

**Preventív és terápiás lehetőségek a kísérletes colitis
gyulladásos következményeinek gátlására**

Dr. Kovács Tamás

Ph.D. Tézis

**Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola**

Témavezető:

Dr. Habil. Kaszaki József

Szegedi Tudományegyetem, Sebészeti Műtéttani Intézet, Szeged

2012

A tézis alapjául szolgáló közlemények:

1. Varga G, Érces D, Fazekas B, Fülöp M, **Kovács T**, Kaszaki J, Fülöp F, Vécsei L, Boros M: N-Methyl-D-aspartate receptor antagonism decreases motility and inflammatory activation in the early phase of acute experimental colitis in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 217-225. IF=**3,349**
2. **Kovács T**, Varga G, Érces D, Tőkés T, Tizslavicz L, Ghyczy M, Boros M, Kaszaki J: Dietary phosphatidylcholine supplementation attenuates inflammatory mucosal damage in a rat model of experimental colitis. *Shock* 2012 (közlésre elfogadva). IF=**3,203**
3. Érces D, Varga G, Fazekas B, **Kovács T**, Tőkés T, Tizslavicz L, Fülöp F, Vécsei L, Boros M, Kaszaki J: N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist therapy suppresses colon motility and inflammatory activation six days after the onset of experimental colitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2012 (közlésre elfogadva). IF=**2,737**
4. **Kovács T**, Varga G, Érces D, Tőkés T, Tizslavicz L, Ghyczy M, Boros M, Kaszaki J: Terápiás lehetőségek összehasonlító vizsgálata a gyulladássos bélbetegség állatkísérletes modelljében. *Magyar Sebészet* 2012 (közlésre elfogadva). IF=0

A tézis alapjául szolgáló előadáskivonatok:

1. **Kovács T**, Fazekas B, Varga G, Érces D, Kaszaki J, Vécsei L, Boros M: Az NMDA-receptorgátlás vizsgálata bélgyulladásos patkánymodellben. *Magyar Sebészet* 2009; 62: 154.
2. Varga G, **Kovács T**, Kaszaki J, Ghyczy M, Boros M: A foszfatidil-etanolamin gyulladáscsökkentő hatása kísérletes colitis modellben. *Magyar Sebészet* 2009; 62: 145-146.
3. Fazekas B, Varga G, Érces D, **Kovács T**, Kaszaki J, Vécsei L, Boros M: Az NMDA-receptor-aktiváció jelentősége kísérletes bélgyulladásban. *Magyar Sebészet* 2009; 62: 153.
4. Érces D, Varga G, **Kovács T**, Kaszaki J, Vécsei L, Boros M: Glutamate receptor inhibition improves intestinal function in experimental colitis. *British Journal of Surgery* 2008; 95: 17.

5. Varga G, Érces D, Fazekas B, Fülöp M, **Kovács T**, Kaszaki J, Fülöp F, Vécsei L, Boros M: N-methyl-D-Aspartate receptor inhibition decreases motility and inflammatory activation in experimental colitis. *Shock* 2009; 32(S1): 14.
6. Varga G, **Kovács T**, Tökés T, Érces D, Kaszaki J, Ghyczy M, Boros M: Effects of oral phosphatidylcholine on the inflammatory activation in early and late phases of experimental colitis. *Acta Physiologica* 2011; 202(S684): 124-125.

BEVEZETÉS

A gyulladásoos bélbetegségek (Crohn betegség és colitis ulcerosa) krónikus, relapsusokkal tarkított, ismeretlen etiológiájú kórképek. A gyulladásoos folyamat következtében a belek morfológiája súlyosan károsodik; colitis ulcerosában fekélyek és pseudopolypok alakulnak ki, míg a Crohn betegséget transzmurális, granulomatózus gyulladás jellemzi, strikturákkal, perianális és belek közötti sipolyokkal, tályogokkal. A krónikus gyulladás következtében fokozódik a colorectális carcinoma rizikója is.

