

**N-metil-D-aszpartát receptorok szerepe a vastagbél
motilitás-zavaraiban**

Dr. Érces Dániel

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 közlemények:

- I. Kaszaki J, Palásthy Z, **Érces D**, Rácz A, Torday C, Varga G, Vécsei L., Boros M (2008) Kynurenic acid inhibits intestinal hypermotility and xanthine oxidase activity during experimental colon obstruction in dogs. *Neurogastroenterol Motil* **20(1)**: 53-62. **IF=3,338**
- II. Varga G, **Érces D**, Fazekas B, Fülöp M, Kovács T, Kaszaki J, Fülöp F, Vécsei L, Boros M (2010) N-Methyl-D-aspartate receptor antagonism decreases motility and inflammatory activation in the early phase of acute experimental colitis in the rat. *Neurogastroenterol Motil* **22**: 217-225. **IF=3,349**
- III. **Érces D**, Varga G, Fazekas B, Kovács T, Tókécs T, Tiszlavicz L, Fülöp F, Vécsei L, Boros M, Kaszaki J (2012) N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist therapy suppresses colon motility and inflammatory activation six days after the onset of experimental colitis in rats. *European Journal of Pharmacology* **691**: 225-234. **IF=2,737**
- IV. Kaszaki J, **Érces D**, Varga G, Szabó A, Vécsei L., Boros Mihály (2012) Kynurenines and intestinal neurotransmission: the role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neural Transm* **119(2)**: 211-223. **IF=2,730**
- V. **Érces D**, Varga G, Kovács ÁL, Fülöp F, Vécsei L, Boros M, Kaszaki J (2011) N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist therapy in experimental colitis. *In: Functional and Motility Disorders of the Gastrointestinal Tract. Proceedings of the Humboldt Kolleg Neurogastro* pp 41-49.

A tézis alapjául szolgáló előadáskivonatok:

1. **Érces D**, Varga G, Kovács T, Kaszaki J, Vécsei L, Boros M (2008) Glutamate receptor inhibition improves intestinal function in experimental colitis. *British Journal of Surgery* **95(S6)**: 1-104.
2. Varga G, **Érces D**, Fazekas B, Fülöp M, Kovács T, Kaszaki J, Fülöp F, Vécsei L Boros M (2009) N-methyl-D-aspartate receptor inhibition decreases motility and inflammatory activation in experimental colitis. *Shock* **32(S1)**: 18.
3. **Érces D**, Rácz A, Kaszaki J, Vécsei L, Boros M (2007) Kinurénsav kezelés hatása a vastagbél keringésre kísérletes ileusban. *Érbetegségek* **S1**: 10.

4. Kaszaki J, **Érces D**, Varga G, Tordai Cs, Vécsei L, Boros M (2007) Szabadgyök képződés gátlása glutamát receptor antagonistá kezeléssel akut vastagbél obstrukcióban. *Folia Hepatologica* **11(S3)**: 22.
5. Kovács T, Fazekas B, Varga G, **Érces D**, Kaszaki J, Vécsei L, Boros M (2009) Az NMDA-receptorgátlás vizsgálata bélgyulladásos patkánymodellben. *Magyar Sebészet* **62(S3)**: 154.
6. Fazekas B, Varga G, **Érces D**, Kovács T, Kaszaki J, Vécsei L, Boros M (2009) Az NMDA-receptor-aktiváció jelentősége kísérletes bélgyulladásban. *Magyar Sebészet* **62(S3)**: 153.
7. Palásthy Zs, **Érces D**, Kaszaki J, Vécsei L, Lázár Gy, Boros M (2009) Szabadgyök képződés gátlása glutamát receptor antagonistá kezeléssel akut vastagbél obstrukcióban. *Magyar Sebészet* **62(S3)**: 153.
8. Varga G, **Érces D**, Fazekas B, Fülöp M, Kovács T, Kaszaki J, Fülöp F, Vécsei L, Boros M (2009) N-methyl-D-Aspartate receptor inhibition decreases motility and inflammatory activation in experimental colitis. *Shock* **32(S1)**: 14.

1. BEVEZETÉS

A gasztrointesztinális (GI) rendszer motilitás-zavarral járó kórképeit lokális gyulladás kísérheti, például a mechanikai bélelzáródás szövődménye - a kiváltó októl függetlenül – a hasi gyulladás. A létrejött súlyos állapot megoldását a motilitászavar mielőbbi sebészi megszüntetése jelenti, a gyulladásos szövődmények kezelésére ugyanakkor csak korlátozott lehetőségek állnak rendelkezésre.

GI motilitás-zavarok kialakulhatnak másodlagosan is, a bél gyulladásos megbetegedései miatt. A colitis ulcerosa, vagy a Crohn-betegség a bél nyálkahártya károsodásával jár együtt (Stein et al. 1998), és ekkor a gyulladás megváltoztatja a bél motilitásának szabályozásában részt vevő neuronális funkciót is (Boughton-Smith 1994, Jacobson et al. 1997).

