

**A GYOMOR SAVSZEKRECIÓ- ÉS MOTILITÁS SZABÁLYOZÓ
MECHANIZMUSAI. A CITOKINEK, A CRF PEPTID- ÉS
RECEPTORCSALÁD SZEREPE A FOLYAMTOKBAN**

Ph.D. tézisek

Dr. Czimmer József

Programvezető: Prof. Dr. Mózsik Gyula, az MTA Doktora
Pécsi Tudományegyetem OEKK KK
I. sz. Belgyógyászati Klinika
Pécs, 2006

Előszó

A Hans Selye által 1936-ban leírt biológiai stressz koncepció folytatásaként 1955-ben felfedezésre került a folyamatok kulcsszereplője, a corticotropin-releasing faktor (CRF), majd a hypothalamus – hipofízis - mellékvese tengely központi szerepe a fizikai illetve emocionális stresszre adott fiziológias válaszreakcióban. Az ezt követő számos kísérleti eredményből kiderült, hogy a központi idegrendszerbe juttatott CRF képes kiváltani a szervezet stresszhatásokra fiziológiásan adott viselkedési-, autonóm-, immun- és zsigeri válaszait, és mindez függetlenül működik a hipofízis - adrenerg endokrin tengelytől. Ezek az eredmények újabb kutatási irányokat generáltak megalapozva az immun-agy-bél szabályozó tengely koncepcióját.

A dolgozatban a szerző a stressz-válasz mediálásában résztvevő CRF peptidcsalád és gyulladáscitokinek szerepét vizsgáló kutatásait részletezi a gyomor funkciók, a savszekréció és motilitás szabályozási mechanizmusában. Tematikai megfontolásokból a dolgozat két részre tagolódik. Az első fejezetben a CRF peptidcsalád és az interleukin-1 bétának a gyomor motilitás (gyomorürülés) szabályozásában betöltött szerepével, míg a második fejezetben az interferon-alfa gyomorsav-szekrécióban betöltött szerepével kapcsolatos kísérletek kerülnek részletezésre.

I. Fejezet: A CRF rendszer és az interleukin -1β szerepe a gyomor motilitás szabályozásában. A CRF1 és CRF2 típusú receptorok szerepe a folyamatban

BEVEZETÉS

A CRF egy 41 aminosavból álló polipeptid, amely szekvenciája az élővilágban a gerincesek között viszonylag magas szinten konzervált, tükrözve alapvető szabályozó szerepét. A CRF kapcsolódni és aktiválni képes a CRF1 és CRF2 típusú receptorokat – előbbi 10-szer erősebben –, amelyeknek a későbbiekben több splice variánsát fedezték fel a különböző fajokban lényegében azonos kötési képességekkel. A CRF peptidcsalád elsőként felfedezett újabb tagjai a nem emlős gerincesekben kimutatott sauvagine és urotenszin-1 felvetették hasonló peptidek létezésének valószínűségét emlősökben is, ami végül az urocortin 1 (Ucn 1) karakterizálásához vezetett. Az Ucn 1 egyenlő mértékben képes kötődni a CRF1 és CRF2 receptorokhoz. A humán- és egér genom adatbázis létrehozását követően intenzív keresés eredményeként szekvencia homológitás alapján felfedezésre kerültek újabb, a CRF családdhoz tartozó peptidek, névszerint az urocortin 2 (Ucn 2 vagy

stresscopin related peptide=SRP) és az urocortin 3 (Ucn 3 vagy stresscopin), amelyek specifikusan kötődnek a CRF2 receptorokhoz, míg a CRF1 receptorhoz lényegében nem. Később további előrelépést jelentett a CRF-mediálta fiziológiás- és stressz-mediálta folyamatok megismerésében a vér-agy gáton igen gyengén penetráló CRF receptor peptid antagonisták egymás utáni felfedezése, nevezetesen az alfa helikális-CRF 9-41 és D-Phe12-CRF 12-41, antisauvagine-30, astressin és atressin-B, amelyek kompetitíven kötődnek mind a CRF1 és CRF2 receptorokhoz. Ezekkel számos indirekt bizonyíték gyűlt össze arról, hogy a gyomor szekréció és motilitás szabályozási folyamataiban elsősorban a CRF2 receptorok involváltak. Az újabb CRF2 szelektív peptid receptor antagonista, az astressin-2B tette végül lehetővé a direkt bizonyítást. A szintetikus, nem-peptid CRF1 receptor antagonisták ezzel ellentétben igen könnyen átjutnak a vér-agy gáton, egyik fontos képviselőjük a CP-154,526.