A jelenleg alkalmazott konzervatív kezelési módok elsősorban a gyulladásoos aktiválódást próbálják gátolni, illetve a relapsusokat megelőzni, helyi és szisztémás antiinflammációs vagy immunmoduláns ágensekkel (Munkholm 1993). Sebészi beavatkozásként colitis ulcerosában proctocolectomia és analis mucossectomia ileoanostomiával kuratív lehet, Crohn betegség esetén limitált bélreszekciók, fistulák, tályogok szanálása jöhet szóba a konzervatív terápia hatástalansága esetén. A konzervatív kezelésként alkalmazott gyógyszerek mellékhatásai, különös tekintettel a hosszú távú, több évtizedes használatra, jelentős morbiditással járnak, így a kevesebb szövödménnyel járó, új kezelési módoknak nagy jelentőségük van.

A humán gyulladásoos bélbetegségek kísérletes modellezésére széles körben alkalmazott eljárás a trinitro-benzol-szulfonsav (TNBS) intracolonalis alkalmazásával kiváltott colitis, amely rágcsőokban több mint 8 héten át tartó, transmuralis bélgyulladást idéz elő, kifejezett súlyvesztéssel, morfológiai elváltozásokkal, valamint tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) plazmaszint emelkedéssel és szövöti granulocita akkumulációval (Morris 1989). A gyulladásoos aktiváció során a pro-inflammációs citokin TNF- α a jelátvitel fontos komponense (Braus 2009). Hatását részben közvetlenül, további citokinek aktiválásán keresztül, illetve egyes gének expressziójának gátlásán keresztül fejt ki. A másik jelentős összetevő a fehérvérsejtek aktiválódási folyamata, melynek során a leukociták interakcióba lépnek az endotheliummal, extravazálódnak, és toxikus szabadgyököket generálnak, amelyek további citokin felszabadulást okozhatnak (Babbs 1992, Treede 2009).

Az elmúlt évtizedekben számos állatkísérletes és humán vizsgálat irányult a gyulladásoos bélbetegségek, azaz a colitis következményeinek befolyásolására. Új terápiai lehetőséget jelenthetett Forrest és mtsai megfigyelése is: e szerzők emelkedett L-kinurenin szintet mutattak ki gyulladásoos bélbetegségben szenvedő betegek vérében (Forrest 2002). Az L-kinurenin - kinurénsav útvonal a triptofán metabolizmus része, melynek kórtani

jelentőségét számos neurodegeneratív betegség esetében már igazolták (Klivényi 2004). A kinurénsav az N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát receptor antagonistá hatása alapján potens endogén neuroprotektív szernek bizonyult a központi idegrendszert érintő kórképekben. A glutamát a központi idegrendszer fő excitatorikus neurotranszmittere, de hatását kifejtheti az enterális idegrendszerben (ENS) is, és az ENS neuronjaiban nagyszámú NMDA-receptor expresszálódik (Liu 1997, Giaroni 2003). A jelenlegi feltételezések szerint a glutamát receptorok szerepet játszhatnak a gyulladásos bélbetegségekkel kapcsolatos nocicepcióban, de az NMDA receptorok perifériás gátlásának következménye nem teljesen ismert: ez a jelátviteli útvonal a gasztrointesztinális traktusban jórészt még feltérképezetlen, élettani és gyulladásos körülmények között egyaránt. Az utóbbi évek kutatómunkája során fejlesztették ki a kinurénsav szintetikus analógját, az SZR-72-t, amely a kinurénsavval ellentétben átjut a vér-agy gáton. Az SZR-72 alkalmazásnak központi idegrendszeri következményeit a korábbiakban más munkacsoportok már megvizsgálták, de a perifériás NMDA receptorok gátlásának következményei, vagyis az ENS hatások nem ismertek.

