

**Potenciálisan bioaktív vegyületek gyulladáscsökkentő  
hatásainak vizsgálata intravitális mikroszkópos  
technikával**

**Varga Gabriella**

**Ph.D. Tézis**

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

**Témavezető:**

**Dr. Habil. Kaszaki József**

**Szegedi Tudományegyetem, Sebészeti Műtéttani Intézet, Szeged**

**2013**

## A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

*A tézis alapjául szolgáló, lektorált folyóiratban megjelent teljes tudományos 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. KASZAKI J, ÉRCES D, **VARGA G**, SZABÓ A, VÉCSEI L., BOROS M: Kynurenines and intestinal neurotransmission: the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neural Transm* 2012; 119: 211-223. **IF=2.730**
3. KOVÁCS T, **VARGA G**, ÉRCES D, TÖKÉS T, TISZLAVICZ L, GHYCZY M, BOROS M, KASZAKI J: Dietary phosphatidylcholine supplementation attenuates inflammatory mucosal damage in a rat model of experimental colitis. *Shock* 2012; 38: 177-185. **IF=3.203**
4. ÉRCES D, **VARGA G**, FAZEKAS B, KOVÁCS T, TÖKÉS T, TISZLAVICZ 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; 691: 225-234. **IF=2.737**
5. KOVÁCS T, **VARGA G**, ÉRCES D, TÖKÉS T, TISZLAVICZ L, GHYCZY M, BOROS M, KASZAKI J: Terápiás lehetőségek összehasonlító vizsgálata a gyulladásoos bélbetegség állatkísérletes modelljében. *Magyar Sebészet* 2012; 65(4): 191-197. **IF=0**

*A tézis alapjául szolgáló, lektorált folyóiratban megjelent előadáskivonatok*

1. 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 (S6): 17.
2. 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.
3. **VARGA G**, KOVÁCS T, KASZAKI J, GHYCZY M, BOROS M: A foszfatidil-etanolamin gyulladáscsökkentő hatása kísérletes colitis modellben. *Magyar Sebészet* 2009; 62: 145-146.
4. 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.
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**, 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. (Suppl. 1): P18.
7. **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.

## EGYÉB, A TÉZIS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

1. BOROS M, GHYCZY M, ÉRCES D, VARGA G, TÓKÉS T, KUPAI K., TORDAY C, KASZAKI J: The anti-inflammatory effects of methane. *Critical Care Med* 2012; 40(4): 1269-1278. **IF 6.254**
2. VARGA G, ÉRCES D, KASZAKI J, GHYCZY M, BOROS M: Metán belélegzés gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata iszkémia-reperfúzió alatt. *Magyar Sebészet* 2012; 65(4): 205-211. **IF=0**

# 1. BEVEZETÉS

## 1.1. Gyulladásos bélbetegségek

A colitis ulcerosát és a Crohn betegséget magába foglaló gyulladásos betegségcsoport (*Inflammatory Bowel Disease – IBD*) az emésztőrendszer krónikus, relapsusokkal tarkított, ismeretlen etiológiájú kórképei. A gyulladásos folyamat következtében a belek nyálkahártyája hyperaemiássá, ödémássá válik, súlyosan károsodik. IBD-ben a mikrokeringés is sérül, és az érrendszeri károsodás megelőzi a nyálkahártya sérüléseket, fekélyek kialakulását, így korai kórjelzőnek tekinthető (Hatoum et al. 2003). A mikrokeringési károsodások érintik a mikroerek architektúráját és funkcióját is, a kapillárisok struktúrája megváltozik, miközben megnő az erek permeabilitása és mikrokeringési diszfunkció alakul ki (Hatoum et al. 2005).

## 1.2. A gyulladásos mikrokeringési zavarok kialakulása

A bélnyálkahártya mikrokeringésének kiemelkedő jelentősége van a transzport mechanizmusok működésében, végső soron a bélnyálkahártya homeosztázisában (Foitzik et al. 1999). A gyulladásos mediátorok által közvetített folyamatok során romlik a bélnyálkahártya mikrokeringési hálózatának vazomotoros működése és a kapilláris perfúzió, sejt-sejt kölcsönhatások alakulnak ki és aktiválódik a véralvadási kaszkád (Granger 1999). Ezek a változások részben a mikrokeringés autoregulációjára kifejtett közvetlen hatásokon alapulnak. A károsodott mikrokeringés miatt megváltozik a gyulladásos, reaktív oxigén szabadgyököket (ROS) generáló enzimek, például a mieloperoxidáz (MPO) és xantin oxidoreduktáz (XOR) aktivitása. A fokozott ROS termelődés végső soron endothel károsodást eredményez, így ezen enzimek funkcionális zavara, valamint az aktivált endothel együttesen a vazokonstriktor hatású endotelin-1 (ET-1) peptid (Masaki et al. 1989) és az értágító nitrogén monoxid (NO) (Palmer et al. 1987) egyensúlyának felborulását eredményezi. Ezek a változások a mikrokeringés másodlagos változásait, az endothelium további károsodását, a kapilláris permeabilitás és a barrier-funkció tartós zavarát okozzák, és jelentős extracelluláris ödéma kialakulásához vezetnek (Granger et al. 1988).

