

A Crohn-betegség néhány klinikai, farmakológiai és immunológiai aspektusa

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Simon Higin

Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Gyógyszertudományi Doktori Iskola

Iskolavezető:	Prof. Dr. Barthó Loránd (előző) Prof. Dr. Pintér Erika (jelenlegi)
Programvezető:	Prof. Dr. Fischer Emil (előző) Prof. Dr. Botz Lajos (jelenlegi)
Témavezető:	Prof. Dr. Fischer Emil

Pécs

2016

1. Bevezetés

A terminális ileum gyulladós betegségét egy 34 éves férfiben postmortem Morgagni már leírta és ez a "De Sedibus et Causis Morborum" könyvében 1765-ben jelent meg. Az elváltozást többen is közölték, de igazából Crohn, Ginzburg és Oppenheimer 1932-ben megjelent közleménye óta ismert ez a gyulladós bélbetegség, amit Crohn-betegségnek nevezünk (CD).

Mai ismereteink szerint a gyulladós bélbetegség egy összetett etiológiájú kórkép, melyben genetikai, környezeti, mikrobiológiai és immunológiai tényezők játszanak szerepet, illetve azok speciális interakciója áll fenn. A családi halmozódás, rassz és etnikai különbségek, valamint az ezekkel összefüggő genetikai tényezők fontos szerepet játszanak a gyulladós bélbetegségek kialakulásában. Klinikailag két formája ismert, ezek a colitisz ulceróza (Ulcerativ Colitisz-UC) és a Crohn-betegség (CD). A Crohn-betegség a klasszikus terminális ileum megjelenési formán kívül az emésztőtraktus bármely pontján megjelenhet. Az érintett emésztőcsatorna szakaszokon változó intenzitású gyulladós folyamat zajlik, a moderált inflammáció és az enterális traktus minden rétegét érintő destruktív gyulladás váltakozása észlelhető a Crohn-betegségben.

A Crohn-betegség leggyakoribb fiatal felnőtt korban, de bármely életkorban előfordulhat, a legmagasabb incidenciát az Izraeli zsidó közösségekben figyelhető meg. A városokban élőkben magasabb az incidenciát, ami az urbanizációval függhet össze. A betegségben lassan csökken a mortalitás, de a várható életkilátások rosszabbak, mint az átlag lakosságban, ez elsősorban a súlyos szövődeményekkel magyarázható.

A betegséggel kapcsolatos genetikai ismeretek az utóbbi évtizedben sokat fejlődtek, ezek jelentősége rendkívül hangsúlyos lett. A betegségre való hajlamot hordozó gének kimutatása áttörést jelentett az etiopatogenezis kutatásában, a hajlam az esetek egy részében genetikusan meghatározott, az öröklés poligénes. Számos adat igazolja, hogy a betegség kialakulása a normális mukózális immuntolerancia hiányának a következménye. A megfelelő tolerancia hiányában a szokásos lumenális flóra aktív, nem regulált immunválaszt indukál. A tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) a szisztémás gyulladós válasz szabályozásban központi szerepet játszik.

Mivel a Crohn-betegség etiológiája nem ismert, így a terápiája sem megoldott. A kezelésben az utóbbi időben jelentős változások történtek, ilyen például a TNF- α ellenes antitest terápia (biológiai terápia) bevezetése. A kezelésben leggyakrabban használt gyógyszerek a Sulfasalazin, a Kortikoszteroidok, az Azatioprin, az Infliximab, az Adalimumab és a Vedulizumab.

2. Célkitűzés

Az értekezés alapvető célkitűzése a Crohn-betegség néhány klinikai aspektusának a vizsgálata volt, továbbá egy olyan állatkísérletes modell létrehozása, amelynek a segítségével morfológiai, funkcionális/farmakológiai és immunológiai változások is tanulmányozhatók. A bél gyulladós folyamatának a kísérleti állatokon történő létrehozása lényegében a Crohn-betegség modelljéül szolgálhat, így módon annak a befolyásolása és a tünetek létrejöttének, illetve a súlyosságának a kivédése, vagy csökkentése nagy jelentőséggel bírhat mind klinikai, mind elméleti szempontból. Mindezek figyelembevételével az értekezés célkitűzései az alábbiakban foglalhatók össze:

1. – A Crohn-betegség klinikai aspektusainak vizsgálata különös tekintettel a gyógyszeres terápiával kapcsolatos rezisztencia kialakulására és a vaszkuláris faktorok változására.
2. – A Crohn-betegség modelljeként patkány vékonybélben gyulladás létrehozása indometacinnal, a változások morfológiai és funkcionális/farmakológiai elemzése.
3. – A vékonybél eliminációs tevékenységének a vizsgálata indometacin előkezelés hatására, valamint a változások befolyásolhatóságának, illetve kivédésének a tanulmányozása.
4. – A máj epetermelő funkciójának és az eliminációs működésének a vizsgálata indometacin előkezelést követően, illetve a változásokkal kapcsolatos védőhatások elemzése.
5. – Immunológiai vizsgálatok: Az LPS-el és a PMA-val stimulált TNF- α szintek mérése, az indometacinnal indukált változások befolyásolhatóságának a vizsgálata.