A gyulladásos bélbetegségeket jellemző kórállapot további, közelmúltban feltárt eleme, hogy colitis ulcerosában szenvedő betegeknél a colon epithéliumot borító mucin foszfatidilkolin (PC) komponensének mennyisége jelentősen lecsökken (Stremmel 2005), ezért rendkívül nagy jelentőségük lehet az étrend részeként a gasztrointesztinális rendszerbe jutó PC tartalmú anyagoknak. Korábbi vizsgálatainkban a biomembránokat alkotó PC exogén bevitele gyulladásos és ischaemiás folyamatokban is protektív hatásúnak bizonyult (Erős 2006, Gera 2007, Ghyczy 2008, Tökés 2011). PC alkalmazása csökkentette az intesztinális strikturák kialakulását is (Mourelle 1996), és a klinikai tapasztalatok szerint a nyák PC szintjének emelkedése a tünetek javulásával és a gyulladásos aktivitás csökkenésével járt együtt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérletes munkánk legfontosabb, általános célkitűzése a perorális PC előkezelés, valamint az akut kinurénsav kezelés gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata volt a colitis akut és szubakut fázisaiban, különös tekintettel a mucosa destrukció befolyásolására. A morfológiai változások dinamikájának *in vivo* követését fluoreszcens konfokális pásztázó lézer endomikroszkóppal végeztük, az eredményeket konvencionális hisztopathológiai vizsgálattal hasonlítottuk össze. Mivel a megfelelő terápia alkalmazása a klinikai gyakorlatban leginkább a tünetek megjelenése, a diagnózis felállítás után következhet, kísérletes modellünkben a vizsgált terápiák hatását a colitis indukciót követő korai és késői periódusban (az 1. és a 6. napon) is megvizsgáltuk. Ennek megfelelően a következő célokat jelöltük ki:

- a gyulladásos folyamatok jellemzése a kísérletes colitis akut és szubakut fázisaiban;
- a morfológiai változások meghatározása konvencionális és dinamikus, *in vivo* hisztológiai módszerekkel;
- a perorális PC előkezelés hatásainak vizsgálata a kísérletes colitis akut és szubakut fázisaiban, különös tekintettel a nyálkahártya destrukció befolyásolhatóságára;
- a korai és késleltetett NMDA antagonisták kezelés hatékonyságának vizsgálata a gyulladásos folyamatokra kísérleti modellünkben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletekhez 96 hím Sprague-Dawley patkányt (300 g) használtunk, a vizsgálatokat a NIH irányelvei alapján (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) végeztük a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyásával.

3.1. Colitis indukció

Az állatok a colitis indukció előtt 12 órán keresztül éheztek, majd a vastagbélgyulladást TNBS (40 mg/kg 0,25 ml 25%-os etanolban oldva) intracolonalis beöntésével idéztük elő (Morris 1989), átmeneti éteres bódítása mellett. Az álműtött csoport egyedeit a TNBS oldószerével kezeltük.

3.2. Sebészi beavatkozás és hemodinamikai monitorozás

Az állatokat a beöntést követő 1. ill. 6. napon Na-pentobarbitál (50 mg/tskg i.p.) altatás mellett hanyatt fekvő helyzetben fűthető műtőasztalra helyeztük. Tracheosztómiát végeztünk a spontán légzés biztosítására, majd a jobb oldali vena jugularis kanülálása (PE50) után az állatok Ringer-laktát infúziót (10 ml/kg/h) kaptak a kísérlet végéig. Az állatok vérnyomásának és szívfrekvenciájának mérése céljából kanüláltuk az arteria carotis communis, a hemodinamikai adatok folyamatos monitorozása SPEL Advanced Cardiosys 1.4 adatgyűjtő szoftver (Experimetria Ltd., Budapest) alkalmazásával történt. A perctérfogatot termodilúciós technikával határoztuk meg.

3.3. Plazma TNF- α és IL-6 mérése

A vizsgálatok végén a vena cava inferiorból 0,5 ml vérmintákat vettünk EDTA-s polipropilén csövekbe, melyeket 20 percen keresztül 1000 g-vel centrifugáltuk (4°C). Ezt követően a mintát lefagyasztottuk és a mérések időpontjáig -70°C-on tároltuk. A plazma TNF- α ill. interleukin-6 (IL-6) koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható enzim-kapcsolt immunosorbent-assay segítségével határoztuk meg (Quantikine ultrasensitive ELISA kit; Biomedica Hungaria Kft, Magyarország). A detektálható minimum TNF- α koncentráció 0,5 pg/ml, minimum IL-6 koncentráció pedig 14-36 pg/mL, a módszer inter-és intra-assay koefficiens értéke 10%-nál alacsonyabb volt.

