

Zárójelentés

A hidrogénszulfid és a kéntartalmú gyógyvizek gyulladásgátló hatásának állatkísérletes vizsgálata bőr-, légúti, ízületi és bélgyulladás modellekben

2010-04-01 - 2013-08-31

Vezető kutató: Dr. Pintér Erika

A projekt megvalósítása során született új eredmények:

1. A hidrogén-szulfid (H₂S) TRPA1 receptorokon keresztül fokozza a szenzoros . neuronokól történő CGRP-felszabadulást, valamint a bőr mikrocirkulációját

A kapszaicin-érzékeny idegvégződéseken expresszáldó Tranziens Receptor Potenciál Ankyrin 1 (TRPA1) és Vanilloid 1 (TRPV1) ioncsatornák aktivációja több gyulladásoo neuropeptid, többek között a kalcitonin gén-rokon peptid (CGRP) kiáramlását okozzák. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a hidrogén-szulfid (H₂S) által kiváltott, szenzoros neuronokból történő CGRP felszabadulás, valamint a H₂S-indukálta mikrocirkuláció fokozódás a TRPA1 receptorok aktivációján keresztül valósul-e meg.

Az izolált patkány trachea szenzoros neuronjaiból történő CGRP-felszabadulást radioimmunoassay-el mértük. Stimuláló ágensként a mustárolajban található allilizotiocianátot (AITC) ill. a H₂S donor nátrium- hidrogén-szulfidot (NaHS) alkalmaztunk. A bőr véráramlásának mérése során Balb/c és C57BL/6, valamint TRPA1 és TRPV1 receptor génkiütött (TRPA1^{-/-}, TRPV1^{-/-}) egerek fülét AITC-tal ill. NaHS-dal kezeltük, majd laser Doppler imaging technikával vizsgáltuk. A patkány tracheákat ill. a vizsgálatban részt vevő egereket az alábbi kezelések valamelyikének vetettük alá: ultrapotens TRPV1 agonista resiniferatoxin (RTX), szelektív TRPA1 antagonistá HC-030031, TRPV1 receptor blokkoló BCTC, NK1 receptor antagonistá CP-99994, valamint CGRP1 receptor antagonistá BIBN4096.

Kísérleteink során mind az AITC, mind a NaHS dózisfüggő módon fokozta a patkány tracheából történő CGRP-felszabadulást. A TRPA1 antagonistá HC-030031 mindkét választ gátolta, ugyanakkor a TRPV1 blokkoló BCTC nem volt hatással rájuk. Az egérfülon alkalmazott AITC mellett a NaHS is fokozta a bőr mikrocirkulációját. A kapszaicin-érzékeny idegvégzödések deszenzibilizációját eredményező RTX-, ill. a HC-030031 előkezelésben részesült csoportban, ill. a TRPA1 génkiütött egerek esetében - az AITC hatásához hasonlóan - a NaHS alkalmazása után is csökkent mértékű vazodilatátor választ detektáltunk. Ezzel ellentétben, a TRPV1 genetikus hiánya nem befolyásolta sem az AITC-tal, sem a NaHS-dal kiváltott véráramlásfokozódást. Ezen kívül, a NaHS-dal kiváltott vazodilatációt mind az NK1 receptor antagonistá CP-99994, mind a CGRP1 blokkoló BIBN4096 gátolta.

Eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy a H₂S aktiválja a TRPA1 receptorokat, továbbá a TRPA1 ioncsatornák aktiválásával elősegíti a szenzoros neuronokból történő CGRP-felszabadulást, valamint a bőr mikrocirkulációjának fokozódását, míg a TRPV1 receptorok nem vesznek részt ezekben a folyamatokban. A NaHS-dal kiváltott vazodilatáció

kialakulásában a proinflammatorikus hatású neuropeptidek, pl. a CGRP és a SP is fontos szerepet játszanak. Eredményeink jól rávilágítanak arra, hogy a TRPA1 receptorok aktivációját a H₂S vazoaktív hatásainak egyik lehetséges mechanizmusaként kell tekintenünk.

A témához tartozó publikációk:

Pintér et al. Br J Clin Pharmacol. 2013

Pozsgai et al. Eur J Pharmacol. 2012

Pozsgai et al. Acta Physiologica 2011

Hajna et al. Clinical Neuroscience, 2012

Pozsgai et al. Front Neurosci. Conference 2011

2. A hidrogén-szulfid hatására felszabaduló szomatosztatin szerepet játszik a kéntartalmú gyógyvíz hatásmechanizmusában gyulladásos bőrbetegségekben

Az immun-mediálta bőrbetegségek kezelésében a balneoterápiának elismert szerepe van, habár molekuláris hatásmechanizmusát még nem tárták fel. Ezért célunk volt megvizsgálni a harkányi kéntartalmú gyógyvíz hatását dermatitisz egérmodellben valamint pszoriázisos betegek kezelésében. Célunk volt továbbá megvizsgálni, hogy a hidrogén-szulfidnak van-e szerepe a szomatosztatin neuropeptid felszabadulásában a fürdőkezelések során.

A gyulladást oxazolonnal váltottuk ki az egerek hátsó lábán. A gyulladás kialakulása után mértük az ödéma mértékét, a TNF-alfa citokin valamint a mieloperoxidáz enzim koncentrációját és vizsgáltuk a szövettani elváltozásokat. Az egerek naponta 20 percig gyógyvizes fürdőt kaptak (a kontroll csoportot desztillált vízben fürdettük). A hidrogén-szulfid szomatosztatin felszabadulásra gyakorolt hatásának megvizsgálására az egereket két hétig nátrium-hidrogén-szulfid oldatban is fürdettük. A szomatosztatin plazma koncentrációját nanoHPLC-ESI-Q-TOF-MS készülékkel határoztuk meg. A klinikai vizsgálatok során 19 beteg (PASI: 2,2-21,6) 2x25 perc gyógyvizes fürdőt kapott 21 napon keresztül. Szomatosztatin-szerű immunreaktivitást mértünk a betegek plazmájából rádióimmun assay-vel. Kezelés előtt és után bőrbiopsiákat vettünk a betegektől, melyek szövettani kiértékelésre kerültek.

Az oxazolon 29,43-33,73 %-os lábbőr duzzadást okozott az egerekben, melyet a gyógyvizes fürdetés szignifikánsan csökkentett, a mieloperoxidáz enzim, TNF-alfa citokin szintje azonban nem változott a kezelés hatására. A plazma szomatosztatin koncentrációja szignifikánsan csökkent a kezeléseik végére.

A klinikai vizsgálatok során a PASI értékek jelentősen csökkentek (0-13,4) míg a plazma szomatosztatin szintek szignifikánsan emelkedtek. A szövettani metszetek alapján a bőr Langerhans sejtjei a dermisz rétegből az epidermiszbe vándoroltak.

Vizsgálatainkból arra következtetünk, hogy a gyógyvizes kezelés hatásos a pszoriázis kezelésében, és a hidrogén-szulfid hatására felszabaduló szomatosztatinnak ebben jelentős szerepe van.

