, hogy képes a CB<sub>1</sub>-receptor parakrin aktivációjára. Metabotróp glutamát receptorok (mGlu1) CB<sub>1</sub>-receptorokon keresztül gátolták a preszinaptikus excitatorikus kisagyi kúszórostok aktivációját (Maejima és mtsai, 2001), továbbá a CCK CCK-2 receptorokon keresztül endocannabinoid-függő mechanizmussal szabályozza a hippocampális piramis sejtek GABAerg információit (Foldy és mtsai, 2007). *In vitro* kísérletekben NIH3T3 sejteken figyeltek meg 2-AG felszabadulást, mely szerotonin 5-HT<sub>2A</sub>-receptorok PLC-függő hatásának eredménye volt (Parrish és Nichols, 2006), valamint CHO sejteken leírták az angiotenzin AT<sub>1</sub>-receptorainak kölcsönhatását CB<sub>1</sub>-receptorokkal, mely folyamat gátolható volt a DAGL enzim antagonistá THL preinkubációjával (Turu és mtsai, 2007).

A 2-arachidonoyl glicerol szintézisében fontos szerepet játszik a foszfolipáz C (PLC) enzim, amelynek stimulálása többek között a  $G_{q/11}$  protein kapcsolt transzmembrán receptorok aktiválásának eredménye. Az aktivált PLC a foszfatidil-inozitol (4,5) biszfoszfátot (PIP2) hasítja inozitol-trifoszfátra (IP3) és diacylglycerolra (DAG), amelyből a DAG-lipáz (DAGL) enzimatis közreműködésével 2-AG keletkezik (Bisogno és mtsai, 1997; Di Marzo és mtsai, 1996b). Összefoglalva tehát az Ang II  $AT_1$ -receptor aktiválásával indirekt módon, a DAG koncentráció növelésével fokozza a 2-AG szintézisét, amely ezután  $CB_1$ -receptorokon fejti ki gasztroprotektív hatását.

Teóriánk alátámasztására alkalmaztuk a szelektív  $AT_1$ -receptor antagonistá candesartant (5.2 és 31.7 nmol i.c.v.), valamint a  $CB_1$ -szelektív antagonistá AM 251-et (1.8 nmol i.c.v.), mindkét vegyület szignifikánsan felfüggesztette az Ang II által kifejtett védelmet, mely bizonyítja a  $CB_1$ -receptorok  $AT_1$ -receptorok általi aktivációját. Szintén szignifikánsan gátolta az Ang II hatását a DAGL gátló tetrahydrolipstatin (THL) (0.2 nmol i.c.v.). Mivel a DAGL a 2-AG szintéziséhez elengedhetetlen enzim, így a THL gátló hatása 2-AG-mediált folyamatot jelez. Ez az eredmény egybevá g Turu és munkacsoportja kísérleteivel, ahol CHO sejteken az  $AT_1$ -receptor által kiváltott  $CB_1$ -receptor aktiváció gátolható volt THL preinkubációjával (Turu és mtsai, 2007).

Doktori munkám során, mivel vegyületeinket legnagyobb részt centrálisan (i.c.v.) adagoltuk fontos kérdés volt annak tisztázása, hogy milyen útvonalon befolyásolja egy centrális receptor a perifériás nyálkahártya integritást. Amint az előzőekben kifejtettem a dorzális vágusz komplex (DVC) és a vágusz szerepe a centrálisan indukált gyomorvédelemben elengedhetetlen. Ezt bizonyítja, hogy bilaterális cervikális vagotómia és/vagy atropin felfüggesztette többek között az adrenomedullin, amylin, opioid peptidek ( $\beta$ -endorfin, enkefalinok), SP, nociceptin, nocistatin és az agmatin védő hatását (Brancati és mtsai, 2013; Guidobono és mtsai, 1998; Gyires és Ronai, 2001; Kaneko és mtsai, 1998; Zadori és mtsai, 2008; Zadori és mtsai, 2014). Az Ang II centrálisan indukált bradikardiás hatásában is fontos szerepet játszik a DVC, közvetlenül a dorzál motoros váguszmagba, illetve a nucleus tractus solitarii ventrális szegmensébe mikroinjektált femtomoláros mennyiségű Ang II ugyanis szignifikánsan csökkentette mind a vérnyomást, mind a pulzusszámot patkányon, mely hatás felfüggeszthető volt mind metilatropinnal, mind bilaterális cervikális vagotómiával (Diz és mtsai, 1984). Szintén bradikardiás hatást fejtett ki a nucleus tractus solitariiba mikroinjektálva egy endogén angiotenzin, az angiotenzin

(1-12), melyet proangiotenzin-12-nek is szoktak nevezni, a periférián ugyanis gyors reakcióban alakul Ang II-vé (Chitravanshi és Sapru, 2011). A hatás gátolható volt bilaterális cervikális vagotómiával, és szelektív AT<sub>1</sub>-receptor blokkolók (L-158.809 és ZD-7155) mikroinjektálásával, nem befolyásolta azonban centrálisan injektált AT<sub>2</sub>-receptor blokkoló (PD-123319) (Chitravanshi és Sapru, 2011). A centrális AT<sub>1</sub>-receptorok szerepét bizonyítja továbbá a kardiovaszkuláris funkciók és viszceroszenzoros területről érkező információk szabályozásában, hogy igen magas denzitásban található meg a cirkumventrikuláris szervek (pl. area postrema, szubfornikális szerv) és a hypothalamikus paraventriculáris mag (PVN), illetve a dorzális vágusz komplexben a nucleus tractus solitarii (NTS) területén (Molinari és mtsai, 2003). Érdekes megfigyelés, hogy a gasztroprotektív hatáshoz hasonlóan az Ang II NTS-n keresztül kifejtett kardiovaszkuláris hatásai is bifázisosak. Alacsony (0.5 fmol) dózisban csökkenti a vérnyomást és bradikardiát okoz, míg magasabb dózis (500-5000 fmol) hipertenzív és tachikard hatást idéz elő (Mosqueda-Garcia és mtsai, 1990; Tseng és mtsai, 1994).

Kísérleteinkben ezért vizsgáltuk mind a vagotómia, mind az atropin (1 mg/kg i.v.) hatását az i.c.v. adagolt Ang II által kifejtett gyomorvédelemre, mely mindkét komponens szignifikánsan felfüggesztette az Ang II által indukált védelmet, ismét bizonyítva, hogy a perifériás nyálkahártya védelem centrálisan a DVC-által mediált útvonalon aktiválódik.

Az általam vizsgált faktorokon kívül kérdéses, hogy a RAAS másik komponense(i) nem vesznek e részt az Ang II által kiváltott gasztroprotektióban. Például, míg az Ang II gasztroprotektív szerepe az irodalomban még nem teljesen tisztázott (gyomornyálkahártya károsító, de védő hatását is leírták), egyre több eredmény jelenik meg a RAAS egy másik vegyülete, az angiotenzin (1-7) gasztroprotektív hatásáról. Az Ang (1-7) az angiotenzin II metabolitja, mely az ACE<sub>2</sub> enzim közreműködésével keletkezik, és hatásait egy G-protein kapcsolt receptoron, a Mas receptoron fejti ki. Az Ang (1-7) az Ang II-vel ellentétben vazodilatátor hatású, és i.p. adagolva szignifikánsan csökkentette a stressz-indukálta gasztrointesztinális léziók kialakulását azáltal, hogy növelte a gyomor nyálkahártya vérátáramlását (Brzozowski, 2014). Ez a hatás gátolható volt mind Mas-receptor antagonistával (A-779), mind LNNA-val (NOS aktivitás gátló), valamint indomethacinnal (szelektív COX-1 gátló) és rofecoxibbal (szelektív COX-2 antagonistá) is, mely bizonyítja, hogy az Ang (1-7) vazodilatátor hatását Mas receptoron keresztül fejti ki, azáltal, hogy növeli a nitrogén-monoxid szintáz aktivitását, és a

következetes NO-produkciót, valamint fokozza a PGE<sub>2</sub> felszabadulást (Brzozowski, 2014; Jaiswal és mtsai, 1993). Krónikusan (1 hétig) i.c.v. adagolt Ang (1-7) (0.11-1.1 nmol/L) továbbá dóziszfüggően csökkentette a gasztrointesztinális léziók kialakulását CRS modellen, mely folyamat szintén gátolható volt A-779-el (Mas-receptor antagonist) (Zhu és mtsai, 2014). Hatásában szerepet játszik az antioxidáns enzimek aktivitásának fokozása, és a sósav produkció csökkentése, szignifikánsan emelte ugyanis a stressz hatására lecsökkent kataláz és szuperoxid-dizmutáz szinteket, valamint csökkentette a H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-áz (protonpumpa) aktivitását, amely a gyomor sósavelváltásáért felelős enzim. Úgy tűnik, hogy az Ang (1-7) a stresszfékélyek neurohormonális szabályozásában is részt vesz azáltal, hogy csökkenti egyes neurotranszmitterek (noradrenalin, dopamin, szerotonin) és az Ang II stressz hatására megnövekedett szintjét mind a plazmában, mind az agy egyes területein (hypothalamus, hippocampus, prefrontális kéreg) (Zhu és mtsai, 2014). Szintén gasztroprotektívnek bizonyult a diminazén-acetát (Dize) nevű anyag, mely az ACE<sub>2</sub> aktiválásával fokozza az Ang (1-7) szintjét. Periférisan adagolt Dize (0.7-20 mg/kg p.os) dóziszfüggően, szignifikánsan gátolta az alkoholos léziók kialakulását, és csökkentette bizonyos gyulladáshoz vezető citokinek (TNF- $\alpha$ , IL-6) megnövekedett szintjét (Souza és mtsai, 2016). Az Ang (1-7) szerteágazó hatásait tekintve szintén többféle szignáltranszdukciós folyamat elindításában szerepet játszhat, melyek között a G<sub>q/11</sub> protein kapcsolt útvonal is szerepel. Ezen okból, illetve a fent tárgyalt gasztroprotektív hatásait tekintve a későbbiekben érdekes lehet számunkra annak vizsgálata, hogy létrejön-e az angiotenzin (1-7) és a cannabinoid rendszer G<sub>q/11</sub>-receptor mediált aktivációja akut i.c.v. injektálás esetén alkoholos fekélymodellen, illetve, hogy Ang II injektálása esetén befolyásolja-e Mas-receptor antagonist a hatás létrejöttét, amely bizonyítaná az Ang (1-7) szerepét a folyamatban.

Eredményeim abból a szempontból is érdekesek lehetnek, hogy a bevezetőben ismertetett klasszikus endogén cannabinoid szint emelésén felül (a metabolizáló enzimek – FAAH, MAGL gátlása, anandamid visszavétel gátlás), a CB<sub>1</sub>-receptorok parakrin aktiválása egy másik indirekt útvonalon képes aktiválni az endocannabinoid rendszert, illetve növelni a 2-AG endogén szintjét. Érdekes volna vizsgálni, hogy ebben az esetben is elmaradnak-e a cannabimimetikus mellékhatások, és amennyiben igen, úgy kiaknázni a parakrin aktiváció előnyeit, főként mivel a közelmúltban FAAH gátlóval végzett humán fázis I kísérletek során súlyos mellékhatás jelentkezett (letális kimenetelű neurológiai

károsodás), amely mindenképp felveti ezen vegyületek biztonságos klinikai alkalmazásának aggályait (Mallet és mtsai, 2016).

Továbbá az angiotenzin-endocannabinoid rendszer kapcsolatának bizonyítása fontos információ lehet a veseműködés (pato)fiziológiájának szempontjából is. Az ugyanis régóta ismert, hogy az Ang II az aldosteron elválasztás szabályozásával befolyásolja a vese működését, a szervezet folyadék-és sóháztartását. Az utóbbi évek kutatásai azonban arra engednek következtetni, hogy a cannabinoid rendszer is fontos szerepet tölthet be a vese fiziológiás (és akár patológiás) működésében. CB<sub>1</sub>-receptorokat leírtak a proximális és disztális kanyarultatos csatornában, a gyűjtőcsatornában, és a köztesséjteken (Larrinaga és mtsai, 2010). CB<sub>2</sub>-receptorok találhatóak a proximális tubulusban, és a glomerulus mesangiális sejtjein (Jenkin és mtsai, 2013). In vitro patkány juxtamedulláris preparátumon vizsgálva, az anandamid NO-mediált útvonalon vazodilatációt okozott mind az afferens, mind az efferens glomeruláris arteriolákon, ezáltal növelte a vese vérátáramlását (Deutsch és mtsai, 1997). In vivo vizsgálatokban a vesemedencébe infundálva gyors diuretikus hatást hozott létre CB<sub>1</sub>-mediált útvonalon (Li és Wang, 2006), továbbá fehérjevizelést (albuminúria) állapítottak meg szelektív CB<sub>1</sub>-receptor agonistával (WIN55,212-2) kezelt patkányok esetében (Hsu és mtsai, 2015). Szelektív CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonista (AM 251 ill. JD 5037) vegyület krónikus adagolása viszont kémiai indukált diabéteszes nefropátia modellen egérben és patkányon is csökkentette az albuminúriát, és javította a vesefunkciót (Barutta és mtsai, 2010; Jourdan és mtsai, 2014). CB<sub>2</sub>-receptor agonista (AM 1241) szintén csökkentette a vizelet albuminszintjét és a Na<sup>+</sup>-kiválasztást, valamint különböző fibrotikus markerek (TNF-β, VEGF, collagen IV) génexpresszióját obezitás-eredetű diabéteszes nefropátia modellen patkányon (Jenkin és mtsai, 2016). Krónikus veseelégtelenségben tehát elmondhatjuk, hogy a CB<sub>1</sub>-receptorialis hatások gátlása, és a CB<sub>2</sub>-receptorok aktiválása jelenthet terápiás lehetőséget (Park és mtsai, 2017). Akut veseelégtelenségben (*Acute Kidney Injury*, AKI) az eredmények kevésbé egyértelműek, valószínűleg függenek az adott modelltől is. Ischemia/reperfúziós (I/R) modellben CB<sub>1</sub>-és CB<sub>2</sub>-agonista is gátolta a tubuláris károsodást egéren (Feizi és mtsai, 2008). Cisplatin-indukált akut veseelégtelenségben azonban szintén a krónikushoz hasonló eredményeket kaptak: CB<sub>1</sub>-receptorok gátlása és/vagy CB<sub>2</sub>-receptorok aktiválása bizonyult protektívnek a tubuláris károsodással szemben. A CB<sub>1</sub>-receptor aktiváció fokozta a reaktív oxigén gyökök keletkezését, mely



az NF- $\kappa$ B transzkripciójának fokozásával, vagy a p38/MAPK/JNK útvonal aktivációjával indítja be az apoptotikus folyamatokat. Ezzel szemben a CB<sub>2</sub>-receptor aktiváció antiapoptotikus hatással rendelkezik azáltal, hogy csökkenti a leukocita infiltrációt és a gyulladásos citokinek expresszióját (Mukhopadhyay és mtsai, 2010a; Mukhopadhyay és mtsai, 2010b). Noha rágcésálókban sem a CB<sub>1</sub>- sem a CB<sub>2</sub>-receptorok mRNS-ének átírásában nem mutatkozott változás akut veseelégtelenségben, egér bilaterális I/R modellen nézve szignifikánsan nőtt a 2-AG szintje a vesében. Moradi és munkacsoportja a MAGL enzim gátlásával (JZL 184) emelte a 2-AG szintjét, mely csökkentette a veseelégtelenségben megnövekedett szérum kreatinin szintet, és csökkentette a tubuláris károsodás mértékét, azonban a pontos hatásmechanizmust nem tisztázták (Moradi és mtsai, 2016).

