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

Doktori tézisek

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 adjunktus

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

BEVEZETÉS

A peptikus fekélybetegség napjainkban is népbetegségnek számít, a teljes populáció mintegy 10-15%-ban érintett élete során. Az utóbbi 20-30 évben a peptikus fekély előfordulási statisztikái gyorsan javuló tendenciát mutatnak, amely a szekréció gátlók preventív alkalmazásának, illetve a *H.pylori* eradikációs terápiájának fejlődésével magyarázható. Nem magyarázza azonban, hogy a teljes népesség ~15%-nál okoz problémát a sósav, holott a sósavtermelődés fiziológiás folyamat, és a *H. pylori* fertőzött populáció esetében is csak mintegy 20%-nál alakulnak ki fekélyes elváltozások. Szintén problémát jelent a szekréciógátló gyógyszerek alkalmazásával kapcsolatban, hogy míg a gasztroduodenális fekélyek hátterében általában hyperaciditás áll, gyomorfekélyek esetén sokszor mérnek normo- vagy hypoaciditást, valamint a NSAID-ok mellékhatásaként kialakuló, egyre gyakrabban detektált vékonybél érintettségű léziók kialakulása ellen sem jelentenek kellő védelmet. Egyes betegségek (pl. a kórházak intenzív osztályain gyakran előforduló stressz-fekély szindróma) esetében pedig kifejezetten kontraindikált az alkalmazásuk, a gyomor savas pH-jának emelésével ugyanis jelentősen növelik a különböző fertőzések és a következetes aspirációs tüdőgyulladás előfordulását. Ezen adatok alapján elmondható, 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, a gyomor nyálkahártya védelem komplex mechanizmusának felderítése és terápiás alkalmazása a mai napig intenzíven kutatott téma.

A mukozális védelemben a perifériás faktorokon (mucus-bikarbonát-foszfolipid barrier, mukozális mikrocirkuláció, prosztaglandinok, CGRP, SOM, stb.) kívül a központi idegrendszer részvétele is jelentős. A védelemben részt vevő különböző agyi strukturák közül fontos szerepet játszik a hypothalamus és a dorzális vágusz komplex (DVC), de emellett egyéb struktúrák (pl. amygdala, nucleus accumbens) szerepe is bizonyított. A centrálisan indukált gyomorvédelem a periférián a *n. vagus* közvetítésével valósul meg. A vágusz szerepét a gasztrointesztinális szabályozásban egyértelműen bizonyítják az akut vagotómia hatásai: csökkent antrális kontrakciók és savszekréció, megnövekedett tónus a gyomor fundusban.

Az endogén cannabinoid rendszer

Doktori munkám során az endogén cannabinoid rendszer szerepét vizsgáltam a gyomor nyálkahártya védelemben.

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_1- és CB_2-receptorok megtalálhatóak a gasztrointesztinális traktusban, és több gasztrointesztinális hatásukat leírták, pl. savszekréció befolyásolása, gyomor motoros aktivitásának csökkentése, gyomorürülés gátlása. A cannabinoidok több savfüggő és savfüggetlen fekélymodellen bizonyultak védő hatásúnak. CB_1-receptoron keresztül gátolták a savszekréciót, ezáltal védő hatást fejtettek ki savfüggő fekélymodelleken, és az endogén cannabinoid 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. 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_1-receptor antagonistával (SR141716A), mely a centrális CB_1-receptorok részvételét jelzi a folyamatban. Doktori munkám során a perifériásan és centrálisan injektált 2-AG hatását vizsgáltam savfüggetlen, alkoholos fekélymodellen.

A cannabinoid receptorok direkt aktivációja gyakran jár pszichoaktív mellékhatások (hangulatzavarok, szédülés, nyugtalanság, aluszékonyság) megjelenésével. A receptorok indirekt aktiválása megvalósulhat egyrészt az endogén cannabinoidok metabolizálásáért felelős enzimek (FAAH, MAGL, uptake-gátlás) gátlásával, illetve $G_{q/11}$-kapcsolt receptorok aktiválásával. Az indirekt aktiváció jelentősen limitálhatja a megjelenő mellékhatások számát.