A témához tartozó publikációk:

Boros et al. Eur. J. Integrative Medicine, 2013

Kemény et al. J. Mol. Neurosci. 2012

Boros et al. J. Mol. Neurosci. 2012

Boros et al. Eur. J. Clin. Invest. 2011

3. A harkányi víz és a NaHS oldat itatása gyulladáscsökkentő hatással bír a dextrán szulfáttal indukált egér colitis modellben

Izolált bél-vizsgálatok: Patkányból és egerből gyomor fundus-hosszanti csíkokat, emberi vékony- és vastagbélből hosszanti és körkörös csík-preparátumokat vizsgáltunk in vitro, izolált szervi kísérletekben. A rágcsáló-gyomor csíkok mozgásait erőmérő, az emberi bél-darabokat elmozdulásmérő segítségével regisztráltuk. A preparátumokat acetil-kolinnal előkontraháltuk. Az NaHS (0,2-1 mmol/l) elernyedést okozott minden típusú preparátumon. Az elernyedés 1 mmol/l NaHS esetén közel maximális volt. A szer kimosása és 40 perc szünet után az NaHS hatása újból kiváltható volt, bár általában kb. 1/3-dával kisebb volt, mint az első válasz.

A kontroll, csapvízzel itatott egércsoporton a kapszaicin (1 $\mu\text{mol/l}$) 46,1 \pm 4,4 %-os elernyedést okozott a bélen. A 2 %-os DSS-sel itatott egereknél ez szignifikánsan, több mint 50%-kal csökkent. Ezzel szemben, ha 2 %-os DSS oldatot harkányi vízben oldva kapták az egerek, akkor ez a csökkenés már lényegesen kisebb volt, a harkányi vizes kontrollhoz képest (átlagosan kb. 30%). Szignifikáns különbséget kaptunk a DSS oldatot fogyasztó és a DSS oldatot+harkányi vizet fogyasztó egércsoportok kapszaicin válaszaiban. Azoknál az egereknél, amelyek egyszerre ittak NaHS+2 %-os DSS oldatot, nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kapszaicin relaxációban a csak DSS oldatot fogyasztókhoz képest. Nem észleltünk szignifikáns különbséget a csapvíz, harkányi víz és NaHS oldat itatás esetén a kapszaicin elernyesztő hatásában. A dextrán szulfát kezelés hatására az állatok klinikai állapotát jellemző pontszám a kísérlet végére jelentősen megemelkedett. Kontroll egereknél nem tapasztaltunk számottevő változást. Amennyiben a gyulladást okozó szulfatált dextránt harkányi gyógyvízben oldottuk fel, a klinikai állapot kevésbé romlott. A harkányi víz önmagában nem befolyásolta az állatok hogylétét. A harkányi víz hidrogén-szulfid tartalmát utánzó nátrium hidrogén-szulfid alkalmazása oldószerként ugyancsak szignifikánsan csökkentette a megbetegedés súlyosságát. A nátrium hidrogén-szulfid oldat önmagában nem okozott eltérést. Harkányi gyógyvíz és nátrium hidrogén-szulfid oldat alkalmazása oldószerként nem befolyásolta számottevően az állatok napi vízfogyasztását. A mieloperoxidáz enzim (MPO) aktivitása az adott szövetben akkumulálódott neutrofil granulociták számával arányos, így a gyulladás sejtes fázisának súlyosságát jól jellemzi. A 7 napig tartó dextrán-szulfát kezelés jelentős MPO aktivitás-emelkedést okozott. Amennyiben a gyulladást okozó szert harkányi gyógyvízben oldottuk fel, az enzimaktivitás csökkent, de nem szignifikánsan. Hidrogén szulfidot felszabadító nátrium hidrogén-szulfid oldat alkalmazása esetén az MPO aktivitás emelkedése szignifikánsan kisebb volt, illetve a nátrium hidrogén-szulfid oldatot fogyasztó kontrollcsoporthoz képest nem emelkedett meg jelentősen. A harkányi víz és nátrium hidrogén-szulfid oldat ivása önmagában nem okozott jelentős MPO aktivitás-emelkedést. Az egyhetes dextrán-szulfát kezelés a disztális vastagbél keresztmetszetén jól látható gyulladással elváltozásokat okozott, ami a szövettani pontszám szignifikáns emelkedésében nyilvánult meg. A harkányi gyógyvízben feloldott dextrán esetén kisebb mértékű eltéréseket tapasztaltunk, habár a hatás nem volt szignifikáns az egyszerű dextrán-szulfát oldatot fogyasztó csoporthoz viszonyítva. A harkányi vízben oldott szulfatált dextrán ugyanakkor nem váltott ki szignifikáns gyulladással eltéréseket a harkányi vizet ivó állatokhoz képest. Amennyiben az oldatot nátrium hidrogén-szulfidot tartalmazó vízzel készítettük, szignifikánsan csökkentek a gyulladással paraméterek. A harkányi gyógyvíz és

nátrium hidrogén-szulfid oldat fogyasztása önmagában nem okozott jelentős eltéréseket a szövettani képben.

***(a témához tartozó publikációk:
Kézirat megírás alatt.***

4. A TRPA1 receptor szerepet játszik a H₂S közvetítette gyulladásgátló hatásban, egér colitis modellben.

Igazolódott a transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptorok szerepe a Crohn-betegség és colitis ulcerosa állatmodelljeiben. A jelen munkában megvizsgáltuk az exogén és endogén H₂S, valamint a TRPA1 receptorok szerepét dextrán-szulfáttal (DSS) kiváltott vastagbél gyulladásban egérben, ami a colitis ulcerosa állatmodellje. A H₂S általi TRPA1 receptor aktivációnak vastagbél gyulladásban betöltött szerepére vonatkozó adatok nem találhatók a szakirodalomban.

A vastagbél gyulladást az állatok ivóvizéhez adott 2% DSS idézte elő. Az oldatot TRPA1 WT és KO egerek 7 napon keresztül fogyasztották. Egyes állatcsoportok a H₂S donor nátrium-hidrogén-szulfidot (NaHS, 100 mg/L) tartalmazó vizet fogyasztottak. Más állatcsoportokat D,L-propargil-glicinnel (PAG, 50 mg/kg, i.p. naponta) kezeltünk. A PAG az endogén H₂S-t a perifériás szövetekben termelő cisztationin- γ -liáz enzim irreverzibilis gátlószere. Az állatok klinikai állapotát naponta pontoztuk. A pontszám (disease activity index, DAI) a testsúly változását, a széklet konzisztenciáját és a széklet vértartalmát tartalmazta. A 7 napos kezelés végén az állatok disztális vastagbélből mintát vettünk. Meghatároztuk a minták myeloperoxidáz (MPO) enzimaktivitását tetrametil-benzidin módszerrel, ami az akkumulálódott neutrofil granulociták számára utal. Megmértük továbbá a minták interleukin-16 (IL-16) és szolubilis intercellular adhesion molecule 1 (sICAM-1) tartalmát ELISA módszerrel. Az IL-16 T-limfocita aktivátor, az sICAM-1 pedig a neutrofil granulociták extravazációjában szerepet játszó adhéziós molekula szolubilis változata. A vastagbél mintákat szövettani szempontból is értékeltük. Pontoztuk a gyulladós sejtek számát, a Lieberkühn-kripták hosszát, a gyulladás transzmurális és keresztmetszet szerinti kiterjedését. Eredményeink a TRPA1 receptor gyulladás gátló szerepét igazolják az állatok klinikai állapotának vonatkozásában DSS kiváltotta vastagbél gyulladásban. Az exogén H₂S TRPA1 receptortól függetlenül csökkentette a betegség klinikai súlyosságát, ugyanakkor TRPA1 receptoron keresztül gyulladás gátló hatást is kifejtett. Az endogén H₂S TRPA1 receptoron keresztül mérsékelte a modellt kísérő klinikai tüneteket. A gyulladás sejtes fázisára vonatkozó adataink az exogén és endogén H₂S bonyolult szabályozó szerepére utalnak. Az exogén és endogén H₂S-nek a neutrofil sejtek akkumulációjára és citokin szekrécióra kifejtett hatása nem befolyásolta a gyulladás klinikai megjelenését TRPA1 WT egerekben. Vizsgálatunk hozzájárulhat a H₂S és TRPA1 receptor vastagbél gyulladásban betöltött szerepének megértéséhez, valamint rámutat a H₂S hatásainak összetettségére.

