

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Sigma-1 receptor mediálta protektív mechanizmus vizsgálata TNBS-indukálta patkány colitis modellben

Almási Nikoletta

Témavezető:

Dr. Kupai Krisztina
tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék



Szeged

2021

Rövidítések jegyzéke:

3-NT	3-nitrotirozin
ANOVA	analysis of variance
CD	Crohn betegség
CU	colitis ulcerosa
DMSO	dimetil-szulfoxid
DTNB	5,5-ditio-bisz-2-nitrobenzoészav
eNOS	endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz
ER	endoplazmatikus retikulum
FLV	fluvoxamin
GI	gastrointesztinális
GSH	glutathion
HMGB1	high mobility group box 1
HO	hemoxigenáz
IBD	gyulladásos bélbetegségek (Inflammatory Bowel Diseases)
IL-6	interleukin-6
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid-szintáz
IP ₃ R	inositol-1,4,5-trifoszfát receptor
MAM	mitokondrium-asszociált endoplazmatikus retikulum membrán
MPO	mieloperoxidáz
NF- κ B	nukleáris faktor kappa B
NOS	nitrogén-monoxid-szintáz
Prdx1, -2, -4, -6	peroxiredoxin-1, -2, -4, -6
ROS	reaktív oxigén gyökök
SASP	szulfaszalazin
SEM	standard error of mean
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SSRI	szelektív szerotonin visszavétel gátló
TNBS	2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav
UCHL-1	ubiquitin C-terminális hidroláz L1
σ 1R	sigma-1 receptor
σ 2R	sigma-2 receptor
σ R	sigma receptor

Bevezetés

A gyulladásoz bélbetegségek (Inflammatory Bowel Diseases (IBD)) a gasztrointesztinális (GI) traktus krónikus gyulladással járó kórképeinek gyűjtőneve. Az IBD két fő típusa a Crohn betegség (CD) és a colitis ulcerosa (CU). Epidemiológiai kutatások alapján az IBD a nyugati, fejlettebb országokban elterjedtebb és az utóbbi évtizedben stagnálást mutat, míg a fejlődő országokban a betegség incidenciája növekszik. Egyre inkább tisztázott, hogy a betegség kialakulásában genetikai faktorok, környezeti tényezők, különböző immunológiai folyamatok, valamint a szervezet mikrobiomja játszik szerepet. Az IBD patogenezisében számos immunológiai folyamat és mediátor szerepe megemlíthető, mint az interleukin-6 (IL-6) citokin megnövekedett szintje és a nukleáris faktor kappá B (NF- κ B) emelkedett expressziója. Továbbá szerepet játszhat még a high mobility group box 1 (HMGB1) nukleáris mediátor, az ubiquitin C-terminális hidroláz L1 (UCHL-1) deubiquitináló enzim immunszuppresszálo szerepe, a szén-monoxid gázotranszmittert termelő hemoxigenáz (HO) enzim működése, valamint a nitrogén-monoxid termeléséért felelős nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) enzimek. Emellett az oxidatív stressz szerepe is bizonyítást nyert az IBD kialakulásában. IBD esetében megnövekedett reaktív oxigén gyök (ROS) termelés tapasztalható, amely nemcsak annak patomechanizmusában, hanem az IBD-asszociált daganatos megbetegedések kialakulásában és progressziójában is fontosnak bizonyul. Az oxidatív stressz mértékére a 3-nitrotirozin (3-NT) szint meghatározásával lehet következtetni. A szervezetben képződő ROS-ok semlegesítéséért az antioxidáns rendszer a felelős, amelynek fontos résztvevői a thiol tartalmú glutation (GSH), a szuperoxid-dizmutáz (SOD), valamint a peroxiredoxin (Prdx) enzimcsalád izoformái.

A sigma receptorok (σ R) intracelluláris chaperon tulajdonságú fehérjék, amelyek a mitokondrium-asszociált endoplazmatikus retikulum (ER) membránban (MAM) lokalizálódnak. Alapvető funkciójuk az inozitol-1,4,5-trifoszfát receptoron (IP₃R) keresztül Ca²⁺ homeosztázis regulálása, valamint az ER védelme oxidatív stresszel szemben. Különböző stressz vagy agonista ligandkötődés hatására a receptor a MAM-ból a plazmamembránba és a nukleáris membránba transzlokálódik, így fejtve ki protektív hatását az egész sejtben. A σ R-eket alapvetően két csoportra oszthatjuk, a σ 1R és a σ 2R-ra, amelyek közül a σ 1R nagyobb figyelmet kap a kutatásban és szerepe felmerült gyulladással járó kórképek, mint a szepszis kezelésében.