A mikrokeringés autoregulációjának fő eleme a lokális NO és a ROS képződés kapcsolata. A vazodilátor NO rövid fél-életidejű reaktív mediátor, L-argininből képződik a NOS enzimek által katalizált folyamatokban. A NOS fő izoformái az ér endothelium által termelt endotheliális NOS (eNOS vagy NOS1), a neuronális NOS (nNOS vagy NOS3), és a különböző sejttípusok (makrofágokat és gliasejteket) aktiválódása révén termelődő indukálható, kalcium / kalmodulin-független izoforma (iNOS vagy NOS2) (Moncada és Higgs, 1991

Moncada et al. 1991). Az NO erős értágító és antiadhéziós hatása mellett modulálja a vaszkuláris permeabilitást is (Moncada et al. 1999; Duran et al. 2010).

A kapilláris károsodás másik fontos eleme a ROS képződés, amely számos forrásból, többek között a XOR rendszerből, valamint a neutrofil leukocytákból (Granger et al. 1988) származhat. Az NO molekula párosítatlan elektronnal rendelkezik, így nagy affinitással reagál a szuperoxid gyökökkel, melyekkel peroxynitrit aniont képez. A peroxynitrit rendkívül reaktív oxidatív ágens, jelentős szerepe van a protein struktúrák módosításában, funkciójuk megváltoztatásában, lipidperoxidációt és további sejtkárosodást okozhat (Beckman et al. 1990; Radi et al. 1991).

Az autoreguláció további jelentős komponense a vazokonstriktor hatású ET-1 képződése és metabolizmusa, mely szoros kapcsolatban áll a keringési elégtelenségek mikrokeringési következményeivel. Az ET-1 a prekapilláris és arterioláris simaizom sejteken keresztül erőteljes vazokonstriktor hatást gyakorol az értónusra, autocrin, illetve paracrin módon.

A perivaszkuláris szövetben a gyulladásozó sejtek megjelenése komplex kaszkád mechanizmus következménye. A leukocytá-endothel interakció a posztkapilláris venulák endothel felületén a neutrofil leukocyták gördülésével (*rolling*) indul. Hátterében az endothel sejtek felszínén E- és P szelektinek, míg a leukocytá oldalon L-szelektin molekulák expressziója áll. Ezt követően a leukocyták mozgása oly mértékben lelassul, hogy időlegesen, majd tartósan kitapadnak az endothelium felszínéhez. A folyamatot az endothel sejteken további adhéziós molekulák (ICAM-1, VCAM-1), míg a leukocyták esetében integrinek (CD11/CD18) megjelenése követi. Végül a leukocyták az érpályából kilépve a szöveti oldalon akkumulálódnak. A leukocyták által termelt proteázok és elasztázok további mikrovaszkuláris károsodást, és mikrokeringési zavart okoznak (Granger and Kubes, 1994).

Az értágító és vazokonstriktor mediátorok egyensúlyának felborulása, valamint a leukocytá-endothel interakciók kialakulása a mikrokeringés két fő komponensének (funkcionális kapilláris denzitás, vörösvértest áramlási sebesség) megváltozásához vezet. A funkcionális kapilláris denzitás a szöveti perfúzió jelzője, amely függ az átjárható kapillárisok számától és a vizsgált terület nagyságától. A csökkenő funkcionális kapilláris denzitás a szöveti perfúzió hatékonyságának csökkenését jelzi (Tsai et al. 1995). A kapillárisokban a vörösvértest áramlási sebességet a prekapilláris érátmérő és a véráramlás mértéke határozza meg.

### 1.3. Mikrokeringési zavarok kialakulása IBD-ben

Élettani körülmények között a bélnyálkahártya fontos barrier funkciót tölt be a kémiai ágensek és a baktériumok ellen, valamint számos transzportfolyamatot modulál. A vastagbél gyulladása során a nyálkahártya epithelium sérülésének következtében a barrier funkció romlik (Appleyard et al. 2002), ami bakteriális transzlokációhoz vezet.

IBD-ben a vastagbél intramurális mikrokeringése megváltozik, vazodilatáció, vénás pangás (Laroux et al.2001), valamint vérbőséggel és egyidejű szöveti hipoperfúzióval járó heterogén áramlás alakul ki, és e folyamatban az endothelium jelentős szerepet játszik (Hatoum et al. 2003). *Ex vivo* kísérletekben, IBD-ben szenvedő betegek vastagbeléből származó biopsziákból mutatták ki, hogy a jelenség hátterében az endothelium-eredetű mediátorok (ET-1, NO) egyensúlyzavara állhat (Hatoum et al. 2003).