A témához tartozó publikációk:

Pozsgai et al. Second European Conference on the Biology of Hydrogen Sulfide, Exeter, UK, 2013.

Pozsgai et al 11th World Congress on Inflammation: Immuno Natal, Natal, Brazil, 2013.

Kézirat: megírás alatt

5. A nem-neuronális TRPV1 és TRPA1 expressziójának változása és a TRPA1 receptor protektív szerepe dextrán-szulfát (DSS) indukálta egér colitis modellben

A tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) és a TRPV1 receptorok szerepe ismert hő- és fájdalomérzékelésben, hiperalgéziában, neurogén gyulladásban. A receptorok a szenzoros idegvégződések mellett nem neurális struktúrákon: dermális, epiteliális és nyálkahártya sejteken is megtalálható. Célkitűzéseink voltak: 1) A TRPA1 és TRPV1 receptorok expresszióváltozásának detektálása fehérje és mRNS szinten humán gyulladásos bélbetegségekben (IBD) valamint egér colitis modellben. 2) A TRPA1 receptor szerepének tanulmányozása dextrán-szulfát kiváltotta colitis modellben TRPA1 génhányos (knock-out, K.O.) egerekben.

A vastagbél biopsziás mintavétel három betegcsoportban történt: a. nem gyulladásos bélbetegség (n=5); b. vastagbél tumor (n=8); c. colitis ulcerosa vagy Crohn betegség (n=12). Nőstény egerekben (n=6, C57Bl/6, 20-25 g testtömeg, 6-8 hetes életkor) colitist váltottunk ki az állatok ivóvizébe adagolt 2% dextrán-szulfáttal (DSS). A kontrollcsoport (n=6) vizet kapott. A vastagbél disztális harmadát kimetszettük kvantitív PCR, radioimmunszé, szövettani vizsgálatok céljára.

Mind a gyulladás nélküli kontroll, mind DSS kezelt egérmintákban a TRPA1 receptorok az izomrétegben, a myentericus ganglionokon, makrofágokon lokalizálódnak az immunhisztokémiai eredményeink alapján. A nem-neuronális TRPV1 receptor egérben kimutatható az epithelréteg lumen felőli oldalán, a mirigyek kivezetőnyílásai körül és a makrofágokon. A TRPA1 mRNS szignifikánsan megnőtt mind az aktív IBD-betegekben, mind a DSS-sel kezelt egerek mintáiban a kontrollcsoportéhoz képest. Ezzel szemben a TRPV1 receptor génextpresszió csökkent mind az aktív és inaktív IBD-betegekben, mind a DSS-sel kezelt állatokban. A TRPA1 K.O. egerek súlyosabb gyulladást mutattak a betegségindex (DAI), a szövettani pontozás, az IL-1 β gyulladásos citokin, valamint a colitis tachykinin kulcsmediátorai (P-anyag, neurokinin A) és NK1 receptoruk magasabb lokális génextpressziója alapján. A PACAP (hipofízis adenilát cikláz polipeptid) génextpresszió szignifikánsan nagyobb mértékben nőtt meg a TRPA1 K.O. egerekben a DSS kezelés hatására. A vad genotípusú egerekből izolált makrofágok, ellentétben a TRPA1 K.O. makrofágokkal, Ca²⁺ beáramlással válaszoltak a receptort szelektíven izgató mustárolajra. A TRPV1 receptor mRNS expressziója csökkent mind az egérmódelben, mind a humán vastagbél biopsziás mintákban.

Vastagbél gyulladásban a TRPA1 receptor upregulálódik, a makrofágok funkcionális TRPA1-et expresszálnak. A TRPV1 génextpresszió gyulladás hatására történő csökkenése a vastagbélben a receptort kifejező epithelsejtek destrukciójával magyarázható. A TRPA1 DSS-indukálta colitisben egyértelműen protektív szerepének bizonyult.

A témához tartozó publikációk:

Kun et al. Periodicum Biologorum, Vol 115, Suppl 2, P1-60, Zagreb, September, 2013, ISSN 0031-5362.

Kun et al. 3. Congress of Croatian Physiological Society and 1. Regional Congress of the Physiological Societies, 13-15 September, 2013, Rijeka – Croatia

6.. Sebészi és kémiai denerváció nem befolyásolja a nem-neuronális TRPV1 receptor kifejeződését patkány szájnálkahártyában és lábi bőrben

A kapszaicin és ultrapotens analógja, a reziniferotoxin (RTX) a TRPV1 ioncsatornán szelektíven ható agonista. A kapszaicin, ill. a kísérleti állatok által jobban tolerált RTX szisztémásan történő ismételt vagy nagy dózisu adása a TRPV1-et kifejező szenzoros érzőidegvégződéseket deszenzitizálja, amely a terminális ideiglenes károsodáshoz, denerváláshoz vezet. Az ily módon deszenzitizált állatok káros kémiai anyagok hatására nem mutatnak védőreflexet vagy gyulladást. A kísérleti módszer alkalmas a neuronális TRPV1 fájdalomban és gyulladásban betöltött szerepének vizsgálatára, annak időleges eliminálásával. Célkitűzésünk: a kapszaicin/RTX deszenzitizáció a TRPV1 receptorokat tartalmazó extraneuronális sejt típusokat is károsítja-e? Erre a választ az érzőidegeket bizonyítottan károsító sebészi, ill. RTX kiváltotta kémiai denerválás útján kerestük, patkány lábháti és talpi bőr, valamint szájnyálkahártya qPCR és immunhisztokémiai módszerrel való vizsgálatával.

A TRPV1 receptor mRNS az előzetes várakozásaink szerint kimutatható volt qPCR-rel a lábháti és talpi bőrben, valamint a szájnyálkahártyában mind az RTX-előkezelt, mind a kezeletlen kontroll állatokban, illetve a sebészileg denervált (n. saphenus, n. ischiadicus) láb bőrében. A relatív TRPV1 mRNS expresszió nem különbözött szignifikánsan a denervált és kontroll állatok azonos típusú mintái között. Erős pozitív TRPV1 protein immunfestést tapasztaltunk a lábi bőrsejtek keratinocitákon, a talpbőr kapilláris endothel sejteken, a dorzális bőrben sebocitákon is. Szájnyálkahártyában egyértelmű TRPV1 immunopozitivitást találtunk keratinocitákon, valamint a kötőszövetben fibroblastokon, limfocitákon és érendothel sejteken. A TRPV1 immunfestődés intenzitása (szemikvantitatív értékelés) nem mutatott különbséget egyik szövettípusban sem kémiai/sebészi denerválás hatására.