A GI traktust károsító hatások az enterális idegrendszerre fokozott veszélyt jelentenek, mivel a perifériás neuronokat nem védi a vér-agy gáthoz hasonló struktúra. A mikrokeringésben megjelenő toxikus anyagok gyorsan károsíthatják a neuronok működését és a szabályozási zavar következtében a colon motilitása megváltozik. E komplex mechanizmus részletei még nem pontosan ismertek, de számos közvetett adat és megfigyelés utal arra, hogy ebben a folyamatban központi szerepe lehet a bélfal glutamáterg neuronjainak.

1.1. A bélmotilitás szabályozása. Az enterális idegrendszer

Az enterális idegrendszer (ENS) neuronjainak száma (10^7 - 10^8) nagyságrendileg azonos a gerincvelő neuronjainak számával (Jabbur et al. 1988). Mindezek alapján találó a tankönyvek „bél-agy” elnevezése. Az ENS szorosan összekapcsolt ganglionok és idegfonatok, plexusok hálózatából áll, amelyek a GI traktus valamennyi szöveti rétegében megtalálhatók, a nyelőcsőtől kezdve a gyomor, vékony és vastagbélén át az anális záró izomzatig.

A vastagbél perisztaltika autonóm idegi szabályozás alatt áll, amelyben érző neuronok, interneuronok, valamint felszálló serkentő és leszálló gátló (motorikus, mozgató) neuronok vesznek részt. Az excitációs mozgató idegsejtek fő neurotranszmittere az acetilkolin (ACh), míg a gátló neuronok esetében kiemelendő a tachykinin receptorok jelentősége. Az ENS neuron funkció szabályozásában azonban fontos szereppel bírnak a ko-transzmitterek is, melyek mind az excitációs, mind a gátló neuronok működését befolyásolhatják. Ezek közé sorolhatjuk a nitrogén monoxidot (NO), az ATP-t és a vazoaktív intesztinális peptidet (VIP). A motilitás-zavarokkal járó gyulladásos kórfolyamatokban különösen az induktív módon termelődő NO járulhat hozzá jelentősen a perisztaltika megváltozásához.

1.2. Glutamát receptorok az ENS-ben

A glutamát a központi idegrendszer fő excitációs neurotranszmittere. Magas koncentrációját és ezzel összefüggésben az over-excitációban játszott szerepét kimutatták több súlyos központi idegrendszeri kórkép kialakulásában is (Coyle et al. 1993, Ozawa et al. 1998, Turski et al. 1993, Weinberg et al. 1999). A glutamát receptorok az ENS sejtjein is kimutathatók (Liu et al. 1997), de szerepük ezen a területen kevésbé tisztázott.

A glutamát receptorok funkciójuk és farmakológiai érzékenység alapján több csoportra bonthatóak. Az ionotrop receptorok ioncsatornaként működnek és a glutamát receptorok többségét alkotják. Farmakológiai érzékenységük alapján megkülönböztetünk kainát, alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol-propionsav (AMPA) és N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát receptorokat. A másik fő csoportot a metabotrop receptorok alkotják, amelyek G-fehérjékhez kapcsolódnak.

Az ENS kolinerg neuronjainak jelentős százalékán kimutathatók NMDA típusú glutamát receptorok is (Liu et al. 1997, Moroni et al. 1986, Shannon et al. 1989, Wiley et al. 1991). Az axon terminálisok vezikulái között azonosítottak glutamát tartalmúakat is, amelyekből a megfelelő stimulus hatására glutamát szabadulhat fel (Sinsky et al. 1998, Wiley et al. 1991). Ezeket az adatokat megerősíti, hogy az NMDA receptor aktiváció ACh felszabadulást vált ki a plexus myentericus idegsejtjeiből (Giaroni et al. 2003, Kirchgessner et al. 2001). Ugyanakkor az NMDA receptorok Ca^{2+} csatornaként működnek, így aktiválódásuk sejten belüli Ca^{2+} koncentráció-emelkedést okoz. E folyamat eredményeként több Ca^{2+} -függő enzim működése is fokozódhat, a túlzott mértékű beáramlás pedig végül a sejt pusztulását okozhatja. A beáramló Ca^{2+} fokozott NO szintáz (NOS) enzim működéshez, NO felszabaduláshoz vezet, amely a bél motilitásának szabályozását befolyásolhatja. A xantin-oxidoreduktáz (XOR) enzim működése is fokozódik, amely jelentős szuperoxid (SOX) termeléssel jár. A SOX és a további, reaktív szabadgyökök szövetkárosító hatása, valamint az NMDA receptorok excitotoxicitása az ENS neuronjainak károsodását, pusztulását okozza. Ez a folyamat végül a neuronvesztésen keresztül motilitás-zavarokhoz vezet.

1.3. Kinurénsav és a neuroprotekción az ENS-ben

Az ENS védelmének fontos szerepe lehet a GI traktus gyulladási szövődményeinek megelőzésében. A kinurénsav (KynA) a glutamáterg receptorok nem szelektív gátlószere, a központi idegrendszerben (CNS) jól ismert neuroprotektív hatású vegyület. Irodalmi adatok szerint mind *in vivo* (Simon et al. 1986, Gill et al. 1987, Faden et al. 1989), mind *in vitro* (Choi et al. 1988) körülmények között csökkenti a CNS neuronok excitotoxikus károsodását.