A GI traktusban kialakuló gyulladós folyamatok modellezésére széles körben alkalmazható a trinitro-benzén-szulfonsav (TNBS) által kiváltott kísérletes colitis, mely a humán IBD számos jelét és tünetét mutatja. Rágcsálókban TNBS intracolonalis alkalmazásával több héten át tartó, kifejezett súlyvesztéssel, gyulladós biokémiai paraméterek emelkedésével járó transmuralis bélgyulladás idézhető elő (Morris et al. 1989). Ebben a modellben a gyulladós aktiváció során súlyos morfológiai destrukció jön létre (Tatsumi and Lichtenberger 1996), és a colon mukóza kapilláris véráramlása még 24 órával az indukció után is emelkedett (Kruschewski et al. 2001). TNBS colitisben Petersson és munkatársai kimutatták az összefüggést az emelkedett mikroperfúzió és a fokozott cNOS aktivitás között (Petersson et al. 2007).

### 1.4. A mikrokeringés *in vivo* monitorozási lehetőségei

A mikrokeringési változások vizsgálata az élettani, kórélettani és gyógyszerterani kutatások fókuszában áll. Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt fektetnek e vizsgálatokra a klinikai diagnosztikában is: az alapkutatói eredmények számos képalkotó eszköz megjelenését és dinamikus fejlődését segítették elő. A technikákat nyolc nagyobb csoportba sorolhatjuk (Vollmar et al. 2009). 1. A radioaktív izotóppal, fluoreszcens festékkel jelzett, vagy színezett mikrogyöngy módszer abszolút értékű adatokat nyújt a véráramlásról és a perfúzióról. Hátránya, hogy folyamatos regisztrálásra nem ad lehetőséget, és hogy a gyöngyöket *post mortem* kell eltávolítani, ami a klinikai alkalmazást nem teszi lehetővé. 2. A hidrogén, xenon és indocianin zöld *clearance* technika inert gázok szövetekbe való bevitelén alapul, a telítettség után a szinteket és a hígulást platina elektróddal polarográfiásan határozzák meg, ezzel mérve a véráramlás és a perfúzió mértékét. 3. Indikátor-hígulás módszer, amely az indikátor anyagnak az adott szervbe való egyszeri bejuttatását jelenti, majd

annak hígulási mértékéből az áramlási sebesség és a térfogatáram kiszámolható. 4. A lézer-Doppler áramlásmérő technika alkalmas a hajszálerek teljes véráramlásának szummációs monitorozására. 5. A közeli infravörös spektroszkópia a szöveti O<sub>2</sub> szaturáció nem invazív monitorozására alkalmas. 6. Az intravitális videomikroszkópos (IVM) módszerek közül az *in vivo* fluoreszcens mikroszkópia fluoreszcens markerek alkalmazásával lehetővé teszi a mikrokeringés funkcionális és morfológiai vizsgálatait az élő szövetekben. 7. Az ortogonális polarizációs spektrális (OPS) képalkotó technika fluoreszcens festék hozzáadása nélkül alkalmas a mikrokeringés monitorozására. Vizsgálható vele az érsűrűség, az áramlás és a perfúzió mértéke. 8. A sidestream dark field (SDF) képalkotó technika az OPS technika továbbfejlesztett változata. Festékanyag hozzáadása nélkül teszi láthatóvá a vörösvértesteket és a fehérvérsejteket is (Vollmar et al. 2009).

Vizsgálatainkban nem invazív, vagy minimálisan invazív technikákat használtunk, melyek alkalmasak a mikrovaszkuláris perfúzió direkt megjelenítésére, vagy közvetett meghatározására, mindemellett klinikai körülmények között is alkalmazhatók. Ezek egyike a mélyebb (ca. 200 µm-es) rétegek mikrokeringésének megfigyelésére alkalmas OPS képalkotás, amely a hemoglobin tartalmú képletekről kontraszterősítés nélküli IVM képalkotást tesz lehetővé. Ez esetben a vizsgált tárgyat lineárisan polarizált fényvel világítják meg. A képalkotás a szövetek belsejéből visszaérkező depolarizált fényel történik, amely elegendő ahhoz, hogy hátulról megvilágítson minden olyan struktúrát, ami a tárgy felszíne alatt található. Az OPS képalkotáshoz az 548 nm-es hullámhosszhoz közelítő fényt alkalmaznak (ebben a tartományban a hemoglobin és az oxihemoglobin egyenlő mértékű abszorbananciát mutat), ezáltal minden olyan képletet láthatóvá lehet tenni, ami hemoglobint tartalmaz (Groner et al. 1999; Lindert et al. 2002).

További IVM vizsgáló módszerünk a fluoreszcens konfokális pásztázó lézer endomikroszkópia (CLSEM), amellyel *in vivo*, valós idejű, dinamikus szövettani vizsgálatok végezhetők (McLaren et al. 2001). A technika jellegzetessége és előnye, hogy digitális „metszetek” készíthetők, melyek kiküszöbölik a hagyományos szövettani vizsgálatok során a metszéssel, fixálással és beágyazással keletkező műtermékeket. Lokálisan, vagy szisztémásan beadott fluoreszcens festékek alkalmazásával nagy felbontású, három-dimenziós optikai biopszia készíthető, anélkül hogy a vizsgált szövet integritását megváltoztatnánk (Kiesslich et al. 2007). A fluoreszcens CLSEM 488 nm-es hullámhosszúságú egysoros lézer megvilágítással dolgozik, mely lehetővé teszi a nyálkahártya felszínével párhuzamos, 0-250 µm mélységű digitális felvételek rögzítését. A technika alkalmas egyes celluláris és szubcelluláris elváltozások monitorozására, valamint a mikroér hálózat morfológiai és

funkcionális változásainak vizsgálatára is (Kiesslich et al. 2007). A módszer szenzitivitása és specificitása lehetővé teszi a célzott biopszia vételét, mellyel javulhat a diagnosztika eredményessége egyes GI betegségekben.