A klasszikus cannabinoidok ( $\Delta^9$ -THC és szintetikus analógjai) terápiás felhasználását akut/krónikus veseelégtelenségben mindenképpen limitálja erős CB<sub>1</sub>-receptor kötődésük. Amerikában számos jelentés beszámol szintetikus cannabinoid fogyasztás után fellépő akut veseelégtelenségről (bár ezek nagy részénél az utcáról beszerzett anyagról van szó, melynél nincsenek bevizsgálva az egyéb nemicannabinoid szennyező vegyületek). Egy 31 tanulmányt felölelő áttekintés azonban, amely kísérletekben szigorúan orvosi marihuánát fogyasztottak a páciensek átlagosan 2 hétig, nem talál összefüggést a veseelégtelenség és a cannabisfogyasztás között (nem voltak komolyabb mellékhatások, nem fordult elő akut veseelégtelenség, és csak egy esetben jelentettek vérvizelést). Krónikus fogyasztás esetén, egy 647 páciensből álló kohorszot 7 évig követve, valamelyest emelkedik a rizikója a veseelégtelenség kialakulásának a marihuánát fogyasztók csoportjában, így maga az anyanövény nem javasolható a veseműködés helyreállítására (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2013; Moradi és mtsai, 2016; Vupputuri és mtsai, 2004; Wang és mtsai, 2008). Azonban az előbbieken bemutatott angiotenzin-cannabinoid transzaktiváció érdekes alternatíva lehet. Az Ang II G<sub>q/11</sub> – PLC $\beta$  – DAGL útvonalon fokozza a 2-AG bioszintézisét, mely erős agonistája a CB<sub>2</sub>-receptoroknak, melyek aktiválása protektív hatást válthat ki a tubuláris károsodással szemben mind akut, mind krónikus veseelégtelenségben.

### 6.3. Az endogén cannabinoid szint emelők hatása a gyomorvédelemre

Doktori munkám legfontosabb pontja az endogén cannabinoid szint emelők hatásának vizsgálata volt. Az elmúlt években sikerrel alkalmaztak FAAH-és MAGL gátló vegyületeket a fájdalomcsillapítás és gyulladáscsökkentés területén állatkísérletes modelleken, továbbá mind az URB 597 (FAAH-gátló), mind a JZL 184 (MAGL-gátló) hatékonynak bizonyultak savelválasztás függő (NSAID indomethacin-indukálta) fekélymodellen a léziók kialakulásának csökkentésében perifériás adagolás mellett (Fowler, 2015). Mindkét vegyület esetében CB<sub>1</sub> (-/-) knockout egéren végzett vizsgálatokkal bizonyították a CB<sub>1</sub>-receptor elengedhetetlen szerepét a folyamat mediálásában, míg a JZL 184 esetén kimutatták az indomethacin hatására megnövekedett gyulladáshoz vezető mediátorok (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ) szintjének szignifikáns csökkenését is (Kinsey és mtsai, 2011; Naidu és mtsai, 2010).

Az anandamid visszavétel gátló vegyületekről kevesebb adat áll rendelkezésre, bár a VDM11-ről leírták, hogy a FAAH-és MAGL gátlók mellett szintén csökkenti a gyulladáshoz vezető értékeket TNBS-indukálta colitis modellen (Alhouayek és mtsai, 2011), nem vizsgálták a hatását sem savfüggő, sem savfüggetlen fekélymodelleken.

Munkám során 3 endogén cannabinoid szint emelő vegyület hatásait vizsgáltam centrális és perifériás adagolás során, alkoholos fekélymodellen: a szelektív FAAH-gátló URB 597-ét, mely az anandamid endogén szintjét növeli, a MAGL-gátló JZL 184-ét, mely a 2-AG szintjének növekedéséért felel és az anandamid szinaptikus visszavételét gátló AM 404-ét. Intracerebroventrikuláris adagolás során mind az URB 597 (0.6-88.5 nmol i.c.v.), mind a JZL 184 (0.3-2.7 nmol i.c.v.), valamint az anandamid-uptake gátló AM 404 (0.5-25 nmol i.c.v.) dózisfüggően, közel azonos hatáserősséggel gátolta az alkoholos léziók kialakulását. Az intraperitoneális adagolás során elért hatás maximumai szintén közel azonosak voltak a 3 vegyület esetében: URB 597 (2.9-11.8  $\mu$ mol/kg i.p.) 90%, JZL 184 (9.6-19.2  $\mu$ mol/kg i.p.) 90% és az AM 404 (1.5-15  $\mu$ mol/kg i.p.) 88%. Érdekes megfigyelni, hogy míg centrálisan az effektív dózisértékek nanomoláros nagyságrendűek (1.4; 0.4; 1.05 nmol), perifériás adagolásnál  $\mu$ mol-os koncentrációban érik el ugyanazon hatáserősséget (3.86; 9.7; 2.9  $\mu$ mol). I.c.v. adagolás során az endogén szint emelők nagyobb dózisainál szintén a hatás csökkenését figyelhetjük meg, a 2-AG és Ang II esetében is jelentkező harang alakú dózis-hatás görbe jellemző. Kérdésként felmerülhet, hogy míg az anandamid dózis-hatás görbéje nem harang alakú, mind az URB

597, mind az AM 404 (melyek az anandamid endogén szintjét emelik) esetében megfigyelhető a magasabb dózisoknál a hatás csökkenés. Ez magyarázható azzal, hogy sem az URB 597, sem az AM 404 nem szelektív ligand. Az URB 597 hat a MAGL enzimre, de szubsztrátja egyéb karboxil-észterázoknak is, míg az AM 404 közvetlen agonistája a TRPV1-receptornak, és kötődik a FAAH enzimhez. Elképzelhető tehát, hogy az általuk létrehozott indirekt anandamid-szint emelés nem követi lineárisan a dózis emelkedését. Továbbá perifériás (i.p.) adagolás során sem jelenik meg a harang-alakú dózis-hatás görbe, melynek oka lehet, hogy az általunk i.p. adagolt dózistartomány az i.c.v.-nél sokkal szűkebb (i.p. kb. 4-10-szeres, míg i.c.v. 10-150-szeres), azaz nem alkalmazunk az effektív dózisonál jóval magasabb dózisokat, melyeknél a vegyületek esetlegesen elveszítik szelektivitásukat.

Szintén vizsgáltuk a hatást mediáló receptorokat.

Az irodalmi adatoknak megfelelően a FAAH-és MAGL-gátló vegyületek CB<sub>1</sub>-receptoron fejtették ki hatásukat, ugyanis mind az i.c.v., mind az i.p. adagolásuk során kifejtett védelem gátolható volt centrálisan adagolt CB<sub>1</sub>-receptor inverz agonistával (AM 251 1.8-3.6 nmol i.c.v.).

Az anandamid kötődik a TRPV1-receptorokhoz is (Zygmunt és mtsai, 1999). Mivel a FAAH-gátló URB 597 az anandamid endogén szintjét növeli, vizsgáltuk a TRPV1-receptor antagonistá capsazepin hatását az URB 597 által kifejtett védelemre. A capsazepin (2.6 nmol i.c.v.) centrális adagolásnál szignifikánsan gátolta az URB 597 (2.9 nmol i.c.v.) által létrehozott gasztroprotektív alkoholos fekélymodellen, így indirekt módon is igazoltuk, hogy az anandamid gasztroprotektív hatásában a CB<sub>1</sub>-receptorok mellett TRPV1-receptorok is részt vesznek.

Az anandamid visszavétel gátló AM 404 esetében az eredmények kissé ellentmondásosak, ugyanis az AM 404 centrális adagolása során a szintén centrálisan adott AM 251 valamelyest csökkentette ugyan a hatást, de ez a változás nem volt szignifikáns, míg a perifériásan adagolt AM 404 által kifejtett védelmet egyértelműen gátolta. Ennek a jelenségnek pontos mechanizmusa további vizsgálatokra szorul, azonban tudni kell, hogy a három általunk alkalmazott vegyület közül messze az AM 404 a legkevésbé szelektív. Míg szintetizálásakor szelektívnek gondolták az anandamid transzportjára, a későbbiekben kiderült, hogy szubsztrátja a FAAH enzimnek (Hillard és mtsai, 1997), sőt, direkt aktiválja a TRPV1-receptorokat is (De Petrocellis és mtsai,

2000). Elképzelhetőnek tűnik, hogy közvetlenül centrálisan injektálva magasabb anandamid-koncentrációt hoz létre az agyban, mint perifériásan adagolva, és ez a koncentráció különbség okozza a megváltozott receptor-panelt.

Mivel mindhárom endogén szintemelő vegyület jól penetrál az agyba, így perifériás (i.p.) adagolás során nem lehet egyértelműen megállapítani, hogy a hatás mediálásában centrális, vagy perifériás (esetleg mindkettő) CB<sub>1</sub>-receptorok vesznek e részt. Ennek vizsgálatára alkalmaztam az URB 937-es perifériás FAAH-gátló vegyületet, melynek effektív dózisa (0.2 mg/kg s.c.) növeli a perifériás szövetekben a FAAH enzimaktivitást, azonban 200x nagyobb dózis (40 mg/kg s.c.) szükséges az agyi penetrációhoz. Az irodalmi adatok szerint az URB 937 szintén gátolta az indomethacin-indukálta fekélyek kialakulását, feltételezve a perifériás CB<sub>1</sub>-receptorok részvételét a folyamatban (Sasso és mtsai, 2012). Kísérleteink során az URB 937 (0.8-16.9 µmol/kg i.p.) nem gátolta az alkoholos léziók kialakulását.

Összefoglalva tehát egyértelműen jelzi számunkra a centrálisan indukált gyomorvédelmet az a tény, hogy a perifériásan adagolt FAAH, MAGL-és anandamid uptake gátló hatását centrális CB<sub>1</sub>-antagonista (AM 251) felfüggesztette, illetve, hogy a perifériára szelektív FAAH gátló (URB 937) nem váltott ki gasztroprotektív hatást.

A vágusz indukált gyomorvédelem a periférián a szenzoros afferensekből felszabaduló neuropeptideken keresztül valósul meg. Ezek legfontosabbika a CGRP, mely a NOS ativálásával erőteljes NO-mediált mukozális vérátáramlás-növekedést hoz létre, ami elengedhetetlen a lokális nyálkahártya védelem szempontjából (Holzer, 1998). Továbbá a NO-szintáz aktivitás fokozásával a CGRP fokozza a mucinelválasztást (Ichikawa és mtsai, 2000), valamint CGRP-1 receptorokon csökkenti a gyomorsav elválasztást a gasztrin-és ACh felszabadulás gátlásával (Evangelista és mtsai, 1992), és stimulálja a szomatosztatin (SOM) szekréciót (Manela és mtsai, 1995). A szomatosztatin centrális (i.c.v.) és perifériás (i.v.) adagolás mellett is gátolja a gyomorsav szekréciót, és szintén fokozza a mukozális vérátáramlást, azonban a CGRP-től kissé eltérő mechanizmussal, az endotheliális NO-szintézis fokozásával (Ancha és mtsai, 2003). Továbbá a SOM-analóg octreotidról leírták, hogy gátolta a NSAID-ok indukálta mukozális léziók kialakulását a leukocita kitapadás gátlásával (a kitapadó leukociták ugyanis fokozzák a nekrotizáló ágensek endothel-károsító hatását) (Scheiman és mtsai, 1997). Az alkohol és károsító ágensek hatására létrejövő nekrozis markánsan

csökkenti a nyálkahártya CGRP és SOM szintjét, mely nagyban hozzájárul a fekélyek kialakulásához (Ancha és mtsai, 2003).

Kísérleteinkben RIA (radioimmunoassay) módszerrel mértük mind a CGRP, mind a SOM szintjét a gyomor nyálkahártyában alkoholos fekélymodellen, a savas alkohol beadása után 1 órával. Mindkét neuropeptid szintje jelentősen lecsökken alkohol hatására (a CGRP esetében 1.78-ról 0.26 fmol/mg szövet-re, míg a SOM-nál 20.22-ről 2.7 fmol-ra szövet milligrammonként). A FAAH-gátló URB 597 (2.9 nmol i.c.v.), a MAGL-gátló JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.) és az anandamid visszavétel gátló AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) is szignifikánsan megnövelte a CGRP-és SOM-szinteket bizonyítva, hogy ezen faktorok hatása közrejátszik a vegyületek gasztroprotektív hatásának mediálásába a periférián.

A reaktív oxigén gyökök (*Reactive oxygen species*, ROS) által okozott lipid peroxidáció folyamata a szervezet egy fontos károsító tényezője, mely az alkohol-és nemszteroidok által indukált nyálkahártya károsodásban is részt vesz. A lipid peroxidáció folyamata során károsodik az epithelium és a sejtmembrán, a lizoszomális enzimek felszabadulása pedig növeli a szövetkárosodást, amely a léziók súlyosbodásához vezet (Demir és mtsai, 2003). A szervezet védekező mechanizmusa az antioxidáns enzimrendszerek működése, melyek a ROS-képződést gátolják, illetve a keletkezett gyököket semlegesítik. Ilyen antioxidáns enzim a szuperoxid dizmutáz (SOD), a kataláz (CAT), illetve a glutation-peroxidáz (GPX). Mindhárom antioxidáns enzimről kimutatták, hogy részt vesznek a citoprotektív vegyületek mukozális védelmi mechanizmusában alkohol és aspirin indukálta fekélymodellen (Ozbayer és mtsai, 2014; Pihan és mtsai, 1987; Zamora Rodriguez és mtsai, 2007).

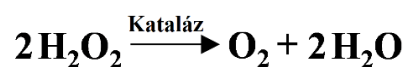
A szuperoxid dizmutáz egy fém-tartalmú enzim (metalloenzim), amely a szuperoxidgyök-anion vízzé és hidrogén-peroxiddá való átalakulását katalizálja (McCord és Fridovich, 1969).



A szuperoxidgyök-anion önmagában is képes diszproporcionálódásra, azonban ennek sebessége ( $k \sim 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , pH = 7.4) nem elegendő ahhoz, hogy a termelődő gyök károsító hatását megelőzze. A szuperoxid dizmutáz enzim által katalizált reakció nagyságrendekkel gyorsabb ( $k = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , pH = 7.4), így a szervezet számára elsődleges védelmet jelent az oxidatív stresszel szemben (Bannister és mtsai, 1987). A

SOD enzimeket a fém kofaktortól függően 3 csoportba osztjuk. A réz/cink tartalmú enzimek (Cu/Zn-SOD) a citoplazmában, a mangán tartalmú enzimek (Mn-SOD) a mitokondriumokban, míg a vas tartalmúak (Fe-SOD) extracellulárisan (főként a plazmában, nyirokban és a szinoviális folyadékban) találhatóak (Marklund, 1980).