Érdekes módon a σ 1R-hoz rengeteg ligandféleség kötődik magas affinitással, mint például különböző benzomorfan-származékok, antipszichomimetikumok, antihisztaminok, antidepresszánsok, antifungális szerek, valamint szerotonin visszavétel gátlók (SSRI). A σ 1R-

hoz agonistaként magas affinitással kötődik az SSRI fluvoxamin (FLV), amelyről számos állatmodellben leírták annak gyulladáscsökkentő hatását.

Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a σ 1R szerepének vizsgálatát 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS)-indukálta patkány colitis modellben.

Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Kifejeződik-e a σ 1R a colonszövetben, valamint, hogy befolyásolják-e a receptor denzitását és expresszióját a TNBS modell indukálása és a különböző alkalmazott σ 1R-asszociált kezeléseink?
- σ 1R ligandok (agonista: FLV, antagonistá: BD1063) alkalmazása során mely dózisokat tekinthetjük effektívnek a TNBS-indukálta gyulladásra kifejtett hatásuk alapján?
- Valamint, hogy hogyan valósul meg az FLV hatásos dózisének alkalmazásával a protektív mechanizmus?

Kísérleti elrendezésünkben az FLV a σ 1R aktiválását, a BD1063 antagonistá a σ 1R csökkent aktivitását modellezi, a kombinációs kezelés során pedig az agonista és antagonistá szimultán beadásakor feltételeztük, hogy a biokémiai paraméterekben tapasztalt változás σ 1R regulált, ha az antagonistá megszüntette az agonista-indukálta protekciót.

Anyagok és módszerek

σ 1R radioligandum kötődés vizsgálata patkány colon membrán preparátumon

A kompetíciós receptorkötődési vizsgálatokat Wistar Hannover patkányok colon membrán preparátumán végeztük [³H](+)-pentazocin vagy hideg ligand alkalmazásával. Az egyensúlyi disszociációs állandót és a receptorsűrűséget radioligandum telítési kísérlettel határoztuk meg.

Kísérleti elrendezés és a TNBS-indukálta colitis modell

Kísérleteinket 225-250 g-os hím Wistar Hannover patkányokon végeztük. Az állatokat 3 csoportra osztottuk: abszolút kontroll (nem kaptak kezelést, n=12), 50% etanol intracolónálisan (i.c.), (n=12), és TNBS (10 mg 50% etanolban oldva i.c., n=85). A colitis modellt Morris és mtsai. által leírt módszerrel indukáltuk, amely során az állatokat 16 órán keresztül éhezettük,

majd a TNBS beöntést i.c. végeztük egy 8 cm-es polietilén kanül segítségével a rektumon keresztül. A TNBS kezelést kapott állatokat tovább osztottuk 10 csoportra és a következő anyagokkal kezeltük: fluvoxamin (FLV, σ 1R agonista) i.c. különböző dózissal (10 mg/kg, 1 mg/kg, 0,1 mg/kg és 0,01 mg/kg 3% dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldva); BD1063 (σ 1R antagonist) 1 mg/kg és 0,1 mg/kg (0,9%-os fiziológias sóoldatban oldva); FLV + BD1063 (kombinációs kezelés a két ligand hatásos dózissal: FLV 1 mg/kg + BD1063 0,1 mg/kg); fiziológias sóoldat (BD1063 vivőanyaga); DMSO (3%, FLV vivőanyaga); szulfaszalazin (SASP, pozitív kontroll, per os 2 x 25 mg/kg). A kezeléseket napi egyszer végeztük 3 napig ugyanabban az időpontban. Az állatokat az i.c. kezelések előtt 5 órán keresztül éhezettük. A TNBS kezelés után 72 órával az állatokat feláldoztuk a rektumtól számított 8 cm-es vastagbél szakaszokat kipreparáltuk további makroszkópos analízisre. A szövetet ezután folyékony nitrogénben fagyasztottuk és biokémiai mérésekre használtuk fel.

Lézió meghatározása

A kialakult lézió makroszkópos analízisét az elkészült fotók alapján vizsgáltuk, a laborunk által fejlesztett, a planimetria elvén alapuló programmal (Stat_2_1_1, Szeged). A kialakult lézió nagysága a teljes kipreparált 8 cm-es bélszakasz területének és a gyulladt terület méretének hányadosa.