Hatását tekintve a CRF mind centrális, mind perifériás beadását követően csökkenti a gyomor tranzit időt, de hozzá hasonlóan az emlős- és nem-emlős eredetű CRF-szerű peptidek, mint a sauvagine, urotensin és urocortin 1 is gátolják a gyomorürülést.

Az interleukin-1 (IL-1) rendszer, a gyulladássos- és immunreakciók kulcs-citokinje, IL-1 α , IL-1 β agonista ligandokból, IL-1 antagonistából és IL-1 receptorból áll. Az IL-1 β – amely makrofágokban, T lymphocytákban és az agy mikroglia, astrocyta és endothel sejtjeiben termelődik – perifériás beadását követően gátolja a gyomor motilitását és a savszekréciót, centrális beadását követően aktivál CRF tartalmú neuronokat az agyban a hypothalamus paraventricularis magjában.

CÉLOK

- A központi idegrendszerbe beadott Ucn 2 gyomorürülésre kifejtett hatásának karakterizálása;
- A CRF2 receptor szelektív peptid agonista, Ucn 2 hatás összehasonlítása a CRF1/CRF2 receptor affinitással rendelkező Ucn 1 és CRF hatásával szelektív CRF2 receptor antagonista alkalmazásával;
- A centrálisan beadott Ucn 2 és Ucn 1 gyomorürülést gátló hatása autonóm mechanizmusainak karakterizálása vagotómia és adrenerg receptor blokáddal;
- A centrális CRF1 és CRF2 receptorok szerepének tisztázása a perifériásan alkalmazott interleukin-1 β gyomorürülést gátló hatásában a nem-peptid CRF1 receptor antagonista CP-154,526 és a szelektív CRF2 antagonista astressin2-B alkalmazásával.

MÓDSZEREK / EREDMÉNYEK

Felnőtt Spague-Dawley törzsből származó, 250-300 g tömegű, kontrollált fény-, hőmérséklet és páratartalom mellett tartott patkányokon folytak a kísérletek, amelyek előtt 16-18 óras éheztetésük történt.

- Az Ucn 2 és Ucn 1 centrális, intraciszternális injekciója a viszkózus folyadék 20-perces gyomorürülését dóziszfüggő módon gátolta;
- Az intraciszternálisan beadott astressin2-B előkezelés meggátolta az Ucn 2 és a CRF-indukálta csökkent gyomorürülés kialakulását, de önmagában nem befolyásolta a gyomorürülés alapértékét;
- A vagotomia gátolta az intraciszternálisan beadott CRF-indukálta gyomorürülés gátlást, ezzel szemben szignifikánsan fokozta az intraciszternálisan adott Ucn 2-indukálta gátló hatást;
- Az intraperitonealis bretylium-tozilát előkezelés kivédte mind az intraciszternálisan, mind az intracerebroventrikulárisan adott Ucn 2-indukálta gyomorürülés-gátlást, de nem befolyásolta az intravénás Ucn 2-, illetve az intracerebroventrikulárisan beadott CRF vagy Ucn 1-indukálta gátló hatást;
- A subcutan prazozin előkezelés kivédte az intraciszternális Ucn 2-indukálta gyomorürülés gátlást, míg a subcutan yohimbin és propranolol előkezelésnek ilyen hatása nem volt;
- Az intravénásan beadott nem peptid CRF1 receptor szelektív antagonistá, CP-154,526 parciálisan-, míg intracerebroventrikulárisan beadva teljes mértékben kivédte az intravénás interleukin-1 β -indukálta gyomorürülés gátlást;
- Az intravénásan beadott CRF2 receptor szelektív antagonistá, astressin2-B parciálisan kivédte az intravénás interleukin-1 β -indukálta gyomorürülés gátlást, míg intraciszternálisan alkalmazva nem volt rá hatással.

MEGBESZÉLÉS

A tézisekben szerepeltetett kísérletes eredmények demonstrálják, hogy az újonnan felfedezett CRF2 receptor agonista, az Ucn 2 intraciszternálisan injektálva dózis-függő módon gátolja éber, éheztetett patkányokban a viszkózus nem-kalorikus folyadék kiürülését a gyomorból. Az intracerebroventrikuláris injektálás során az Ucn 2 azonos hatáserősségűnek bizonyult. Az Ucn 2 intraciszternálisan beadva erősebb gyomorürülést gátló hatást fejt ki a korábban karakterizált Ucn 1-hez képest. A szelektív CRF2 receptor antagonistá, astressin2-B