A kataláz (CAT) egy hem-tartalmú oxidoreduktáz, mely az emlős szervezetben főként peroxisómákban található, és a fiziológiásan jelen lévő, illetve patológiásan az oxidatív stressz folyamata közben keletkező reaktív oxigén-fajta hidrogén-peroxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) lebontását katalizálja az alábbi reakció szerint:



Munkám során a gyomor nyálkahártya SOD és CAT enzim aktivitás szintjét mértem kolorimetriás módszerrel mindhárom vegyületre nézve. Alkohol hatására jelentősen csökkent a SOD enzimaktivitás (0.055-ről 0.024 U/mg szövet), a CAT aktivitása azonban nem. Ez a jelenség nem egyedülálló az irodalomban, lehetséges magyarázata lehet, hogy a CAT és GPX affinitása alacsony koncentrációjú  $\text{H}_2\text{O}_2$ -hoz jelentősen, egy nagyságrenddel eltér ( $K_{m(\text{GPX})} = 1 \mu\text{mol}$  vs.  $K_{m(\text{CAT})} = 1 \text{mmol}$ ), így az általunk alkohollal indukált  $\text{H}_2\text{O}_2$ -termelődés eliminálásában a GPX-nek van nagyobb szerepe (Zamora Rodriguez és mtsai, 2007). Az URB 597 és JZL 184 szignifikánsan emelte az alkohol által lecsökkentett SOD enzimaktivitást, mely bizonyítja, hogy a szuperoxidgyök-anion eliminálása a periférián szerepet játszik a kialakult védelemben. Ezzel szemben az anandamid visszavétel gátló AM 404 hatása nem befolyásolta szignifikánsan a SOD enzim aktivitását, ami szintén jelezheti az anandamid transzportjának enzimatisz hidrolíziséhez képest kisebb jelentőségét a gasztrointesztinális traktusban (Calignano és mtsai, 1997). A SOD a szuperoxidgyök-aniont hidrogénperoxidra és vízre bontja, így a SOD enzimaktivitás növelésével következetesen nő a  $\text{H}_2\text{O}_2$ -koncentráció, melynek eliminálásában a CAT enzim is nagyobb szerepet játszik. Mindhárom vegyületünk szignifikánsan növelte a CAT enzimaktivitást, mely alapján valószínűsíthető, hogy ez a mechanizmus is részt vesz az általuk kifejtett gasztroprotekción.

A gyomormotilitás szerepének megítélése a nyálkahártya védelemben ellentmondásos a kutatók között. Egyfelől, logikusnak tűnik, hogy a gyomorürülés gátlása fokozza a károsodás mértékét, több ideje van ugyanis a károsító ágenseknek a behatásra. Ezzel összefüggésben a prokinetikus metoclopramid védő hatást fejtett ki

savfüggő fekélymodellen, mely összefüggésben volt gyomorürülést serkentő hatásával (Gupta és mtsai, 1989). Azonban az utóbbi években bizonyítást nyert az a teória is, hogy a nyálkahártya károsító ágensek (pl. a NSAID indomethacin) hypermotilitást okozó hatása fokozza a mukozális mikrocirkuláció zavarait, ez abnormális nyomást fejt ki a gyomorfalra, és növeli a vaszkuláris permeabilitást, fokozva a gyulladást és a szöveti károsodást (Takeuchi, 2012). Ebben az esetben a hypermotilitás gátlása csökkentheti a léziók kialakulásának mértékét.

A  $\Delta^9$ -THC, és szintetikus analógjainak gasztrointesztinális hatásai között szerepel perifériás és centrális adagolás során is a gyomorürülés elnyújtása és az intragasztrikus nyomáscsökkenés, mely  $CB_1$ -receptoron keresztül valósul meg (Shook és Burks, 1989). A  $CB_1$ -receptor szerepét az is alátámasztja, hogy nagy számban található  $CB_1$ -receptorok mind a gyomor fundusban, a corpusban és az antrális területeken, míg  $CB_2$ -receptorokat nem figyeltek meg ebben a régióban (Adami és mtsai, 2002). Az endogén cannabinoidok közül az anandamid gyomorürülést gátló hatását írták le, melyet valószínűleg szintén  $CB_1$ -receptorok mediálnak, gátolható volt ugyanis  $CB_1$ -receptor szelektív antagonistával, nem befolyásolta azonban  $CB_2$ -receptor szelektív antagonistá és TRPV1-receptor antagonistá sem (Di Marzo és mtsai, 2008). Továbbá centrálisan (i.c.v.) adagolt WIN 55212-2 szintén lassította a gyomorürülést, mely hatás szelektív  $CB_1$ -receptor antagonistával gátolható volt, centrális  $CB_1$ -receptorok szerepét valószínűsítve a hatásban (Pertwee, 2001). Kísérleteinkben ezért vizsgáltuk az endogén cannabinoid szint emelő hatását a gyomor motoros aktivitására. A gasztroprotektív dózisban, valamint annak 10x-esében alkalmazva (URB 597 2.9, 29.5 nmol i.c.v.; JZL 184 1.3, 13 nmol i.c.v.; AM 404 2.5, 25 nmol i.c.v.), a vegyületeink nem befolyásolták sem a gyomor antrális kontrakcióit, sem a fundus tónusát (tehát az intragasztrikus nyomást) intracerebroventrikuláris adagolás során. A gyomor motoros aktivitásának gátlása ebben a dózisban tehát nem érvényesül, következésképpen nem vesz részt a FAAH-, MAGL- és visszavétel-gátlók gasztroprotektív hatásának mediálásában.

A direkt cannabinoid agonisták/antagonisták terápiás alkalmazásának limitációja a nemkívánt pszichotikus mellékhatások (szedáció, rossz közérzet, depresszió, mely akár öngyilkossági hajlam növekedéséhez is vezethet, ahogy láttuk azt az azóta forgalomból kivont Rimonabant esetében, stb.) megjelenése. Krónikus alkalmazása a  $\Delta^9$ -THC-nek tartós strukturális és funkcionális változásokat idéz elő a hippocampusban, mely rontja a

tanulási folyamatokat és az emlékezést mind patkány, mind ember esetében (Scallet, 1991). Állatkísérletes modellen végzett teszteken  $\Delta^9$ -THC adagolása után az úgynevezett klasszikus tetrad jelenik meg (katalepszia, csökkent testhőmérséklet, immobilitás és termális antinocicepció) (Fowler, 2015). Ezek a mozgáskoordinációval kapcsolatos mellékhatások azonban embernél elmaradnak, ugyanis relatív alacsony a kisagyi CB<sub>1</sub>-receptorok száma (Herkenham és mtsai, 1990). Az endogén cannabinoid szint emelők alkalmazásával indirekt aktiválhatók a cannabinoid-receptorok, így elképzelhető, hogy a cannabimimetikus mellékhatások száma csökkenthető.

Szelektív FAAH-gátlókkal végzett kísérletek során úgy tűnik, hogy valóban nem jelentkezett a szedáció, katalepszia, immobilitás vagy a lokomotoros aktivitás csökkenése (patkányon) (Kathuria és mtsai, 2003). Egy humán kísérlet is zajlott a szelektív FAAH-gátló PF-04457845-el, mely során nem befolyásolta a kognitív funkciókat, tanulási folyamatokat, koncentrációt és a probléma megoldó képességet (Li és mtsai, 2012). Itt kell megemlítenünk, hogy noha cannabimimetikus mellékhatásokat valóban nem okozott, sajnálatos módon súlyos agykárosodással járt egy másik FAAH-gátló (BIA 10-2474) fázis I humán kísérletekben, ami miatt fel is függesztették a folyamatban levő kísérletet. A teljes képhez hozzá tartozik, hogy ez a súlyos mellékhatás azon páciensek esetében jelentkezett csak, akik napi 5-6-szori adagolással kapták magasabb dózisban (50 mg) a hatóanyagot, míg a 20 mg-os dózissal kezelteknél nem. Továbbá sem a preklinikai kísérletek során, sem az előzetes dózisztitrálásnál (amelynél a 100 mg-os egyszeri dózist vették felsőértéknek) nem figyeltek meg hasonló neurológiai károsodásokat, ezért mindenképpen további, alaposan megtervezett kísérletekre volna szükség a mellékhatás megjelenésének, a vegyületek biztonságosságának vizsgálatához (Mallet és mtsai, 2016). A MAGL-gátló JZL 184 azonban, noha nem okozott katalepsiát és hypothermiát, szignifikánsan csökkentette a lokomotor aktivitást, míg a MAGL enzim iránt szelektívebb ligand (KML29) esetében ez a jelenség nem volt megfigyelhető (Long és mtsai, 2009). Az AM 404 szerepe itt is kissé ellentmondásos. I.c.v. (10 µg, 25 nmol) adagolva fokozta az immobilitást patkányon, a hatás azonban csak a beadást követő 60. percben volt szignifikáns (Beltramo és mtsai, 2000). Szintén okozott hypothermiát i.p. adagolt nagy dózisa (10-20 mg/kg), ez azonban gátolható volt TRPV1-receptor antagonistával (Rawls és mtsai, 2006), valamint befolyásolhatja az a tény, hogy az AM 404 hidrolízisének terméke a paracetamol, mely köztudottan hőcsökkentő (Hogestatt és mtsai, 2005).



A gasztroprotektív hatás maximumát kifejtő koncentrációban vizsgáltuk a három endogén szintemelő vegyület katalapsziát és hypothermiát okozó hatását, intracerebroventrikuláris adagolás során. A méréseket mindkét paraméter esetén közvetlenül az i.c.v. injektálás előtt végeztük, majd további 40 percig 10 percenként. Eredményeink alapján sem a FAAH-gátló URB 597 (2.9 nmol i.c.v.), sem a MAGL-gátló JZL 184 (1.3 nmol i.c.v.), sem az anandamid transzportját gátló AM 404 (2.5 nmol i.c.v.) nem befolyásolta sem az állatok rektális hőmérsékletét, sem a katalapsziát.

Természetesen felmerül a kérdés, hogy ha az exogén adagolt cannabinoidok, illetve származékaik ugyanazokon a receptorokon keresztül fejtik ki hatásaikat, mint az endogén ligandok, akkor hogyan lehetséges a pszichotikus mellékhatások elmaradása? Sőt, akár ide sorolhatnánk a motilitásgátló hatás elmaradását is, ugyanis az irodalmi adatok a  $\Delta^9$ -THC és szintetikus analógjainak hatásai között leírják a gyomorürülést gátló hatást, míg ezt mi a szint emelők gasztroprotektív dózisainál nem tapasztaltuk. Hogy lehet, hogy egyes CB<sub>1</sub>-mediálta hatások endogén szint emelés esetén is fennállnak, míg más hatások nem jelennek meg? Ez az alapvető kérdés a cannabinoid kutatás egy homályos foltja, bár több teória is létezik rá. Egyfelől a nem pszichoaktív fitocannabinoid vegyületek hatásmechanizmusának felderítéséből próbálnak többet megtudni a kutatók. A *Cannabis sativa* növényből ugyanis a pszichoaktív cannabinoid komponenseken kívül ~120 ún. fitocannabinoid vegyületet is izoláltak, amelyek nem rendelkeznek pszichoaktív hatásokkal (Morales és mtsai, 2017). Ilyen vegyület pl. a cannabiregol (CBG), vagy a cannabichromen (CBC) amely az AM 404-hez hasonlóan az anandamid visszavételét gátolja, valamint a cannabidiol (CBD), amely talán a legjelentősebb nempszichoaktív fitocannabinoid, a CB<sub>1</sub> és CB<sub>2</sub>, valamint a GPR55-és 18-as receptorokon antagonistá hatást fejt ki (Mechoulam és mtsai, 2007). Receptor profiljuk mindenképpen szerteágazóbb, aktiválnak  $\alpha_2$ - és 5-HT-receptorokat, PPAR $\gamma$ -receptort, számos transziens receptor potenciál csatornát, az adenosin A<sub>1</sub>-receptort, sőt a GABA<sub>A</sub>-receptort is (Morales és mtsai, 2017), ez önmagában azonban még nem magyarázza a pszichoaktív hatások elmaradását. Az utóbbi években azonban több fitocannabinoidról kimutatták (pl. a CBD-ről), hogy allosztérikus modulátora a CB<sub>1</sub>-receptoroknak. A CB<sub>1</sub>-receptor ugyanis az ortosztérikus kötőhelyen kívül egy allosztérikus kötőhelyet is tartalmaz, amely lehetőséget ad egy második ligand bekötődésére a receptorhoz, mely befolyásolja a primer ligand által kifejtett hatás irányát, erősségét, vagy akár modulálhatja a kiváltott

szignáltranszdukciót is (Khurana és mtsai, 2017). Mind pozitív, mind negatív allosztérikus modulátorait leírták a receptornak, és úgy tűnik, hogy a pozitív allosztérikus modulátorok esetében szintén nem jelennek meg a cannabimimetikus mellékhatások. Ignatowska-Jankowska és mtsai például sikerrel alkalmazták a ZCZ-011 pozitív allosztérikus modulátort neuropátiás fájdalom modellen egérben, a pszichotikus mellékhatások megjelenése nélkül (Ignatowska-Jankowska és mtsai, 2015). Amennyiben tehát a szintemelő vegyületek is allosztérikus modulátorként hatnak a receptoron (ha nem is direkt, de akár egy metabolitjuk révén), az ortosztérikus kötőhelyre bekötött endogén ligand hatáspanelje megváltozhat, ami magyarázhatja a fentebb vázolt anomáliát.

Eredményeink mindenképpen előremutatóak a fekélykutatás szempontjából is. Az utóbbi 20-30 évben ugyanis a peptikus fekélybetegség statisztikai gyorsan javuló tendenciát mutatnak, amely a protonpumpa gátlók preventív alkalmazásának, illetve a *H.pylori* eradikációs terápiájának fejlődésével magyarázható (Lanas és Chan, 2017). Az újabb vizsgálatok azonban a gyomorfekélyek számának csökkenése mellett egyre nagyobb számban mutatnak ki vékonybél érintettségű léziókat, fekélyesedést, mely szintén összefügg a krónikus NSAID-terápiával. Kis elemszámú vizsgálatokban ennek mértéke igen riasztó méreteket ölt, akár az 50-70%-ot is elérheti a vékonybél léziók megjelenése rheumatoid arthritis-el kezelt páciensek esetében, nagy számú kohorsz követése azonban, amely nem egy kifejezetten magas rizikójú betegcsoportot figyel, finomít ezen a statisztikán, és nagyjából 10-15%-os rizikónövekedést állapít meg (Graham és mtsai, 2005). Úgy tűnik továbbá, hogy a NSAID-ok közül az aspirin alacsony dózisban is (100 mg) sokkal erőteljesebb károsító hatás kifejtésére képes. Ebben a dózisban az aspirin széleskörűen alkalmazott a kardiovaszkuláris kockázat csökkentésére, és mivel a gyomorfekélyek kialakulását is fokozza, így általában gyomornedvellenálló bevonatot kap. Ez a bevonat azonban megvédi ugyan a gyomrot, de csak „eltolja” a károsító hatást, ami így a vékonybélben fog jelentkezni (Higuchi és mtsai, 2009). Lengeling vizsgálatában 40 vékonybél fekélyvel diagnosztizált páciensből 19 szedett gyomornedvellenálló bevonattal rendelkező aspirint (Lengeling és mtsai, 2003). Egy másik vizsgálatban 11 gyomorfekélyes beteg vékonybélét vizsgálták kapszula endoszkópiás módszerrel, akiket hosszútávon kezeltek alacsony dózisú aspirinnel. Kiterjedt gyulladás (pirosság, ödéma) minden páciensnél látható volt, 11-ből 10 betegnél pedig elkezdődött a léziók, fekélyek kialakulása. Nyilvánvalóan azoknál a pácienseknél

vizsgálva, akiknél már fennáll a gyomor nyálkahártyájának károsodása, magasabb az esélye a vékonybél károsodások kialakulásának is, ez az arány (100 ill. 91%) azonban akkor is meglehetősen magas (Watanabe és mtsai, 2008). Érdekes megfigyelés, hogy egy genetikai polimorfizmus, amely a NSAID-okat metabolizáló enzimet érinti (CYP2C9) növelte a gastroduodenális vérzések kialakulását, tehát lehetséges, hogy a nemszteroidok károsító hatása genetikailag predisponálható (Pilotto és mtsai, 2007).