MPO enzim aktivitásának meghatározása

A pro-inflammatorikus mieloperoxidáz (MPO) enzim a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok markerének tekinthető, aktivitása korrelál a gyulladás mértékével, valamint a neutrofil granulocita akkumulációval. Az MPO enzim aktivitását spektrofotometriás módszerrel vizsgáltuk.

A σ 1R, az UCHL-1, az iNOS, az NF κ -B p65, valamint a HMGB1 expressziójának vizsgálata

A σ 1R, az UCHL-1, az iNOS, az NF κ -B p65, valamint a HMGB1 fehérjék expresszióját Western blot technikával határoztuk meg. Az előhívást a torma-peroxidáz enzim működésén alapulva, ECL felhasználásával végeztük és a kapott eredményt QuantityOne szoftverrel analizáltuk. Az eredményt β -aktin belső kontrollra normalizáltuk.

IL-6, eNOS, 3-NT és a PRDX1, -2, -4, -6 szintjének és a SOD aktivitásának meghatározása

Az említett paraméterek szintjének meghatározása ELISA módszerrel történt, a SOD enzim aktivitásának meghatározása pedig specifikus kit segítségével történt. Méréseink során követtük a gyártó által a kitekhez mellékelt instrukcióit.

A HO enzim aktivitásának meghatározása

A HO enzim aktivitását a reakció során képződő bilirubin szintjének meghatározásán alapuló spektrofotometriás módszerrel mértük.

A GSH szintjének meghatározása

A thiol tartalmú GSH szintjének meghatározása az 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzoésav (DTNB) módszerrel történt és spektrofotometriásan mértük.

Fehérjemeghatározás

Az összfehérje mennyiségi meghatározását Bradford módszerrel végeztük és spektrofotometriás módszerrel detektáltuk.

Statisztikai analízis

Eredményeinket átlag \pm standard error of mean (SEM)-ben ábrázoltuk. A statisztikai analízist analysis of variance (ANOVA) módszerrel végeztük Bonferroni vagy Holm-Sidak post hoc tesztekkel. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

Eredmények

A [³H](+)-pentazocin specifikus kötődése nagy affinitású telítést mutatott a colon szövetben. Az abszolút kontroll állatok esetében, amelyek nem kaptak semmilyen kezelést, közepes σ 1R denzitást tapasztaltunk, amely TNBS kezelés hatására szignifikáns csökkenést mutatott. Továbbá megállapítottuk, hogy az 1 mg/kg-os FLV kezelés szignifikánsan növelte a σ 1R maximális kötési kapacitását a TNBS csoporthoz viszonyítva, valamint szignifikánsan növelte a σ 1R expresszióját is. A hatásos FLV dózis szignifikánsan csökkentette a gyulladáshoz vezető kiterjedtségét, a BD1063 σ 1R antagonistája szignifikánsan súlyosbította, valamint a két ligand hatásos dózisának szimultán beadásakor (kombinációs kezelés) a BD1063 jelenléte megszüntette az FLV-indukálta protekciót a colonban. A kombinációs kezelés eredményeiből arra következtettünk, hogy az FLV-indukálta protekció a σ 1R-on keresztül valósulhat meg. Az FLV-indukálta protekció molekuláris hátterében eredményeink alapján a gyulladáshoz vezető faktorok közül az IL-6 szint csökkenését, az UCHL-1 enzim megnövekedett expresszióját, a HO aktivitás növekedését és az NF- κ B p65-ös alegységének, valamint a HMGB1 nukleáris mediátor kifejeződésének csökkenését, valamint a NOS enzim izoformái esetében az FLV iNOS csökkentő és eNOS serkentő hatásának szerepét feltételezzük a protekció kialakulásában.

Az oxidatív stresszhez köthető faktorok esetében a 3-NT csökkenésének, a GSH növekedésének és a Prdx1 enzim szint emelkedésének tulajdonítunk jelentős szerepet a σ 1R-asszociált kezeléseink eredményeként a protekció kialakulásában.