A 2-AG szintézisében fontos szerepet játszik a foszfolipáz C enzim, amelynek stimulálása többek között a $G_{q/11}$ protein kapcsolt transzmembrán receptorok aktiválásának eredménye. Tágabb értelemben tehát minden olyan neurotranszmitter, amely $G_{q/11}$ protein kapcsolt receptoron fejti ki hatását (noradrenalin α_1 adrenerg, acetilkolin $M_{1,3,5}$ACh, angiotenzin AT_1, bradykinin B_2, vazopresszin V_1 receptorokon) képes a cannabinoid receptorok parakrin aktiválására. Turu kísérleteiben kínai hörcsög ovárium (Chinese hamster ovary, CHO) sejteken bizonyította az AT_1- és CB_1-receptorok transzaktivációját. Az aktivált AT_1-receptor stimulálja a PLC aktivitását, amely a PIP_2 átalakulást katalizálja IP_3-ra és DAG-ra. A DAG a 2-AG keletkezési molekulája, a folyamat a DAG-lipáz (DAGL) enzim aktiválásával játszódik le. Összességében tehát az AT_1-receptor aktiválásával megnő a 2-AG in vivo bioszintézise, amely a cannabinoid receptorok aktivációjával jár. CHO sejteken az AT_1-receptor által kiváltott CB_1-receptor aktiváció következésképpen gátolható volt tetrahydrolipstatin (THL), egy DAGL antagonista preinkubációjával. Doktori munkám során ezért vizsgáltam, hogy alkoholos fekélymodellen megvalósul e a CB_1-receptorok AT_1-receptorok általi aktivációja.

A cannabinoid receptorok indirekt aktivációjának másik módja az endogén cannabinoidok szintjének emelése. Kísérleteinkben három szintemelő vegyület, a FAAH-gátló URB 597 (mely az anandamid endogén szintjét emeli az annak metabolizmusát végző enzim gátlásával), a MAGL-gátló (a 2-AG lebontásáért felelős enzim) JZL 184 és az anandamid visszavétel gátló AM 404 hatását vizsgáltuk a gasztroprotekcióra. Savfüggő, NSAID indukálta fekélyeken már bizonyították az URB 597 és JZL 184 védő hatását, mely hatás perifériás CB_1-receptorok aktiválásával csökkentette a fekélyes elváltozások számát. Munkám során savfüggő, alkoholos fekélymodellen vizsgáltam, hogy létrejön e a gasztroprotekció az endogén szint emelők i.c.v. injektálásakor.

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.).

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. 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 permeábilitást, fokozva a gyulladást és a szöveti károsodást. Ebben az esetben a hypermotilitás gátlása csökkentheti a léziók kialakulásának mértékét. Kísérleteinkben ezért vizsgáltuk az endogén cannabinoid szint emelők hatását a gyomor motoros aktivitására.
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. Az endogén cannabinoid szint emelők alkalmazásával indirekt aktiválhatók a cannabinoid-receptorok, így elképzelhető, hogy a cannabimimetikus mellékhatások száma csökkenthető.

CÉLKITŰZÉS

Doktori munkám során a következőket vizsgáltam:

1. Az endogén cannabinoidok gasztroprotektív hatása

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

2. A CB_1-receptorok AT_1-receptorok általi aktivációjának vizsgálata

2.1. Van-e a centrálisan adagolt angiotenzin II-nek gasztroprotektív hatása?
2.2. Amennyiben van, megvalósul e az AT1-receptorok általi aktiváció CB1-receptorokon?

3. Az endogén cannabinoid szintemelők gasztroprotektív hatásának vizsgálata

3.1. Kiváltható-e gasztroprotekció nem csak a cannabinoid receptotok direkt aktiválásával, hanem a szöveti szintjük emelésével is?
3.2. Amennyiben igen, milyen centrális és perifériás receptorok vesznek részt a folyamatban?
3.3. A periférián, a gyomornyálkahártyában, mely faktorok és mechanizmusok mediálják a hatást?
3.4. Befolyásolják-e a szint emelő vegyületek a gyomormotilitást?
3.5. Okoznak-e az általunk vizsgált vegyületek katalepsziát és hypothermiát (centrális cannabimimetikus hatásokat)?

MÓDSZEREK

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 12 órás fényciklusú, légkondícionált szobában tartottuk, kontrollált (22±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 éheztettük, 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).

Alkalmazott vegyületek

Munkám során az alábbi vegyületeket alkalmaztam: anandamid, 2-AG, URB 597, JZL 184, Ang II (Ascent Scientific Ltd.); AM 251, AM 404 (Tocris Bioscience); candesartan (Toronto Research Chemicals); URB 937, tetrahydrolipstatin – THL, capsazepin, atropin-szulfát, nátrium-pentobarbitál, uretán (Sigma Chemical Co.).
A vegyületek törzsoldatai az alábbi oldószerekkel készültek: anandamid – etanol; 2-AG – acetonitril/etanol; AM 251 – DMSO; 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 higitása 0.9%-os fiziológiás sóoldattal készült. A kontroll állatok a megfelelő oldószert kapták.