Az ENS esetében a KynA terápiás jelentőségére utalt Forrest és munkatársai megfigyelése: az L-kinurenin szintjének emelkedése gyulladással járó bélbetegségekben szenvedő betegek vérében (Forrest et al. 2002). Az L-kinurenin - KynA útvonal a triptofán metabolizmus része, melynek kóreltani jelentőségét neurodegeneratív betegségek esetében már igazolták (Klivényi et al. 2004). A KynA az N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát receptorok működésének gátlása révén hatékony endogén neuroprotektív szernek bizonyult a CNS-t érintő kórképekben.

Habár jelenlegi ismeretek szerint a glutamát receptorok szerepet játszhatnak a gyulladással járó bélbetegségekkel kapcsolatos nocicepcióban, az NMDA receptorok perifériás gátlásának következménye nem teljesen ismert: ez a jelátviteli útvonal a GI traktusban jórészt még feltérképezetlen, élettani és gyulladással járó körülmények között egyaránt.

Az utóbbi évek szegedi kutatómunkája során fejlesztették ki a KynA szintetikus analógját, az SZR-72 kódnevű vegyületet, amely a KynA-val ellentétben átjut a vér-agy gáton. Az SZR-72 alkalmazásnak központi idegrendszeri következményeit a korábbiakban más munkacsoportok már megvizsgálták (Knyihár-Csillik et al. 2008), de a perifériás NMDA receptorok gátlásának következményei, vagyis az ENS-ben kifejtett hatásai nem ismertek.

2. CÉLKITŰZÉS

Kísérletes munkánk legfontosabb célkitűzése az NMDA típusú glutamát receptorok szerepének vizsgálata volt a GI rendszer gyulladással kísért, motilitás-zavarral járó kórképei során. A gyulladás és a motilitás-zavar egymáshoz viszonyított kapcsolata, valamint a kórfolyamat időbeli változásai miatt három kísérletes protokollt alkalmaztunk, vizsgálatainkat akut mechanikus ileus modelljében, trinitro-benzol-szulfonsav (TNBS) indukált colitis korai, 23 órás és késői, 6 nap utáni szakaszában végeztük.

1. Az I. kísérletsorozat célja a colon motilitás-zavart követő gyulladás kialakulásának nyomon követése, valamint a KynA kezelés vastagbél motilitásra gyakorolt hatásainak vizsgálata volt.
2. A II. kísérletsorozat célja az akut gyulladást követő motilitás-zavarok vizsgálata volt. TNBS-indukált colitis modellben vizsgáltuk az NMDA receptorok szerepét, a központi idegrendszeri NMDA receptor-hatások vizsgálata céljából a KynA mellett SZR-72 kezeléseket alkalmaztunk.
3. A III. kísérletsorozat célja a késői, a gyulladás kialakulása után több nappal megfigyelhető motilitás-zavarok azonosítása és befolyásolása volt. Megvizsgáltuk az

NMDA receptor antagonistákkal történő kezelés hatásait a későbbi, klinikailag releváns időszakban is.

4. További célunk volt, hogy meghatározzuk a modell-kísérletekhez használt állatfajok (kutyá és patkány) és fajták (Wistar és Sprague-Dawley patkányok) esetében kapott adatok összehasonlíthatóságát.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálatokat a NIH irányelvei alapján (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) végeztük a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyásával. Az I. kísérletsorozatot a Szegedi Tudományegyetem Állatházából származó hím- és nőstény keverék kutyákon végeztük (átlagos testtömeg 18 ± 2 kg; $n=16$). A II. kísérletsorozathoz 24 hím Wistar patkányt (300 g) használtunk, míg a III. kísérletsorozatot 21 hím Sprague-Dawley patkányon (350 g) végeztük.

3.1. Sebészi beavatkozás és hemodinamikai monitorozás az I. kísérletsorozatban

Kísérleteinket Na-pentobarbitállal (30 mg/ttkg iv.) altatott hím és nőstény, keverék kutyákon végeztük (átlagos testtömeg: 18 ± 2 kg). Az endotracheálisan intubált állatok bal oldali artéria és véna femoralisába polietilén kanüloket vezetünk vérnyomásmérés illetve infúzió adása (10 ml/ttkg/h Ringer laktát) céljából. A jobb véna femoralison keresztül Swan-Ganz katétert vezetünk az artéria pulmonalisba. Laparotomiát követően a v. lienalison keresztül katétert vezetünk a v. portaeba, vérminta vétel céljából. A colon transversum középső szakaszán kijelöltük az obstrukció helyét, itt egy szilikon katétert vezetünk át a bél alatt (az obstrukciót a tourniquet megszorításával hoztuk létre). Ettől a ponttól antimesenterialisan, orálisan 10 cm-re nyúlásmérő bélyeget varrtunk fel a bélmotilitás regisztrálása céljából. A hasfalat időlegesen zártuk, a vizsgálati állatok maghőmérsékletét fűtőpad segítségével állandóan $37-39$ °C között tartottuk.