3. Vizsgálati módszerek

3.1 Klinikai vizsgálatok

3.1.1. A multidrug rezisztencia vizsgálata.

A multidrug rezisztencia vizsgálatok 30 Crohn-betegen történtek. A betegek inaktív stádiumban voltak és a Mesalazin fenntartó terápiában részesültek. A szteroid rezisztenciát élősejteken P-glycoprotein (MDR fehérje expresszió) és funkcionális MDR teszt (Calcein-Verapamil teszt) segítségével határoztuk meg.

3.1.2. A vaszkuláris faktorok vizsgálata.

Az inaktív stádiumban lévő és Mesalazin terápiában részesülő betegek könyökvénájából nyert vérből történtek a trombocitákkal kapcsolatos vizsgálatok. Az érfal károsodás megítélésére a vWFAg meghatározást alkalmaztuk. A szolubilis vaszkuláris faktorok (IL-6, IL-8, CD-40, tPA, MCP-1, P-szelektin, sVCAM-1) meghatározása az irodalomban leírt módszerekkel történt.

3.2. Farmakológiai és farmakokinetikai vizsgálatok.

3.2.1. Állatkísérletek

A vizsgálatokat 220-250 g-os hím Wistar patkányokon végeztük. A kísérletek előtt az állatok 24 órán át éheztek, de vizet szabadon fogyaszthattak. Az állatokat uretánnal (1,2 g/kg i.p.) narkotizáltuk. A hasfalat a középvonalban hosszanti irányú metszéssel felnyitottuk és a vékonybél középső szegmentumát kb. 10 cm hosszban kanüláltuk in vivo. A béllument átöblítettük meleg (37 °C) izotóniás oldattal a bélben lévő táplálék maradványok eltávolítása céljából, majd 4-5 ml levegő átfűvésével üressé tettük. A béllument ezt követően az izolált szegmentum mindkét végébe helyezett kanül, illetve a hozzájuk csatlakozó műanyagcső segítségével 13 ml/perc sebességű izotóniás médiummal perfundáltuk recirkulációs módszerrel, az oldat meghatározott koncentrációjú (általában 500 μ M) PNP-t (p-nitrofenol) tartalmazott. Azért választottuk az 500 μ M-os koncentrációt, mert ilyen kísérleti körülmények között tudtuk megbízhatóan analizálni és összehasonítani a PNP metabolitjainak (PNP-glukuronid: PNP-G;

PNP- szulfát: PNP-S) az intesztinális és biliáris exkrécióját. Az izolált bélszakasz disztális végébe helyezett kanülön keresztül kifolyó oldatot egy rezervoárba vezettük, amelyből egy perfúziós pumpa segítségével azt folyamatosan juttattuk vissza a béllumenbe. A kezdeti perfúziós volumen 15,0 ml volt, a perfúzió 90 percig tartott.

A kanülált szegmentumból kifolyó perfúziós folyadékból 250 µl-es mennyiségű mintát vettünk különböző időpontokban. Az állatokat és perfúziós folyadék hőmérsékletét 37°C-on tartottuk. A biliáris exkréció vizsgálata során az epevezeték vékony műanyagcsővel (PE -10) kanüláltuk és az epét folyamatosan, 15 perces periódusokban gyűjtöttük. A perfúziós és epe mintákat az analízis előtt hűtőszekrényben (-20 °C) tartottuk. A Crohn-betegség modelljéül szolgáló gyulladási reakciót a bélben indometacinnal hoztuk létre (indometacin-induced bowel inflammation) melyet különböző dózisban (7,5-10-16 mg /kg) adtunk három napon át naponta egyszer szubkután. A mi kísérleti körülményeink között figyelembe véve a toxikus tüneteket és a letalitást, a 10 mg/kg-os adag bizonyult a legmegfelelőbbnek, ezért a tájékoztató kísérleti periódust követően az indometacinnak ezt az adagját alkalmaztuk. A szteroidokat (Prednizolon 0,5 mg/kg per os, Metilprednizolon 1,78-3,75 mg/kg i.p.), a Pentoxifyllint (40 mg/kg i.p.), a Mesalazint (125-1000 mg /kg) és a Pro-Gastrot (42,86 mg /kg) gyomorszondán keresztül, három napon át naponta egyszer adtuk az állatoknak a védőhatások vizsgálata céljából. A hasfal feltárását követően, illetve a kísérletek végén a morfológiai változások makroszkópos vizsgálata után fényképezőgéppel felvételeket is készítettünk, az elváltozásokat 0-5-ig terjedő pontszámmal értékeltük azok jellege és súlyossága alapján. A bélszakaszok szövettani vizsgálata hematoxilín-eozin festéssel és 40x-es nagyítással történt.