Elsőként mutattuk ki patkány talpi és lábháti bőrben, továbbá szájnyálkahártyában a TRPV1 receptor mRNS és fehérjeszintű jelenlétét. Keratinocitákon végzett *in vitro* vizsgálatok irodalmi adatai alapján feltételezésünk, hogy a nem-neuronális TRPV1 receptorok és az azokat tartalmazó sejtek épek maradnak szisztémás RTX előkezelés után, beigazolódott. Ezáltal továbbra is érvényesnek tekinthetjük az axiómát, amely szerint a szisztémás RTX kezelés kizárólagosan a neuronális TRPV1 receptorokra szelektív. Ezzel a farmakológiai eszközzel *in vivo* gyulladás- és fájdalommodellekben vizsgálható 1) a neurális TRPV1 funkció hiánya; 2) az intakt nem-neurális TRPV1 működése.

A témához tartozó publikációk:

Kun et al. J. Mol. Neurosci. 2012,

Szolcsányi et Pintér Expert Opinion 2013

7. A nem-neuronális TRPV1 és TRPA1 receptorok jelenléte krónikus rhinosinuszitisben

A tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1)-más néven kapszaicin receptor ingerlésével gyulladós és kevésbé ismert gyulladásgátló folyamatok indulnak a szervezetben. Jelenléte a perifériás és központi idegrendszerben már régóta ismert, és sokáig feltételezték, hogy a receptor neuronális expressziója kizárólagos. A közelmúltban tisztázatlan funkciójú TRPV1 receptorokat azonosítottak nem-neurális sejteken, így különböző immun- és gyulladós sejteken, továbbá kimutatták epitheliális sejteken és nasalis mucosában is. Nem-neurális tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1) receptort nyálkahártya sejtek

expresszálnak, melynek aktivációjával proinflammatorikus mediátorok szabadulnak föl. A receptort számos exogén és endogén ágens aktiválja, pl. a dohányfüst.

Célkitűzésünk a TRPV1 és TRPA1 receptorfehérjék és azok nem-neurális mRNS expressziójának jelenlétének és változásának vizsgálata volt krónikus rhinosinusitisben.

Rhinosinusitises orrpólipos (n=33) and nem-pólipos (n=6), valamint ép kontroll (n=4) mintáink rutinműtétekből származtak. Az immunhisztokémiai jelölés paraffinba ágyazott metszeteken, poliklonális nyúl TRPV1 és TRPA1 antitestekkel történt. A valós-idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) kivitelezése Roche Light Cyclor készüléken TaqMan primerekkel és próbákkal történt.

Az immunhisztokémiai bizonyítékaink szerint a TRPV1 és TRPA1 receptorok kifejeződnek rhinosinusitises betegek biopsziás mintáiban. Hízósejteken erős specifikus TRPV1 immunpozitivitás volt megfigyelhető. TRPA1 antitesttel epitheliális és glanduláris sejtek festődtek. Ezen extraneurális receptorok lokális mRNS expressziója is bizonyítást nyert. A komorbid asztma és allergiás rhinitis növelte a TRPV1 receptor génextpresszióját az orrpólipózisos betegekben az azokkal nem rendelkezőkhöz képest. Ezen komorbid állapotok nélküli pólipópus gyulladásban viszont nem változott a TRPV1 és a TRPA1 mRNS szintje az ép orrnyálkahártyához képest.

Eredményeink alapján önmagában a rhinosinusitis általunk vizsgált altípusa, a pólipópus egyedüli faktorként nem befolyásolta a TRPV1 génextpresszióját a kontroll csoporthoz képest, így annak patomechanizmusában nem feltételezzük a nem neurális TRPV1 szerepét. Mindez nem zárja ki a neurális TRPV1 esetleges szerepét. A komorbid állapotokban ugyanakkor közreműködhet a hízósejteken kimutatott TRPV1.

A témához tartozó publikációk:

Kun et al. ACTA PHYSIOLOGICA 202:(S683) pp. 64-65. (2011)

Tóth et al. Magyar Fül-, Orr-, Gége és Fej-, Nyaksebész Orvosok Egyesülete 42. Kongresszusa, Pécs, 2012. okt. 17-20.

Közlemény megírás alatt

8. A karbonil-szulfid tartalmú harkányi gyógyvíz csökkenti a gyulladós sejtek akkumulációját az endotoxinnal kiváltott szubakut légúti gyulladás egérmódelijében

A carbachol inhalációra bekövetkező bronchiális hiperreaktivitás jelentősen emelkedett a desztillált vízzel fürdetett csoportban az LPS instilláció hatására, 24 órával a gyulladás kiváltása után. A harkányi gyógyvízzel történő fürdetés nem befolyásolta a gyulladós légúti hiperreaktivitást. A desztillált vízzel fürdetett kontroll egerek BAL mintái 2307,976±617,18 limfocitát, 823,0317±236,18 granulocitát és 1951,05±418,31 makrofágot tartalmaztak 24 órával az LPS kezelés után. A harkányi gyógyvízes előkezelés szignifikáns mértékben csökkentette e gyulladós sejtek számát.

A témához tartozó publikációk:

Markovics et al. 6th European Congress of Pharmacology, Granada, Spanyolország, 2012

Még nem publikált eredmények

A harkányi gyógyvíz hatása akut és krónikus ízületi gyulladás valamint oszteoarthritisz egérmódeljeiben

Bevezetés

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a harkányi gyógyvizes fürdőkezelés hatását kaolin-carrageenan keverékével kiváltott lokális, kevert típusú, neurogén és nem-neurogén komponensekből álló akut, komplett Freund-adjuvánszal (CFA) indukált krónikus ízületi gyulladásban, amely az autoimmun hátterű reumatoid arthritisz elfogadott állatkísérletes modellje, illetve a monojó-d-acetát (MIA) adásával indukált oszteoarthritisz modellben, amely betegség patomechanizmusában elsősorban degeneratív folyamatok játszanak szerepet.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

Kísérleteinkben 20-25 g-os, vegyes nemű CD1 és BALB/c egereket alkalmaztunk, amelyeket a Pécsi Tudományegyetem Központi Állatházában tenyésztettünk és tartottunk 24-25°C-on, normál étellemmel és vízzel *ad libitum* ellátva.

Kezelés

Modelljeinkben az egerek két csoportját a kísérletek ideje alatt 37°C-os harkányi gyógyvízben, a kontroll csoportot 37°C-os desztillált vízben fürdettük naponta 20 percig. A víz állandó hőmérsékleten tartását egy vízforgatóval ellátott termosztát segítségével valósítottuk meg.

Kísérleti modellek, mérési módszerek

1. Kaolin és carrageenin indukálta akut ízületi gyulladás modell

Az akut ízületi gyulladást 2%-os kaolin és 4%-os carrageenin keverékével váltottuk ki, melyből 50 µl-t injektáltunk az egerek bal térdébe. Az egerek a gyulladás kiváltása előtti két napon és az injekció napján kaptak fürdőkezelést. Szoktató és kontroll méréseinket az injekció beadása előtti héten végeztük, a gyulladás következtében kialakult változásokat az injekció adása után 2, 4 és 6 órával mértük. A térdátmérő változását mikrométerrel, a hiperalgéria mértékét dinamikus plantáris eszteziométerrel, a lábterhelés változását „incapacitance testerrel” határoztuk meg. A kapott értékeket a hátsó végtagok súlyeloszlásának mérését kivéve a kaolin-carrageenin adás előtti értékek százalékában adtuk meg. A szívpunkciót követő feldolgozás során kimetszett mintákat az ízületi citokinkoncentrációk meghatározására használtuk fel.

