

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK
KÍSÉRLETES VASTAGBÉLGYULLADÁSOS
PATKÁNYMODELLBEN

MAGYARINÉ BERKÓ ANIKÓ

TÉMAVEZETŐK:

DR. VARGA CSABA

SÓTINÉ DR. BAGYÁNSZKI MÁRIA

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK



SZEGED

2019

Rövidítések jegyzéke

CD Crohn-betegség

CU Colitis ulcerosa

ECM extracelluláris mátrix

ELISA enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok

IBD gyulladásoos bélbetegségek

I.C. intra colonális

IL-6 Interleukin 6

JNJ 10191584 H4 receptor antagonist (5-chlorobenzimidazolyl N-methylpiperazine carboxamide)

JNJ 26993135 LTA₄H inhibitor (1-[4-(benzothiazol-2-yloxy)-benzyl]-piperidine-4-carboxil-sav)

LTA₄H leukotrién A₄ hidroláz

LTB₄ leukotrién B₄

MMP mátrix metalloproteináz

MMP-9 mátrix metalloproteináz 9

MPO mieloperoxidáz aktivitás

TIMP szöveti MMP inhibitor

TIMP-1 szöveti MMP inhibitor 1

TNBS 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav

TNF- α tumornekrózis faktor-alfa

Kulcsszavak

Crohn-betegség, TNBS modell, H4 hisztamin receptor antagonist, leukotrién B₄ inhibitor, MMP-9, TIMP-1

Bevezetés

A gyulladássos bélbetegségek (inflammatory bowel diseases-IBDs) aktív és nyugalmi szakaszok váltakozásával az emésztőszervrendszer bármely területét érinthetik. A betegség kialakulásában számos környezeti és genetikai tényező vesz részt, valamint több egymásra ható molekuláris és immunvédelmi mechanizmus játszik szerepet. Főbb csoportjai a Crohn-betegség (CD), amely a gyomor-bélcsatorna bármely szakaszán előforduló, a bélfal minden szövettani réteget érintő krónikus gyulladás, ami az ileum disztális részén és a colonban jelentkezik leggyakrabban, valamint a colitis ulcerosa (CU), ahol a krónikus gyulladás összefüggő, a mucosa, felületesen a submucosa területét érinti, és a colonra lokalizálódik.

A tüneti kezelésekre számos gyógyszer-típus alkalmazható: ilyen gyógyszer-csoportok a *szalicilsav származékok*, melyek hatásukat helyileg, közvetlenül a nyálkahártyán fejtik ki. A *glükokortikoszteroidokat* súlyos esetekben alkalmazzák, mellékhatásai azonban nem elhanyagolhatók. Lokálisan alkalmazva hasonlóan hatékonyak, mint a szalicilsav származékok. Az *immunszuppresszív, immunmodulációs szerek* a szteroid rezisztencia esetén alkalmazandók. Az *antibiotikumok* antibakteriális hatásukat kifejtve csökkentik a betegség újbóli kialakulását. Az eddig alkalmazott *biológiai hatóanyagok* a gyulladáskeltő citokineket gátolják, növelik a regulátor T sejtek számát, ezáltal csökken a fekélyes területek nagysága, valamint a gyulladás mértéke. Hátrányuk, hogy alkalmazásuk rendkívül drága.

Az MMP-k cink- és kalciumfüggő proteolitikus enzimek, melyek részt vesznek az extracelluláris mátrix (ECM) átalakításában és lebontásában, valamint ezen funkción túlmutatva számos szerepet töltenek be a bélgyulladásban. Az MMP-9 a CD betegek vastagbél-szövetében expresszáldott leggyakoribb mátrix metalloproteináz (MMP), és ezért a IBD súlyosságának, aktivitásának meghatározásában biomarkernek tekinthető, különösen a krónikus vizsgálatok esetében. A fiziológiás körülmények között a szöveti MMP-inhibitor (TIMP) szabályozza az MMP-k működését, de ez a hatásuk számos gyulladás esetén nem érvényesül.