3.2.2. Analitikai eljárások

A fordított (reverz) fázisú HPLC (RP-HPLC) elválasztás talán a leggyakrabban használt és legnépszerűbb folyadékkromatográfiás elválasztási módszer. A PNP-nek és metabolitjainak az elválasztására már több eljárást, beleértve a RP-HPLC módszert is közöltek. Ezeknek egy részét nem biológiai minták mérésre alkalmazták, illetve a minta előkészítés során nem használtak belső standardot és nem közöltek reprodukálhatósági adatokat. A jelen kísérletünkből származó minták mérését ezért az általunk módosított metanol-víz eluent tartalmazó ionpár képző RP-HPLC elválasztási módszerrel végeztük.

3.3. Immunológiai vizsgálatok

3.3.1. Mononukleáris sejtek izolálása és stimulálása

A vért a kísérletek végén a patkány szívből punkcióval nyertük. Az alvadásban gátolt vérmintákból mononukleáris sejteket izoláltunk Ficoll-Paque (Sigma Aldrich) grádiens centrifugálással. A tisztított sejteket steril PBS-el mostuk, majd 10% FCS (fetal calf serum) tartalmú RPMI-1640 médiumban (1% L-Glutamin-Penicillin-Streptomycin) (Sigma Aldrich-) 6 lyukú sejtenyésztő lemezen (TPP) osztottuk szét lyukanként 10^6 sejt / ml koncentrációban. A mononukleáris sejteket 24 órán át stimuláltuk 25 ng/ml PMA (phorbol myristate acetate) és 1 μ g/ml ionomycin, illetve LPS (Sigma Aldrich) kezeléssel. 24 óra letelte után centrifugálást (1000 rpm-10 perc) követően a sejtek felülúszóját összegyűjtöttük és -20 °C-on tároltuk.

3.3.2. TNF- α meghatározás szendvics ELISA technikával.

A felülúszók TNF- α meghatározása a “ rat TNF- α modul set ELISA “ kittel (Bender Medsystems) történt a gyártó által javasolt protokollnak megfelelően. Első lépésben a 96 lyukú poliszitirén Nunc Maxisorp (Termo Scientific) lemezt PBS-ben (phosphate buffered saline) oldott befogó antitesttel érzékenyítettük egy éjszakán át 4°C-on.

A lemezt mosó pufferrel mostuk (0,05 % Tween -20 tartalmú PBS), majd szarvasmarha szérum albumin (BSA) (Sigma Aldrich) és 0,05 Tween -20 (Sigma Aldrich) tartalmú PBS mintahígító pufferrel 2 órán át blokkoltuk szoba hőmérsékleten. A mintahígítóval hígított 2500-39 pg/ml koncentrációjú rekombinált TNF α standardokat és az 1:2 arányban hígított felülúszókat a bitionált detektáló antitest jelenlétében 2 órán keresztül szobahőmérsékleten rázattuk 200 rpm-mel. Mosást követően a lemezt HRPO-val (horseradish peroxidase) jelölt streptavidinnel 2 órán keresztül szobahőmérsékleten rázattuk 200 rpm-el. A reakciót TMB-vel (tetramethylbenzidine) hívtuk elő, 15 perc után 4 N kénsav oldattal állítottuk le, majd 450 nm-en, fotométeren (iEMS reader MF, Thermo Labsystems) mértük az optikai denzitást (OD). A felülúszók TNF α koncentrációját a standard görbe segítségével határoztuk meg

4. Számítások, statisztikai analízis

A PNP-metabolitoknak (PNP-G, PNP-S) a béllumenben és az epében történő megjelenési mértékének a kiszámítása a béllumenben és az epében mért koncentráció, valamint a perfúziós volumen, illetve az epeminták térfogata alapján történt.