### **1.5. Új terápiás lehetőségek a GI traktus gyulladásának csökkentésére**

A gyulladás következtében kialakuló mikrokeringési elváltozásoknak meghatározó szerepük lehet a szövetek túlélésében. Ugyanakkor a jelenleg alkalmazott gyulladáscsökkentő szerek hatása korlátozott, vagy alkalmazásuk mellékhatásokkal járhat (Perrier & Rutgeerts 2012). Új lehetőséget vetett fel a megfigyelés, ami emelkedett L-kinurenin szintet igazolt IBD-ben szenvedő betegek vérében (Forrest et al. 2002). Az L-kinurenin - kinurénsav útvonal a triptofán metabolizmus része, melynek kórtani jelentőségét számos neurodegeneratív betegség esetében igazolták (Klivényi et al. 2004). A kinurénsav N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát receptor antagonistá hatása alapján potens, endogén neuroprotektív szernek bizonyult a központi idegrendszer érintő kórképekben. A glutamát a központi idegrendszer fő excitatorikus neurotranszmittere, de hatását kifejtheti az enterális idegrendszerben (ENS) is. Az ENS neuronjaiban nagyszámú NMDA-receptor expresszálódik (Liu et al. 1997, Giaroni et al. 2003), és a feltételezések szerint a glutamát receptorok szerepet játszhatnak az IBD-vel kapcsolatos nocicepcióban. Ugyanakkor az NMDA receptorok perifériás gátlásának következménye nem teljesen ismert: ez a jelátviteli útvonal a GI traktusban jórészt még feltérképezetlen, élettani és gyulladással körülmények között egyaránt. Az utóbbi évek során kifejlesztették a kinurénsav szintetikus analógját, az SZR-72 jelzésű vegyületet, amely a kinurénsavval ellentétben átjut a vér-agy gáton. Az SZR-72 központi idegrendszeri hatásait a korábbiakban más munkacsoportok már megvizsgálták, de a perifériás NMDA receptorok gátlásának következményei, vagyis az ENS hatások nem ismertek.

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



## 2. CÉLKITŰZÉSEK

A gyulladással járó GI megbetegedésekben a lokális mikrokeringési funkció, illetve a mikrokeringés szöveteket is érintő működési zavarának meghatározása nagy jelentőségű lehet a terápiás lehetőségek feltérképezése során. Azok az anyagok, amelyek hozzájárulnak a mikrokeringés funkcionális javulásához, ígéretes terápiás szerek lehetnek a klinikai gyakorlatban. Vizsgálataink fókuszában olyan lehetséges terápiás útvonalak álltak, melyek mikrovaszkuláris és a mikrocirkulációs hatásukon keresztül a gyulladós folyamatokat mérsékelhetik. Vizsgálataink tárgya a gyulladós aktiváció fokának és a GI mikrokeringés változásának meghatározása volt kísérletes colitis modellekben. További, általános célunk olyan terápiás lehetőségek hatékonyságának meghatározása volt, amelyek egyidejűleg befolyásolhatják a mikrokeringési elváltozásokat és a gyulladós folyamatokat. Mindezek alapján konkrét célkitűzéseink az alábbiak voltak.

1. A GI mikrokeringési diszfunkció és a mikroér hálózat sérüléseinek felismerése/meghatározása/analízise in vivo képalkotó technikák alkalmazásával;
2. Az OPS és CLSEM technikák alkalmazhatóságának összehasonlítása a GI traktusban;
3. Objektív értékelési (*score*) rendszer kidolgozása, amellyel kísérletes körülmények között a mikrokeringési változások mértéke megbecsülhető;
4. Az NMDA receptor antagonistá kezelés mikrokeringési és gyulladáscsökkentő hatásának tanulmányozása kísérletes colitisben;
5. Az orális PC-kezelés gyulladáscsökkentő hatásosságának vizsgálata a kísérletes colitis által kiváltott mikrokeringési diszfunkció és szöveti sérülések során.

## 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérletekhez 32 hím Wistar és 80 hím Sprague-Dawley patkányt (280-320 g) használtunk, a vizsgálatokat a NIH irányelvei alapján (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) végeztük a Szegedi Tudományegyetem MÁB jóváhagyásával.

### 3.1. Colitis indukció

Az állatok a colitis kiváltása előtt 12 órán keresztül éheztek. A gyulladást TNBS (40 mg/kg 0,25 ml 25%-os etanolban oldva) egyszeri, intracolonalis beöntésével idéztük elő (Morris et al. 1989), átmeneti éteres bódítás mellett. Az álműtött csoport egyedeit a TNBS oldószerével kezeltük.