Az NSAID-ok savas karakterükből adódóan lokálisan nyálkahártya károsító hatással rendelkeznek a gyomorban, melyre a PPI-k adagolása kézenfekvő terápiás megoldást nyújt. A vékonybél léziók kialakulásának mechanizmusa azonban a gyomorsav szekréciótól független (vagy csak nagyon kis mértékben függ), és sokkal inkább a mukozális protekcióban részt vevő faktorok károsításán keresztül valósul meg (PG-szintézis gátlás, szabadgyök képződés, lipid-peroxidáció fokozása, hypermotilitást fokozó hatás, stb.), így a szekréciógátlók nem alkalmazhatók hatékonyan a bélfekélyek kialakulásának gátlására. A bélfekélyek hatékony terápiájának szempontjából tehát elengedhetetlen olyan hatóanyagok, mechanizmusok fejlesztése, melyek a nyálkahártya integritásának megőrzését, fokozását szolgálják. Az általunk vizsgált endogén cannabinoidok több ponton képesek növelni a gyomor nyálkahártya integritását, amely felveti a szerepüket a bélfekélyek elleni védelem kialakításában is.

## 7. KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ EREDMÉNYEK

- 7.1.** Az anandamidhoz hasonlóan a 2-AG is gasztroprotektív hatást fejt ki mind i.v., mind i.c.v. adagolás során alkoholos fekélymodellen.
- 7.2.** A centrális CB<sub>1</sub>-receptorok részt vesznek mind az anandamid, mind a 2-AG hatásának mediálásában.
- 7.3.** A perifériás hatások közül biztosan szerepet játszik az anandamid és 2-AG által indukált védelemben a CGRP-szint fokozása.
- 7.4.** Az i.c.v. injektált Ang II gasztroprotektív hatást fejt ki alkoholos fekélymodellen.
- 7.5.** Az Ang II gasztroprotektív hatása az AT<sub>1</sub>-receptor indukálta CB<sub>1</sub>-receptor aktivációja révén valósul meg, a folyamat gátolható továbbá DAGL-gátlóval, mely a 2-AG szerepét valószínűsíti a hatás létrejöttében.
- 7.6.** A vágusz és a kolinerg rostok aktivációja szintén részt vesz az Ang II által kiváltott gasztroprotektív hatásban, gátolható volt ugyanis atropinnal és vagotómiával.
- 7.7.** Az endogén cannabinoidok metabolizmusának gátlásával (tehát az anandamid és 2-AG endogén szintjének emelésével) szintén gasztroprotektív hatás váltható ki savfüggetlen modellen.
- 7.8.** A FAAH-gátló URB 597 és MAGL-gátló JZL 184 az anandamid és 2-AG szint emeléssel centrális CB<sub>1</sub>-receptorokon keresztül gasztroprotektív hatást fejt ki.
- 7.9.** A periférián ezt a hatást a CGRP és SOM-szintek és a SOD-enzimaktivitás növelése mediálja. Nem befolyásolták a vegyületek azonban a gyomor motoros aktivitását és tónusát.
- 7.10.** Az anandamid visszavétel gátló AM 404 esetében szintén jelentkezett a gasztroprotektív hatás, melynek mechanizmusa azonban további vizsgálatokra szorul. A mediálásában részt vesznek a centrális CB<sub>1</sub>-receptorok, azonban más receptorok közreműködése is lehetséges. A periférián a CGRP- és SOM-felszabadulás növelése vesz részt a hatásban, nem befolyásolja azonban a gyomor motorikus aktivitására és tónusára kifejtett hatás, sem a SOD enzimaktivitás befolyásolása.
- 7.11.** Az általunk vizsgált cannabimimetikus mellékhatások (katalepszia, hypothermia) a gasztroprotektív dózisban i.c.v. injektálva egyik vegyületnél sem jelentkeztek.

## 8. ÖSSZEFOGLALÁS

A peptikus fekélybetegség előfordulása populációs szinten 5-10%-ot tesz ki, és noha az elmúlt 10-20 évben a szekréciógátlók bevezetésével csökkenő tendenciát mutat, még mindig számos olyan esetet láthatunk, amikor pusztán a károsító, agresszív faktorok csökkentésén alapuló terápiás mechanizmusok nem feltétlenül elégségesek, a gasztrointesztinális nyálkahártya mukozális védelmére kell koncentrálnunk. Jelen munka ezen protektív faktorokat veszi sorra, különös tekintettel az endocannabinoid rendszer szerepére a gasztroprotekción. Kísérleteink során kimutattuk, hogy az endocannabinoid anandamid és 2-AG gasztroprotektív hatást fejt ki mind perifériás (i.v.), mind centrális (i.c.v.) adagolás során, mely hatást az anandamid esetében CB<sub>1</sub>-receptorok és TRPV1-receptorok, míg a 2-AG esetén CB<sub>1</sub>-receptorok mediálják. A perifériás faktorok közül a CGRP-szint növelése biztosan szerepet játszik a gasztroprotekción létrejöttében. Centrálisan (i.c.v.) injektált Ang II szintén gasztroprotektívnek bizonyult alkoholos fekélymodellen. Ez a hatás a CB<sub>1</sub>-receptorok AT<sub>1</sub>-receptorok általi aktivációja révén valósult meg, centrálisan a vágusz és a kolinerg rostok aktivációja mediálja.

Az anandamid és 2-AG endogén szintjének emelése a metabolizmusukat végző enzimek gátlásával egy reménytelen terápiás alternatíva a cannabinoidok pszichoaktív mellékhatások megjelenése nélküli alkalmazására. Három endogén szintemelő vegyület, a FAAH-gátló URB 597 és az anandamid visszavétel gátló AM 404, melyek az anandamid endogén szintjét növelik, valamint a MAGL-gátló JZL 184, mely a 2-AG szintjét befolyásolja, gasztroprotektív hatását vizsgáltuk perifériás (i.p.) és centrális (i.c.v.) adagolás mellett. Mindhárom vegyület védő hatásának bizonyult, mely hatást centrális CB<sub>1</sub>-receptorok aktivációján keresztül fejtik ki (nem volt hatékony ugyanis egy perifériára szelektív vegyület, az URB 937). Az URB 597, és AM 404 esetében egyéb receptorok közreműködése is lehetséges (pl. TRPV1). A periférián ezt a hatást a CGRP és SOM-szintek, illetőleg a kataláz-enzimaktivitás növelése mediálja. Az URB 597 és JZL 184 vegyületek esetében az alkohol hatására csökkent SOD enzimaktivitás növelése szintén szerepet játszik a hatás létrejöttében, a gyomor motoros aktivitását és tónusát azonban egyik vegyület sem befolyásolta. Az általunk vizsgált cannabimimetikus mellékhatások (katalepszia, hypothermia) a gasztroprotektív dózisban i.c.v. injektálva egyik vegyületnél sem jelentkeztek.

## 9. SUMMARY

The prevalence of peptic ulcer disease represents 5-10 % in the general population, and, although it shows a decreasing tendency with the introduction of the antisecretory drugs in the past 10-20 years, in numerous cases the therapeutic mechanisms based on the reduction of the harmful, aggressive factors are still not necessarily enough, this is why the gastric mucosal protection must be privileged. This work specifies these protective factors, in particular view of the role of the endocannabinoid system in the gastroprotection. In our experiments the endocannabinoid anandamide and 2-AG both induced a significant inhibition of gastric mucosal injury evoked by ethanol after peripheral (i.v.) and central (i.c.v.) administration, which gastroprotective effect was mediated by the CB<sub>1</sub>-receptors and TRPV1-receptors in the case of the anandamide, and CB<sub>1</sub>-receptors in the case of the 2-AG. From between the peripheral factors, the increase of the CGRP-level certainly plays a significant role in the gastroprotection. The centrally (i.c.v.) injected Ang II also exerted mucosal protective effect. This protective effect was mediated via transactivation of the AT<sub>1</sub>- and CB<sub>1</sub>-receptors, and centrally by vagal cholinergic pathways.

The elevation of the endocannabinoid levels by inhibitors of their metabolizing enzymes is an attractive therapeutic alternative to the application cannabinoids, without their psychoactive side effects. We examined the gastroprotective effect of the FAAH-inhibitor URB 597 and the anandamide uptake-inhibitor AM 404, which produces elevated level of anandamid, and the MAGL-inhibitor JZL 184, which increase the level of 2-AG, after peripheral (i.p.), and central (i.c.v.) administration. It was found all three of these compounds protective, which effect was mediated by the activation of the central CB<sub>1</sub>- receptors (considering that URB 937, a peripheral-selective compound was not effective). In case of URB 597 and AM 404, the involvement of other receptors (e.g. TRPV1) is also possible. Elevation of the ethanol-induced decreased levels of gastric mucosal CGRP, SOM and the SOD enzyme activity on the periphery may be responsible of the gastroprotective effect, however gastric motility (gastric basal tone and phasic antral contractions) was not influenced either by URB 597, JZL 184 or AM 404. Among cannabimimetic side effects neither catalepsy, nor hypothermia was elicited by the compounds given i.c.v. in gastroprotective doses.

## 10. IRODALOMJEGYZÉK

Abrahamsson H. (1973) Vagal relaxation of the stomach induced from the gastric antrum. *Acta physiol Scand* 89: 406-414.

Adami M, Frati P, Bertini S, Kulkarni-Narla A, Brown DR, de Caro G, Coruzzi G, Soldani G. (2002) Gastric antisecretory role and immunohistochemical localization of cannabinoid receptors in the rat stomach. *Br J Pharmacol* 135: 1598-1606.

Adami M, Zamfirova R, Sotirov E, Tashev R, Dobrinova Y, Todorov S, Coruzzi G. (2004) Gastric antisecretory effects of synthetic cannabinoids after central or peripheral administration in the rat. *Brain Res Bull* 64: 357-361.

Aguilera M, Vergara P, Martinez V. (2013) Stress and antibiotics alter luminal and wall-adhered microbiota and enhance the local expression of visceral sensory-related systems in mice. *Neurogastroenterol Motil* 25: 515-529.

Alhouayek M, Lambert DM, Delzenne NM, Cani PD, Muccioli GG. (2011) Increasing endogenous 2-arachidonoylglycerol levels counteracts colitis and related systemic inflammation. *FASEB J* 25: 2711-2721.

Allen A, Flemstrom G. (2005) Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: 1-19.

Ancha H, Ojeas H, Tedesco D, Ward A, Harty RF. (2003) Somatostatin-induced gastric protection against ethanol: involvement of nitric oxide and effects on gastric mucosal blood flow. *Regul Pept* 110: 107-113.

Antoniou K, Galanopoulos A, Vlachou S, Kourouli T, Nahmias V, Thermos K, Panagis G, Daifoti Z, Marselos M, Papahatjis D, Spyraiki C. (2005) Behavioral pharmacological properties of a novel cannabinoid 1',1'-dithiolane delta8-THC analog, AMG-3. *Behav Pharmacol* 16: 499-510.

Araki H, Ukawa H, Sugawa Y, Yagi K, Suzuki K, Takeuchi K. (2000) The roles of prostaglandin E receptor subtypes in the cytoprotective action of prostaglandin E2 in rat stomach. *Aliment Pharmacol Ther* 14: 116-124.

Arlt GD, Leyh M. (2001) Incidence and pathophysiology of peptic ulcer bleeding. *Langenbecks Arch Surg* 386: 75-81.

Armstrong DM, Manley L, Haycock JW, Hersh LB. (1990) Co-localization of choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase within neurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Chem Neuroanat* 3: 133-140.

- Aurang K, Wang J, Lloyd KC. (1997) Somatostatin inhibition of acid and histamine release by activation of somatostatin receptor subtype 2 receptors in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 245-252.
- Aviello G, Matias I, Capasso R, Petrosino S, Borrelli F, Orlando P, Romano B, Capasso F, Di Marzo V, Izzo AA. (2008) Inhibitory effect of the anorexic compound oleoylethanolamide on gastric emptying in control and overweight mice. *J Mol Med (Berl)* 86: 413-422.
- Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. (1987) Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev Biochem* 22: 111-180.
- Bardou M, Toubouti Y, Benhaberou-Brun D, Rahme E, Barkun AN. (2005) Meta-analysis: proton-pump inhibition in high-risk patients with acute peptic ulcer bleeding. *Aliment Pharmacol Ther* 21: 677-686.
- Barnett K, Bell CJ, McKnight W, Dickey M, Sharkey KA, Wallace JL. (2000) Role of cyclooxygenase-2 in modulating gastric acid secretion in the normal and inflamed rat stomach. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: 1292-1297.
- Barutta F, Corbelli A, Mastrocola R, Gambino R, Di Marzo V, Pinach S, Rastaldi MP, Perin PC, Gruden G. (2010) Cannabinoid receptor 1 blockade ameliorates albuminuria in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* 59: 1046-1054.
- Beales I. (2017) Recent advances in the management of peptic ulcer bleeding. *F1000Res* 6: 1763.
- Beltramo M, de Fonseca FR, Navarro M, Calignano A, Gorriti MA, Grammatikopoulos G, Sadile AG, Giuffrida A, Piomelli D. (2000) Reversal of dopamine D(2) receptor responses by an anandamide transport inhibitor. *J Neurosci* 20: 3401-3407.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277: 1094-1097.
- Berthoud HR, Neuhuber WL. (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci* 85: 1-17.
- Bisogno T, Sepe N, Melck D, Maurelli S, De Petrocellis L, Di Marzo V. (1997) Biosynthesis, release and degradation of the novel endogenous cannabimimetic metabolite 2-arachidonoylglycerol in mouse neuroblastoma cells. *Biochem J* 322: 671-677.



- Blankman JL, Cravatt BF. (2013) Chemical probes of endocannabinoid metabolism. *Pharmacol Rev* 65: 849-871.
- Blankman JL, Simon GM, Cravatt BF. (2007) A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem Biol* 14: 1347-1356.
- Bojesen IN, Hansen HS. (2003) Binding of anandamide to bovine serum albumin. *J Lipid Res* 44: 1790-1794.
- Bouaboula M, Bianchini L, McKenzie FR, Pouyssegur J, Casellas P. (1999) Cannabinoid receptor CB1 activates the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE-1 isoform via Gi-mediated mitogen activated protein kinase signaling transduction pathways. *FEBS Lett* 449: 61-65.
- Brain SD, Williams TJ, Tippins JR, Morris HR, MacIntyre I. (1985) Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator. *Nature* 313: 54-56.
- Brancati SB, Zadori ZS, Nemeth J, Gyires K. (2013) Substance P induces gastric mucosal protection at supraspinal level via increasing the level of endomorphin-2 in rats. *Brain Res Bull* 91: 38-45.
- Bregonzio C, Armando I, Ando H, Jezova M, Baiardi G, Saavedra JM. (2004) Angiotensin II AT1 receptor blockade prevents gastric ulcers during cold-restraint stress. *Ann N Y Acad Sci* 1018: 351-355.
- Brzozowski T. (2014) Role of renin-angiotensin system and metabolites of angiotensin in the mechanism of gastric mucosal protection. *Curr Opin Pharmacol* 19: 90-98.
- Buckley NE, Hansson S, Harta G, Mezey E. (1998) Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat. *Neuroscience* 82: 1131-1149.
- Caenazzo L, Hoehe MR, Hsieh WT, Berrettini WH, Bonner TI, Gershon ES. (1991) HindIII identifies a two allele DNA polymorphism of the human cannabinoid receptor gene (CNR). *Nucleic Acids Res* 19: 4798.
- Caffarel MM, Sarrio D, Palacios J, Guzman M, Sanchez C. (2006) Delta9-tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation. *Cancer Res* 66: 6615-6621.
- Calignano A, La Rana G, Makriyannis A, Lin SY, Beltramo M, Piomelli D. (1997) Inhibition of intestinal motility by anandamide, an endogenous cannabinoid. *Eur J Pharmacol* 340: 7-8.