Az ábrákon és a táblázatokon feltüntetett adatok az átlagértékeket és az S.E.-t jelölik, n a kísérletek, vagy a mérések számát jelenti. A szignifikanciát az egymintás Student–féle t teszttel számítottuk ki.

5. Eredmények

5.1. Klinikai vizsgálatok

5.1.1. A multidrug rezisztencia vizsgálata.

Ennek ismerete nagyon fontos az adekvát terápia szempontjából, a vizsgálatok 30 Crohn-betegen történtek, akik inaktívak voltak és Mesalazin fenntartó terápiában részesültek. A szteroid rezisztenciára utal a nagyobb szteroid dózis igény, az immunszuppresszív terápia bevezetésének a korai szükségessége, a TNF- α ellenes antitest terápia igénye, továbbá az adekvát terápia melletti műtéti megoldás szükségessége és a gyakori relapsusok. A vizsgált betegek közül 18 tartósan szteroid szedő volt, ebből 9 beteg egyszer már operált is volt, 6 beteg pedig már Imuránt is szedett, ez utóbbiak közül 3 beteg ennek ellenére is műtétre szorult. Magas kemorezisztenciás hajlamot 5 betegnél észleltünk, ezek C/C homozigóták voltak.

5.1.2. Vaszkuláris faktorok vizsgálata inaktív Crohn-betegeken.

A trombocitákkal kapcsolatos vizsgálatok adatai alapján megállapítható, hogy a vérlemezke funkció, az ADP-vel indukált és aktivált vérlemezkék százalékos aránya, illetve az érfalsérülés indikátorának számító von Willebrand faktor antigén szintje nem tért el a normális értékektől.

A szolubilis vaszkuláris faktorok vizsgálata során a sCD-40L (a trombocita aktiváció egyik markere a vérben), az IL-8 és IL-6 (interleukinek) szintjét, a monocita kemotaktikus protein (MCP-1) koncentrációját a szolubilis vaszkuláris sejt adhéziós molekula (sVCAM -1) szintjét, valamint a P-szelektin és a szöveti plazminogén aktivátor (tPA) szintjét határoztuk meg. Vizsgálataink eredménye alapján megállapítható, hogy az sCD-40L, az MCP-1, az IL-8, az IL-6 szintje a betegek 40 százalékánál volt emelkedett, a tPA értéke 30%-nál alacsonyabb volt a kontrolloknál, a P-szelektin értéke pedig minden betegnél csökkent. A vaszkuláris károsodás legjobb paramétere a szolubilis vaszkuláris sejt adhéziós molekula (sVCAM-1) szintje viszont minden általunk vizsgált betegnél emelkedett volt, ezek alapján ennek a szerepe a Crohn-betegség kialakulásában feltételezhető, illetve fontos lehet.

5.2. Farmakológiai és farmakokinetikai vizsgálatok

5.2.1. A CD modell létrehozása, morfológiai változások.

Az indometacinnal kiváltott gyulladás makroszkópos morfológiai jeleit vizsgálva és a változásokat egy általánosan használt kritérium rendszer (Tamaki score) alapján értékelve megállapítható hogy a 10 mg/kg-os dózisban adott indometacin jellegzetes és jól definiálható tüneteket vált ki a vékonybélben, ezért az ezzel az eljárással létrehozott állapota a Crohn-betegség modelljének tekinthető. Az indometacinnal kiváltott morfológiai elváltozásokat illetően mind szteroid (metilprednizolon), mind nem-szteroid (Mesalazin) előkezeléssel jelentős védőhatást tudtunk elérni.

Az indometacinnal kiváltott gyulladás szövettani képét elemezve a bélben megállapítható, hogy a kezelt állatokban mély fekély jött létre az izopropriális-muszkuláris réteg érintettségével, továbbá nem specifikus gyulladás alakult ki a zsírszövet alatt. A metilprednizolon és a mesalazin

a szövettani képek alapján is védőhatást fejtettek ki, amely erőteljesebb volt a mesalazin esetében.

5.2.2. A vékonybél eliminációs tevékenysége

A vékonybél PNP-t tartalmazó oldattal történő perfúziója során azt találtuk, hogy az indometacin hatására a vegyület nagyobb mértékben marad a bélben a kontrollhoz viszonyítva, ami rosszabb felszívódásra vagy nagyobb mértékű vér→béllumen irányú transzportra utal (fokozott permeabilitás). Ezt a hatást a mesalazin kivédte.