### 3.2. Sebészi beavatkozás

A beöntést követő 1. ill. 6. napon Na-pentobarbitál (50 mg/tskg i.p.) altatásban tracheosztómiát végeztünk, majd a 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 kanuláltuk az arteria carotis communist, 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. A mikrokeringés *in vivo* monitorozása**

#### **3.3.1. Intravitalis videómikroszkópia**

A colon serosa mikrokeringését a coecumtól disztálisan 3 cm-re OPS technikával vizualizáltuk (Cytoscan A/R, Cytometrics, USA). A mikrokeringésről S-VHS videofelvételek készültek (Panasonic AG-TL 700, Matsushita Electric Ind. Co. Ltd, Osaka, Japan), melyeket *off-line* analizáltunk (IVM Pictron, Budapest, Magyarország) és meghatároztuk a vörösvértestek áramlási sebességét (RBCV,  $\mu\text{m/s}$ ).

#### **3.3.2. Az ér- és szövetkárosodás *in vivo* vizsgálata**

A disztális colon nyálkahártya károsodás mértékét *in vivo* szövettani vizsgálómódszerrel, fluoreszcens CLSEM segítségével határoztuk meg (Five1, Optiscan Pty. Ltd., Australia). Az anasztól 8 cm-re proximalisan a colon lumenét megnyitottuk, a nyálkahártyát feltártuk. A mucosa mikrovaszkuláris szerkezetét fluoreszcein isothiocianát-dextran (FITC-dextran; 150 KDa, 20 mg/mL oldat fiziológias 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  $\mu\text{m}$  képenként) konfokális képeket készítettünk. A nyálkahártya szerkezeti változásait akridin orange (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA) felszíni alkalmazása után vizsgáltuk. A TNBS-sel kezelt állatokban különálló, aktív, gyulladt területeket vizsgáltunk és ezeket hasonlítottuk össze a kezelt és kontroll csoportokban. Szemikvantitatív módszert dolgoztunk ki, mely alapján 1. a hajszálerek szerkezetét (0 normális; 1 festék kilépés, de az érszerkezet felismerhető; 2 károsodás és az érszerkezet felismerhetetlen); 2. ödéma kialakulását (0 nincs ödéma; 1 mérsékelt epitheliális duzzanat; 2 súlyos ödéma) pontoztuk.

### **3.4. Gyulladásos markerek vizsgálata**

#### **3.4.1. MPO és XOR enzimaktivitás, nitrotyrozin szint meghatározás**

Vastagbél biopsziát a kísérletek végén, az 1. és a 6. napon vettünk. A szövetmintákat felhasználásig  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. A mérésekhez a szövetmintákat homogenizáltuk és a szöveti proteázok gátlása céljából 0,1 mM polimetilszulfonil fluoridot tartalmazó Trisz-HCl pufferrel (0,1 M, pH=7,4), majd 24 000 g-n 20 percig  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk.

A vizsgált szövet MPO aktivitása a polimorf magvú (PMN) leukociták szöveti akkumulációját jellemzi. Aktivitását a colon szöveti homogenizátum üledékéből határoztuk meg Kuebler és munkatársai (Kuebler et al. 1996) metodikája alapján.

A XOR aktivitás a szuperoxid gyök termelés jelentős forrása a bélszövetben. A colon homogenizátum felülúszójából Beckman (Beckman et al. 1989) módszerével mértük fluorometriás kinetikus assay segítségével.

A nitrotyrozin a peroxynitrit képződés markere, melyet enzim-kötött immunszorbens próbával (ELISA; Cayman Chemical; Ann Arbor, MI) a colon homogenizátum felülúszójából határoztunk meg.

### **3.4.2. Plazma nitrit/nitrát (NO<sub>x</sub>) meghatározás**

Az NO stabil végtermékét, a plazma nitrit/nitrát (NO<sub>x</sub>) szintet Griess reakcióval mértük. A mesenterialis vénából vett, heparinizált vérmintákat 4 °C-on 1000 g-vel centrifugáltuk, a plazmát felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Első lépésben a minta nitrát tartalmát enzimatis konverzióval nitritté alakítottuk, melyet a nitrit tartalom meghatározása követett 546 nm-en spektrofotométerrel (Moshage et al. 1995).

### **3.4.3. NOS aktivitás mérés**

A szöveti konstitutív és induktív NO szintáz (cNOS; iNOS) enzim aktivitásának meghatározásához a <sup>3</sup>H-arginin-<sup>3</sup>H-citrullin konverzió alapuló metodikát használtuk (Szabó 1993). A kapott aktivitásból és a mintából mért protein tartalomból adtuk meg a NOS aktivitást.

## **3.5. Kísérleti csoportok és protokoll**

Az I. kísérletsorozat első részében a colitis akut fázisát (1. nap) vizsgáltuk. Az állatokat 4 csoportba osztottuk (1-4. csoport, n=10 minden csoportban): az első csoport csak oldószert kapott intracolónálisan (25% etanol) és kontrollként szolgált. A többi csoport egyedénél 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 szintetikus kinurénsav analóg SZR-72 (Gyógyszerkémiai Intézet, Szegedi Tudományegyetem, 10 mg/kg/ml) kezelést alkalmaztunk *iv* infúzióban.