A hisztamin H₄ blokkolók gátolják többek között a neutrofil infiltrációt és ezáltal is számos gyulladásos modellben pozitív hatásúnak bizonyultak.

A leukotriének és származékaik számos gyulladásos hatással bírnak, így inhibitoraik lehetséges farmakológiai felhasználási lehetőségeket ígérnek.

A fentiek alapján az *egyéb lehetséges gyulladást csökkentő anyagok*, mint a szelektív hisztamin H₄ receptor antagonisták, LTA₄H szelektív inhibitorok szájon át történő alkalmazása ígéretes kezelési terápiát jelenthet.

Célkitűzések

Doktori munkám első részében azt vizsgáltuk, hogy a **krónikus** bélgyulladás esetén bizonyos szabályozó fehérjéknek milyen szerepe van a striktúrák kialakulásában:

- I. Hogyan változik az ECM-et szabályozó MMP-9 és TIMP-1 fehérje expressziója és aktivitása krónikus TNBS patkány modellben?

Munkám második felében a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk:

- II. Hogyan változnak a gyulladási paraméterek hisztamin H4 receptor blokkoló hatására akut TNBS modellben?
- III. Hogyan befolyásolja az LTB₄ gátlása a CD-t akut TNBS modellben?

Vizsgálati módszerek

A gyulladáshos bélbetegségek modellezése

Az általunk alkalmazott 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav(TNBS)-modell kémiailag kiváltott gyulladáshos modell. Egyszeri beadással akut-, többszöri, ismételt kezelés alkalmazásával krónikus gyulladáshos lehet előidézni, mely az irodalomban elfogadott, a Crohn-betegség tüneteit jól reprodukáló modell.

I. Krónikus vizsgálatok

a. *Krónikus TNBS modell:* A kísérlet során az állatokat random módon felosztottuk kontroll, 1x,- 2x- 3x TNBS-sel kezelt csoportokra. A gyulladáshos periódusok kialakulását két hetente ismétlődő 10 mg TNBS kezeléssel idéztük elő intra colonálisan (i.c.) (összesen maximum 3x TNBS kezelést alkalmazva). Mintavétel a krónikus kísérleti periódus 90. és 120. napján történt, a végbéltől számított 8 cm bélszakaszt eltávolítva.

b. *Gyulladáshos paraméterek meghatározása:* Az állatok testtömegét hetente mértük. A gyulladáshos kiterjedését, a makroszkópos károsodást számítógépes program segítségével lemértük, a kapott értéket a 8 cm-es béldarab teljes területének %-ban ábrázoltuk.

c. *Szövetteni vizsgálatok:* A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a mintavétel az adott szűkületek területéről történt. A kontroll állatoknál a colon végbél felőli 8 cm-es szakaszának középső részét vizsgáltuk. Toluidinkék festést alkalmaztunk félvékony metszeteken.

d. *Fehérje(MMP-9 és TIMP-1) expresszióshos és aktivitáshos vizsgálatok:* a vastagbél körkörös és hosszanti simaizomrétegeiből a kísérleti periódus (120. nap) végén. Az expresszióshos és aktivitáshos int x mm²-ben fejeztük ki. A fehérjemérésnél Bradford módszereét alkalmaztuk.

e. *Statisztikai analízis*: Az adatok értékelése során ANOVA és Newman-Keuls tesztet végeztünk. Az értékeket átlag±szórás (standard error of mean, SEM) formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ valószínűségi értékben határoztuk meg.