Összefoglalás

- I. A σ 1R a colon szövetben detektálható mennyiségben van jelen, közepes denzitással.
- II. A TNBS-indukálta gyulladás a σ 1R csökkent denzitását eredményezte a kontroll állatokhoz képest. A receptor denzitása az FLV-vel történő kezelés után a kontroll állatok értékeihez konvergált. Továbbá a σ 1R agonista FLV effektív dóziséval történő kezelés a σ 1R megnövekedett expresszióját indukálta.
- III. A σ 1R agonista FLV hatásos dózisa szignifikánsan csökkentette a gyulladásos léziók kiterjedését a TNBS-indukálta colitis csoporthoz viszonyítva. Az FLV által közvetített protekciót a BD1063 antagonistá szimultán beadása (kombinációs kezelés) megszüntette.
- IV. A σ 1R-indukálta protekció mechanizmusában eredményeink alapján fontos lehet a gyulladásos folyamatok mérséklése, többek között az MPO enzim aktivitásának és az IL-6 citokin szintjének csökkenése, továbbá az UCHL-1 enzim expressziójának emelkedése. Mindemellett szerepet játszhatott a protekcióban az FLV-indukálta 3-NT szint csökkenése és a totál GSH szint növekedése, tehát összességében az oxidatív stressz csillapítása.

Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10060398

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája:

1. **Almási N.**; Török S.; Dvorácskó S.; Tömböly C.; Csonka Á.; Baráth Z.; Murlasits Z.; Valkusz, Z.; Pósa A.; Varga C.; Kupai K. Lessons on the Sigma-1 Receptor in TNBS-Induced Rat Colitis: Modulation of the UCHL-1, IL-6 Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 4046.

IF: 4,556

2. **Almási N.**; Török S.; Valkusz Z.; Tajti M.; Csonka Á.; Murlasits Z.; Pósa A.; Varga C.; Kupai K. Sigma-1 Receptor Engages an Anti-Inflammatory and Antioxidant Feedback Loop Mediated by Peroxiredoxin in Experimental Colitis. *Antioxidants* 2020, 9, 1081.

IF: 5,014

Egyéb közlemények listája:

1. **Almási N.***, Murlasits Z.*, Al-awar A., Csonka Á., Dvorácskó S., Tömböly C., Török S., Bester D., Pósa A., Varga C., & Kupai K. Effects of aging on proteasomal-ubiquitin system, oxidative stress balance and calcium homeostasis in middle-aged female rat colon, *Physiology International*, 2021, 108(1), 27-42.

* megosztott első szerző

IF: 1,410

2. Al-awar A., **Almási N.**, Szabó R., Ménesi R., Szűcs G., Török S., Pósa A., Varga C. and Kupai K. Effect of DPP-4 inhibitor sitagliptin against ischemia-reperfusion (I/R) injury in hyperlipidemic animals, *Acta Biologica Szegediensis*, 2019, 62(2), pp. 180-189.

3. Al-awar A.; **Almási N.**; Szabó R.; Takacs I.; Murlasits Z.; Szűcs G.; Török S.; Pósa A.; Varga C.; Kupai K. Novel Potentials of the DPP-4 Inhibitor Sitagliptin against Ischemia-Reperfusion (I/R) Injury in Rat Ex-Vivo Heart Model. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3226.

IF: 4,556

4. Kupai K, **Almási N**, Kósa M, Nemcsók J, Murlasits Z, Török S, Al-Awar A, Baráth Z, Pósa A, Varga C. H₂S confers colonoprotection against TNBS-induced colitis by HO-1 upregulation in rats. *Inflammopharmacology*, 2018, Apr;26(2):479-489. IF: 3,238

5. **Almási N***, Pósa A*, Al-Awar A, Török S, Baráth Z, Nemcsók J, Murlasits Z, Nagy I, Puskás G. L, Varga C, Kupai K. Differentially expressed microRNAs and their relation to neurotransmitters in TNBS-induced colitis in rat colon. *ACADEMIA JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH*, 2017, 5: 9 pp. 277-289., 13 p.

* megosztott elsőszerező

6. Al-awar A, Kupai K, **Almási N**, Murlasits Z, Török S, Bóta A, Krész M, Berkó A, Pósa A, Varga C. Effect of long-term physical exercise on metabolic risk parameters in Overweight/Obese subjects: a network-based analysis approach. *ACADEMIA JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH*, 2017, 5: 10 pp. 419-427., 9 p.

Nyilatkozat

Alulírott Dr. Kupai Krisztina, mint a közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Almási Nikoletta Ph.D jelölt jelentős mértékben hozzájárult a dolgozat alapjául szolgáló két tudományos publikáció létrehozásához és értekezésében közölt eredményeit más Ph.D értekezésben nem használjuk fel. Kijelentem, hogy a Jelölt által végzett kísérletek eredményét saját magam és a további társszerzők a tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel, és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

2021.10.06.

Dr. Kupai Krisztina
témavezető