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

Az II. 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 PC-vel dúsított tápot alkalmaztunk (Ssniff Spezialdiäten, Ssniff GmbH, Soest), 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 etetni, és azt követően még további három napig adtuk.

Vizsgálatainkat a colitis indukciót követően, az 1. és a 6. napon végeztük. Műtéti előkészítést követően hemodinamikai, mikrohemodinamikai méréseket, majd CLSEM vizsgálatokat végeztünk, végül vérmintát és szövetszövetmintát vettünk a biokémiai gyulladási markerek vizsgálatára.

### **3.6. 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 interkvartilis féltérjedelmet ábrázoltuk. A szignifikancia szintet  $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. A kísérletes TNBS colitis jellegzetes tünetei**

A TNBS beöntést követően az első napon, a gyulladás akut fázisában a colitises csoportban hiperdinamias keringés, emelkedett perctérfogat volt megfigyelhető a kontroll csoport egyedeihez képest. A vizsgálatok 6. napján a makrohemodinamikai paraméterekben (vérnyomás, szívfrekvencia, perctérfogat) nem tapasztaltunk eltérést a kontroll és a colitises állatok között. Az OPS vizsgálatok kimutatták, hogy a kezeletlen colitis alatt szignifikánsan megnőtt a serosa vörösvértest áramlási sebessége a kontroll értékhez képest. A szubakut fázisban a serosa vörösvértest áramlási sebessége továbbra is szignifikánsan magasabb értéken maradt.

Az akut fázisban a gyulladási mediátorok közül a leukocita akkumulációt jellemző MPO enzim aktivitása a TNBS-indukciót követően a kétszeresére nőtt. A ROS termelésért felelős XOR enzim aktivitás 2,5-szeresére emelkedett. A mikrokeringés egyik fő szabályozó molekulájának képződéséért felelős NOS enzim aktivitása szignifikánsan emelkedett a

proximális colonban. A plazma NO<sub>x</sub> szint szintén emelkedést mutatott a kontroll csoport értékeihez képest. A szubakut fázisban vizsgáltuk az MPO- és a XOR enzim aktivitását, valamint a plazma NO<sub>x</sub> és a szöveti nitrotyrozin szinteket. Mindegyik esetben szignifikánsan emelkedett értéket kaptunk a kontroll értékekhez képest.

A CLSEM technika alkalmazásával végzett *in vivo* vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a kezeletlen colitises csoportokban kifejezett, ödémával társuló kapilláris szerkezeti károsodás alakult ki mindkét vizsgált fázisban. A colitises csoportokban megfigyelhető volt a kapilláris hálózatrendszer torzulása. A TNBS kezelés hatására a fluoreszcens FITC-dextrán festék extravazációja a kapilláris fal roncsolódását jelezte, amelynek eredménye a megnövekedett kapilláris permeabilitás. Akridin orange festéssel kifejezett ödéma képződést észleltünk. Ezzel szemben a kontroll csoportban megtartott érfal mellett szabályos hatszögletű, „lépes méz” mintázatot láttunk; sem szerkezeti, sem funkcionális elváltozás nem volt megfigyelhető.

#### **4.2. NMDA-receptor antagonistá kezeléshatása kísérletes colitisben**

A colitis akut fázisában kialakuló makrohemodinamikai eltéréseket sem a kinurénsav, sem a kinurénsav analóg kezeléshem befolyásolta. Ezzel szemben a colitis mindkét fázisában szignifikánsan emelkedett vörösvértest áramlási sebességet az NMDA-receptor antagonistá kezeléshem normalizálta. Az akut fázisban mindkét receptor antagonistá hatása szignifikáns volt, a szubakut fázisban viszont a kinurénsav analóg kezeléshem hatásosabb volt, szignifikánsan mérsékelte a vörösvértest áramlási sebességet.

A szöveti MPO enzim aktivitását a colitis 1. napján mindkét NMDA receptor antagonistá szignifikánsan csökkentette, míg a 6. napon a kinurénsav kezeléshem bizonyult eredményesebbnek. A NOS enzim aktivitását az akut fázisban vizsgáltuk, mindkét receptor antagonistá kezeléshem esetben szignifikáns csökkenést észleltünk. A colitis szubakut fázisában mértük a NO<sub>x</sub> és a nitrotyrozin szintet; a NO<sub>x</sub> esetében mindkét NMDA receptor antagonistá kezeléshem szignifikáns csökkenést eredményezett, míg a nitrotyrozin szint esetében az SZR-72 kezeléshem volt hatásos.

Az *in vivo* CLSEM vizsgálataink során egyik NMDA receptor antagonistá kezeléshem sem bizonyult hatásosnak. A kapilláris hálózat morfológiai és funkcionális elváltozásait az egyszeri antagonistá kezeléshem nem tudta eredményesen befolyásolni.

#### **4.2. PC kezeléshem hatása kísérletes colitisben**

A colitis akut fázisában jelentkező makrohemodinamikai változásokat a PC előkezeléshem nem befolyásolta. A mikrokeringési vizsgálatok ugyanakkor kimutatták, hogy a PC előkezeléshem szignifikánsan csökkentette a vörösvértest áramlási sebességet az első napon, és kissé mérsékelte az áramlási sebességet a későbbi fázisban.