II. Akut vizsgálatok

a. *Akut TNBS modell*: Az állatokat 10 mg TNBS-val kezeltük i.c. A TNBS kezelést követően, 72 óra elteltével, a cervikális diszlokáció után a vastagbéllet a végbéltől számítva kb. 8 cm hosszan eltávolítottuk.

b. *H4 hisztamin antagonistá vizsgálat*

i. *A hisztamin H4 receptor blokkoló kezelést* 4 napig, naponta kétszer különböző dózisokban (JNJ 10191584 10, 30, 100 mg/kg) alkalmaztuk orálisan.

ii. *Gyulladásos paraméterek meghatározása*: A kezelés sorozat 4 napig tartott, ezalatt az állatok testsúlyát naponta mértük.

A bélszakaszokon keletkezett gyulladás kiterjedését, a makroszkópius károsodást számítógépes program segítségével lemértük. A kapott értéket a 8 cm-es béldarab teljes területének %-ban ábrázoltuk. A károsodás területének mérésén kívül, 1-10-ig pontoztuk a gyulladás mértékének súlyosságát.

Az adott bélszakaszt hosszanti irányban feldaraboltuk úgy, hogy mindegyik sáv tartalmazza a gyulladást. Analitikai mérleggel lemértük a colon darabok súlyát, a további biokémiai mérésekhez egy-egy adott sávot használtunk fel.

A mieloperoxidáz aktivitás (MPO) meghatározása egy ilyen, 8 cm hosszúságú, hosszanti szakaszból történt, az aktivitást mU/mg fehérjére fejeztük ki.

TNF- α expressziójának mérése ELISA kit-tel történt, eredményeinket pg/mg fehérjére vonatkoztattuk.

A fehérjemérésnél Bradford módszerét alkalmaztuk.

iii. *Szövetteni vizsgálatok* során hematoxin-eozin és toluidinkék festést alkalmazva fénymikroszkóp segítségével mértük a mucosa, submucosa vastagságát μm -ben. valamint számoltuk a submucosában a neutrofil granulociták számát

c. *LTA₄H inhibitor vizsgálata*

i. Az orális *LTA₄H inhibitor* kezelést (JNJ 26993135 5, 15, 30 mg/kg) a hisztamin H4 receptor blokkoló kezeléshez hasonlóan végeztük, naponta kétszer.

ii. A *gyulladásos paraméterek*, úgy mint a lézió nagysága, léziók súlyossága, állatok testsúly változása, colon ödéma mérése, MPO aktivitás, gyulladáskeltő citokinek TNF- α expressziójának mérése során ugyanazokat a módszereket alkalmaztuk, mint a H4 hisztamin receptor blokkoló esetében (II.b. pont).

IL-6 és szöveti LTB₄ expressziójának mérése ELISA kit-tel történt, eredményeinket pg/mg fehérjére vonatkoztattuk.

d. *Statisztikai analízis*: Az adatok értékelése során a kétmintás student „t” próbát, valamint ANOVA- Bonferroni tesztet alkalmaztunk. Az értékeket átlag \pm szórás (standard error of mean, SEM) formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$ valószínűségi értékben határoztuk meg.

Eredmények

I. Krónikus vizsgálatok

- a. A gyulladás krónikus fázisában az MMP-9 fehérje expresszió szignifikánsan megnövekedett a 90. napon. Majd a 120. napra enyhén emelkedett volt.
- b. Az MMP-9 aktivitás szintén emelkedett értéket mutatott.
- c. TIMP-1 a jelen kísérletben nem volt kimutatható mennyiségben.

II. Akut vizsgálatok

- a. H4 hisztamin antagonistá szájön át történő alkalmazása dózisfüggően és szignifikánsan csökkentette a gyulladás paramétereit (lézió nagysága, léziók súlyossága, szöveti gyulladások mértéke, neutrophil granulociták száma, állatok testsúly csökkenése, colon ödéma mértéke, MPO aktivitás megemelkedése, gyulladásokeltő citokinek (TNF- α) expressziójának mennyisége).
- b. LTA₄H inhibitor vizsgálata szájön át történő alkalmazása dózisfüggően és szignifikánsan csökkentette a gyulladás paramétereit (lézió nagysága, léziók súlyossága, állatok testsúly csökkenése, Colon ödéma mértéke, MPO aktivitás megemelkedése, gyulladásokeltő citokinek (IL-6, TNF- α) és az LTB₄ expressziójának mennyisége).