3.4. Konvencionális fénymikroszkópos szövettani vizsgálat

Teljes vastagságú bélmintákat vettünk minden csoportban, a biopsziákat 6%-os formalinban fixáltuk, paraffinba ágyaztuk, 4 μ m vastag metszetekre vágtuk és hematoxilín-

ezinnal festettük. Vizsgáltuk a leukocita infiltrációt, a szövetkárosodás mértékét Riley-féle szemikvantitatív módszerrel határoztuk meg (Riley 1991) a következő kritériumok szerint: 1. PMN sejtek akut gyulladással beszűrődése a lamina propriában (0-3); 2. kripta tályogok (0-3); 3. mucin hiány (0-3); 4. felszíni sejt integritás (0-3); 5. krónikus gyulladással beszűrődés, kerek sejtek a lamina propriában (0-3); 6. kripta szerkezet szabálytalansága (0-3); 7. transzmurális vagy csak a lamina propriát érintő károsodás (0-1), diffúz vagy fokális károsodás (0-1).

3.5. A szövetkárosodás *in vivo* vizsgálata

A disztális colon nyálkahártya károsodás mértékét *in vivo* szövettani vizsgálómódszerrel, fluoreszcens konfokális pásztázó lézer endomikroszkópia segítségével határoztuk meg (Five1, Optiscan Pty. Ltd., Melbourne, Victoria, Australia). Az anusztól 8 cm-re proximálisan a colon lumenét megnyitottuk, a nyálkahártyát feltártuk. A mucosa mikrovaskuláris szerkezetét fluoreszcein isothiocianát-dextran (FITC-dextran; 150 KDa, 20 mg/mL oldat fiziológiás sóban, Sigma Chem., 0,3 ml i.v.) adása után vizsgáltuk. Az eszköz objektívét a vastagbél nyálkahártyára helyeztük és 5 perccel a festék beadása után (1 scan/kép, 1024 x 512 pixel és 475 x 475 µm képenként) konfokális képeket készítettünk. A nyálkahártya szerkezeti változásait akridin orange fluoreszcens festék (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) felszíni alkalmazása után vizsgáltuk. A felesleges festéket 2 perccel a képek készítése előtt fiziológiás sóval lemostuk a nyálkahártyáról.

A TNBS-kezelt állatokban különálló, aktív, gyulladt területeket vizsgáltunk és ezeket hasonlítottuk össze a kezelt és kontroll csoportokkal, 4 kritériumon alapuló szemikvantitatív pontrendszerrel: I. a hajszálerek szerkezete (0 normális; 1 festék kilépés, de az érszerkezet felismerhető; 2 károsodás és az érszerkezet felismerhetetlen); II. kripta károsodás/denudáció (0 nincs károsodás; 1 látóterenként legalább egy felismerhetetlen kriptaszerkezet; 2 látóterenként több mint egy felismerhetetlen kriptaszerkezetű terület, vagy több mint 30%-ban denudált kripták; III. ödéma (0 nincs ödéma; 1 mérsékelt epitheliális duzzanat; 2 súlyos ödéma); IV. hámsejtek körvonalai (0 normális, tiszta körvonalak; 1 elmosódott körvonalak; 2 nincs normális sejtkontúr). Látóterenként megszámláltuk a nyáksejteket és meghatároztuk a mirigyekhez való arányukat (nyáksejtek száma/mirigyek száma).