Az artériás középnyomást (MAP) Statham P23Db nyomásérzékelő transducer alkalmazásával mértük. A jobb szívfélen keresztül a truncus pulmonalisba vezetett Swan-Ganz katéter segítségével határoztuk meg a testhőmérsékletet és termodilúciós módszerrel a perctérfogatot (CO). A teljes perifériás ellenállást (TPR) az MAP és a CO hányadosából számítottuk.

3.2. Sebészi beavatkozás és hemodinamikai monitorozás az II- és III. kísérletsorozatban

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 bódítás mellett. Az álműtött csoport egyedeit a TNBS oldószerével kezeltük.

Az állatokat a beöntést követő 16. órában ill. 6. napon Na-pentobarbitál (50 mg/ttkg i.p.) altatásban fűthető műtőasztalra helyeztük. Tracheosztómiát végeztünk a spontán légzés biztosítására, majd a jobb oldali vena jugularis kanülálása után az állatok Ringer-laktát infúziót kaptak a kísérlet végéig. Az állatok vérnyomásának és szívfrekvenciájának mérése céljából kanüláltuk az arteria carotis communist, a hemodinamikai adatok folyamatos monitorozása SPEL Advanced Cardiosys 1.4 adatgyűjtő szoftver (Experimetria Ltd., Budapest) alkalmazásával történt. A CO-ot termodilúciós technikával határoztuk meg.

3.3. Vastagbél motilitás regisztrálás

A colon motilitását *strain-gauge* technika alkalmazásával monitoroztuk (Cowles 1978). A vastagbél proximális szakaszára felvarrt nyúlásmérő bélyeget (FSG-02, medium 6x15 mm, Experimetria Ltd, Budapest) SGM DC *bridge amplifier* modul-on (Experimetria Ltd, Budapest) keresztül adatgyűjtő és analízáló komputerhez kapcsoltuk (Haemosys 1.17 software, Experimetria Ltd, Budapest). A jeleket regisztráltuk és kiszámítottuk a motilitás görbe minimum pontjait összekötő alapvonalhoz viszonyítva a motilitás görbe alatti területet. Az 1 másodpercre vonatkozó területintegrál értéket, mint motilitási indexet adtuk meg, amely a motilitás dinamikus változásait jellemzi (Huge et al. 1998). A motilitásgörbéből számolt paraméterek a következők voltak:

- *Kontrakciók frekvenciája*: az időegységre eső kontrakciós hullámok száma.
- *Izomtónus*: a motilitásgörbe minimumpontjai alapján számítható.
- *A kontrakciók amplitúdóját* az izomtónust demonstráló vonal és az adott kontrakciós hullám maximumpontja közötti távolsággal jellemezhetjük.
- *Motilitási index*: értékét a motilitási görbe alatti terület adja meg.

3.4. Szöveti nitrit/nitrát meghatározás

Az NO stabil végtermékét, a plazma nitrit/nitrát (NO_x) szintet Griess-reakcióval mértük. A szöveti NO_x meghatározást vastagbél szövetminta homogenizátum felülúszójából végeztük. Első lépésben a minta nitrát tartalmát enzimatis konverzióval nitritté alakítottuk, melyet a nitrit tartalom meghatározása követett 546 nm-en spektrofotométerrel (Moshage et al. 1995).

3.5. A NOS aktivitásának mérése

A szöveti konstitutív és induktív NOS (cNOS; iNOS) enzim aktivitásának meghatározásához a ^3H -arginin- ^3H -citrullin konverzió alapuló metodikát használtuk (Szabó et al. 1993). A kapott aktivitásból és a mintából mért protein tartalomtól adtuk meg a NOS aktivitást.

3.6. XOR enzimaktivitás mérések.

Vastagbél biopsziát a kísérletek végén, a TNBS beöntést követő 23. óra után és a 6. napon vettünk. A szövetmintákat felhasználásig $-70\text{ }^\circ\text{C}$ -on tartottuk. A XOR aktivitást colon homogenizátum felülcszójából Beckman (1989) módszerével mértük fluorometriás kinetikus assay segítségével.

3.7. *In vitro* XOR aktivitás mérés

10 mU XOR aktivitását $5\text{ }\mu\text{M}$ xantin jelenlétében mértük, kemiluminometriás módszerrel, KynA-val vagy allopurinollal (XOR gátlószer) $1\text{ }\mu\text{M}$ - 1 mM koncentráció tartományban illetve ezek hozzáadása nélkül, $0,1\text{ mM}$ EDTA-t tartalmazó 50 mM KPO_4 pufferben ($\text{pH}=7,4$; kísérletes puffer oldat). $100\text{ }\mu\text{M}$ luminolt tartalmazó kísérletes pufferhez előre összeállított, $10\text{ mU XOR}/5\text{ }\mu\text{M}$ xantint tartalmazó oldatot mértünk. A teljes reakció elegy térfogata 1 ml volt (Ferdinandy et al. 2000, Onody et al. 2003).

A kemiluminometriás méréseket 2 perces sötét adaptálódás után 5 percen keresztül végeztük (Packard Tri-Carb 2100 Model). Az eredményeket a kontroll százalékaéhoz viszonyított gátlás mértékeként adtuk meg.