Összefoglalás

- I. A **krónikus TNBS modell**ben a betegséggel járó szövődmények súlyosbodtak, szűkületek alakultak ki.
 - a. A folyamatok során a jelentős MMP-9 expressziót és aktivitást mutattunk a lamina propriában. Az MMP-9 jól alkalmazható biomarkerként ebben a modellben is.
 - b. A TIMP-1 expresszió nem volt detektálható, így az irodalmi adatok alapján a gyulladásos folyamatok során nem befolyásolja az MMP-k szintjét és aktivitását.
- II. Az **akut TNBS modell**ben a hisztamin H₄ receptor antagonistá kezelés szignifikánsan és dóziszfüggően csökkentette a gyulladásos paramétereket.
- III. Az **akut TNBS modell**ben az LTA₄H inhibitor kezelé szintén dóziszfüggően és szignifikánsan csökkentette a gyulladásos paramétereket.
- IV. A fentiek alapján a hisztamin H₄ receptor antagonisták és az LTA₄H inhibitorok ígéretes farmakológiai támadáspontot jelenthetnek a bélgyulladások kezelésében.

Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító : 10027758

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája

1. Talapka P, **Berko A**, Nagy LI, Chandrakumar L, Bagyanszki M, Puskas LG, et al. Structural and molecular features of intestinal strictures in rats with Crohn's-like disease. World J Gastroenterol. 2016;22(22):5154-64.

Megosztott elsőszereplőség **IF : 3,300**

2. Whittle BJ, Varga C, **Berko A**, Horvath K, Posa A, Riley JP, et al. Attenuation of inflammation and cytokine production in rat colitis by a novel selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase. Br J Pharmacol. 2008;153(5):983-91. **IF : 6,810**

3. Varga C, Horvath K, **Berko A**, Thurmond RL, Dunford PJ, Whittle BJ. Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat. Eur J Pharmacol. 2005;522(1-3):130-8. **IF : 3,040**

Folyóiratban megjelent egyéb közlemények listája

1. Szabo R, Borzsei D, Karacsonyi Z, Gesztelyi R, Nemes K, **Berko AM**, et al. Postconditioning-like effect of exercise: new paradigm in experimental menopause. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2019;316(2):H400-H7. **IF : 3,569**

2. Heredi J, Cseh EK, **Berko AM**, Veres G, Zadori D, Toldi J, et al. Investigating KYNA production and kynurenergic manipulation on acute mouse brain slice preparations. Brain Res Bull. 2019;146:185-91. **IF : 3,441**

3. Szabo R, Karacsonyi Z, Borzsei D, Juhasz B, Al-Awar A, Torok S, et al. Role of Exercise-Induced Cardiac Remodeling in Ovariectomized Female Rats. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:6709742. **IF : 4,936**

4. Posa A, Szabo R, Kupai K, **Berko AM**, Veszélka M, Szucs G, et al. Cardioprotective Effect of Selective Estrogen Receptor Modulator Raloxifene Are Mediated by Heme Oxygenase in Estrogen-Deficient Rat. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:2176749.

IF : 4,936

5. Heredi J, **Berko AM**, Jankovics F, Iwamori T, Iwamori N, Ono E, et al. Astrocytic and neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the adult mouse brain. *Brain Struct Funct.* 2017;222(4):1663-72. IF : 4,231

6. Posa A, Szabo R, Kupai K, Barath Z, Szalai Z, Csonka A, et al. Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:876805. IF : 4,936

7. Posa A, Szabo R, Csonka A, Veszélka M, **Berko AM**, Barath Z, et al. Endogenous Estrogen-Mediated Heme Oxygenase Regulation in Experimental Menopause. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:429713. IF : 4,936