2. Freund adjuvánssal kiváltott krónikus ízületi gyulladás modell

A komplett Freund adjuváns (CFA) hővel előlt *Mycobacterium tuberculosis* (1 mg/ml) paraffinolajos szuszpenziója, amelynek 50-50 µl-ét faroktőbe valamint az egyik talpba szubkután injektálva a tibiotarzális ízület gyulladását váltottuk ki. A szisztémás hatás fokozása érdekében a faroktőbe történő CFA-adást a következő napon megismételtük, ezt a napot tekintjük a kísérlet első napjának. Az adjuváns alkalmazásának helyén a sajtos granulóma képződésért a makrofágok fokozott mértékű antigén-feldolgozása felelős, a krónikus poliartritisz kialakulásában CD4+ T sejt klónok aktiválódása játszik szerepet.

A gyulladás következtében kialakult ödémát pletizmométerrel, a mechanonoczeptív küszöb csökkenését (hiperalgéria) dinamikus plantáris eszteziométerrel mértük 3 héten át. A kapott értékeket minden esetben a CFA adás előtti értékek százalékában adtuk meg. Szoktató és kontrollméréseinket az injekció beadása előtti héten végeztük, majd a CFA hatására bekövetkező funkcionális változásokat az injekció után a kísérlet 2., 3., 6., 8., 10., 13., 15., 17. és 20. napján határoztuk meg. Az állatok fürdetését az első CFA adást megelőző napon kezdtük és a kísérlet végéig alkalmaztuk.

A 21. napon altatásban (ketamin: 100 mg/kg és xylazin: 5 mg/kg i.p.) elvégzett szívpunkció után a tibiotarzális ízületeket kimetszettük. A preparátumok felét a szövettani vizsgálatig 4%-os paraformaldehidben, a másik felét -80°C-on tároltuk, majd ezekből homogenizálás után ELISA módszerrel gyulladáscitokinek (IL-1 β , TNF- α) mennyiségét határoztuk meg.

3. Monojód-acetát indukálta oszteoartritisz modell

Modellünkben a gyulladást térdízületbe adott 20 µl, 25mg/ml monojód-acetát (MIA) oldattal váltottuk ki, amely a porc metabolizmusát befolyásolja elsősorban a glikolízis és a

proteoglikánok termelésének gátlásával. A kóros folyamatokért továbbá a reaktív oxigéngyököket, valamint a TNF- α -t és az IL-1 β -t tartják felelősnek, amelyek a mátrix metalloproteáz (MMP) stimulációja révén fejtik ki porckárosító hatásukat.

A térdátmérő változását mikrométerrel, a hiperalgécia mértékét dinamikus plantáris eszteziométerrel, a lábterhelés változását „incapacitance testerrel” határoztuk meg. A kapott értékeket a hátsó végtagok súlyeloszlásának mérését kivéve a MIA adás előtti értékek százalékában adtuk meg. Szoktató és kontroll méréseinket az injekció beadása előtti héten végeztük, majd a MIA hatását a különböző funkcionális paraméterekre az injekció után a kísérlet 2., 3., 4., 7., 9., 11., 15., és 21. napján határoztuk meg. A térdátmérőt ezen kívül MIA adás után 3, 6 és 12 órával is mértük. A 22. napon altatásban (ketamin: 100 mg/kg és xylazin: 5 mg/kg i.p.) elvégzett szívpunkció után a térdízületeket kimetszettük. A preparátumokat a szövettani vizsgálatig 4%-os paraformaldehidben tároltuk.

Szövettani vizsgálatok

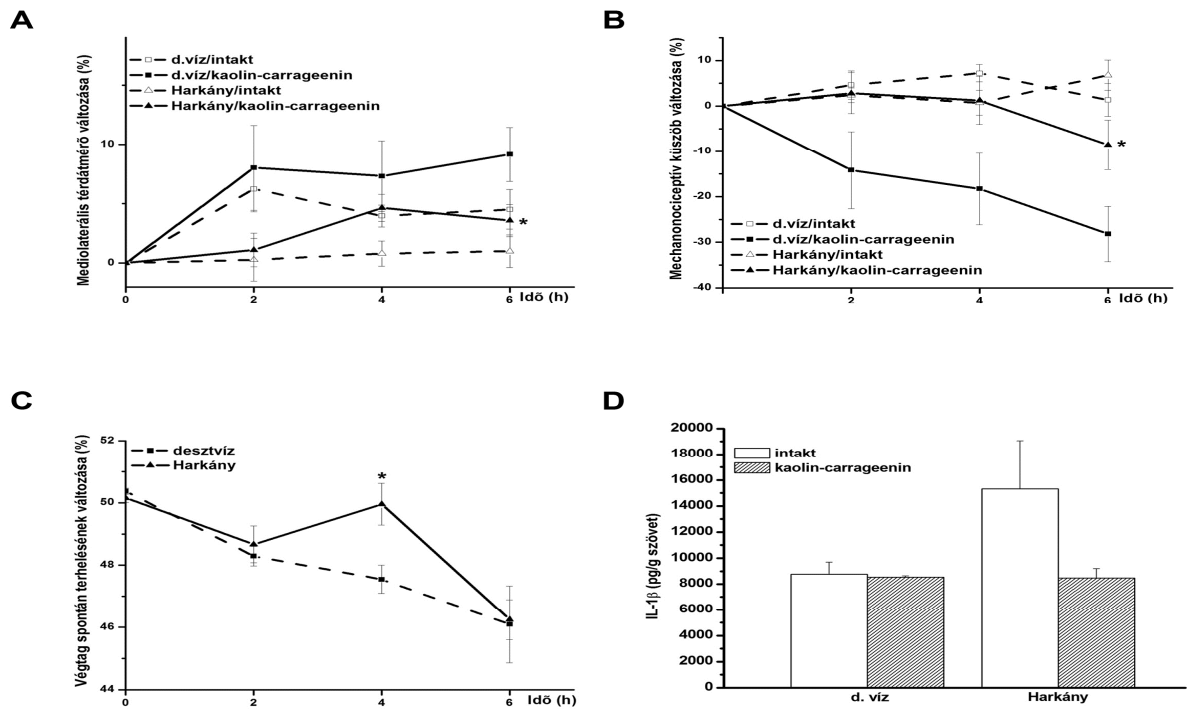
Az eltávolított ízületeket 4%-os paraformaldehidben fixáltuk, majd alumínium-kloridot, hangyasavat és sósavat tartalmazó EDTA oldatban dekalcináltuk (Helyes és mtsai, 2004). Paraffinos beágyazás után 6 μ m vastag, hematoxilinnal és eozinnal (HE)-festett metszeteket készítettünk és fénymikroszkópos hisztopatológiai vizsgálatot végeztünk. Vizsgálataink során az ödéma, a leukocita-infiltráció, a porc- és csontkárosodás, valamint a szinoviális sejtréteg megvastagodásának mértékét tartottuk szem előtt CFA-val kiváltott krónikus ízületi gyulladás modellünkben. A szöveti károsodást az oszteoarthritisz modellben a metszetek szövettani pontozásával ítéltük meg az erózió és a nekrozis kiterjedtségére, illetve a porcréteg és a szinóvium elváltozásaira fókuszálva.