3.8. Kísérleti csoportok és protokoll az I. kísérletsorozatban

Az állatokat 3 csoportra osztottuk. Az 1. csoport álműtéten esett át ($n=5$) és a keringési paraméterek változásának követésére szolgált. A 2. csoport egyedeinél ($n=6$) mechanikus vastagbél elzáródást hoztunk létre, a colon transversum leszorításával. A 3. csoportban ($n=5$) a vastagbél elzáródás mellett a kísérlet 180. percétől a glutamát receptorok nem szelektív gátlószerét, KynA-at juttattunk i.v. a keringésbe 50 mg/kg dózisban, 20 ml volumenben, 60 ml/h sebességgel.

A műtétet követő 30 perces nyugalmi periódus után kezdtük el a méréseket, a kísérlet 0. percét az ileus kezdete jelentette. A megfigyelési periódus 420 percen át tartott, amely során óránként (0, 60, 120, 180, 240, 300, 360. és 420. percnél) monitoroztuk a hemodinamikai paramétereket és regisztráltuk a bélmotilitás változásait. A kísérlet végén szövetmintákat vettünk a vastagbélből XOR és NOS enzimaktivitás meghatározása céljából.

3.9. Kísérleti csoportok és protokoll a II. és III. kísérletsorozatban

A II. kísérletsorozatban a colitis akut fázisát (17-23. óra) vizsgáltuk (1-4. csoport, $n=6$ minden csoportban): az első csoport oldószert kapott intracolonálisan (25% etanol) és kontrollként szolgált. A többi csoport egyedénél TNBS (40 mg/kg) intracolonális alkalmazásával vastagbélgyulladást hoztunk létre. A 3. csoport tagjainál a colitis indukció után KynA (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 III. kísérletsorozatban a colitis szubakut fázisát (6. nap) modelleztük. Az 1. csoport álműtött ($n=5$) volt, míg a többiben colitist ($n=15$) indukáltunk. A 2. csoport állatai nem kaptak kezelést ($n=5$), a 3. csoportban KynA ($n=6$), a 4. csoportban SZR-72 ($n=5$) kezelést alkalmaztunk a TNBS beöntés utáni 6. napon. Vizsgálatainkat a colitis indukciót követően, a 17-23. óra között és a 6. napon végeztük. Műtéti előkészítés után hemodinamikai méréseket végeztünk, regisztráltuk a vastagbél motilitását. A kísérletek végén szövetmintát vettünk a szöveti NO_x szint és NOS, XOR aktivitás meghatározására.

3.10. Statisztikai analízis

Az adatok kiértékelését statisztikai software csomag segítségével végeztük (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Németország), nem paraméteres módszereket alkalmazva. A csoporton belüli eltéréseket Friedman próbával vizsgáltuk, ezen belül a kontroll értéktől való eltérést Dunn próbával teszteltük. 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

4.1. Hemodinamika

Az I. kísérletsorozatban a MAP nem változott szignifikáns mértékben, nem észleltünk eltérést a csoportok között. A mechanikus ileus jelentős CO emelkedést okozott a kísérlet 5. órájára, amit a KynA kezelés nem befolyásolt. Az ileust követően fokozatosan, szignifikánsan csökkent a TPR, ezt a változást a KynA kezelés a kísérlet végére jelentősen mérsékelte.

A II. kísérletsorozatban a colitis indukciót követő 17-23. óra között az álműtött csoporthoz képest alacsonyabb MAP alakult ki mindhárom colitises csoportban. Sem a KynA, sem az SZR-72 nem befolyásolta a gyulladás által okozott MAP csökkenést.

A TNBS beöntést követő 1. nap végén a hemodinamikát jelentősen emelkedett CO mellett csökkent TPR jellemezte. A CO esetében egyik NMDA receptor antagonistá kezelésem bizonyult hatásosnak. A TPR értékeket az SZR-72 jelentősen emelte, míg a KynA ebben az esetben is hatástalannak bizonyult.

A III. kísérletsorozatban, a colitis indukciót követő 6. napon, a csoportok között nem volt szignifikáns különbség az általunk vizsgált, három hemodinamikai paraméter (MAP, CO, TPR) esetén, sem a monitorozás kezdetekor, sem az NMDA receptor antagonistá kezeléseket követően.

4.2. Vastagbél motilitás

Az I. kísérletsorozatban a bélelzáródás helyétől orális irányban található bélszakasz motilitása jelentősen megemelkedett a kísérlet alatt. A motilitási index emelkedését a perisztaltika frekvenciájának és amplitúdójának növekedése kísérte, miközben a bél simaizomzatának tónusa lecsökkent. A KynA kezelés csökkentette a motilitási indexet, a kontrakciók frekvenciáját, amplitúdóját és emelte a vastagbél simaizom tónusát.