A gyulladási biokémiai markerek vizsgálata során kimutattuk, hogy a PC előkezelés az akut és a szubakut fázisban egyaránt csökkentette az emelkedett MPO- és XOR enzim aktivitást, valamint a magas plazma NO<sub>x</sub> szintet.

A vastagbél nyálkahártya kapillárisainak morfológiai vizsgálata előbbi eredményeinket megerősítette. A PC kezelés hatására a kísérletes colitis mindkét vizsgált fázisában csökkent a kapillárisok károsodása. A mikroér hálózat szabályos szerkezetű maradt, az ödéma és a fluoreszcens festék kiáramlásának mértéke nagymértékben csökkent az akut fázisban. A szubakut fázisban a PC előkezelés kivédte mind az érálózat szerkezeti destrukcióját, mind az érfal funkcionális elváltozásait jelző ödémát.

## 5. DISZKUSSZIÓ

Kísérletes munkánkban a TNBS által okozott colitis akut és szubakut fázisaira jellemző mikrokeringési és mikrovaszkuláris változásokat, a gyulladási választ, illetve ezek befolyásolhatóságát vizsgáltuk. Összehasonlítottuk két új vizsgálati módszer alkalmazhatóságát és két új terápiás lehetőség eredményességét a mikrokeringési zavarral járó kórkép diagnosztikájában és kísérletes terápiájában. Az általunk alkalmazott TNBS colitis jól modellezi a humán IBD klinikai tüneteit (hasmenés, véres széklet, súlyvesztés), valamint a gyulladási mediátorok szintjében és a mikrokeringésben (érstruktúra és mikrohemodinamika) bekövetkező változásokat. A mikro- és makrokeringési változások a leukociták kitapadásával és extravasalódásával jártak, melyek mértéke a colitis egyes fázisaiban - a gyulladási változásokhoz hasonlóan – jellegzetesen különbözött egymástól.

Az NMDA receptor antagonistáknak és az SZR-72 analóg egyszeri adása és az orális PC előkezelés is jelentősen mérsékelte a gyulladási markereket, a XOR aktivitást és a NOS enzim és a vele szorosan összefüggő NO végtermékek szintjét valamint a leukocita aktiváció mértékét, a gyulladás mindkét vizsgált fázisában. További, részletes mikrokeringési vizsgálataink során a colitis alatt kialakuló mikrokeringési zavart és kapillárisok szerkezeti és funkcionális károsodását elemeztük. A károsodások feltérképezésre irányuló vizsgálataink igazolták a vizsgálati technikák jó diagnosztikus alkalmazhatóságát, és mindkét kezelés hatékonyságát a mikrokeringési zavar normalizálásában. Igazoltuk, hogy a PC előkezelés eredményes a kapilláris sérülésekkel szemben is, ugyanakkor ez a hatás az NMDA-receptor antagonistáknak egyszeri alkalmazásával nem volt kimutatható.

Az IBD pontos pathomechanizmusa nem teljesen tisztázott. Kísérletes adataink alapján a biokémiai és mikrokeringési zavar hátterében egyrészt az NMDA receptorok és a NOS rendszer közötti kapcsolat, valamint a béltraktusban zajló kóros immunológiai reakció is

állhat. Welters és munkatársai kapcsolatot igazoltak az NMDA receptor aktiváció és leukocytá sejt vonalak között (Welters et al. 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 et al. 2010). Az NMDA receptorok inaktív limfocitákon alig expresszálódnak, ehhez megfelelő stimulus szükséges, ugyanakkor TNBS colitisben expresszálódnak nagyfokú. A glutamát az NMDA receptorokon keresztül a PMN granulociták aktiválásához és kifejezett intracelluláris  $Ca^{2+}$  beáramláshoz vezet, ami citotoxikus hatású lehet. Valószínűsíthető tehát, hogy a béltraktusban az enterális idegrendszer és a celluláris immunrendszer közötti szabályozó folyamatokban az NMDA receptorok aktiválásának kulcsszerepe van (Boldyrev et al. 2004, Miglio et al. 2005).

Eredményeink bizonyítják, hogy az endogén és szintetikus NMDA-receptor antagonistá kezeléssel a colitis indukció 1. és 6. napján egyaránt csökkenti az oxidatív és nitrozatív stressz okozta elváltozásokat, csökkenti a leukocytá akkumulációt és hatékonyan modulálja a mikrocirkuláció változásait. Ugyanakkor az NMDA antagonisták egyszeri alkalmazása nem csökkentette a kapillárisok morfológiai és funkcionális károsodását, ezért a terápiás hatáshoz ismételt, vagy elhúzódó dózisok (és ennek igazolásához további kísérletek) 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 nyálkjában is (Stremmel et al. 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 gyulladást okozó kaskád (Braun et al. 2009).