A vegyületek alkalmazásának módjai

A centrális adagolás intracerebroventrikuláris (i.c.v.) injektálással, 10 µl-es volumenben történt, míg perifériásan intravénás (i.v.), intraperitoneális (i.p.) és per os adagolási módokat alkalmaztunk (0.5ml/100 ttg).

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. 60 perccel az alkohol adagolása után az állatokat dekapitáltuk, a gyomrokat kimetszettük, a nagy görbület mentén felvágtuk és fiziológiás sóoldattal megtisztítottuk a szennyeződésektől. A mukozális léziók kiértékelése fekély index számolásával, egy 0-4-ig terjedő pontrendszer segítségével történt. 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- [A kezelt csoport fekély indexe/A kontroll csoport fekély indexe * 100]. 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.

A gyomor motilitásának mérése *in vivo*

A gyomor motilitásának in vivo mérését az ún. gumiballon technikával végeztem. A kísérlethez 200-300 g-os hím, Wistar patkányokat alkalmaztam, melyek a kísérlet előtt 24 óráig éheztek, majd urethannal (1.25 g/kg i.p.) lettek bealtatva. Az állandó testhőmérséklet fenntartásának érdekében az állatokat a kísérlet során melegítőpadon tartottam, az átjárható légutakat trachea kanül behelyezése biztosította. Az állatok vérnyomását egy, az arteria carotisba helyezett kanül segítségével detektáltam. Az intragasztrikus nyomás egy 10 mm * 30 mm nagyságú vékony latex gumiballon segítségével mérhető, melyet egy flexibilis szilikon csőhöz rögzítve szájon át juttattunk a gyomorba. A ballont 2 ml 37 °C-os vízzel töltjük fel, ezzel biztosítva a kezdeti 10±0,5 cmH2O intragasztrikus nyomást. A ballon pontos elhelyezkedését a gyomorban minden kísérlet után ellenőriztem. 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 regisztráltam, 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 kanülön keresztül.
A kiértékelés során 2 paramétert határoztam meg: egyrészt a tónusos intragasztrikus nyomást (cmH_2O-ben), amely jól korrelál a gyomorfundus motoros aktivitásával, a fázisos nyomásgörbe minimumértékeinek átlagolásával kaptam meg. Másrészt a tónusos nyomásra rátevődő fázikus gyomorkontrakciók amplitúdójának átlagos nagyságát, amely az antrum tevékenységéből adódik (Referencia). Mindkét paramétert 5 perces időintervallumokban vizsgáltam: a vegyületek beadása előtt, alatt és után. Az értékek megadása a bazális értékhez viszonyított százalékban történt. 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.

Bilaterális cervikális vagotómia

Pentobarbitálos altatásban (35 mg/kg i.p.) az állatok mindkét oldali vágusának 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.

Katalepszia mérése

A katalepszia mérését a „rúd-technikával” végeztem. Az állatok mellső végtagjait óvatosan egy 10 cm magasan elhelyezett rúdra helyeztem, és mértem 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 mértem egymás után, ha egy állat 60 másodpercig nem reagált a tesztet befejezettnek tekintettem, és 60 másodperces értéket rögzítettem az adott állathoz. Az immobilitást másodpercben mértem közvetlenül az i.c.v. szúrás előtt, majd 40 percig 10 percenként.

Hypothermia mérése

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

Radioimmunoassay (RIA) mérések

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).
A C1012 számú **CGRP** antiszérumot az α-CGRP-marha thyroglobulin antigén ellen termeltették nyúlban (Sigma). 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 (NaN3) tartalmazott. A 125I izotóppal jelölt patkány Tyr-α-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-α-CGRP (23-37) (Bachem) peptidet alkalmaztak standardként a RIA-hoz 0-100 fmol/ml tartományban (az assay érzékelési határa 0.2 fmol/ml volt).
A 775/7-es **SOM** antiszérumot SOM14-marha thyroglobulin antigén ellen termeltették birkában, a mérés során 1:600.000 hígításban alkalmazták. A 125I izotóppal jelölt Tyr(1)-somatostatin-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).