A II. kísérletsorozatban, a TNBS beöntést követő 17-23. óra között a motilitási index szignifikánsan magasabb volt a colitises csoportban és a gyulladásoos válasz részeként lecsökkent a béltónus. Az NMDA receptor antagonistákkal történt kezelés csökkentette a vastagbél motilitási indexét és megemelte a simaizomzat tónusát. A KynA és az SZR-72 hatása eltérő kinetikát mutatott. A KynA esetében gyorsan kialakuló, rövid ideig tartó hatást figyeltünk meg, szemben az SZR-72 fokozatosan megjelenő, hosszabb ideig tartó hatásával.

A III. kísérletsorozatban, 6 nappal a TNBS beöntést követően, a motilitási index és az amplitúdó nem különbözött a 3 colitises csoportban. A kontrakciók frekvenciája magasabb volt valamennyi colitises csoportban az álműtöthöz képest. Az NMDA receptor antagonistá kezeléseket követően a kontrakciók frekvenciája csökkent, a bél tónusa megemelkedett.

4.3. NO termelés

A bél motilitásának fontos szabályozó molekulája a NO, amelynek egyik legfontosabb forrása a NOS enzim. Az I. kísérletsorozatban a vastagbélből vett szövetmintákban emelkedett NOS aktivitást mértünk a bélelzáródást követően. A KynA kezelés jelentősen csökkentette a szöveti NOS aktivitás mértékét.

A II. kísérletsorozat vastagbél mintáiban magas NOS aktivitást mértünk. Mindkét NMDA receptor antagonistá kezelést követően a NOS aktivitás jelentősen mérséklődött a colitises csoporthoz képest.

A III. kísérletsorozatban, 6 nappal a TNBS indukciót követően a vastagbél NO_x koncentrációja megemelkedett a colitises csoportban. Mind a KynA, mind az SZR-72 kezelés jelentősen csökkentette a NO_x szintet.

4.4. XOR aktivitás a vastagbélben

A gyulladás során a XOR enzim a SOX egyik fő forrása, emiatt fontos szerepe van a gyulladást kísérő szövetkárosodásban. Az I. kísérletsorozatban, a mechanikus ileust követően szignifikánsan magasabb XOR aktivitást mértünk a vastagbélben, amit a KynA kezelés lecsökkentett.

A II. kísérletsorozatban, a colitis korai szakaszában a XOR aktivitás megemelkedett. Mindkét NMDA receptor antagonistá kezeléssel szignifikánsan csökkentette a XOR aktivitást.

A III. kísérletsorozatban, a TNBS beöntést követő 6. napon megemelkedett XOR aktivitást mértünk a colitises csoportban, amit a KynA kezelés hatékonyan csökkentett, de az SZR-72 esetében nem sikerült szignifikáns hatást kimutatni.

4.5. A KynA hatása a XOR aktivitásra. *In vitro* vizsgálatok

A KynA hatását a XOR enzim SOX termelésére *in vitro*, sejtmentes környezetben kemilumineszcencia-mérési technikával vizsgáltuk. A KynA az 1 μM - 5 mM közötti koncentráció tartományban hatékonyan csökkentette a xantin/XOR rendszer által termelt SOX mennyiségét. Kísérleteinket elvégeztük allopurinollal is. 1 μM -os koncentráció esetén a KynA és az allopurinol közel azonos hatékonysággal csökkentette a xantin/XOR eredetű SOX termelést. Magasabb koncentráció esetén az allopurinol bizonyult hatékonyabbnak.

A KynA közvetlen hatását a XOR enzim aktivitásra fluorometria alkalmazásával vizsgáltuk. A mérések 0,1 mM és 1 mM KynA koncentráció tartományban történtek. A KynA 60-98%-os XOR gátlást fejtett ki a kontrollhoz viszonyítva.

4.6. Az NMDA antagonistá kezelések hatásai a vastagbél-gyulladással járó akut motilitás-zavarokra különböző fajokban

A vastagbélgyulladás korai, akut szakaszára valamennyi általunk használt állatmodell (kutya és patkány) esetében ugyanazok a motilitás-zavarok jellemzőek. Minden esetben emelkedett motilitási index és csökkent bél simaizom tónus társult fokozott gyulladással, XOR, NOS aktivitással. Az NMDA receptor antagonistá kezeléssel fajtól függetlenül csökkentette a motilitás indexet és emelte a bél simaizomzatának tónusát. Fontos leszögezni, hogy a TNBS által kiváltott gyulladás jeleit először az indukciót követő 14-17. órában lehetséges kimutatni, ezért a 17-23. óráig tartó szakaszt a TNBS colitis akut szakaszának

tekinthetjük, amely összehasonlítható a mechanikus ileust követő korai, 1-7 óráig tartó időszakkal.

5. MEGBESZÉLÉS

A vastagbélben kialakuló lokális gyulladás gyakran társul a GI rendszer motilitásának megváltozásával. A motilitás szabályozásáért felelős teljes neuronhálózat a bélrendszer falában található, így a különböző gyulladásos mediátorok könnyen befolyásolhatják működését, és így jelentős szerepük lehet a GI traktus funkciózavarainak kialakulásában. (Lakhan et al. 2010, Törnblom et al. 2005).