- Camilleri M, Carlson P, McKinzie S, Grudell A, Busciglio I, Burton D, Baxter K, Ryks M, Zinsmeister AR. (2008) Genetic variation in endocannabinoid metabolism, gastrointestinal motility, and sensation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: 13-19.
- Carriba P, Navarro G, Ciruela F, Ferre S, Casado V, Agnati L, Cortes A, Mallol J, Fuxe K, Canela EI, Lluís C, Franco R. (2008) Detection of heteromerization of more than two proteins by sequential BRET-FRET. *Nat Methods* 5: 727-733.
- Casado-Arroyo R, Gargallo C, Lanás Arbeloa A. (2012) Balancing the risk and benefits of low-dose aspirin in clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 26: 173-184.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2013) Acute kidney injury associated with synthetic cannabinoid use—multiple states, 2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 62: 93-98.
- Chiou SK, Tanigawa T, Akahoshi T, Abdelkarim B, Jones MK, Tarnawski AS. (2005) Survivin: a novel target for indomethacin-induced gastric injury. *Gastroenterology* 128: 63-73.
- Chitravanshi VC, Sapru HN. (2011) Cardiovascular responses elicited by a new endogenous angiotensin in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300: 230-240.
- Clapper JR, Moreno-Sanz G, Russo R, Guijarro A, Vacondio F, Duranti A, Tontini A, Sanchini S, Sciolino NR, Spradley JM, Hohmann AG, Calignano A, Mor M, Tarzia G, Piomelli D. (2010) Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism. *Nat Neurosci* 13: 1265-1270.
- Clapper JR, Vacondio F, King AR, Duranti A, Tontini A, Silva C, Sanchini S, Tarzia G, Mor M, Piomelli D. (2009) A second generation of carbamate-based fatty acid amide hydrolase inhibitors with improved activity in vivo. *ChemMedChem* 4: 1505-1513.
- Cook DJ, Fuller HD, Guyatt GH, Marshall JC, Leasa D, Hall R, Winton TL, Rutledge F, Todd TJ, Roy P. (1994) Risk factors for gastrointestinal bleeding in critically ill patients. Canadian Critical Care Trials Group. *N Engl J Med* 330: 377-381.
- Coruzzi G, Adami M, Coppelli G, Frati P, Soldani G. (1999) Inhibitory effect of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on pentagastrin-induced gastric acid secretion in the anaesthetized rat. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 360: 715-718.

- Cravatt BF, Demarest K, Patricelli MP, Bracey MH, Giang DK, Martin BR, Lichtman AH. (2001) Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9371-9376.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384: 83-87.
- Davenport HW. (1965) Is the apparent hyposecretion of acid by patients with gastric ulcer a consequence of a broken barrier to diffusion of hydrogen ions into the gastric mucosa? *Gut* 6: 513.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V. (2000) Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett* 483: 52-56.
- Deadwyler SA, Hampson RE, Bennett BA, Edwards TA, Mu J, Pacheco MA, Ward SJ, Childers SR. (1993) Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons. *Receptors Channels* 1: 121-134.
- Dembinski A, Warzecha Z, Ceranowicz P, Dembinski M, Cieszkowski J, Pawlik, WW, Konturek SJ, Tomaszewska R, Hladki W, Konturek PC. (2006) Cannabinoids in acute gastric damage and pancreatitis. *J Physiol Pharmacol* 5: 137-154.
- Demir S, Yilmaz M, Koseoglu M, Akalin N, Aslan D, Aydin A. (2003) Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. *Turk J Gastroenterol* 14: 39-43.
- Deutsch DG, Goligorsky MS, Schmid PC, Krebsbach RJ, Schmid HH, Das SK, Dey SK, Arreaza G, Thorup C, Stefano G, Moore LC. (1997) Production and physiological actions of anandamide in the vasculature of the rat kidney. *J Clin Invest* 100: 1538-1546.
- Devane WA, Dysarz FA, 3rd Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34: 605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258: 1946-1949.

- Di Marzo V. (2006) A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci* 27: 134-140.
- Di Marzo V, Capasso R, Matias I, Aviello G, Petrosino S, Borrelli F, Romano B, Orlando P, Capasso F, Izzo AA. (2008) The role of endocannabinoids in the regulation of gastric emptying: alterations in mice fed a high-fat diet. *Br J Pharmacol* 153: 1272-1280.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sepe N, Buono A. (1996a) Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. *Biochem J* 316: 977-984.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Sugiura T, Waku K. (1996b) Potential biosynthetic connections between the two cannabimimetic eicosanoids, anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol, in mouse neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227: 281-288.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372: 686-691.
- Di Sabatino A, Battista N, Biancheri P, Rapino C, Rovedatti L, Astarita G, Vanoli A, Dainese E, Guerci M, Piomelli D, Pender SL, MacDonald TT, Maccarrone M, Corazza GR. (2011) The endogenous cannabinoid system in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunol* 4: 574-583.
- Diz DI, Barnes KL, Ferrario CM. (1984) Hypotensive actions of microinjections of angiotensin II into the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Hypertens Suppl* 2: 53-56.
- Egertova M, Giang DK, Cravatt BF, Elphick MR. (1998) A new perspective on cannabinoid signalling: complementary localization of fatty acid amide hydrolase and the CB1 receptor in rat brain. *Proc Biol Sci* 265: 2081-2085.
- Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O. (2006) The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* 49: 67-79.
- Enck P, Aziz Q, Barbara G, Farmer AD, Fukudo S, Mayer EA, Niesler B, Quigley EM, Rajilic-Stojanovic M, Schemann M, Schwille-Kiuntke J, Simren M, Zipfel S, Spiller RC. (2016) Irritable bowel syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16014.

- Evangelista S, Tramontana M, Maggi CA. (1992) Pharmacological evidence for the involvement of multiple calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in the antisecretory and antiulcer effect of CGRP in rat stomach. *Life Sci* 50: 13-18.
- Everitt BJ, Hokfelt T, Terenius L, Tatemoto K, Mutt V, Goldstein M. (1984) Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neuroscience* 11: 443-462.
- Farquhar-Smith WP, Egertova M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. (2000) Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci* 15: 510-521.
- Feizi A, Jafari MR, Hamedivafa F, Tabrizian P, Djahanguiri B. (2008) The preventive effect of cannabinoids on reperfusion-induced ischemia of mouse kidney. *Exp Toxicol Pathol* 60: 405-410.
- Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggin RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS Lett* 393: 231-235.
- Feledziak M, Lambert DM, Marchand-Brynaert J, Muccioli GG. (2012) Inhibitors of the endocannabinoid-degrading enzymes, or how to increase endocannabinoid's activity by preventing their hydrolysis. *Recent Pat CNS Drug Discov* 7: 49-70.
- Ferguson AV, Marcus P, Spencer J, Wallace JL. (1988) Paraventricular nucleus stimulation causes gastroduodenal mucosal necrosis in the rat. *Am J Physiol* 255: 861-865.
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sante M, Morelli A, Cirino G, Wallace JL. (2005) Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* 129: 1210-1224.
- Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL. (2006) The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131: 259-271.
- Fogel R, Zhang X, Renehan WE. (1996) Relationships between the morphology and function of gastric and intestinal distention-sensitive neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Comp Neurol* 364: 78-91.

- Fohl AL, Regal RE. (2011) Proton pump inhibitor-associated pneumonia: Not a breath of fresh air after all? *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2: 17-26.
- Foldy C, Lee SY, Szabadics J, Neu A, Soltesz I. (2007) Cell type-specific gating of perisomatic inhibition by cholecystokinin. *Nat Neurosci* 10: 1128-1130.
- Fowler CJ. (2015) The Potential of Inhibitors of Endocannabinoid Metabolism for Drug Development: A Critical Review. *Handb Exp Pharmacol* 231: 95-128.
- Fowler CJ, Tiger G, Ligresti A, Lopez-Rodriguez ML, Di Marzo V. (2004) Selective inhibition of anandamide cellular uptake versus enzymatic hydrolysis--a difficult issue to handle. *Eur J Pharmacol* 492: 1-11.
- Galve-Roperh I, Rueda D, Gomez del Pulgar T, Velasco G, Guzman M. (2002) Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 62: 1385-1392.
- Garg M, Angus PW, Burrell LM, Herath C, Gibson PR, Lubel JS. (2012) Review article: the pathophysiological roles of the renin-angiotensin system in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 35: 414-428.
- Garrick T, Buack S, Bass P. (1986) Gastric motility is a major factor in cold restraint-induced lesion formation in rats. *Am J Physiol* 250: 191-199.
- Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR. (1999) Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral arterial muscle functions to inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> channel current. *Am J Physiol* 276: 2085-2093.
- Gemici B, Tan R, Ongut G, Izgut-Uysal VN. (2010) Expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in gastric ischemia-reperfusion: role of angiotensin II. *J Surg Res* 161: 126-133.
- Germano MP, D'Angelo V, Mondello MR, Pergolizzi S, Capasso F, Capasso R, Izzo AA, Mascolo N, De Pasquale R. (2001) Cannabinoid CB1-mediated inhibition of stress-induced gastric ulcers in rats. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 363: 241-244.
- Ghosh S, Wise LE, Chen Y, Gujjar R, Mahadevan A, Cravatt BF, Lichtman AH. (2013) The monoacylglycerol lipase inhibitor JZL184 suppresses inflammatory pain in the mouse carrageenan model. *Life Sci* 92: 498-505.
- Gifford AN, Samiian L, Gatley SJ, Ashby CR Jr. (1997) Examination of the effect of the cannabinoid receptor agonist, CP 55,940, on electrically evoked transmitter release from rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 324: 187-192.

- Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D. (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* 2: 358-363.
- Glass M, Felder CC. (1997) Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor. *J Neurosci* 17: 5327-5333.
- Godlewski G, Offertaler L, Wagner JA, Kunos G. (2009) Receptors for acylethanolamides-GPR55 and GPR119. *Prostaglandins Other Lipid* 89: 105-111.
- Gomez del Pulgar T, Velasco G, Guzman M. (2000) The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. *Biochem J* 347: 369-373.
- Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A, Uhl GR. (2006) Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res* 1071: 10-23.
- Gonsiorek W, Lunn C, Fan X, Narula S, Lundell D, Hipkin RW. (2000) Endocannabinoid 2-arachidonyl glycerol is a full agonist through human type 2 cannabinoid receptor: antagonism by anandamide. *Mol Pharmacol* 57: 1045-1050.
- Graham DY, Opekun AR, Willingham FF, Qureshi WA. (2005) Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID users. *Clin Gastroenterol Hepatol* 3: 55-59.
- Griffin G, Tao Q, Abood ME. (2000) Cloning and pharmacological characterization of the rat CB(2) cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 292: 886-894.
- Grijalva CV, Derognaucourt J, Code CF, Novin D. (1980) Gastric mucosal damage in rats induced by lateral hypothalamic lesions: protection by propantheline, cimetidine, and vagotomy. *Proc Soc Exp Biol Med* 163: 528-533.
- Guagnini F, Valenti M, Mukenge S, Matias I, Bianchetti A, Di Palo S, Ferla G, Di Marzo V, Croci T. (2006) Neural contractions in colonic strips from patients with diverticular disease: role of endocannabinoids and substance P. *Gut* 55: 946-953.
- Guidobono F, Pagani F, Ticozzi C, Sibilina V, Netti C. (1998) Investigation on the mechanisms involved in the central protective effect of amylin on gastric ulcers in rats. *Br J Pharmacol* 125: 23-28.
- Gupta RK, Kulshrestha VK, Sharma ML. (1989) Effect of metoclopramide on gastric ulceration and secretion in albino rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 297: 158-165.

- Gyires K. (2004) Neuropeptides and gastric mucosal homeostasis. *Curr Top Med Chem* 4: 63-73.
- Gyires K, Barna I. (2002) Differences in gastroprotective processes in 6- to 8- and 14- to 16-week-old rats. *Dig Dis Sci* 47: 2775-2782.
- Gyires K, Nemeth J, Zadori ZS. (2013) Gastric mucosal protection and central nervous system. *Curr Pharm Des* 19: 34-39.
- Gyires K, Ronai AZ. (2001) Supraspinal delta- and mu-opioid receptors mediate gastric mucosal protection in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 1010-1015.
- Gyires K, Ronai AZ, Mullner K, Furst S. (2000) Intracerebroventricular injection of clonidine releases beta-endorphin to induce mucosal protection in the rat. *Neuropharmacology* 39: 961-968.
- Gyires K, Toth VE, Zadori ZS. (2015) Gastric mucosal protection: from the periphery to the central nervous system. *J Physiol Pharmacol* 66: 319-329.
- Halici Z, Polat B, Cadirci E, Topcu A, Karakus E, Kose D, Albayrak A, Bayir Y. (2016) Inhibiting renin angiotensin system in rate limiting step by aliskiren as a new approach for preventing indomethacin induced gastric ulcers. *Chem Biol Interact* 258: 266-275.
- Hallersund P, Elfvin A, Helander HF, Fandriks L. (2011) The expression of renin-angiotensin system components in the human gastric mucosa. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 12: 54-64.
- Ham EA, Soderman DD, Zanetti ME, Dougherty HW, McCauley E, Kuehl FA Jr. (1983) Inhibition by prostaglandins of leukotriene B4 release from activated neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4349-4353.
- Hansen KB, Rosenkilde MM, Knop FK, Wellner N, Diep TA, Rehfeld JF, Andersen UB, Holst JJ, Hansen HS. (2011) 2-Oleoyl glycerol is a GPR119 agonist and signals GLP-1 release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 96: 1409-1417.
- Hearnshaw SA, Logan RF, Lowe D, Travis SP, Murphy MF, Palmer KR. (2011) Acute upper gastrointestinal bleeding in the UK: patient characteristics, diagnoses and outcomes in the 2007 UK audit. *Gut* 60: 1327-1335.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1932-1936.



- Hernandez DE, Xue BG. (1989) Imipramine prevents stress gastric glandular lesions in rats. *Neurosci Lett* 103: 209-212.
- Hierlihy LE, Wallace JL, Ferguson AV. (1994) Autonomic pathways in development of neural stimulation-induced gastric mucosal damage. *Am J Physiol* 266: 179-185.
- Higuchi K, Umegaki E, Watanabe T, Yoda Y, Morita E, Murano M, Tokioka S, Arakawa T. (2009) Present status and strategy of NSAIDs-induced small bowel injury. *J Gastroenterol* 44: 879-888.
- Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A, Campbell WB. (1997) Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 69: 631-638.
- Hogaboam CM, Bissonnette EY, Chin BC, Befus AD, Wallace JL. (1993) Prostaglandins inhibit inflammatory mediator release from rat mast cells. *Gastroenterology* 104: 122-129.
- Hogestatt ED, Jonsson BA, Ermund A, Andersson DA, Bjork H, Alexander JP, Cravatt BF, Basbaum AI, Zygmunt PM. (2005) Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acetylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem* 280: 31405-31412.
- Holzer P. (1998) Neural emergency system in the stomach. *Gastroenterology* 114: 823-839.
- Holzer P. (2007) Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense. *Curr Opin Pharmacol* 7: 563-569.
- Holzer P, Livingston EH, Saria A, Guth PH. (1991) Sensory neurons mediate protective vasodilatation in rat gastric mucosa. *Am J Physiol* 260: 363-370.
- Holzer P, Wachter C, Heinemann A, Jovic M, Lippe IT, Herbert MK. (1995) Sensory nerves, nitric oxide and NANC vasodilatation. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 329: 67-79.
- Howlett AC. (1987) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: relative activity of constituents and metabolites of marijuana. *Neuropharmacology* 26: 507-512.
- Howlett AC, Champion TM, Wilken GH, Mechoulam R. (1990) Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology* 29: 161-165.
- Howlett AC, Qualy JM, Khachatrian LL. (1986) Involvement of Gi in the inhibition of adenylate cyclase by cannabimimetic drugs. *Mol Pharmacol* 29: 307-313.