A PNP metabolizmusának a vizsgálataival kapcsolatos kísérletek adataiból megállapítható, hogy az indometacin gátolta mind a PNP-G, mind a PNP-S kumulatív megjelenését a perfundált bélkacsbán, ami az intesztinális metabolikus-exkréciós funkció csökkenésére utal. Érdekes, hogy az indometacinnak a PNP metabolizmusára gyakorolt negatív hatását a mesalazin érdemben nem befolyásolta.

5.2.3. A máj eliminációs tevékenysége

Kísérleteink adatai szerint az indometacin csökkentette az epefolyást, az epetermelésre gyakorolt negatív hatást a vizsgált védőanyagok közül csak a mesalazin volt képes ellensúlyozni, kisebb mértékű kompenzáció még a pentoxifyllin esetében volt megfigyelhető.

Az indometacin mind az anyavegyület (PNP), mind a metabolitok (PNP-G, PNP-S) biliáris exkrécióját nagyon jelentősen csökkentette, ami arra utal, hogy nem csak a bélben, de a májban is történhetnek változások a Crohn-betegség modelljének tekinthető intesztinális gyulladásos folyamatok esetén. Érdekes, hogy ezek a változások részben, vagy egészben kivédhetők mesalazinnal, ami ellentétes a vékonybélben mért eredményekkel.

5.2.4. A pentoxifyllin hatása a vékonybél és a máj eliminációs tevékenységére.

Kísérleti eredményeink szerint az indometacin-indukálta csökkenést a PNP-G és a PNP-S lumenális megjelenésében a pentoxifyllin nem befolyásolta és nem védte ki a negatív hatást sem az anyavegyület, sem a metabolitok (PNP-G, PNP-S) biliáris exkrécióját illetően.

5.3. Immunológiai vizsgálatok

Az indometacin mind a Lipopoliszacharid (LPS), mind a Phorbol Mirisztát Acetát (PMA) által stimulált TNF- α szintjét jelentősen emelte. Megállapítható, hogy ezt a megemelt szintet a mesalazin, a Pro-Gastro és a kettőjük kombinációja szignifikánsan csökkentette. Nem találtunk azonban jelentős különbséget az egyes védőanyagok által kiváltott gátló effektusok között, továbbá a kombinációban adott Pro-Gastro nem fokozta a mesalazin hatását.

6. Megbeszélés-következtetések,

A klinikai vizsgálataink során összefüggést találtunk a kemorezisztencia kialakulása és az alkalmazandó szteroidok dózisa között. A kemorezisztencia közepes és magas szintjét elérő betegeknél az anamnesztikus relapszusok száma magasabb volt a kontrollhoz viszonyítva. Vizsgálati adataink arra utalnak, hogy a multidrug rezisztencia (MDR-1) klinikai laboratóriumi kimutatásához több tényező (genetikai, fehérje expressziós, MDR funkció) komplex vizsgálata szükséges. Kóros állapotban az MDR-1 megnövekedett expressziója nem jár feltétlenül együtt a funkció fokozódásával. A Crohn-betegség biológiai viselkedése, a terápia hatékonysága és az MDR-1 státusza közötti korrelációk a betegek individuális genetikai konstellációjától és klinikai állapotától függően rendkívül változatosak. Saját vizsgálataink adatai szerint a vérlemezkek száma és funkcionális állapota nem tért el lényegesen a kontroll tartománytól, ennek feltehetően az a magyarázata, hogy a vizsgálatok inaktív Crohn-betegeken és gyógyszeres (Mesalazin) kezelés alatt történtek. A szolubilis vaszkuláris faktorokkal kapcsolatos vizsgálatainak eredményei alapján megállapítható, hogy az áramlási citometriás vizsgálatok nem mutattak kóros aktivációt. A többi vizsgált szolubilis vaszkuláris faktor adatai sem tértek el konzekvensen a normális tartománytól, kivéve a vaszkuláris sejt adhéziós molekula (VCAM-1) értékét, amelyek következetesen magasabbak voltak a kontrollnál. Ez a mérési eredményünk azóta megerősítést nyert más szerzők újabb adataival és megfelel az ennek alapján elképzelt legújabb elméletnek, amely szerint a gyulladásos folyamat elindításában a mikrovaszkuláris endotél sejtek immunregulációs szerepének van jelentősége.