Eredmények

1. Akut ízületi gyulladás modell

Kaolin-carrageenin hatására a térdátmérő 7-9%-os növekedése következett be a kontroll csoportban. A duzzadás mértékét a gyógyfürdő csökkentette, de a különbség csak a 6 órás mérésnél volt szignifikáns (1A ábra). A desztillált vízben fürdetett csoportban 14-28%-os mechanonociceptív küszöbcsökkenés alakult ki. A harkányi gyógyvizet csoportban a kísérlet teljes ideje alatt kisebb mértékű hiperalgécziát tapasztaltunk, de ez a különbség is csak a 6 órás mérésben bizonyult szignifikánsnak (1B ábra). A végtag spontán terhelésének változása 4

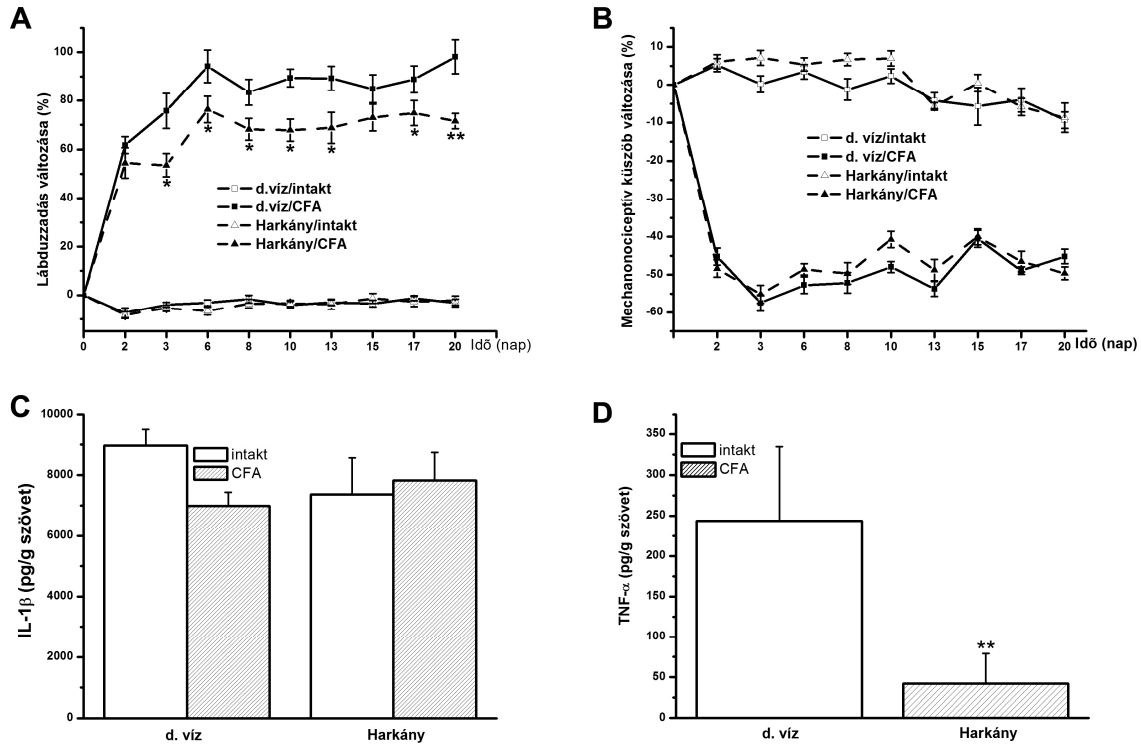
órás mérésben volt szignifikáns (1C ábra). A szövettani minták IL-1 β koncentrációjának esetén nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni az egyes csoportok között (1D ábra).



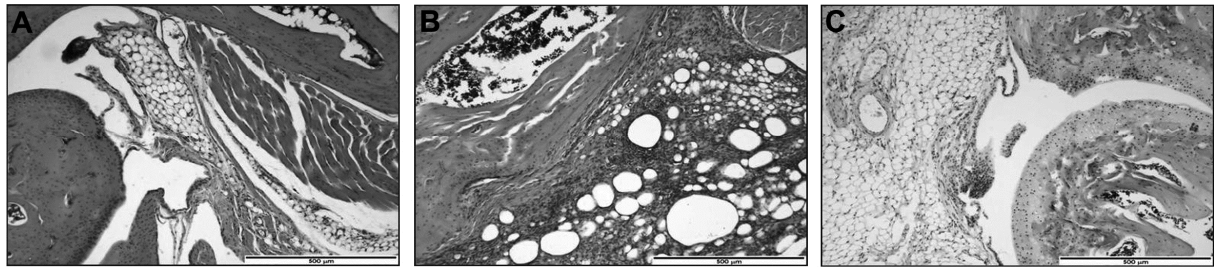
1. ábra A harkányi gyógyvíz hatása kaolin-carrageenin keverékével kiváltott A: lábduzzadásra (* $p < 0.05$ vs. d.víz/kaolin-carrageenin, páratlan t próba, $n = 7-9$ /csop.), B: mechanikai hiperalgéziára (* $p < 0.05$ vs. d.víz/kaolin-carrageenin, páratlan t próba, $n = 7-9$ /csop.), C: végtag spontán terhelésének változására (* $p < 0.05$ vs. d.víz/kaolin-carrageenin, nem parametrikus t próba, Mann-Whitney poszt teszt, $n = 7-9$ /csop.) és D: IL-1 β ízületi koncentrációjának változására ($n = 3$ /csop.)

2. Krónikus ízületi gyulladás modell

A CFA 61-94 %-os lábduzzadást okozott a kontroll csoportban. Az ödéma mértékét a 3. naptól a harkányi gyógyvíz szignifikánsan csökkentette és ez fennmaradt a kísérlet teljes ideje alatt (2A ábra). A gyulladásos mechanikai hiperalgéziát, amely a desztillált vízben fürdetett csoportban a 3. napon elérte az 57%-ot, a kén tartalmú fürdő nem befolyásolta szignifikánsan (2B ábra). A szöveti IL-1 β koncentrációban nem volt szignifikáns különbség a csoportok között (2C ábra), azonban a TNF- α mennyiségét, amely a CFA hatására jelentősen megnövekedett, a gyógyvízes fürdetés szignifikánsan csökkentette (2D ábra). A szövettani metszeteken megfigyelhető a CFA hatására elvékonyodott porcréteg, csontterozió, a szinoviális sejtréteg megvastagodása, a szinoviális kötőszövet ödémája és gyulladásos sejtekkel való infiltráltsága. Ehhez képest a gyógyvíz hatására enyhébb szinoviális ödéma és csökkent mértékű gyulladásos sejtes beszűrődés figyelhető meg (3. ábra).



2. ábra A harkányi gyógyvíz hatása CFA-val kiváltott A: lábduzzadásra (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. d.víz/CFA, two-way ANOVA+ Dunnett poszt teszt, $n=10$ /csop.), B: mechanikai hiperalgéziára (two-way ANOVA+ Dunnett poszt teszt, $n=10$ /csop.), C: IL-1 β és D: TNF- α ízületi koncentrációjának változására (** $p < 0.01$ vs. d.víz/CFA Mann-Whitney U-teszt, $n=5$)