- Hsu YC, Lei CC, Shih YH, Ho C, Lin CL. (2015) Induction of proteinuria by cannabinoid receptors 1 signaling activation in CB1 transgenic mice. *Am J Med Sci* 349: 162-168.
- Huggins JP, Smart TS, Langman S, Taylor L, Young T. (2012) An efficient randomised, placebo-controlled clinical trial with the irreversible fatty acid amide hydrolase-1 inhibitor PF-04457845, which modulates endocannabinoids but fails to induce effective analgesia in patients with pain due to osteoarthritis of the knee. *Pain* 153: 1837-1846.
- Ichikawa T, Ishihara K, Kusakabe T, Hiruma H, Kawakami T, Hotta K. (2000) CGRP modulates mucin synthesis in surface mucus cells of rat gastric oxyntic mucosa. *American journal of physiology. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G82-89.
- Ignatowska-Jankowska BM, Baillie GL, Kinsey S, Crowe M, Ghosh S, Owens RA, Damaj IM, Poklis J, Wiley JL, Zanda M, Zanato C, Greig IR, Lichtman AH, Ross RA. (2015) A Cannabinoid CB1 Receptor-Positive Allosteric Modulator Reduces Neuropathic Pain in the Mouse with No Psychoactive Effects. *Neuropsychopharmacology* 40: 2948-2959.
- Ignatowska-Jankowska BM, Ghosh S, Crowe MS, Kinsey SG, Niphakis MJ, Abdullah RA, Tao Q, ST ON, Walentiny DM, Wiley JL, Cravatt BF, Lichtman AH. (2014) In vivo characterization of the highly selective monoacylglycerol lipase inhibitor KML29: antinociceptive activity without cannabimimetic side effects. *Br J Pharmacol* 171: 1392-1407.
- Isenberg JI, Selling JA, Hogan DL, Koss MA. (1987) Impaired proximal duodenal mucosal bicarbonate secretion in patients with duodenal ulcer. *N Engl J Med* 316: 374-379.
- Ishikawa T, Nagata M, Osumi Y. (1983) Dual effects of electrical stimulation of ventromedial hypothalamic neurons on gastric acid secretion in rats. *Am J Physiol* 245: G265-269.
- Izzo AA, Coutts AA. (2005) Cannabinoids and the digestive tract. *Handb Exp Pharmacol* 168: 573-598.
- Izzo AA, Mascolo N, Capasso R, Germano MP, De Pasquale R, Capasso F. (1999) Inhibitory effect of cannabinoid agonists on gastric emptying in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360: 221-223.

- Jaiswal N, Jaiswal RK, Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM. (1993) Alterations in prostaglandin production in spontaneously hypertensive rat smooth muscle cells. *Hypertension* 21: 900-905.
- Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G. (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14136-14141.
- Jenkin KA, McAinch AJ, Briffa JF, Zhang Y, Kelly DJ, Pollock CA, Poronnik P, Hryciw DH. (2013) Cannabinoid receptor 2 expression in human proximal tubule cells is regulated by albumin independent of ERK1/2 signaling. *Cell Physiol Biochem* 32: 1309-1319.
- Jenkin KA, O'Keefe L, Simcocks AC, Briffa JF, Mathai ML, McAinch AJ, Hryciw DH. (2016) Renal effects of chronic pharmacological manipulation of CB2 receptors in rats with diet-induced obesity. *Br J Pharmacol* 173: 1128-1142.
- Jin W, Brown S, Roche JP, Hsieh C, Celver JP, Kover A, Chavkin C, Mackie K. (1999) Distinct domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate desensitization and internalization. *J Neurosci* 19: 3773-3780.
- Johansson LH, Borg LA. (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174: 331-336.
- Jourdan T, Szanda G, Rosenberg AZ, Tam J, Earley BJ, Godlewski G, Cinar R, Liu Z, Liu J, Ju C, Pacher P, Kunos G. (2014) Overactive cannabinoid 1 receptor in podocytes drives type 2 diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 5420-5428.
- Kaneko H, Mitsuma T, Nagai H, Mori S, Iyo T, Kusugami K, Tache Y. (1998) Central action of adrenomedullin to prevent ethanol-induced gastric injury through vagal pathways in rats. *Am J Physiol* 274: 1783-1788.
- Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valino F, Duranti A, Tontini A, Mor M, Tarzia G, La Rana G, Calignano A, Giustino A, Tattoli M, Palmery M, Cuomo V, Piomelli D. (2003) Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med* 9: 76-81.
- Khurana L, Mackie K, Piomelli D, Kendall DA. (2017) Modulation of CB1 cannabinoid receptor by allosteric ligands: Pharmacology and therapeutic opportunities. *Neuropharmacology*. 124: 3-12.

- King AR, Lodola A, Carmi C, Fu J, Mor M, Piomelli D. (2009) A critical cysteine residue in monoacylglycerol lipase is targeted by a new class of isothiazolinone-based enzyme inhibitors. *Br J Pharmacol* 157: 974-983.
- Kinsey SG, Cole EC. (2013) Acute Delta(9)-tetrahydrocannabinol blocks gastric hemorrhages induced by the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac sodium in mice. *Eur J Pharmacol* 715: 111-116.
- Kinsey SG, Nomura DK, O'Neal ST, Long JZ, Mahadevan A, Cravatt BF, Grider JR, Lichtman AH. (2011) Inhibition of monoacylglycerol lipase attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric hemorrhages in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 338: 795-802.
- Korz A, Keren O, Gafni M, Bar-Josef H, Sarne Y. (2008) Modulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) by opioid and cannabinoid receptors that are expressed in the same cell. *Brain Res* 1189: 23-32.
- Kotani T, Kobata A, Nakamura E, Amagase K, Takeuchi K. (2006) Roles of cyclooxygenase-2 and prostacyclin/IP receptors in mucosal defense against ischemia/reperfusion injury in mouse stomach. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 547-555.
- Kouznetsova M, Kelley B, Shen M, Thayer SA. (2002) Desensitization of cannabinoid-mediated presynaptic inhibition of neurotransmission between rat hippocampal neurons in culture. *Mol Pharmacol* 61: 477-485.
- Kwok YN, McIntosh CH. (1990) Release of substance P-like immunoreactivity from the vascularly perfused rat stomach. *Eur J Pharmacol* 180: 201-207.
- Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. (2008) Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. *Gastroenterology* 135: 41-60.
- Lambert DM, Fowler CJ. (2005) The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem* 48: 5059-5087.
- Lambrecht N, Burchert M, Respondek M, Muller KM, Peskar BM. (1993) Role of calcitonin gene-related peptide and nitric oxide in the gastroprotective effect of capsaicin in the rat. *Gastroenterology* 104: 1371-1380.
- Lanas A, Chan FKL. (2017) Peptic ulcer disease. *Lancet* 390: 613-624.
- Larrinaga G, Varona A, Perez I, Sanz B, Ugalde A, Candenas ML, Pinto FM, Gil J, Lopez JJ. (2010) Expression of cannabinoid receptors in human kidney. *Histol Histopathol* 25: 1133-1138.

- Lauckner JE, Hille B, Mackie K. (2005) The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 19144-19149.
- Lee Y, Jo J, Chung HY, Pothoulakis C, Im E. (2016) Endocannabinoids in the gastrointestinal tract. *American journal of physiology. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311: 655-666.
- Lengeling RW, Mitros FA, Brennan JA, Schulze KS. (2003) Ulcerative ileitis encountered at ileo-colonoscopy: likely role of nonsteroidal agents. *Clin Gastroenterol Hepatol* 1: 160-169.
- Leontiadis GI, Sharma VK, Howden CW. (2006) Proton pump inhibitor treatment for acute peptic ulcer bleeding. *Cochrane Database Syst Rev* 3: Cd002094.
- Leung D, Saghatelian A, Simon GM, Cravatt BF. (2006) Inactivation of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D reveals multiple mechanisms for the biosynthesis of endocannabinoids. *Biochemistry* 45: 4720-4726.
- Li GL, Winter H, Arends R, Jay GW, Le V, Young T, Huggins JP. (2012) Assessment of the pharmacology and tolerability of PF-04457845, an irreversible inhibitor of fatty acid amide hydrolase-1, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 73: 706-716.
- Li J, Wang DH. (2006) Differential mechanisms mediating depressor and diuretic effects of anandamide. *J Hypertens* 24: 2271-2276.
- Li Y, Owyang C. (2003) Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes? V. Remodeling of vagus and enteric neural circuitry after vagal injury. *American journal of physiology. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: 461-469.
- Lichtenberger LM. (1999) Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol* 15: 463-472.
- Ligresti A, Bisogno T, Matias I, De Petrocellis L, Cascio MG, Cosenza V, D'Argenio G, Scaglione G, Bifulco M, Sorrentini I, Di Marzo V. (2003) Possible endocannabinoid control of colorectal cancer growth. *Gastroenterology* 125: 677-687.
- Liu J, Gao B, Mirshahi F, Sanyal AJ, Khanolkar AD, Makriyannis A, Kunos G. (2000) Functional CB1 cannabinoid receptors in human vascular endothelial cells. *Biochem J* 346: 835-840.

- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Huang BX, Kim HY, Luquet S, Palmiter RD, Krystal G, Rai R, Mahadevan A, Razdan RK, Kunos G. (2008) Multiple pathways involved in the biosynthesis of anandamide. *Neuropharmacology* 54: 1-7.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou Z, Huang BX, Kim HY, Kunos G. (2006) A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13345-13350.
- Long JZ, Jin X, Adibekian A, Li W, Cravatt BF. (2010) Characterization of tunable piperidine and piperazine carbamates as inhibitors of endocannabinoid hydrolases. *J Med Chem* 53: 1830-1842.
- Long JZ, Nomura DK, Vann R., Walentiny DM, Booker L, Jin X, Burston JJ, Sim-Selley LJ, Lichtman AH, Wiley JL, Cravatt BF. (2009) Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20270-20275.
- Lopez-Rodriguez ML, Viso A, Ortega-Gutierrez S, Fowler CJ, Tiger G, de Lago E, Fernandez-Ruiz J, Ramos JA. (2003) Design, synthesis, and biological evaluation of new inhibitors of the endocannabinoid uptake: comparison with effects on fatty acid amidohydrolase. *J Med Chem* 46: 1512-1522.
- Mackie K, Hille B. (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3825-3829.
- Maejima T, Hashimoto K, Yoshida T, Aiba A, Kano M. (2001) Presynaptic inhibition caused by retrograde signal from metabotropic glutamate to cannabinoid receptors. *Neuron* 31: 463-475.
- Maldonado R, Robledo P, Berrendero F. (2013) Endocannabinoid system and drug addiction: new insights from mutant mice approaches. *Curr Opin Neurobiol* 23: 480-486.
- Mallet C, Dubray C, Duale C. (2016) FAAH inhibitors in the limelight, but regrettably. *Int J Clin Pharmacol Ther* 54: 498-501.
- Manela FD, Ren J, Gao J, McGuigan JE, Harty RF. (1995) Calcitonin gene-related peptide modulates acid-mediated regulation of somatostatin and gastrin release from rat antrum. *Gastroenterology* 109: 701-706.
- Marklund S. (1980) Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand* 492: 19-23.

- Martin-Calderon JL, Munoz RM, Villanua MA, del Arco I, Moreno JL, de Fonseca FR, Navarro M. (1998) Characterization of the acute endocrine actions of (-)-11-hydroxy-delta8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl (HU-210), a potent synthetic cannabinoid in rats. *Eur J Pharmacol* 344: 77-86.
- Martinez V, Coy DH, Lloyd KC, Tache Y. (1996) Intracerebroventricular injection of somatostatin sst5 receptor agonist inhibits gastric acid secretion in rats. *Eur J Pharmacol* 29:, 153-160.
- Mascia MS, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Bohme GA, Imperato A, Fratta W. (1999) Lack of morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of cannabinoid CB(1) receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 383: 1-2.
- Mascolo A, Sessa M, Scavone C, De Angelis A, Vitale C, Berrino L, Rossi F, Rosano G., Capuano A. (2017) New and old roles of the peripheral and brain renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS): Focus on cardiovascular and neurological diseases. *Int J Cardiol Heart Vasc* 227: 734-742.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346: 561-564.
- Matsumoto J, Takeuchi K, Okabe S. (1991) Characterization of gastric mucosal blood flow response induced by intragastric capsaicin in rats. *Jpn J Pharmacol* 57: 205-213.
- Maurelli S, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Luccia A, Marino G, Di Marzo V. (1995) Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'. *FEBS Lett* 377: 82-86.
- McCord JM, Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
- McFarland MJ, Porter AC, Rakhshan FR, Rawat DS, Gibbs RA, Barker EL. (2004) A role for caveolae/lipid rafts in the uptake and recycling of the endogenous cannabinoid anandamide. *J Biol Chem* 279: 41991-41997.
- Mechoulam R, Gaoni Y. (1965) Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron* 21: 1223-1229.
- Mechoulam R. Cannabinoid chemistry. In: Mechoulam R (szerk.), *Marijuana. Chemistry, Metabolism, Pharmacology and Clinical Effects*. Academic Press, New York, 1973: 1–99.

- Mechoulam R, Fride E. The unpaved road to the endogenous brain cannabinoid ligands, the anandamides. In: Pertwee RG (szerk.), *Cannabinoid Receptors*. Academic Press, London, 1995: 233–258.
- Mechoulam R, Fride E, Di Marzo V. (1998) Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol* 359: 1-18.
- Mechoulam R, Peters M, Murillo-Rodriguez E, Hanus LO. (2007) Cannabidiol--recent advances. *Chem Biodivers* 4: 1678-1692.
- Mileni M, Kamtekar S, Wood DC, Benson TE, Cravatt BF, Stevens RC. (2010) Crystal structure of fatty acid amide hydrolase bound to the carbamate inhibitor URB597: discovery of a deacylating water molecule and insight into enzyme inactivation. *J Mol Biol* 400: 743-754.
- Minowa S, Ishihara S, Tsuchiya S, Horie S, Murayama T. (2005) Capsaicin- and anandamide-induced gastric acid secretion via vanilloid receptor type 1 (TRPV1) in rat brain. *Brain Res* 1039: 75-83.
- Modlin IM, Kidd M, Lye KD, Wright NA. (2003) Gastric stem cells: an update. *Keio J Med* 52: 134-137.
- Molinari C, Battaglia A, Grossini E, Florio S, Mary DA, Vassanelli C, Vacca G. (2003) Activation of the renin-angiotensin system contributes to the peripheral vasoconstriction reflexly caused by stomach distension in anaesthetized pigs. *Exp Physiol* 88: 359-367.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Moradi H, Oveisi F, Khanifar E, Moreno-Sanz G, Vaziri ND, Piomelli D. (2016) Increased Renal 2-Arachidonoylglycerol Level Is Associated with Improved Renal Function in a Mouse Model of Acute Kidney Injury. *Cannabis Cannabinoid Res* 1: 218-228.
- Morales P, Hurst DP, Reggio PH. (2017) Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. *Prog Chem Org Nat Prod* 103: 103-131.
- Mosqueda-Garcia R, Tseng CJ, Appalsamy M, Robertson D. (1990) Cardiovascular effects of microinjection of angiotensin II in the brainstem of renal hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 255: 374-381.