Az állatkísérletekben az indometacinnal (1x10mg/kg s.c. három napig) váltottunk ki gyulladást a vékonybélben annak érdekében, hogy a Crohn-betegséghez hasonló állapotot

hozzunk létre, amely lényegében annak a modelljéül szolgálhat. Megállapítottuk, hogy az indometacinnal kiváltott bélgyulladás a morfológiai tünetek megjelenése és súlyossága alapján és az érintett bélszakasz szövettani képe szerint is jól értékelhető és nyomon követhető. A tünetek mind szteroid (metiprednizolon), mind nem-szteroid (mesalazin) gyulladáscsökkentővel mérsékelhetők.

A vékonybél perfúziós kísérleteink adatai szerint a PNP mennyisége magasabb volt az indometacinnal kezelt patkányokban, mint a kontrollokban. Ennek egyik magyarázata a rosszabb felszívódás, a másik a csökkent metabolizmus, de indokolhatja az eltérést a megváltozott intesztinális permeabilitás is. Ha a metabolizmusban észlelt csökkenést összehasonlítjuk a PNP mennyiségének a perfúziós médiumban való növekedésével, akkor nyilvánvaló, hogy az utóbbi az előzővel nem magyarázható, mert nagyságrendi különbség van a két változás között. Érdekes, hogy a mesalazin az indometacinnak a bélben lévő PNP-t növelő hatását képes volt megszüntetni, de a metabolitokra vonatkozó csökkentő hatását nem befolyásolta. Ezek a kísérleti adatok felhívják a figyelmet arra is, hogy a bélben a permeabilitás a gyulladásos folyamat során mindkét irányban (lumen → vér és vér → lumen) változhat.

Kísérleteink figyelemreméltó eredménye, hogy a vékonybélnél tapasztaltakkal ellentétben a máj csökkent eliminációs működését illetően a mesalazin védőhatást mutat, azaz a csökkentett glukuronid képzés részben, a szulfát metabolit képzés pedig teljesen normalizálható volt mesalazinnal. Ez arra utal, hogy az indometacinnal létrehozott bélgyulladás során a bél mellett más szervek is érintettek lehetnek (pl. a máj), a változások létrejötté, mértéke és befolyásolhatósága azonban eltérő lehet.

A Crohn-betegség etiopatogenezisében különböző faktorok, például a bakteriális fertőzések, vagy az enterális bélflóra megváltozása is szerepet játszhat, megvizsgáltuk ezért az erőteljes antibakteriális hatású pentoxifyllin hatását is az indometacinnal kiváltott gyulladásos tünetekre. Morfológiai és hisztológiai szempontból megállapítható, hogy a pentoxifyllin önmagában az általunk vizsgált kísérleti körülmények között nem szüntette meg a indometacin által kiváltott tüneteket, de kombinációban adva sem javította számottevően a mesalazin hatását. Lényegében ehhez hasonlóan észleltünk a farmakológiai hatásokkal kapcsolatban is. Más szerzők által az antibakteriális szerekekkel végzett vizsgálatok különböző eredményekre vezettek, ennek a háttérben feltehetően az eltérő kísérleti körülmények és a kórokozók különböző érzékenysége állhat.

Az immunológiai tényezők vizsgálata során azt találtuk, hogy az LPS-el és a PMA-val stimulált magasabb TNF- α szintet az indometacinnal kezelt patkányok értékéhez viszonyítva a mesalazin szignifikánsan csökkentette. Hasonlót észleltünk a Pro-Gastro adása esetén is, bár a hatás az utóbbinál esetenként kisebb volt, kombinációban adva pedig nem javította a mesalazin hatását. Kísérleti eredményeink nem zárják ki, hogy a miénktől eltérő körülmények között nem lehet egyéb, vagy erőteljesebb hatásokat létrehozni.

7. Összefoglalás és új eredmények

1. Az MDR-1 klinikai laboratóriumi kimutatásához és a jelentőségének a megítéléséhez a genetikai, fehérje expressziós és az MDR-1 funkciós vizsgálatok komplex módon szükségesek. A beteganyagunkban összefüggést találtunk a kemorezisztencia (szteroid rezisztencia) kialakulása és az alkalmazandó szteroid dózis között.
2. A szolubilis vaszkuláris faktorok elemzése során azt találtuk, hogy az egyes faktorok külön-külön, de együttesen is változhatnak. Az sVCAM-1-et leszámítva konzekvens eltéréseket nem találtunk, ennek feltehetően az az oka, hogy inaktív Crohn-betegekben történtek a vizsgálatok, valamint, hogy a betegek mesalazin kezelésben részesültek. Az sVCAM általunk talált egyértelmű emelkedése megerősítést nyert más szerzők újabb adataival is, a legújabb felfogás szerint ez a paraméter döntő tényező és indikátor a gyulladásos folyamatokban.
3. Állatkísérleteinkben az indometacinnal kiváltott bélgyulladás a morfológiai tünetek megjelenése és súlyossága alapján egy pontozásos rendszer (Scoring system) segítségével és az érintett vékonybél szakasz (középső vékonybél szegment) szövettani képe szerint is jól értékelhető és nyomon követhető, ezért a Crohn – betegség modelljének tekinthető. Ezen gyulladásos modell segítségével megállapítottuk, hogy mind a szteroid (metilprednizolon) mind a nem szteroid gyulladáscsökkentők (5-ASA, mesalazin) védőhatásúak a morfológiai tünetek mérséklése alapján.