3.6. Kísérleti csoportok és protokoll

Az I. kísérletsorozatban a PC előkezelés hatásait vizsgáltuk a colitis akut fázisában 3 kísérleti csoportban (1-3. csoport), míg további 3 csoport állatai esetében (4-6. csoport) a

szubakut fázisban kifejtett hatását elemeztük (n=8; minden csoportban). Az 1. és a 4. csoport állatai csak oldószert kaptak intracolónálisan (25% etanol) és az 1 és a 6 napos vizsgálathoz kontrollként szolgáltak. A többi csoport egyedeinél TNBS (40 mg/kg) intracolónális alkalmazásával vastagbélgyulladást hoztunk létre. A 3. csoportban a TNBS indukció előtt, hat napon keresztül speciális tápot alkalmaztunk (Ssniff Spezialdiäten, Ssniff GmbH, Soest, Germany), ezek az állatok 2%-os PC (1,2-diacilglicero-3-foszfokolin, R45, Lipoid GmbH, Ludwigshafen) tartalmú tápot, míg az 1-2. és 4-5. csoport tagjai normál laboratóriumi tápot kaptak. A 6. csoportban pedig a PC-vel dúsított tápot 3 nappal a colitis indukció előtt kezdtük, és azt követően még további három napig adtuk.

A II. kísérletsorozat első részében, melyben a colitis akut fázisát (1. nap) vizsgáltuk, 4 csoportba osztottuk az állatokat (1-4. csoport, n=10 minden csoportban): az első csoport csak oldószert kapott intracolónálisan (25% etanol) és kontrollként szolgált. A többi csoport egyedeinél TNBS (40 mg/kg) intracolónális alkalmazásával vastagbélgyulladást hoztunk létre. A 3. csoport tagjainál a colitis indukció után kinurénsav (Sigma Chem. USA, 25 mg/kg/ml), a 4. csoportban pedig SZR-72 (Gyógyszerkémiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem, 10 mg/kg/ml) kezelést alkalmaztunk i.v. infúzióban.

A II. kísérletsorozat másik részében, amelyben a colitis szubakut fázisát (6. nap) modelleztük, hasonlóan jártunk el (5-8. csoport, n=8 minden csoportban). Az 5. csoport az álműtött volt, míg a többiben colitist indukáltunk. A 7-8. csoportban kinurénsav, ill. SZR-72 kezelést a TNBS beöntés utáni 6. napon alkalmaztuk.

Vizsgálatainkat a colitis indukciót követően, az 1. és a 6. napon végeztük. Műtéti előkészítést követően hemodinamikai méréseket, majd konfokális lézer scanning endomikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, végül vérmintát vettünk a plazma citokin szint meghatározásra, és szövetmintát konvencionális kórszövetteni vizsgálatra.

3.7. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelését statisztikai szoftver csomag segítségével végeztük (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Németország), nem parametriás módszereket alkalmazva. A csoportok közötti különbségek meghatározása Kruskal–Wallis és Dunn próbával történt. A grafikonokon a medián értéket és az interquartilis félterjedelmet ábrázoltuk. A szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

4. EREDMÉNYEK

A gyulladás akut fázisát hiperdinámiás keringés, emelkedett perctérfogat jellemezte, és ezt sem a kinurénsav kezelés, sem a PC előkezelés nem tudta befolyásolni. A vizsgálatok 6. napján nem tapasztaltunk eltérést a kontroll és a colitises állatok keringési paramétereiben (vérnyomás, szívfrekvencia, perctérfogat). Ugyanakkor a kezeletlen colitis alatt a plazma TNF- α és IL-6 citokinek szintje jelentősen, szignifikánsan emelkedett a kontroll értékekhez képest mind az akut, mind a szubakut fázisban, amelyet a kinurénsav és a PC alkalmazása is szignifikánsan csökkentett.

A hagyományos fénymikroszkópos hisztopathológiai vizsgálat során a kontroll csoportban ép vastagbél mucosa szerkezetet figyelhettünk meg, leukocita infiltrációt nem tapasztaltunk. A TNBS indukciót követő 1. és 6. napon egyaránt jelentős mucosa károsodás volt megfigyelhető a kezeletlen colitises csoportban, amely pontszerűen a lamina propria réteget érintette, a felszíni mucin réteg hiányzott és jelentős leukocita infiltráció kísért. A leukocita akkumulációt mind a kinurénsav, mind a PC kezelés szignifikánsan csökkentette, mindkét fázisban, de a gyulladt vastagbél morfológiai változásait, a mucosa és a mucin réteg károsodását csak a PC előkezelés csökkentette szignifikáns mértékben, az NMDA antagonistá kezelési lényegében hatástalan volt erre a paraméterre.