centrális beadása során kivédi mind az intraciszternálisan adott Ucn 2, mind az Ucn 1 és a CRF-indukálta gyomorürülést gátló hatást, ami direkt farmakológiai bizonyítékul szolgál – szemben a korábbi indirekt, nem-szelektív antagonistákkal végzett kísérletek során kapott eredményekkel– a CRF2 receptorok kulcsszerepére a folyamatokban. Egybevágó eredmények igazolják a kísérletek során azt is, hogy a centrálisan beadott Ucn 2-indukálta gyomorürülés gátló hatás szimpatikus-, α 1-adrenerg receptoriálisan mediált úton szabályozódik, amely az alkalmazott antagonisták farmakodinámiája alapján perifériás adrenerg posztganglionális idegvégződésekre lokalizálható (feltételezett neurotranszmitterek: noradrenalin, neuropeptid Y és az ATP). A subdiaphragmaticus vagotómia fokozott gátló hatást eredményezett az Ucn 2 indukált gyomorürülés-gátlásban, amely a szimpatikus- és paraszimpatikus tónus egyensúlyának felborulását, így a szimpatikus mediáció túlsúlyát eredményezhette a háttérben. Neuroanatómiai tanulmányok eredményeire és sajátjainkra alapozva feltételezzük, hogy a centrális (ic és icv) Ucn 2 a nucleus tractus solitariuson, area postremán, a hypothalamus paraventricularis magján, a centralis amygdalában és a vagus ideg dorsalis motoros magjában befolyásolhatja központilag a szimpatikus effektor utat funkcionálisan befolyásolva / mediálva a stressz folyamatok által indukált gasztrointesztinális motilitás gátlását. Az intravénásan beadott Ucn 2 hasonlóképpen a centrális beadáshoz képest szignifikánsan gátolta a viszkózus folyadék kiürülését a gyomorból, de a hatás nem volt blokkolható szimpatikus ganglion blokkolóval, utalva arra, hogy a két út különféle módon regulálódik.

Az interleukin-1 β -ről ismeretes, hogy gátolja a gyomorürülést rágcsálókban és emlősökben, és az is, hogy a CRF receptorok szerepet játszanak a folyamatban. A jelen kísérletek tisztázták szelektív peptid CRF2 antagonista és nem-peptid CRF1 antagonista használatával, hogy a szisztémásan beadott (iv) interleukin-1 β centrális CRF1 receptoriális úton fejt ki fent nevezett hatását és az irodalmi adatok alapján a hatáshely feltételezhetően a hypothalamusban van.

II. Fejezet: Az interferon- α szerepe a gyomor szekréció szabályozásában

BEVEZETÉS

A gyomorsav szekréció szabályozásának neurális, hormonális, parakrin és autokrin mechanizmusait több évtizede tanulmányozzák, és az utóbbi időben több bizonyíték igazolta, hogy az immunrendszernek is szerepe van a folyamatokban részben citokinek termelése útján. A gyomorműködés, így a savszekréció regulációjában, a nyálkahártya vérellátás szabályozásában fontos szerepet tulajdonítanak a nitrogén monoxidnak mind perifériásan

effektor molekulaként, mind centrálisan neuromodulátorként. A CRF receptorok és peptid agonisták (elsősorban CRF2 receptor mediálta úton) ugyancsak gátló módon befolyásolják a gyomorsav-elválasztást komplex módon utánozva a stresszre adott válaszreakció során bekövetkező gasztrointesztinális folyamatokat. Az interferon- α -nak hasonlóan az interleukin-1-hez központi szerepe van az immunválasz során a citokin kaszkád mechanizmusok elindításában / regulációjában. Számos humán tapasztalat gyűlt össze interferon- α -kezelt hepatitiszes és mieloproliferatív betegektől mellékhatások / hatások tekintetében, így a gyomorürülést gátló hatásáról. Mindazonáltal a gyomorsav-szekrécóra kifejtett hatása ezidáig nem került leírásra, karakterizálásra.

CÉLOK

- Az interferon- α gyomorsav szekrécóra kifejtett hatásának karakterizálása egy centrális vago-vagalis reflex útján stimuláló pylorus ligációs állatkísérleti modellben;
- Annak eldöntése, hogy az interferon- α hatásheyle priméren centrális vagy perifériás lokalizációjú;
- A nitrogén monoxid rendszer szerepének tisztázása az intraciszternális interfeon- α -indukálta gyomorürülés gátlás folyamatában;
- A szimpatikus vegetatív receptorok szerepének tisztázása az interferon- α indukálta gyomorsav szekrécio gátlás kialakulásában;
- Az endogén prosztaglandin rendszer szerepének tisztázása az interferon- α indukálta gyomorsav szekrécio gátlás kialakulásában;
- A centrális CRF2 receptorok szerepének tisztázása az interferon- α indukálta gyomorsav szekrécio gátlás kialakulásában;
- A CRF1 receptorok szerepének tisztázása az interferon- α - indukálta gyomorsav szekrécio gátlás kialakulásában.