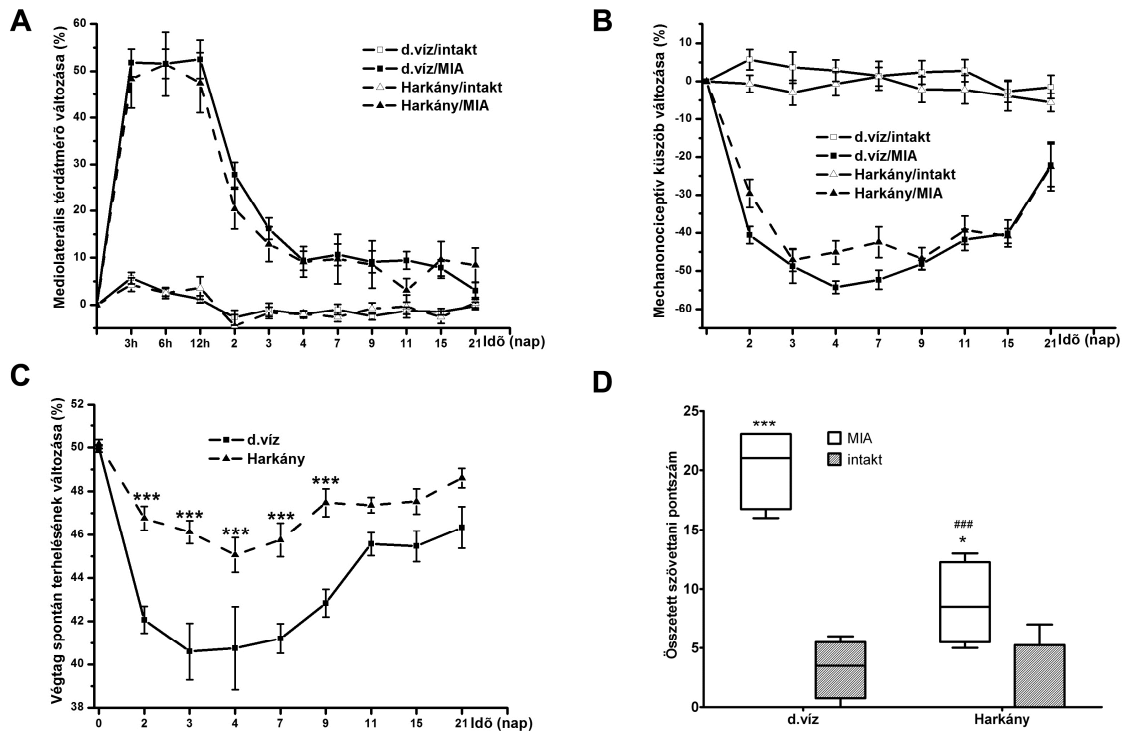


3. ábra CFA injekció után 22 nappal levett A: ép, B: desztillált vízben fürdetett gyulladt, C: harkányi gyógyvízzel kezelt tibiotarzáris ízület szövettani képe (hematoxin-eozin, 100x)

3. Oszteoarthritisz modell

A MIA injekció után kialakult ízületi duzzadás az első kísérleti napon érte el a maximumát, 51-52%-ot, amely a következő napokban lecsökkent és a 21. napra megszűnt. A térdátmérváltozásra a fürdőkezelés nem gyakorolt szignifikáns hatást (4A ábra). A desztillált vízzel kezelt csoportban a MIA injekció a mechanonociceptív küszöb 40-54 %-os csökkenését okozta. Ezt a harkányi gyógyvíz nem befolyásolta szignifikánsan (4B ábra). Azonban ebben a modellünkben a gyulladt láb jelentősen kisebb mértékű terheléscsökkenését (4C ábra)

figyelhettük meg a kéntartalmú fürdő hatására. A szövettani metszetek szemikvantitatív értékeléséből kiderül, hogy a kialakult ízületi károsodás enyhébb mértékű a gyógyvízzel kezelt csoportban a kontrollhoz képest. A harkányi gyógyvíz hatására elsősorban a porcréteg rendezetlensége, valamint a szinoviális hiperplázia és gyulladás kisebb mértéke miatt, az értékeléskor kapott összetett hisztopatológiai pontszám szignifikáns csökkenése volt tapasztalható (4D ábra).



4. ábra A harkányi gyógyvíz hatása oszteoarthritisz modellben A: a mediolaterális térdátmérő változására (two-way ANOVA+Bonferroni-féle poszt teszt, n=12-13/cso.), B: a mechanikai hiperalgéziára (two-way ANOVA+Bonferroni-féle poszt teszt, n=12-13/cso.), C: a végtag spontán terhelésének változására (*p<0.05; ***p<0.001 vs. d.viz/CFA, Two-way ANOVA+Bonferroni-féle poszt teszt, n=12-13/cso.). D: A térdízület szemikvantitatív szövettani értékelése (*p<0.05; ***p<0.001 vs. d.viz/CFA, ANOVA+Bonferroni-féle poszt teszt, n=4/cso.)

Megbeszélés

Igazoltuk, hogy a gyógyvízben való fürdetés krónikus adjuváns-arthritiszben csökkenti a duzzadást és a limfocita-akkumulációt, valamint a TNF- α termelését. A H₂S gyulladásozó folyamatokban betöltött szerepére vonatkozóan az irodalmi adatok meglehetősen ellentmondásosak, valószínűleg a dózistól, a donor vegyületek beadásának módjától, a szövettől és az adott folyamat pathomechanizmusától függ a tapasztalt gátló vagy éppen

gyulladás-keltő hatás. Carrageeninnel kiváltott lábödéma esetében például egyes közlemények a H₂S donor NaHS adását követően tapasztaltak duzzadásgátlást, míg mások ugyanezt a hatást a szintézisgátló PAG premedikációval érték el.

Feltételezzük, hogy a H₂S gyulladáscsökkentő (ödémát és szöveti károsodást gátló) és az oszteoarthritisz modellben tapasztalt analgetikus hatása a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződéseken található TRPV1 és TRPA1 receptorhoz köthető. Az utóbbi évek kutatásai számos bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a H₂S aktiválja ezeket az ioncsatornákat.

Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján elképzelhető, hogy a H₂S tónusos stimuláló hatásának következtében a kapszaicin-érzékeny peptiderg afferensekből gátló hatású mediátorok, elsősorban szomatosztatin, szabadul fel, amely a szisztémás keringésen keresztül gátolja a gyulladást és a nocicepciót. Ennek a teóriának az igazolására meghatároztuk a plazma szomatosztatin (SOM) koncentrációját két hetes, a harkányi gyógyvízzel azonos kéntartalmú (12 mg/l) NaHS-oldatos fürdetést követően egerekben, valamint vizsgáltuk a kapszaicin-érzékeny idegvégződéseken megtalálható TRPA1 receptor szerepét monojódomacetát(MIA)-indukálta oszteoarthritisz modellben TRPA1 receptorgén-hiányos egerek felhasználásával.

TRPA1 receptor szerepe MIA-indukálta oszteoarthritisz modellben

Bevezetés

Kísérleteink igazolták, hogy krónikus oszteoarthritisz modellben, ahol elsődlegesen degeneratív folyamatok dominálnak a pathomechanizmusban, a spontán fájdalom megítélésére alkalmas nehézkedés-csökkenést a harkányi víz szignifikánsan gátolta, továbbá jelentősen csökkentette a szövettani elváltozások súlyosságát. Feltételezzük, hogy a hidrogén-szulfid (H₂S) oszteoarthritisz modellben tapasztalt szöveti károsodást gátló és analgetikus hatása a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegvégződéseken található TRPV1 és TRPA1 receptorhoz köthető. Az utóbbi évek kutatásai számos bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a H₂S aktiválja ezeket az ioncsatornákat és az afferensekből gátló hatású mediátorok, elsősorban szomatosztatin felszabadulását idézi elő. A szomatosztatin a szisztémás keringésen keresztül gátolja a gyulladást és a nocicepciót. Jelen kísérletben TRPA1 receptorgén-hiányos egerek felhasználásával vizsgáltuk, hogy a kapszaicin-érzékeny idegvégződéseken megtalálható TRPA1 receptor milyen szerepet játszik a monojódomacetát(MIA)-indukálta oszteoarthritisz modellben.