Az *in vivo* vastagbél nyálkahártya morfológiai vizsgálat megerősítette az előbbieket, a kezeletlen colitises csoportokban kifejezett szöveti károsodást láttunk - kapilláris szerkezeti károsodással, ödémával, hámhiánnyal, nyáksejtek eltűnésével, míg a kontroll csoportban lényegi eltérést nem találtunk. TNBS hatására a fluoreszcens festék extravazációja a kapilláris rendszer roncsolódását jelezte, valamint kifejezett ödéma képződést észleltünk. A felszíni epithelium pusztulását, hámfosztottságot, a kripták denudációját, és a nyáktermelő sejtek számának fogyatkozását akridin orange festéssel tettük láthatóvá. A PC-vel előkezelt állatoknál a szöveti destrukciót ki lehetett védeni mindkét fázisban, mind a kapilláris-, mind az epithelium szerkezete megtartott volt, és a kehelysejtek száma is magasabb volt a colitises csoport egyedeihez képest. A kinurénsavval kezelt csoportokban nem észleltünk jelentős hatást, itt a konfokális pásztázó lézer endomikroszkópos vizsgálattal továbbra is a súlyos szöveti károsodás képe látszott.

5. DISZKUSSZIÓ

Kísérletes munkánkban a TNBS által okozott colitis akut és szubakut fázisaira jellemző gyulladási választ és a morfológiai elváltozások befolyásolhatóságát vizsgáltuk, két új terápiás lehetőség eredményeinek összehasonlításával. Az általunk alkalmazott TNBS modell nemcsak a humán gyulladási bélbetegségek klinikai tüneteit (hasmenés, véres széklet, súlyvesztés) utánozza, hanem a gyulladási mediátorok szintjében és a morfológiában bekövetkező változásokat (lokális szövethárosodás, nekrozis, bélfali leukocita infiltráció) is. Jellegzetes mikro- és makrokeresési változások következnek be, leukociták kitapadásával és extravasalódásával. A folyamat végeredményeképpen különböző fokú morfológiai károsodás alakul ki, amely a gyulladási változásokhoz hasonlóan különbözik a colitis egyes fázisaiban.

Az orális PC előkezelés és az NMDA receptor antagonistá kinurénsav és az SZR-72 analóg egyszeri adása jelentősen mérsékelte a gyulladási markereket, a TNF- α és a leukocita aktiváció mértékét a gyulladás mindkét vizsgált fázisában. A további, részletes morfológiai vizsgálatok során a colitis alatt kialakult epithelium és kapilláris szerkezeti károsodásról, valamint a mucin termelő helysejtek számának változásáról nyertünk adatokat. Ezt követően, a strukturális károsodás feltérképezésre irányuló vizsgálataink a PC előkezelés hatékonyságát és a kinurénsav kezelés hatástalanságát igazolták.