MÓDSZEREK / EREDMÉNYEK

Felnőtt CFY törzsből származó, 180-220 g tömegű, kontrollált körülmények között tartott patkányokon folytak a kísérletek, amelyek előtt 16-18 órás éheztetésük történt. A kísérletek 10 és 14 óra között zajlottak konzekvensen elkerülendő a CRF termelés cirkadián ritmusából adódó változásokat. Humán leukocita liofilezett interferon-a (Egiferon) került felhasználásra, oldószerként steril fiziológiás sóoldatot használtunk, a törzsoldatok tárolása -80°C-on történt.

- A subcutan beadott interferon- α dózisfüggő módon gátolta mind a pylorus ligáció indukálta gyomor szekréció volument, mind a gyomorsav szekréció mennyiségét 2 óra alatt;
- Az intraciszternálisan beadott interferon- α dózisfüggő módon gátolta mind a pylorus ligáció indukálta gyomor szekréció volument, mind a gyomorsav szekréció mennyiségét 2 óra alatt. Az interferon- α intraciszternális beadást követően két nagyságrenddel kisebb dózisban fejtette ki ugyanazt a gátlási szintet, mint a subcutan alkalmazás mellett, ezért ezt követően a centrális ED50 dózissal (100 NE/állat) folytak a kísérletek;
- Az intraciszternális interferon- α -indukálta gyomorsav szekréció gátlás felfüggeszthető volt a nem-szelektív nitrogén oxid szintáz (NOS) gátló L-NAME intravénás előkezeléssel, és utóbbi ez kivédhető volt az enzim szubsztrátjának, az L-argininnek túlszubsztituálásával kompetitív antagonizmus révén;
- A szelektív indukálható (i)NOS gátló aminoguanidin nem függesztette fel az intraciszternális interferon- α -indukálta gyomorsav szekréció gátlást;
- A subcutan beadott szimpatikus alfa adrenerg blokkoló phentolamin felfüggesztette az intraciszternális interferon- α -indukálta gyomorsav szekréció gátlást;
- A subcutan beadott szimpatikus béta adrenerg blokkoló phentolamin nem befolyásolta az intraciszternális interferon- α -indukálta gyomorsav szekréció gátlást;
- A subcutan beadott ciklooxygenáz gátló indomethacin nem függesztette fel az intraciszternális interferon- α -indukálta gyomorsav szekréció gátlást;
- Az intraciszternálisan beadott CRF1/CRF2 receptor antagonistá CRF9-41 és a CRF2 receptor antagonistá antisauvagine-30 felfüggesztette az intraciszternális interferon- α -indukálta gyomorsav szekréció gátlást;
- Az intraciszternálisan beadott CRF1 receptor antagonistá CP-154,526 nem függesztette fel az intraciszternális interferon- α -indukálta gyomorsav szekréció gátlást.

MEGBESZÉLÉS

A tézisekben összefoglalt kísérletes eredmények karakterizálták az interferon- α dózisfüggő gátló hatását a gyomorsav szekrécióban - amely hatása ezidáig nem került leírásra - egy

vago-vagális reflex útján stimulált pylorus-ligált patkánymodellben. Az interferon- α két nagyságrenddel hatásosabbnak bizonyult az intraciszternális beadása során, mint subcutan alkalmazva, ezzel sugallva priméren centrális mechanizmusok szerepét a folyamatban. Az interferon- α gyomorsav szekréciót gátló hatását a nem-szelektív NOS kompetitív antagonistá (L-NAME) szignifikánsan gátolta, míg az indukálható NOS gátló aminoguanidin nem. Az alfa- és béta szimpatikus receptor szelektív blokkolókkal végzett kísérletek alapján az interferon- α -indukálta gyomorsav szekréció gátlás az alfa adrenerg úton mediálódik. A szabályozó folyamatban a centrális CRF2 receptoroknak is szerepük van feltételezve az interferon- α immun-stressz-válaszban a gyomorsav szekréció (motilitással együtt a gasztrointesztinális funkciók) gátlásában betöltött kulcsszerepét. Irodalmi adatok és ezen eredmények alapján a hatáshely a hypothalamus és a vagus ideg dorsalis motoros magjába tehető, azonban további kísérletek szükségesek a pontos mechanizmus felderítéséhez.