Mindezek mellett fontos megjegyezni, hogy a motilitás zavarai módosulnak a neurotranszmisszió vagy a funkciókárosodás változásainak megfelelően, a gyulladás előrehaladásával párhuzamosan (Kaszaki et al. 1987). Ez a jellegzetesség megnehezíti a kórfolyamat kialakulásának vizsgálatát és összetett kísérleti elrendezések létrehozását igényli.

A tézis alapjául szolgáló kísérletsorozatok megtervezésekor arra törekedtünk, hogy minél átfogóbb képet kaphassunk a motilitás-zavarral járó gyulladásos folyamatok időbeli változásairól, és a motilitás változások kialakulásának gyulladással való viszonyáról is. Vizsgálatainkat ezért három különböző modellben terveztük és végeztük el.

5.1. Az NMDA receptorok szerepe az elsődleges motilitás-zavarok kialakulásában: I. kísérletsorozat

Az I. kísérletsorozat során nyert eredményeink rámutattak a KynA kezelés hatékonyságára az akut vastagbél elzáródás következtében kialakuló gyulladásos válaszra és a motilitás-zavarokra is. Ebben a kutya modellben a mechanikus ileus kialakulását fokozott vastagbél motilitás és a gyulladásos mediátorok, NOS és XOR szignifikáns emelkedése követte. Ezeket a változásokat a hemodinamika hiperdinamiás jellegű reakciója kísérte.

A közelmúlt felismerései alapján azt feltételeztük, hogy a glutamáterg neurotranszmisszió nemcsak a központi idegrendszerben, de a periférián is fontos szerepet játszik, és képes más neurotranszmitterek felszabadulását befolyásolni (Liu et al. 1997, Kirchgessner et al. 2001, Wiley et al. 1991, Sinsky et al. 1998). A KynA kezelés hatékonysága a mechanikus ileust követően arra utal, hogy a motilitásban bekövetkező excitációs jellegű változások kialakulásáért a glutamát receptorok működése is felelős.

A bél gyulladásos állapotaiban az ENS és a NO termelés kapcsolata különös figyelmet érdemel (Ekblad et al. 1994, Qu et al. 1999, Furness et al. 2000). Az NMDA receptorok működése fokozza a sejtbe irányuló Ca^{2+} áramot, amely a cNOS megnövekedett aktivitásához, végső soron emelkedett NO termeléshez vezet, amely a vastagbél

simaizomzatának relaxációját, a bélfal tónusának csökkenését eredményezi. Az emelkedett intracelluláris Ca^{2+} koncentráció hatására megnövekszik a XOR enzim aktivitása is, amely SOX képződéshez vezet, így nagyban hozzájárul az NMDA receptor aktivációt követő szöveti károsodáshoz. A glutamát toxicitás a sejten belüli ionháztartás felborulásán, nitrozó- és oxigén gyökök képződésén keresztül vezet a vastagbél motilitás szabályozásában részt vevő neuronok károsodásához, működésük megváltozásához (Liu et al. 1997, Furness et al. 2000). Az I. kísérletsorozatban tett megfigyeléseink alapján a KynA neuroprotektív hatását az NMDA receptor aktiváció gátlása és az ennek következtében lecsökkent NO termelés és XOR aktivitás révén fejtí ki.

5.2. Neuroprotekcíó a gyulladást kísérő motilitás-zavarok során: II- és III. kísérletsorozat

A motilitás-zavarok nemcsak kiválthatják a bélrendszer gyulladását, hanem a vastagbél gyulladással járó kórképeiben másodlagosan is kialakulhatnak. Ez figyelhető meg a Crohn-betegségben vagy colitis ulcerosaban szenvedők esetében is.

A II- és III. kísérletsorozatban általunk alkalmazott TNBS colitis jól modellezi az emberi gyulladós bélbetegségek klinikai tüneteit (hasmenés, véres széklet, súlyvesztés), valamint a gyulladós mediátorok szintjében bekövetkező változásokat (Morris et al. 1989). A jellegzetes makrokeringési és motilitásbeli változások, akárcsak a gyulladós válasz elemei, különböznek a colitis korai, akut és későbbi, szubakut szakaszában. A II- és a III. kísérletsorozatunkat ezért úgy terveztük, hogy alkalmasak legyenek a korai és késői fázis változásainak összehasonlítására.

A II. kísérletsorozatban a hemodinamikai, motilitásbeli és gyulladós paraméterek az akut mechanikus ileust jellemző változásokhoz hasonlóan alakultak. A colitis indukciót követően fokozott motilitást, hiperdinamiás jellegű keringést tapasztaltunk, amelyet emelkedett NO termelés és XOR aktivitás kísért. A KynA és SZR-72 kezelés hatékonysága arra utal, hogy - hasonlóan az I. kísérletsorozat eredményeihez - az NMDA receptorok ebben az esetben is jelentős szerepet játszanak a gyulladást követő reakciók kialakulásában.

Fontos azonban kiemelni a két NMDA receptor antagonistá szer hatása közötti különbséget a TPR esetében. Az SZR-72 alkalmazásakor TPR emelkedés figyelhető meg, amely KynA kezelés után nem jelentkezik. A különbséget a két vegyület eltérő vér-agy gáton való átjutási képessége magyarázhatja (Bari et al. 2006, Vécsei et al. 1992). Ezt támasztja alá az a korábbi megfigyelés, amely szerint a nucleus tractus solitarii területére mikroinjektált L-glutamát dózis-függő csökkenést okozott a vérnyomásban és az artéria iliaca érellenállásában.