Az IBD pontos pathomechanizmusa még nem teljesen tisztázott, de a klinikai és kísérletes vizsgálatok alapján, a béltraktusban zajló kóros immunológiai reakció állhat a háttérben. Welters és munkatársai kapcsolatot igazoltak az NMDA receptor aktiváció és leukocita sejtvonalak között (Welters 2010). Kimutatták, hogy az NMDA receptorok nemcsak a neuronokon, hanem az endotheliumon és immun-kompetens sejteken is jelen vannak, ami közös szabályozó mechanizmusra utal (Mashkina 2010). Az NMDA receptorok inaktív limfocitákon alig expresszálódnak, ehhez megfelelő stimulus szükséges, ugyanakkor TNBS colitisben nagyfokú expresszálódásuk észlelhető. A glutamát az NMDA receptorokon keresztül a polimorf magvú (PMN) granulociták aktiválásához és kifejezett intracelluláris Ca^{2+} beáramláshoz vezet, ami citotoxikus hatású lehet. Igazolható tehát, hogy a béltraktusban az enterális idegrendszer és a celluláris immunrendszer közötti szabályozó folyamatokban az NMDA receptorok aktiválásának kulcsszerepe van (Boldyrev 2004, Miglio 2005). Vizsgálatainkban az NMDA receptor antagonistá kezeléssel a colitis hatására kialakuló PMN leukocita infiltrációt és a gyulladási citokin felszaporodást gátolni tudtuk a colitis 6. napján, azonban az akut fázisban a kezelés nem befolyásolta a TNF- α plazmaszintjét. Ennek

magyarázata a citokinek eltérő időbeli expressziója lehet; kimutatták, hogy a TNF- α indukciója időfüggő, és a szintje a colitis korai fázisában nem emelkedik meg szignifikánsan. Ugyanakkor kísérletünkben az NMDA antagonisták szerek egyszerű alkalmazásával a gyulladás által indukált morfológiai változásokat nem sikerült lényegesen csökkenteni. Az NMDA antagonisták terápiás hatásának igazolásához tehát további kísérletek (ismételt, vagy elhúzó dózisok) szükségesek.

A PC a bél nyálkahártya hidrofóbicitásáért felelős mucin alapvető komponense és protektív hatását részben lokálisan, részben szisztémásan fejtheti ki. A mucin PC tartalma bizonyítottan csökken TNBS alkalmazása után, valamint colitis ulcerosában szenvedő betegek nyákjában is (Stremmel 2005). Az elvékonyodott mucin nem képes hatékony barrierként működni, rajta keresztül átjuthatnak és a hámsejtekkel kapcsolatba kerülhetnek a bélben levő baktériumok, és immunválaszt kiváltva elindíthatják a gyulladásos kaskádot (Braun 2009). Kísérletünkben a PC-vel kezelt állatokban megemelkedett a mucin termelő kehely sejtek száma, amely a mucin kiemelt jelentőségét jelzi a gyulladás megelőzésében, illetve a PC által indukált regeneráció folyamatában.

Mind ezt a következtetést tovább erősítik azok a korábbi adatok, amelyek a PC jótékony hatását írják le a gastrointesztinális traktus gyulladásos állapotaiban. Humán vizsgálatban 3 hónapos PC kezelés hatására a krónikusan aktív colitises betegek zömében remissziót, vagy a betegség klinikai aktivitásának szignifikáns javulását sikerült elérni, a szteroid kezelés elhagyása mellett (Ehehalt 2004). Ugyanakkor az orálisan bejuttatott PC nemcsak helyileg képes a gyulladást befolyásolni, felszívódása után a kolin metabolit a kolinerg anti-inflammációs útvonalon keresztül, a makrofágok és PMN leukociták gátlását is okozhatja (Tracey 2007).

Modellünkben *in vivo* körülmények között figyelhetjük meg a TNBS hatására kialakult kifejezett epitélium és kapilláris szerkezet roncsolódást, és a PC kezelés protektív hatását a gyulladás korai és szubakut fázisaiban egyaránt. A táplálékkal bejuttatott PC előkezelés megőrizte a nyálkahártya integritását és potenciálisan jótékony hatása a kehelysejtek számának növekedésében is megmutatkozott. NMDA antagonisták adásával ezt a protektív hatást nem tudtuk elérni. A különbség oka a PC kezelés hosszabb időtartama lehet; az állatok a gyulladás kiváltása előtt és az akut fázisban is kezelést kaptak, míg a kinurénsavat csak egy alkalommal, a már kialakult, florid colitist követő szakaszban alkalmaztuk.