- Mu J, Zhuang SY, Kirby MT, Hampson RE, Deadwyler SA. (1999) Cannabinoid receptors differentially modulate potassium A and D currents in hippocampal neurons in culture. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 893-902.
- Mukhopadhyay P, Pan H, Rajesh M, Batkai S, Patel V, Harvey-White J, Mukhopadhyay B, Hasko G, Gao B, Mackie K, Pacher P. (2010a) CB1 cannabinoid receptors promote oxidative/nitrosative stress, inflammation and cell death in a murine nephropathy model. *Br J Pharmacol* 160: 657-668.
- Mukhopadhyay P, Rajesh M, Pan H, Patel V, Mukhopadhyay B, Batkai S, Gao B, Hasko G, Pacher P. (2010b) Cannabinoid-2 receptor limits inflammation, oxidative/nitrosative stress, and cell death in nephropathy. *Free Radic Biol Med* 48: 457-467.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365: 61-65.
- Naidu PS, Booker L, Cravatt BF, Lichtman AH. (2009) Synergy between enzyme inhibitors of fatty acid amide hydrolase and cyclooxygenase in visceral nociception. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 48-56.
- Naidu PS, Kinsey SG, Guo TL, Cravatt BF, Lichtman AH. (2010) Regulation of inflammatory pain by inhibition of fatty acid amide hydrolase. *J Pharmacol Exp Ther* 334: 182-190.
- Nelson MT, Quayle JM. (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268: 799-822.
- Németh J, Helyes Z, Görcs T, Gardi J, Pintér E, Szolcsányi J. (1996) Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol Hung* 84: 313–315.
- Nemeth J, Gorcs T, Helyes Z, Oroszi G, Kocsy T, Pinter E, Szolcsanyi J. (1998) Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology (Bp)* 6: 473-475.
- Németh J, Oroszi G, Jakab B, Magyarlaki M, Szilvássy Z, Roth E, Farkas B. (2002) I<sup>125</sup>I-labelling and purification of peptide hormones and bovine serum albumin. *J Radioanal Nucl Chem* 251: 129–133.
- Nguyen T, Chai J, Li A, Akahoshi T, Tanigawa T, Tarnawski AS. (2007) Novel roles of local insulin-like growth factor-1 activation in gastric ulcer healing: promotes actin

polymerization, cell proliferation, re-epithelialization, and induces cyclooxygenase-2 in a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent manner. *Am J Pathol* 170: 1219-1228.

Ohno-Shosaku T, Kano M. (2014) Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* 29: 1-8.

O'Shaughnessy WB. (1838–1840) On the preparations of the Indian hemp (*Cannabis indica*); their effects on the animal system in health, and their utility in the treatment of tetanus and other convulsive diseases. *Trans Med Phys Soc (Bengal)* 71–102: 421–426.

Osumi Y, Aibara S, Sakae K, Fujiwara M. (1977) Central noradrenergic inhibition of gastric mucosal blood flow and acid secretion in rats. *Life Sci* 20: 1407-1416.

Overton HA, Fyfe MC, Reynet C. (2008) GPR119, a novel G protein-coupled receptor target for the treatment of type 2 diabetes and obesity. *Br J Pharmacol* 153: 76-81.

Oyake J, Otaka M, Matsushashi T, Jin M, Odashima M, Komatsu K, Wada I, Horikawa Y, Ohba R, Hatakeyama N, Itoh H, Watanabe S. (2006) Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. *Life Sci* 79: 300-305.

Ozbayer C, Kurt H, Ozdemir Z, Tuncel T, Moheb Saadat S, Burukoglu D, Senturk H, Degirmenci I, Gunes HV. (2014) Gastroprotective, cytoprotective and antioxidant effects of *Oleum cinnamomi* on ethanol induced damage. *Cytotechnology* 66: 431-441.

Pacher P, Batkai S, Kunos G. (2006) The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol Rev* 58: 389-462.

Pagotto U, Pasquali R. (2005) Fighting obesity and associated risk factors by antagonising cannabinoid type 1 receptors. *Lancet* 365: 1363-1364.

Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. (2002) Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 8: 289-293.

Palkovits M. (1999) Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol* 20: 270-295.

Park F, Potukuchi PK, Moradi H, Kovesdy CP. (2017) Cannabinoids and the kidney: effects in health and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 313: 1124-1132.

- Park JM, Choi MG, Cho YK, Lee IS, Kim SW, Choi KY, Chung IS. (2011) Cannabinoid receptor 1 gene polymorphism and irritable bowel syndrome in the Korean population: a hypothesis-generating study. *J Clin Gastroenterol* 45: 45-49.
- Parrish JC, Nichols DE. (2006) Serotonin 5-HT(2A) receptor activation induces 2-arachidonoylglycerol release through a phospholipase c-dependent mechanism. *J Neurochem* 99: 1164-1175.
- Patricelli MP, Cravatt BF. (1999) Fatty acid amide hydrolase competitively degrades bioactive amides and esters through a nonconventional catalytic mechanism. *Biochemistry* 38: 14125-14130.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd ed. Academic Press, Inc., San Diego, 1986.
- Pertwee RG. (2001) Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 48: 859-867.
- Pertwee RG. (2005) The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS J* 7: 625-654.
- Petrosino S, Schiano Moriello A, Cerrato S, Fusco M, Puigdemont A, De Petrocellis L, Di Marzo V. (2016) The anti-inflammatory mediator palmitoylethanolamide enhances the levels of 2-arachidonoyl-glycerol and potentiates its actions at TRPV1 cation channels. *Br J Pharmacol* 173: 1154-1162.
- Phillips MI, de Oliveira EM. (2008) Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med (Berl)* 86: 715-722.
- Pihan G, Regillo C, Szabo S. (1987) Free radicals and lipid peroxidation in ethanol- or aspirin-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 32: 1395-1401.
- Pilotto A, Seripa D, Franceschi M, Scarcelli C, Colaizzo D, Grandone E, Niro V, Andriulli A, Leandro G, Di Mario F, Dallapiccola B. (2007) Genetic susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drug-related gastroduodenal bleeding: role of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Gastroenterology* 133: 465-471.
- Piscitelli F, Di Marzo V. (2012) "Redundancy" of endocannabinoid inactivation: new challenges and opportunities for pain control. *ACS Chem Neurosci* 3: 356-363.
- Pok LSL, Shabaruddin FH, Dahlui M, Sockalingam S, Mohamed Said MS, Rosman A, Lau IS, Isa LM, Hussein H, Ng CT, Mahadeva S. (2018) Clinical and economic implications of upper gastrointestinal adverse events in Asian rheumatological patients on long-term non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Int J Rheum Dis* 5: 943-951.

- Porter AC, Felder CC. (2001) The endocannabinoid nervous system: unique opportunities for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther* 90: 45-60.
- Quigley EM. (2015) Probiotics in Irritable Bowel Syndrome: The Science and the Evidence. *J Clin Gastroenterol* 49: 60-64.
- Raitio KH, Salo OM, Nevalainen T, Poso A, Jarvinen T. (2005) Targeting the cannabinoid CB2 receptor: mutations, modeling and development of CB2 selective ligands. *Curr Med Chem* 12: 1217-1237.
- Rawls SM, Ding Z, Cowan A. (2006) Role of TRPV1 and cannabinoid CB1 receptors in AM 404-evoked hypothermia in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 83: 508-516.
- Renzi D, Santicioli P, Maggi CA, Surrenti C, Pradelles P, Meli A. (1988) Capsaicin-induced release of substance P-like immunoreactivity from the guinea pig stomach in vitro and in vivo. *Neurosci Lett* 92: 254-258.
- Rhee MH, Bayewitch M, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. (1998). Cannabinoid receptor activation differentially regulates the various adenylyl cyclase isozymes. *J Neurochem* 71: 1525-1534.
- Richfield EK, Herkenham M. (1994) Selective vulnerability in Huntington's disease: preferential loss of cannabinoid receptors in lateral globus pallidus. *Ann Neurol* 36: 577-584.
- Ringel-Kulka T, Goldsmith JR, Carroll IM, Barros SP, Palsson O, Jobin C, Ringel Y. (2014) *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects colonic mucosal opioid receptor expression in patients with functional abdominal pain - a randomised clinical study. *Aliment Pharmacol Ther* 40: 200-207.
- Rios C, Gomes I, Devi LA. (2006) Mu opioid and CB1 cannabinoid receptor interactions: reciprocal inhibition of receptor signaling and neuritogenesis. *Br J Pharmacol* 148: 387-395.
- Rogers RC, Hermann GE. (1985) Vagal afferent stimulation-evoked gastric secretion suppressed by paraventricular nucleus lesion. *J Auton Nerv Syst* 13: 191-199.
- Rogers RC, Hermann GE, Travagli RA. (1999) Brainstem pathways responsible for oesophageal control of gastric motility and tone in the rat. *J Physiol* 514: 369-383.
- Rogers RC, Kita H, Butcher LL, Novin D. (1980) Afferent projections to the dorsal motor nucleus of the vagus. *Brain Res bulletin* 5: 365-373.

- Rogers RC, Travagli RA, Hermann GE. (2003) Noradrenergic neurons in the rat solitary nucleus participate in the esophageal-gastric relaxation reflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: 479-489.
- Rouzer CA, Marnett LJ. (2011) Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem Rev* 111: 5899-5921.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. (2001) Proinflammatory actions of angiotensins. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10: 321-329.
- Rutkowska M, Fereniec-Goltbiewska L. (2006) ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide), the selective cannabinoid CB1 receptor agonist, protects against aspirin-induced gastric ulceration. *Pharmazie* 61: 341-342.
- Ryberg E, Larsson N, Sjogren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. (2007) The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol* 152: 1092-1101.
- Saario SM, Salo OM, Nevalainen T, Poso A, Laitinen JT, Jarvinen T, Niemi R. (2005) Characterization of the sulfhydryl-sensitive site in the enzyme responsible for hydrolysis of 2-arachidonoyl-glycerol in rat cerebellar membranes. *Chem Biol* 12: 649-656.
- Salaga M, Zatorski H, Zielinska M, Mosinska P, Timmermans JP, Kordek R, Storr M, Fichna J. (2017) Highly selective CB2 receptor agonist A836339 has gastroprotective effect on experimentally induced gastric ulcers in mice. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 390: 1015-1027.
- Sanchez C, de Ceballos ML, Gomez del Pulgar T, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Ramon y Cajal S, Guzman M. (2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res* 61: 5784-5789.
- Sasso O, Bertorelli R, Bandiera T, Scarpelli R, Colombano G, Armirotti A, Moreno-Sanz G, Reggiani A, Piomelli D. (2012) Peripheral FAAH inhibition causes profound antinociception and protects against indomethacin-induced gastric lesions. *Pharmacol Res* 65: 553-563.
- Sawchenko PE, Arias C, Bittencourt JC. (1990) Inhibin beta, somatostatin, and enkephalin immunoreactivities coexist in caudal medullary neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol* 291: 269-280.

- Scallet AC. (1991) Neurotoxicology of cannabis and THC: a review of chronic exposure studies in animals. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 671-676.
- Scheiman JM, Tillner A, Pohl T, Oldenburg A, Angermuller S, Gorlach E, Engel G, Usadel KH, Kusterer K. (1997) Reduction of non-steroidal anti-inflammatory drug induced gastric injury and leucocyte endothelial adhesion by octreotide. *Gut* 40: 720-725.
- Schlicker E, Timm J, Zentner J, Gothert M. (1997) Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356: 583-589.
- Shen M, Piser TM, Seybold VS, Thayer SA. (1996) Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci* 16: 4322-4334.
- Shiotani A, Nishi R, Yamanaka Y, Murao T, Matsumoto H, Tarumi K, Kamada T, Sakakibara T, Haruma K. (2011) Renin-angiotensin system associated with risk of upper GI mucosal injury induced by low dose aspirin: renin angiotensin system genes' polymorphism. *Dig Dis Sci* 56: 465-471.
- Shook JE, Burks TF. (1989) Psychoactive cannabinoids reduce gastrointestinal propulsion and motility in rodents. *J Pharmacol Exp Ther* 249: 444-449.
- Shujaa N, Zadori ZS, Ronai AZ, Barna I, Mergl Z, Mozes MM, Gyires, K. (2009) Analysis of the effect of neuropeptides and cannabinoids in gastric mucosal defense initiated centrally in the rat. *J Physiol Pharmacol* 60: 93-100.
- Simon GM, Cravatt BF. (2006) Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway. *J Biol Chem* 281: 26465-26472.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. (2000) The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129: 227-230.
- Sofia RD, Diamantis W, Harrison JE, Melton J. (1978) Evaluation of antiulcer activity of delta9-tetrahydrocannabinol in the Shay rat test. *Pharmacology* 17: 173-177.
- Souza LK, Nicolau LA, Sousa NA, Araujo TS, Sousa FB, Costa DS, Souza FM, Pacifico DM, Martins CS, Silva RO, Souza MH, Cerqueira GS, Medeiros JV. (2016) Diminazene aceturate, an angiotensin-converting enzyme II activator, prevents gastric mucosal

damage in mice: Role of the angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis. *Biochem Pharmacol* 112: 50-59.

Sternini C. (1992) Enteric and visceral afferent CGRP neurons. Targets of innervation and differential expression patterns. *Ann N Y Acad Sci* 657: 170-186.

Storr MA, Keenan CM, Emmerdinger D, Zhang H, Yuce B, Sibaev A, Massa F, Buckley NE, Lutz B, Goke B, Brand S, Patel KD, Sharkey KA. (2008) Targeting endocannabinoid degradation protects against experimental colitis in mice: involvement of CB1 and CB2 receptors. *J Mol Med (Berl)* 86: 925-936.

Stroff T, Plate S, Respondek M, Muller KM, Peskar BM. (1995) Protection by gastrin in the rat stomach involves afferent neurons, calcitonin gene-related peptide, and nitric oxide. *Gastroenterology* 109: 89-97.

Sugiura T, Kodaka T, Kondo S, Tonegawa T, Nakane S, Kishimoto S, Yamashita A, Waku K. (1996) 2-Arachidonoylglycerol, a putative endogenous cannabinoid receptor ligand, induces rapid, transient elevation of intracellular free Ca<sup>2+</sup> in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229: 58-64.

Sugiura T, Kodaka T, Nakane S, Kishimoto S, Kondo S, Waku K. (1998) Detection of an endogenous cannabimimetic molecule, 2-arachidonoylglycerol, and cannabinoid CB1 receptor mRNA in human vascular cells: is 2-arachidonoylglycerol a possible vasomodulator? *Biochem Biophys Res Commun* 243: 838-843.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215: 89-97.

Sugiura T, Waku K. (2000) 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108: 89-106.

Suzuki T, Kagoshima M, Shibata M, Inaba N, Onodera S, Yamaura T, Shimada H. (1997) Effects of several denervation procedures on distribution of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactive in rat stomach. *Dig Dis Sci* 42: 1242-1254.