Erre a területre befeccskendezve az NMDA receptor antagonistá MK-801 megszüntette a glutamát hatásait (Tian et al. 1994).

III. kísérletsorozatunkban – amely a colitis későbbi, szubakut szakaszát, az indukciót követő 6. napon vizsgálta – már normalizálódott keringési paramétereket mértünk a nitroztatív stressz jelei mellett. A hemodinamikán kívül a korai és késői gyulladási szakaszok között a motilitást tekintve is határozott különbségeket vehetünk észre. A TNBS beöntést követő 6. napon az akut szakaszra jellemző hipermotilitást már csak a bélmozgások frekvenciája esetében tudtuk kimutatni. A béltónus és a motilitás index normalizálódása figyelhető meg ebben az időszakban. Ez a jelenség a bélmozgások frekvenciájának szabályozásában részt vevő további mediátorok, szabályozó rendszerek jelenlétére utal. Ezt támasztja alá Bossone és munkatársai megfigyelése is, amely szerint TNBS-colitis modellben a kontrakciók frekvenciájának emelkedése kapcsolatba hozható az indukálható NOS (iNOS) aktivitásával (Bossone et al. 2001). A III. kísérletsorozatunkban, a colitis kiváltását követő 6. napon jelentős szöveti NO_x szint emelkedés volt jelen, magas perisztaltikus frekvencia mellett. A feltételezett másodlagos szabályozásnak a motilitás adaptációjában lehet szerepe, lehetővé téve károsodott neuronális funkció mellett is a bél perisztaltika normálhoz hasonló működését. A NO fontos szerepét a bélmotilitás szabályozásában az I- és II. kísérletsorozat eredményei is jól mutatták. Az NMDA receptor antagonistá kezelés hatására a kontrakciók frekvenciája csökken, amelynek hátterében az NMDA receptorokon keresztül, a sejtbe irányuló alacsonyabb Ca²⁺ áram, és ennek következtében lecsökkent NO termelés állhat.

5.3. A KynA közvetlenül képes gátolni a XOR enzimet *in vitro* körülmények között

A KynA motilitásra kifejtett hatásai mellett a legfontosabb szabadgyök termelésért felelős enzimek, a NOS és a XOR enzim aktivitását is csökkentette. A XOR enzimre kifejtett gátlás magyarázható a KynA nem specifikus, szubsztrát analógián alapuló hatásán. Szerkezeti hasonlóság figyelhető meg a hipoxantin/xantin és a KynA között. A sejtmentes környezetben, *in vitro* elvégzett vizsgálataink alapján a KynA valóban hatékonyan képes gátolni a XOR enzim működését, amely nagyban hozzájárulhat gyulladáscsökkentő hatásához. E tulajdonság jelentőségét hangsúlyozza, hogy a SOX és NO reakciója során keletkező peroxinitrit oxidatív tulajdonságokkal bíró, rendkívül citotoxikus molekula, amely különösen fontos szerepet játszik a gyulladást kísérő sejt- és szövetkárosodás kialakulásában (Ko et al. 2005, Linden et al. 2005). A peroxinitrit képződés mértékét a SOX termelődés határozza meg, amelynek egyik legfontosabb enzime a NADPH oxidáz mellett a XOR. A KynA a NO termelés csökkentése és XOR enzim működésének gátlása révén így több irányból is hozzájárulhat a

peroxinitrit képződés csökkenéséhez és ezáltal a szöveti és neuronális károsodás mérsékléséhez.

6. A TÉZIS FONTOSABB MEGÁLLAPÍTÁSAI

1. Az NMDA receptor antagonistá KynA kezelés hatékonyan befolyásolja a vastagbél akut motilitás-zavarait.
2. A motilitás változásaival párhuzamosan az NMDA receptor antagonistá kezelés csökkenti a gyulladást a vastagbélben. Elsőként mutattuk ki a KynA közvetlen XOR gátló hatását, amely fontos szerepet játszhat gyulladáscsökkentő hatásában.
3. Az NMDA receptor antagonistá kezelés gyulladáscsökkentő hatásai 6 nappal a colitis kiváltását követően is megfigyelhetők.
4. A KynA és a vér-agy gáton átjutni képes, szintetikus analóg SZR-72 hatékonysága egymással összemérhető, az SZR-72 ígéretes kísérletes terápiás szer a vastagbél gyulladást, motilitási zavarral járó állapotai esetén.
5. Az NMDA receptor antagonistá kezelés képes befolyásolni a vastagbél gyulladást folyamatait és az azok során megfigyelhető motilitás-zavarokat többféle állatmodellben. Ez az NMDA receptorok fontos, fajtól független szerepére utal a kórfolyamatok kialakulásában.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Boros Mihály Professzor 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 türelmükért és bátorításukért, amellyel munkámban is támogattak.

Jelen kutatási eredmények megjelenését „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