4. Az indometacin csökkentette a PNP eltűnését a béllumenből és redukálta a PNP-metabolitok intesztinális és biliáris exkrécióját, az adatok arra utaltak, hogy a vér→lumen irányú permeabilitás nőtt. A bélre gyakorolt hatáson kívül jelentős változásokat találtunk a máj működésében is. Érdekes azonban, hogy a PNP-metabolitok intesztinális eliminációjának a csökkenését a mesalazin nem befolyásolta, a biliáris exkréció változásánál azonban védőhatást tapasztaltunk.

5. A bakteriális státuszt befolyásoló probiotikum (Pro-Gastro) vagy antibiotikum (pentoxifyllin) adása önmagában ugyan mutatott az egyes paraméterek esetén némi védőhatást, kombinációban adva azonban nem javítottak érdemben a mesalazin effektusát.

6. Az immunológiai vizsgálatok adatai alapján megállapítható, hogy az indometacin emelte az LPS és a PMA által stimulált TNF- α szintet, amely mesalazinnal és Pro-Gastroval csökkenthető volt. A kombinációban adott Pro-Gastro azonban ebben az esetben sem növelte a mesalazin hatását.

8. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom **Dr. Fischer Emil** egyetemi tanárnak, program- és témavezetőmnek, aki mindvégig támogatott és stimulált a PhD munkám során. Tanácsai, útmutatása és segítőkész hozzáállása alapvetően hozzájárult ahhoz, hogy az értekezésben bemutatott kísérleteket eredményesen elvégezhettem és az adatokat az értekezésben összefoglalva bemutathattam.

Köszönettel tartozom **Dr. Pintér Erika** egyetemi tanárnak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, valamint a Gyógyszerésztudományi Doktori Iskola jelenlegi vezetőjének, aki lehetőséget biztosított a tudományos munka végzésére, illetve az értekezés összeállítására.

Köszönettel tartozom **Dr. Barthó Loránd** egyetemi tanárnak, a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, valamint a Gyógyszerésztudományi Doktori Iskola korábbi vezetőjének, aki lehetővé tette számomra a kísérletes munka elvégzését, valamint a PhD tevékenységet a Gyógyszertudományi Doktori Iskola keretein belül.

Köszönettel tartozom **Dr. Berki Tímea** egyetemi tanárnak és lányomnak, **Dr. Simon Dianának**, akik szakmai segítséget nyújtottak az immunológiai vizsgálatok kivitelezése és értékelése során.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Tornóczky Tamás** egyetemi docensnek a bélminták szövetségi feldolgozásában és értékelésében nyújtott szakszerű segítségéért.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Reiszné Horváth Mária** asszisztensnőnek, akitől nem csak az állatkísérletek kivitelezésében, de az értekezés összeállításának a technikai vonatkozásaiban is rendkívül értékes segítséget kaptam.

Köszönöm **Kovács Péter** informatikusnak az értekezés összeállításában nyújtott értékes technikai segítségét.

Végül, de nem utolsósorban megköszönöm **családomnak**, hogy mindvégig kitartó erkölcsi és anyagi támogatásban részesítettek.

9. Közlemények

1. Simon H., Kecskés M.: Vérlemezeke funkció, aktiváltsági állapot és v.WFAG vizsgálata inaktív Crohn betegekben. *Honvédervos* 150/3,206-2013 (1998)
2. Simon H.: Vastagbél diverticulosis és szövődményei. *Granum* VIII/5, 45-46 (2005)
3. Bojcssev S., Almási A., Simon H., Perjési P., Fischer E.: Investigation of drug metabolism in various segments of small intestine in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 100, 115-123 (2013) (I.F: 0,747)
4. Almási A., Bojcssev S., Fischer T., Simon H., Perjési P., Fischer E.: Metabolic enzyme activities and drug excretion in the small intestine and in the liver in the rat. *Acta Physiol. Hung.* 100, 478-488 (2013) (I.F:0,747)
5. Simon H., Fischer T., Almási A., Fischer E.: Effect of Mesalazine on the morphological and functional changes in the indomethacin-induced inflammatory bowel disease (rat model of Cronh's disease). *POR* (közlésre elfogadva) (I.F.:1,855)