Anyagok és módszerek

Kísérleti állatok

Kísérleteinkben nőstény TRPA1 receptorgén-hiányos (KO; n=15) és a receptorral rendelkező vad (W; n=10) egereket alkalmaztunk, amelyeket a Pécsi Tudományegyetem Központi Állatházában tenyésztettünk és tartottunk 24-25°C-on, normál étellel és vízzel *ad libitum* ellátva.

Oszteoarthritisz kiváltása monojó-d-acetát-oldattal

Modellünkben a gyulladást térdízületbe adott 20 µl, 25mg/ml monojó-d-acetát oldattal váltottuk ki, amely a porc metabolizmusát befolyásolja elsősorban a glikolízis és a proteoglikánok termelésének gátlásával. A kóros folyamatokért továbbá a reaktív oxigénradikálokat, valamint a TNF- α -t és az IL-1 β -t tartják felelősnek, amelyek a mátrix metalloproteáz (MMP) stimulációja révén fejtik ki porckárosító hatásukat.

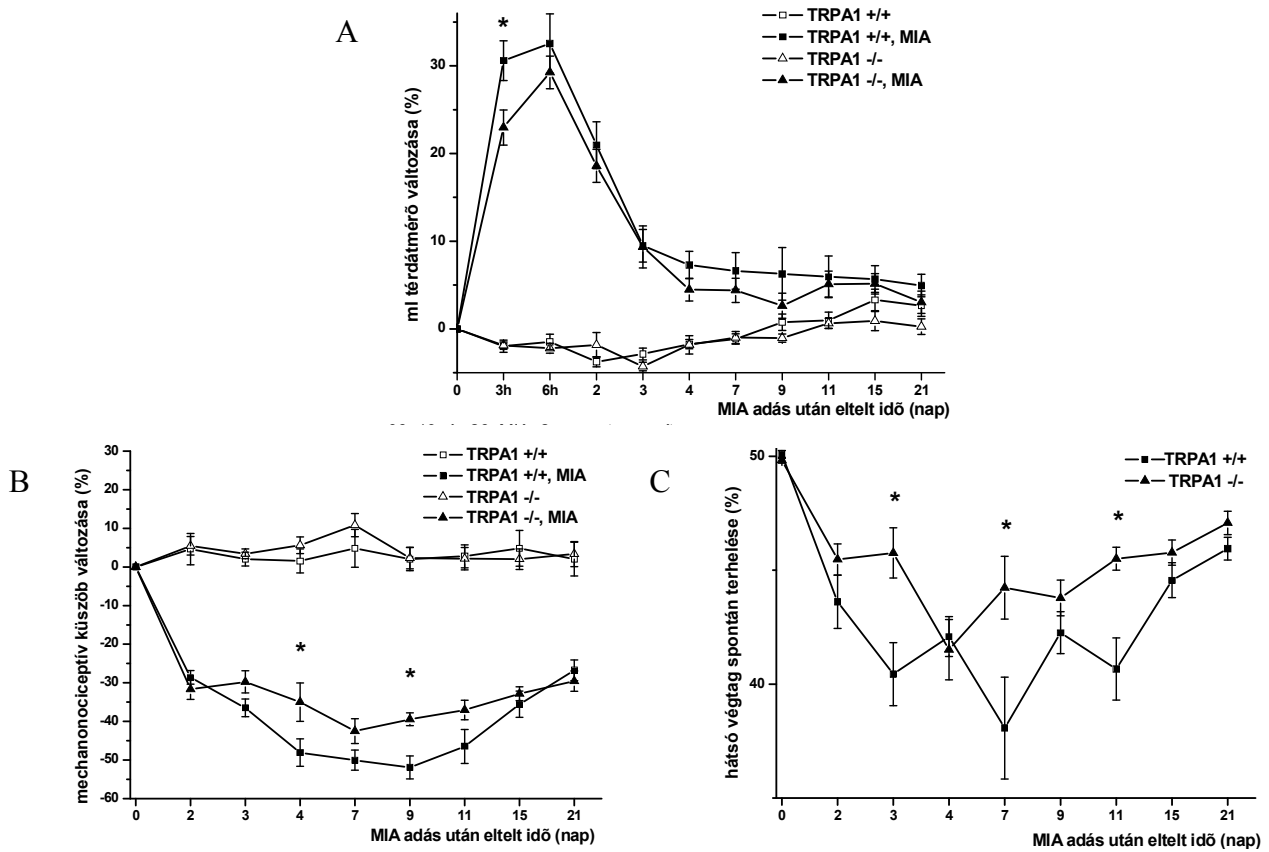
Vizsgált paraméterek, vizsgálati módszerek

A térdátmérő változását mikrométerrel, a hiperalgészia mértékét dinamikus plantáris eszteziométerrel, a lábterhelés változását incapacitance testerrel határoztuk meg. A kapott értékeket a hátsó végtagok súlyeloszlásának mérését kivéve a MIA adás előtti értékek százalékában adtuk meg. Szoktató és kontroll méréseinket az injekció beadása előtti héten végeztük, majd a MIA hatását a különböző funkcionális paraméterekre az injekció után a kísérlet 2., 3., 4., 7., 9., 11., 15., és 21. napján határoztuk meg. A térdátmérőt ezen kívül MIA adás után 3 és 6 órával is mértük. A 22. napon az állatokat altatásban (ketamin: 100 mg/kg és xylazin: 5 mg/kg i.p.) elvégeztettük, a térdízületeket kimetszettük. A minták egy részét 4%-os paraformaldehidben tároltuk a morfológiai elváltozások detektálására tervezett komputertomográfiás és szövettani vizsgálatok kivitelezéséig; másik részét pedig -80 °C-on, citokinpanel segítségével történő citokinprofil meghatározása miatt. Ezeket a vizsgálatokat a közeljövőben tervezzük megvalósítani.

Eredmények

A mediolaterális (ml) irányban mért térdátmérő az első kísérleti napon, a MIA injekció után 6 órával érte el a maximumát, 29.26±1.86%-ot a TRPA1 KO és 32.54±3.38%-ot a W állatoknál. A duzzadás már a 2. naptól jelentősen csökkent. A MIA injekció után 3 órával mért térdátmérő volt szignifikánsan alacsonyabb a KO állatokban (5A ábra). A MIA injekció a W csoportban a mechanonociceptív küszöb 26.8±2.7-51.9±2.9%-os, a KO állatoknál 29.6±2.6-

42.5±3.2%-os csökkenését okozta. Bár a KO csoportban a 3-11. napig kisebb volt a küszöbcsökkenés, ez csak a 4. és a 9. napon bizonyult szignifikánsnak (5B ábra). Modellünkben a gyulladt láb jelentősen kisebb mértékű terheléscsökkenését (5C ábra) figyelhettük meg a 3., 7. és 11. napon a KO csoportban.



5. ábra A TRPA1 receptor szerepe oszteoarthritisz modellben A: a mediolaterális térdtérő változásában, B: a mechanikai hiperalgészia esetén, C: a végtag spontán terhelésének változásában (* $p < 0.05$ TRPA1 KO, MIA vs. TRPA1 W, MIA; two-way ANOVA+Bonferroni-féle poszt teszt, $n=10-15$ /csop.).