Svizenska I, Dubovy P, Sulcova A. (2008) Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 501-511.

Szabo S. (2014) "Gastric cytoprotection" is still relevant. *J Gastroenterol Hepatol* 29: 124-132.

- Szabo S, Vincze A, Sandor Z, Jadus M, Gombos Z, Pedram A, Levin E, Hagar J, Iaquinto G. (1998) Vascular approach to gastroduodenal ulceration: new studies with endothelins and VEGF. *Dig Dis Sci* 43: 40-45.
- Tache, Y, Grijalva CV, Gunion MW, Walsh JH, Novin D. (1982) Stimulation of gastric secretion by acute lateral hypothalamic lesions and its reversal by intracisternal injection of bombesin. *Life Sci* 31: 2485-2491.
- Takahashi M, Maeda S, Ogura K, Terano A, Omata M. (1998) The possible role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in gastric ulcer healing: effect of sofalcone on VEGF release in vitro. *J Clin Gastroenterol* 27: 178-182.
- Takahashi S, Takeuchi K, Okabe S. (1999) EP4 receptor mediation of prostaglandin E2-stimulated mucus secretion by rabbit gastric epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 58: 1997-2002.
- Takahashi T, Owyang C. (1997) Characterization of vagal pathways mediating gastric accommodation reflex in rats. *J Physiol* 504: 479-488.
- Takeuchi K. (2012) Pathogenesis of NSAID-induced gastric damage: importance of cyclooxygenase inhibition and gastric hypermotility. *World J Gastroenterol* 18: 2147-2160.
- Takeuchi K, Aihara E, Sasaki Y, Nomura Y, Ise F. (2006) Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E2 and EP1 receptors in acid-induced HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion in stomach. *J Physiol Pharmacol* 57: 661-676.
- Takeuchi K, Tanaka A, Kato S, Aihara E, Amagase K. (2007) Effect of (S)-4-(1-(5-chloro-2-(4-fluorophenoxy)benzamido)ethyl) benzoic acid (CJ-42794), a selective antagonist of prostaglandin E receptor subtype 4, on ulcerogenic and healing responses in rat gastrointestinal mucosa. *J Pharmacol Exp Ther* 322: 903-912.
- Takezono Y, Joh T, Oshima T, Suzuki H, Seno K, Yokoyama Y, Alexander JS, Itoh M. (2004) Role of prostaglandins in maintaining gastric mucus-cell permeability against acid exposure. *J Lab Clin Med* 143: 52-58.
- Tallett AJ, Blundell JE, Rodgers JR. (2007) Acute anorectic response to cannabinoid CB1 receptor antagonist/inverse agonist AM 251 in rats: indirect behavioural mediation. *Behav Pharmacol* 18: 591-600.



- Tanaka K, Tsutsumi S, Arai Y, Hoshino T, Suzuki K, Takaki E, Ito T, Takeuchi K, Nakai A, Mizushima T. (2007) Genetic evidence for a protective role of heat shock factor 1 against irritant-induced gastric lesions. *Mol Pharmacol* 71: 985-993.
- Tarnawski A, Stachura J, Durbin T, Sarfeh IJ, Gergely H. (1992) Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 102: 695-698.
- Ter Horst GJ, de Boer P, Luiten PG, van Willigen JD. (1989) Ascending projections from the solitary tract nucleus to the hypothalamus. A *Phaseolus vulgaris* lectin tracing study in the rat. *Neuroscience* 31: 785-797.
- Thim L, Madsen F, Poulsen SS. (2002) Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 32: 519-527.
- Tornqvist H, Belfrage P. (1976) Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J Biol Chem* 251: 813-819.
- Trautmann SM, Sharkey KA. (2015) The Endocannabinoid System and Its Role in Regulating the Intrinsic Neural Circuitry of the Gastrointestinal Tract. *Int Rev Neurobiol* 125: 85-126.
- Travagli RA, Gillis RA. (1994) Hyperpolarization-activated currents, IH and IKIR, in rat dorsal motor nucleus of the vagus neurons in vitro. *J Neurophysiol* 71: 1308-1317.
- Travagli RA, Hermann GE, Browning KN, Rogers RC. (2006) Brainstem circuits regulating gastric function. *Annu Rev Physiol* 68: 279-305.
- Travagli RA, Rogers RC. (2001) Receptors and transmission in the brain-gut axis: potential for novel therapies. V. Fast and slow extrinsic modulation of dorsal vagal complex circuits. *American journal of physiology. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: 595-601.
- Tseng CJ, Chou LL, Ger LP, Tung CS. (1994) Cardiovascular effects of angiotensin III in brainstem nuclei of normotensive and hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 558-564.
- Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM. (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83: 393-411.

- Tuncel N, Erkasap N, Sahinturk V, Ak DD, Tuncel M. (1998) The protective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on stress-induced gastric ulceration in rats. *Ann N Y Acad Sci* 865: 309-322.
- Turu G, Hunyady L. (2010) Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *J Mol Endocrinol* 44: 75-85.
- Turu G, Simon A, Gyombolai P, Szidonya L, Bagdy G, Lenkei Z, Hunyady L. (2007) The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT1 receptor-stimulated cannabinoid CB1 receptor activity. *J Biol Chem* 282: 7753-7757.
- Turu G, Varnai P, Gyombolai P, Szidonya L, Offertaler L, Bagdy G, Kunos G, Hunyady L. (2009) Paracrine transactivation of the CB1 cannabinoid receptor by AT1 angiotensin and other Gq/11 protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 284: 16914-16921.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K. (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78: 43-50.
- Valverde O, Ledent C, Beslot F, Parmentier M, Roques BP. (2000) Reduction of stress-induced analgesia but not of exogenous opioid effects in mice lacking CB1 receptors. *Eur J Neurosci* 12: 533-539.
- Varga K, Wagner JA, Bridgen DT, Kunos G. (1998) Platelet- and macrophage-derived endogenous cannabinoids are involved in endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* 12: 1035-1044.
- Vupputuri S, Batuman V, Muntner P, Bazzano LA, Lefante JJ, Whelton PK, He J. (2004) The risk for mild kidney function decline associated with illicit drug use among hypertensive men. *Am J Kidney Dis* 43: 629-635.
- Wallace JL. (2008) Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev* 88: 1547-1565.
- Wallace JL, McKnight W, Reuter BK, Vergnolle N. (2000) NSAID-induced gastric damage in rats: requirement for inhibition of both cyclooxygenase 1 and 2. *Gastroenterology* 119: 706-714.
- Walsh JH, Peterson WL. (1995) The treatment of *Helicobacter pylori* infection in the management of peptic ulcer disease. *N Engl J Med* 333: 984-991.
- Wang R. (2002) Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16: 1792-1798.

- Wang T, Collet JP, Shapiro S, Ware MA. (2008) Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review. *CMAJ* 178: 1669-1678.
- Watanabe T, Sugimori S, Kameda N, Machida H, Okazaki H, Tanigawa T, Watanabe K, Tominaga K, Fujiwara Y, Oshitani N, Higuchi K, Arakawa T. (2008) Small bowel injury by low-dose enteric-coated aspirin and treatment with misoprostol: a pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 6: 1279-1282.
- Wei BQ, Mikkelsen TS, McKinney MK, Lander ES, Cravatt BF. (2006) A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals. *J Biol Chem* 281: 36569-36578.
- Weingarten HP, Powley TL. (1980) Ventromedial hypothalamic lesions elevate basal and cephalic phase gastric acid output. *Am J Physiol* 239: 221-229.
- Wilson RI, Nicoll RA. (2001) Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature* 410: 588-592.
- Wright K, Rooney N, Feeney M, Tate J, Robertson D, Welham M, Ward S. (2005) Differential expression of cannabinoid receptors in the human colon: cannabinoids promote epithelial wound healing. *Gastroenterology* 129: 437-453.
- Wywicka W. (1978) Effects of electrical stimulation within the hypothalamus on gastric acid secretion and food intake in cats. *Exp Neurol* 60: 286-303.
- Yang YH, Wu WK, Tai EK, Wong HP, Lam EK, So WH, Shin VY, Cho CH. (2006) The cationic host defense peptide rCRAMP promotes gastric ulcer healing in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 547-554.
- Zadori ZS, Shujaa N, Koles L, Kiraly KP, Tekes K, Gyires K. (2008) Nocistatin and nociceptin given centrally induce opioid-mediated gastric mucosal protection. *Peptides* 29: 2257-2265.
- Zadori ZS, Gyires K. (2013) In vivo measurement of intragastric pressure with a rubber balloon in the anesthetized rat. *Curr Protoc Toxicol* 57: 21.12.
- Zadori ZS, Toth VE, Feher A, Philipp K, Nemeth J, Gyires K. (2014) Evidence for the gastric cytoprotective effect of centrally injected agmatine. *Brain Res Bull* 108: 51-59.
- Zamora Rodriguez ZB, Gonzalez Alvarez R, Guanche D, Merino N, Hernandez Rosales F, Menendez Cepero S, Alonso Gonzalez Y, Schulz S. (2007) Antioxidant mechanism is involved in the gastroprotective effects of ozonized sunflower oil in ethanol-induced ulcers in rats. *Mediators Inflamm* 2007: 65873.

- Zhang D, Saraf A, Kolasa T, Bhatia P, Zheng GZ, Patel M, Lannoye GS, Richardson P, Stewart A, Rogers JC, Brioni JD, Surowy CS. (2007) Fatty acid amide hydrolase inhibitors display broad selectivity and inhibit multiple carboxylesterases as off-targets. *Neuropharmacology* 52: 1095-1105.
- Zhang YM, Wei EQ, Hu X, Qiao WL, Shi Y, Xu M, Zhang JF. (2008) The role of nuclear factor-kappaB in the effect of angiotensin II in the paraventricular nucleus in protecting the gastric mucosa from ischemia-reperfusion injury in rats. *J Gastroenterol* 43: 687-698.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. (2001) The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 20: 6008-6016.
- Zhu D, Tong Q, Liu W, Tian M, Xie W, Ji L, Shi J. (2014) Angiotensin (1-7) protects against stress-induced gastric lesions in rats. *Biochem Pharmacol* 87: 467-476.
- Zygmunt PM, Ermund A, Movahed P, Andersson DA, Simonsen C, Jonsson BA, Blomgren A, Birnir B, Bevan S, Eschalier A, Mallet C, Gomis A, Hogestatt ED. (2013) Monoacylglycerols activate TRPV1--a link between phospholipase C and TRPV1. *PLoS One* 8: 81618.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-457.

## 11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

### A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények:

Gyires K, Ronai AZ, Zadori ZS, **Toth VE**, Nemeth J, Szekeres M, Hunyady L. (2014) Angiotensin II-induced activation of central AT<sub>1</sub> receptors exerts endocannabinoid-mediated gastroprotective effect in rats. Mol Cell Endocrin 382: 971-978. IF 4.405

**Toth VE**, Feher A, Nemeth J, Gyertyan I, Zadori ZS, Gyires K. (2018) Modulation of central endocannabinoid system results in gastric mucosal protection in the rat. Brain Res Bull 139: 224-234 IF 3.033

### Egyéb publikációk:

Zadori ZS, Feher A, Al-Khrasani M, Lacko E, **Toth VE**, Brancati SB, Hein L, Matyus P, Gyires K. (2013) Imidazoline versus alpha2-adrenoceptors in the control of gastric motility in mice. Eur J Pharmacol 705: 61-67. IF 2.684

Zadori ZS, **Toth VE**, Feher A, Kirsch P, Nemeth J, Gyires K. (2014) Evidence for the gastric cytoprotective effect of centrally injected agmatine. Brain Res Bull 108: 51-59. IF 2.718

Gyires K, **Toth VE**, Zadori ZS. (2014) Gut inflammation: current update on pathophysiology, molecular mechanism and pharmacological treatment modalities. Curr Pharm Des 20: 1063-1081. IF 3.452

Gyires K, **Toth VE**, Zadori ZS. (2015) Gastric mucosal protection: from the periphery to the central nervous system. J Physiol Pharmacol 66: 319-329. IF 2.804

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. (2016) Inhibition of alpha<sub>2A</sub>-adrenoceptors

ameliorates DSS-induced acute intestinal inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 358: 483-491. IF 3.867

Zadori ZS, Feher A, **Toth VE**, Al-Khrasani M, Koles L, Sipos Sz, Del Bello F, Pignini M, Gyires K. (2016) Dual alpha2C/5HT1A receptor agonist allyphenyline induces gastroprotection and inhibits fundic and colonic contractility. *Dig Dis Sci* 61: 1512-1523. IF 2.875

Feher A, **Toth VE**, Al-Khrasani M, Balogh M, Lazar B, Helyes Z, Gyires K, Zadori ZS. (2017) Analysing the effect of I1 imidazoline receptor ligands on DSS-induced acute colitis in mice. *Inflammopharmacology* 25: 107-118. IF 2.59

**Folyóiratban megjelent idézhető előadáskivonatok:**

**Toth V**, Zádori Z, Brancati S, Nemeth J, Gyires K. (2012) Role of endogenous opioids and peripheral mucosal protective factors in centrally induced gastroprotection. *Z Gastroenterol* 50: 80.

Refi E, Szabo E, Feher A, **Toth V**, Lutz H, Gyires K, Zadori Z. (2013) Analysing the effect of imidazoline receptor agonists and antagonists on the gastric motility in mice. *Z Gastroenterol* 51: 475.

Gyires K, **Toth V**, Kiraly K, Barna I, Zadori ZS. (2013) Both supraspinal and spinal mechanisms may be involved in the maintenance of gastric mucosal integrity in the rat. *FASEB J* 27: 1093.21.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton fejezném ki köszönetemet mindazoknak, akik munkámat valamilyen módon segítették, abban részt vettek.

Elsősorban témavezetőimnek, Prof. Dr. Gyires Klárának és Dr. Zádori Zoltánnak, akik eleinte Tudományos Diákköri munkámat segítették, később PhD-hallgatóként kalauzoltak a farmakológia és a kutatói munka (nem mindig egyszerű) világában. Külön köszönöm az élményeket, amelyekkel 3 ott töltött évem alatt gazdagodtam, a külföldi és hazai kongresszusokon való részvételi lehetőséget.

Köszönöm Prof. Dr. Ferdinandy Péternek, aki a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetének vezetőjeként lehetővé tette, hogy kísérleteinket rendezett körülmények között folytassuk.

Prof. Dr. Németh Józsefnek és munkatársainak, akik a Debreceni Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében a CGRP és SOM szint meghatározásokat végezték.

Köszönöm a gasztrointesztinális kutatócsoport volt és jelenlegi tagjainak, Dr. Serena Brancatinak, aki a kísérleti metodika megismertetésében volt nagy segítségemre, valamint Dr. Fehér Ágnesnek, aki aktívan részt vett a kísérletek kivitelezésében. Molnárné Péntes Máriának, Csontos Ildikónak, Pol-Maruzs Veronikának a technikai segítségért és az intézet valamennyi tagjának, akik remek közösséget alkottak.

Köszönet illeti továbbá férjemet, nagyszüleimet, családomat és azon közeli barátokat, akik mindvégig biztosítottak támogatásukról.

Ezt a munkát Szalai Istvánné Jutka emlékének ajánlom, aki laborasszisztensként kutatócsoportunk teljes értékű tagjaként segítette kísérleteink végrehajtását, megtervezését. Köszönöm odaadó segítségét, szakmai felkészültségét és örök optimizmusát, amivel emelte mindennapjaink színvonalát! Sajnos, Ő már nem olvashatta ezt a munkát, melynek elkészültéhez olyan sokat hozzá tett!