Mindkét szer hatásmechanizmusának kulcsfontosságú eleme lehet a plazma TNF- α szintjének csökkentése. Kimutatták, hogy TNBS colitisben a TNF- α a mucin gének expresszióját gátolja, valamint hogy TNF- α ellenes antitestekkel a nyáktermelő sejtek és a

nyák megfogyatkozása megelőzhető (Dharmani 2011). A leukocita akkumuláció és a TNF- α szintjének csökkentése a kinurénsav kezelés kedvező tulajdonságaira utal, így mindezek alapján feltételezzük, hogy a szer dózisének változtatásával, vagy ismételt adásával a hatékonyság fokozható lesz.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a colonban TNBS hatására kialakuló súlyos gyulladós folyamat számos elemét sikeresen tudtuk befolyásolni *per os* PC előkezeléssel és az endogén NMDA receptor antagonistá kezeléssel is. Mindkét kezelés mechanizmusának fókuszában a plazma TNF- α szint csökkentése áll. *In vivo* bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy az orális PC kezelés szöveti destrukciót kivédő kedvező hatása a károsodott nyálkahártya barrier regenerálódásának felgyorsításával függ össze. Mindezek alapján a PC alkalmazását ígéretes lehetőségnek tarthatjuk a gyulladós bélbetegségek terápiájában, a relapsusok megelőzésére és a sebészi beavatkozást igénylő szövödmények számának csökkentésére.

6. A TÉZIS FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. TNBS által kiváltott kísérletes colitis akut fázisában hiperdinamias keringést, emelkedett gyulladós citokin szinteket, és a proximális colon leukocita infiltrációját észleltük. A szubakut fázisban a keringés normalizálódott, de a citokinek szintje és a leukocita infiltráció mértéke továbbra is magas volt.
2. Dinamikus *in vivo* szövettani vizsgálattal, konfokális pásztázó lézer endomikroszkópiával demonstráltuk a morfológiai változásokat a colitis különböző fázisaiban. Bizonyítottuk, hogy PC előkezeléssel a bélfal morfológiai károsodása a colitis mindkét vizsgált fázisában megelőzhető.
3. A PC előkezelés a gyulladós citokin képződés és a szöveti leukocita felszaporodás gátlásán keresztül mérsékelte a gyulladós folyamatot. A vastagbél nyálkahártya kehelysejtjeinek száma szignifikánsan nőtt a PC hatására, a nyáktermelés fokozódott, így mindez kisebb szöveti károsodást eredményezett.
4. NMDA receptor antagonistá kezeléssel a colitis szubakut fázisában a gyulladós folyamat mérsékelhető, a citokin szint csökkentése és a fehérvérsejtek szöveti akkumulációjának gátlása révén. Az általunk alkalmazott endogén és szintetikus NMDA receptor antagonistá szerek egyszeri adásával nem lehetett megakadályozni a szöveti károsodást.

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Itt szeretném kifejezni hálámat jelenlegi és korábbi szakmai vezetőimnek – Túri Sándor Professor Úrnak, Füzesi Kristóf Professor Úrnak, Tornyos Szabolcs és Csajbók Ernő Főorvos Uraknak, hogy szakmai és élettapasztalatuk átadása mellett tudományos munkámat is támogatták.

Köszönettel tartozom Boros Mihály Professor Úrnak, hogy lehetővé tette a tudományos munkám végzését a Szegedi Sebészeti Műtéttani Intézetben, valamint munkám szakmai irányításáért.

Hálával tartozom Kaszaki József Tanár Úrnak a kísérletes munka világába való bevezetésért, a tudományos munkámban nyújtott rengeteg segítségért, tanácsért.

Külön köszönöm Varga Gabriellának a szakmai segítséget és az együttműködést a kísérletek során. Köszönöm az Intézet dolgozóinak hogy szakértelmükkel, pontos munkájukkal hozzájárultak a kísérletek eredményeihez.

Végül, külön köszönetemet és hálámat szeretném kifejezni Szüleimnek a nevelésért, példamutatásért, mellyel pályámon elindítottak, Feleségemnek, családomnak a biztatásért, türelemért, támogatásért és a nyugodt, harmonikus háttérért, mellyel a mindennapokban és ebben a munkában is támogattak.