Mindezt a következtetést tovább erősítik azok a korábbi adatok, amelyek a PC terápiás hatását írják le a GI traktus gyulladást állapotában. Humán vizsgálatban 3 hónapos PC kezeléssel hatására a krónikusan aktív colitises betegek zömében remissziót, vagy a betegség aktivitásának szignifikáns javulását sikerült elérni, a szteroid kezeléssel elhagyása mellett (Ehehalt et al. 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 leukocyták gátlását is okozhatja (Tracey et al. 2007).

Modellünkben *in vivo* körülmények között figyelhetjük meg a TNBS hatására kialakuló mikrohemodinamikai változásokat és a kapillárisok szerkezet roncsolódást.

Bizonyítottuk, hogy a táplálékkal bevitt PC előkezelés protektív a gyulladás korai és szubakut fázisaiban is, normalizálja a mikrokeringési diszfunkciót a colitis mindkét szakaszában. Kimutattuk, hogy a PC előkezelés közvetlen hatékonysága a kapilláris strukturális károsodás és a vaszkuláris permeabilitás emelkedés helyreállításában, illetve kivédésében rejlik.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a TNBS hatására kialakuló súlyos mikrokeringési diszfunkcióval járó gyulladós folyamat számos elemét sikeresen tudtuk befolyásolni mind az NMDA receptor antagonistákkal való kezeléssel, mind a táplálék kiegészítésként alkalmazott PC előkezeléssel. Mindkét kezelés mechanizmusának fókuszában a fokozott serosa mikrokeringés normalizálása áll. *In vivo* bizonyítottuk, hogy mindkét szer alkalmas az oxidatív és nitrozatív stressz csökkentésére, ezáltal a kialakult mikrokeringési zavar normalizálására. Bizonyítottuk továbbá, hogy az orális PC kezelés kivédi a kapilláris károsodást és az érpermeabilitás növekedését, ezáltal kivédi a szöveti destrukciót és hozzájárulhat a bélnyálkahártya barrier regenerálódásához. Mindezek alapján az NMDA receptor antagonisták és a PC egyaránt ígéretes lehetőség lehet az IBD terápiájában.



## 6. A TÉZIS FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. Az intravitális OPS technika jól alkalmazható a mikrokeringés vizsgálatára és kvantitatív értékelésére a GI traktusban gyulladással járó körülmények között. A CLSEM technika jól használható a mucosa kapillárisok funkcionális és morfológiai változásainak meghatározására, valamint az érpermeabilitás valós idejű („*real time*”) vizsgálatára. Eredményeink szerint az intravitális képalkotó technikák helyettesíthetik a hagyományos szövettani módszereket, segítségükkel nagy felbontású szövettani kép készíthető a vizsgált szöveti struktúra fizikai megszakítása nélkül. Mindkét vizsgálati technika hatékonyan használható a mikrovaskuláris strukturális és funkcionális változások nyomon követésére, hasznos, kiegészítő szerepük van a mikrokeringési vizsgálatokban.
2. Új kísérletes értékelési rendszert alkalmaztunk a CLSEM technikával készült felvételek értékelésére a GI kapilláris károsodások vonatkozásában, amely jól használható a GI traktus gyulladással járó állapotokban a mikrokeringési változások mértékének *in vivo* megbecslésére.
3. Intravitális vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy az enterális NMDA receptorok gátlása terápiás jelentőségű lehet a helyi gyulladással járó elváltozások és mikrokeringési diszfunkció normalizálásában a colitis akut és szubakut szakaszában. Az NMDA receptor antagonisták kinurén-sav és SZR-72 egyszeri alkalmazása nem akadályozza meg a TNBS által okozott kapilláris sérüléseket, az emelkedett vörösvértest áramlási sebesség normalizálódik. Ezek a hatások a TNBS colitis 1. és 6. napján is összefüggést mutatnak a PMN leukocita akkumuláció és NO termelés csökkentésével.
4. Intravitális vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a PC előkezelés hatékonyan kivédi a mikrokeringési diszfunkciót és a bélfal kapilláris károsodást a kísérletes TNBS colitis akut és szubakut fázisában.

## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Itt szeretném kifejezni hálámat Boros Mihály Professor Úrnak, hogy lehetővé tette a tudományos munkám végzését a Szegedi Tudományegyetem Sebészeti Műtéttani Intézetében, valamint köszönöm Professor Úrnak munkám szakmai irányítását.

Köszönöm Kaszaki József Tanár Úrnak, hogy végigkísérte és irányította kutatómunkámat. Köszönöm a tudományos munkám szakmai irányítását, a munkámban nyújtott rengeteg segítséget és szakmai tanácsait.

Szeretnék köszönetet mondani Szabó Andrea Tanárnőnek, hogy bevezetett a kísérletes munka világába. Köszönöm, hogy hasznos tanácsaival hozzájárult munkám sikeréhez.

Ezúton köszönöm Érces Dániel kollegámnak a kísérletes munka során nyújtott segítségét, tanácsait.

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

*Jelen kutatási eredmények megjelenését a „Környezeti tényezők és genetikai faktorok interakciójának vizsgálata immunmediált és daganatos betegségek kialakulásában” című, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0035 számú projekt támogatja. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg. További kutatási támogatások: OTKA K104656; TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0073*