Antioxidáns enzimaktivitás mérések

A **szuperoxid dizmutáz (SOD)** egy fém-tartalmú enzim (metalloenzim), amely a szuperoxidgyök-anion vízzé és hidrogén-peroxiddá való átalakulását katalizálja. 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, 1mM 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).

A **kataláz (CAT)** egy hem-tartalmú oxidoreduktáz, mely az emlős szervezetben főként peroxiszómákban található, és a fiziológiásan jelen lévő, illetve patológiásan az oxidatív stressz folyamata közben keletkező reaktív oxigén-fajta hidrogén-peroxid (H_2O_2) lebontását katalizálja. A minták levétele és homogenizálása a szuperoxid dizmutáznál leírtaknak megfelelően zajlott a homogenizáló puffer összetételétől eltekintve, mely a következő komponenseket tartalmazta: 50 mM NaPO4, pH 7.0, 1 mM EDTA (szövet grammonként). A meghatározáshoz szintén a Cayman Chemical Company által gyártott assay kit-et alkalmaztam. A keletkező formaldehid mennyiségéből számítjuk a CAT enzimaktivitást az alábbiak szerint: CAT aktivitás = [a minta formaldehid tartalma (µM)/20 perc] * 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 készítettem, majd feltöltöttem a plate-t, a mintákat duplikátumokban vittem fel rá. 30 µl metanol és 20 µl H2O2 hozzáadásával beindítottam a reakciót, majd 20 perc szobahőmérsékleten való inkubáció után KOH-al leállítottam a hidrolízist, és az elegyhez hozzáadtam 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).

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 ANOVA módszerrel (Newman-Keuls post hoc teszttel), nem-paraméteres minták esetén Kruskal-Wallis 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 tekintettem.

KÖVETKEZTETÉSEK, ÚJ EREDMÉNYEK

Doktori munkám fontosabb megállapításai, melyek új eredményként kerültek közlésre:

1. Az endogén cannabinoidok gasztroprotektív hatása

1.1. Az anandamidhoz hasonlóan a 2-AG is gasztroprotektív hatást fejt ki mind i.v., mind i.c.v. adagolás során alkoholos fekélymodellen.
1.2. A centrális CB_1-receptorok részt vesznek mind az anandamid, mind a 2-AG hatásának mediálásában.

1.3. A perifériás hatások közül biztosan szerepet játszik az anandamid és 2-AG által indukált védelemben a CGRP-szint fokozása.

2. A CB_1-receptorok AT_1-receptorok általi aktivációjának vizsgálata

2.1. Az i.c.v. injektált Ang II gasztroprotektív hatást fejt ki alkoholos fekélymodellen.
2.2. Az Ang II gasztroprotektív hatása az AT_1-receptor indukálta CB_1-receptor aktivációja révén valósul meg, a folyamat gátolható továbbá DAGL-gátlóval, mely a 2-AG szerepét valószínűsíti a hatás létrejöttében.
2.3. A vágusz és a kolinerg rostok aktivációja szintén részt vesz az Ang II által kiváltott gasztroprotekcióban, gátolható volt ugyanis atropinnal és vagotómiával.

3. Az endogén cannabinoid szintemelők gasztroprotektív hatásának vizsgálata

3.1. Az endogén cannabinoidok metabolizmusának gátlásával (tehát az anandamid és 2-AG endogén szintjének emelésével) szintén gasztroprotektív hatás váltható ki savfüggetlen modellen.

3.2. A FAAH-gátló URB 597 és MAGL-gátló JZL 184 az anandamid és 2-AG szint emeléssel centrális CB_1-receptorokon keresztül gasztroprotektív hatást fejt ki.
3.3. A perifférián 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.
3.4. 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_1-receptorok, azonban más receptorok közreműködése is lehetséges. A perifférián 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.
3.5. Az általunk vizsgált cannabimimetikus mellékhatások (katalepszia, hypothermia) a gasztroprotektív dózisban i.c.v. injektálva egyik vegyületnél sem jelentkeztek.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

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_1 receptors exerts endocannabinoid-mediated gastroprotective effect in rats. ***Mol Cell Endocrin*** 382: 971-978. **IF 3.754**

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 2.896**

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 3.033**

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 2.611**

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 2.883**

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$_{2A}$-adrenoceptors ameliorates DSS-induced acute intestinal inflammation in mice. ***J Pharmacol Exp Ther*** 358: 483-491. **IF 3.03**

Zadori ZS, Feher A, **Toth VE**, Al-Khrasani M, Koles L, Sipos Sz, Del Bello F, Pigini 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 3.35**

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.