8. Talapka P, Nagy LI, Pal A, Poles MZ, **Berko A**, Bagyanszki M, et al. Alleviated mucosal and neuronal damage in a rat model of Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(44):16690-7. IF : 3,300

9. Szalai Z, Szasz A, Nagy I, Puskas LG, Kupai K, Kiraly A, et al. Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS-induced colitis in rats: role of NOS/HO/MPO system. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:925981. IF : 4,936

10. Posa A, Kupai K, Menesi R, Szalai Z, Szabo R, Pinter Z, et al. Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:521563. IF : 4,936

11. Molnar AH, Varga C, **Berko A**, Rojik I, Parducz A, Laszlo F, et al. Inhibitory effect of vasopressin receptor antagonist OPC-31260 on experimental brain oedema induced by global cerebral ischaemia. *Acta Neurochir (Wien).* 2008;150(3):265-71. IF : 1,929

12. Molnar AH, Varga C, **Berko A**, Rojik I, Parducz A, Laszlo F, et al. Prevention of hypoxic brain oedema by the administration of vasopressin receptor antagonist OPC-31260. *Prog Brain Res.* 2008;170:519-25. IF : 3,174

13. Horvath K, Varga C, **Berko A**, Posa A, Laszlo F, Whittle BJ. The involvement of heme oxygenase-1 activity in the therapeutic actions of 5-aminosalicylic acid in rat colitis. *Eur J Pharmacol.* 2008;581(3):315-23. **IF : 3,040**
14. Varga C, Laszlo F, Fritz P, Cavicchi M, Lamarque D, Horvath K, et al. Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2007;561(1-3):164-71. **IF : 3,040**
15. Szabolcs A, Tizslavicz L, Kaszaki J, Posa A, **Berko A**, Varga IS, et al. Zerumbone exerts a beneficial effect on inflammatory parameters of cholecystokinin octapeptide-induced experimental pancreatitis but fails to improve histology. *Pancreas.* 2007;35(3):249-55. **IF : 2,958**
16. Czako L, Szabolcs A, Vajda A, Csati S, Venglovecz V, Rakonczay Z, Jr., et al. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet aggravates necrotizing pancreatitis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;572(1):74-81. **IF : 3,040**
17. Szabolcs A, Varga IS, Varga C, **Berko A**, Kaszaki J, Letoha T, et al. Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin-induced experimental pancreatitis. *Eur J Pharmacol.* 2006;532(1-2):187-93. **IF : 3,040**
18. Molnar A, Balaspiri L, Galfi M, Laszlo F, Varga C, **Berko A**, et al. Inhibitory effects of different galanin compounds and fragments on osmotically and histamine-induced enhanced vasopressin secretion in rats. *Eur J Pharmacol.* 2005;516(2):174-9. **IF : 3,040**
19. Pavo I, Laszlo F, Morschl E, Nemcsik J, **Berko A**, Cox DA, et al. Raloxifene, an oestrogen-receptor modulator, prevents decreased constitutive nitric oxide and vasoconstriction in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol.* 2000;410(1):101-4. **IF : 3,040**

Megosztott első szerző nyilatkozat

Alulírott Dr. Talapka Petra nyilatkozom, hogy a Jelölt, a megosztott első szerzős cikkét felhasználhatja a PhD munkájához, a közleményben taglalt eredményekhez jelentős volt a hozzájárulása, további társszerzők a tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

2019.04.12.

Dr. Talapka Petra

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Dr. Varga Csaba nyilatkozom, hogy a Jelölt, mint társszerző hozzájárulása a disszertációjában taglalt eredményekhez jelentős volt. Kijelentem, hogy a Jelölt által végzett kísérletek eredményét (*Br J Pharmacol. 2008;153(5):983-91., Eur J Pharmacol. 2005;522(1-3):130-8.*) saját magam és a további társszerzők a tudományos fokozat megszerzéséhez nem használták fel, és ezt a jövőben sem fogják megtenni.

2019.04.12.

Dr. Varga Csaba