10. Kongresszusi prezentációk

1. Simon H.: Gasztrointesztinális vérzések diagnosztikája (Előadás). Pécsi Honvédkórház Tudományos Tanács Orvosfóruma, Pécs, 1990.
2. Simon H.: Ulcus duodeni esetismertetése és endoszkópia élő bemutató (Előadás). Gasztroenterológia a házi orvosi gyakorlatban POTE-Medicom Glaxo Szimpózium, Pécs, 1955.
3. Tolnai Z., Simon H., Deák G.: Amoebas colitis (Előadás). Magyar Gasztroenterológiai Társaság Nagygyűlése Videosectio Balatonaliga, 1995.

4. Simon H.: A Crohn-betegség kezelése és gondozása betegklub keretében (Előadás). M. H. Központi Katonai Kórház Tudományos ülése, Budapest, 1995.
5. Simon H.: PPI szerepe a fekély kezelésében (Előadás). Baranyai Orvosklub, Pécs, 1998.
6. Simon H.: Vérlemezke funkció, aktiváltsági állapot és vWFAg szint vizsgálata Crohn- betegekben (Előadás). M.H. Belgyógyászainak Összevont VIII. Tudományos Konferenciája, Budapest, 2000.
7. Lukács M., Simon H.: Hasi panaszokkal, melaenával és reccuráló purpurákkal kezelt beteg esete (Előadás). PTE ÁOK Tudományos Szakosztály ülés. Pécs, 2000.
8. Lukács M., Nagy Zs., Papp F, Simon H.: Végbélcarcinoma és purpura: Koincidencia vagy következmény? (Poszter). Magyar Belgyógyász Társaság Nagygyűlése, Budapest, 2000.
9. Simon H.: Vascularis faktorok szerepe a Crohn-betegség etiológiájában. M. H. Központi Katonai Kórház Tudományos ülése (Előadás). Budapest, 2001.
10. Simon H.: Egy Crohn-beteg története (Előadás). PTE ÁOK Tudományos Szakosztály Ülés, Pécs, 2001.
11. Lukács M. Simon H., Pakodi F., Tornóczky T., Ezer P., Kelemen D., Kövér E.: A gyomor submucosus daganatai (Poszter). Magyar Gasztroenterológiai Társaság Nagygyűlése, Budapest, 2002.
12. Simon H.: A NSAID-ok gasztrointesztinális mellékhatásai (Előadás), MSD Szimpózium, Pécs, 2002.

13. Simon H., Fischer E.: Mesalazin és prednizolon hatása az indometacinnal kiváltott intesztinális gyulladásra patkányban (Poszter). Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2004.
14. Simon H., Fischer E., Beró T., Simon D.: Probiotikum, mesalazin és prednizolon hatása az indometacinnal kiváltott bélgyulladásra (Előadás). Magyar Gasztroenterológiai Társaság Nagygyűlése, Szeged, 2004.
15. Simon H., Magyarlaki T., Beró T.: Funkcionális multidrug-rezisztencia (MDR) vizsgálata Crohn-betegségben (Előadás). MBT Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Bükkfürdő, 2005.
16. Simon H., Fischer E., Beró T.: Mesalazin és prednizolon hatása az indometacinnal kiváltott bélgyulladásra és az intesztinális permeabilitás változása patkányban (Poszter). Magyar Gasztroenterológiai Társaság Nagygyűlése, Balatonaliga, 2005.
17. Simon H., Fischer E.: Vaszkuláris faktorok szerepe a Crohn-betegségben (Előadás). MBT Dunántúli Belgyógyász Vándorgyűlés, Sopron, 2006.
18. Simon H., Simon D., Pálinkás L., Fischer E.: Az indometacinnal kiváltott gyulladás kialakulása és befolyásolhatósága patkány vékonybélben (Poszter). Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2006.
19. Simon H., Fischer E., Berki T., Beró T.: Vaszkuláris faktorok vizsgálata inaktív 5-ASA-t szedő Crohn-betegekben. Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-magyarországi Szakcsoport Tudományos Ülése, Eger, 2006.
20. H. Simon, E. Fischer, T. Beró, D. Simon: Effect of probiotics, mesalazin and prednisolon on indomethacin produced bowel inflammation in rats (Poszter). Magyar Gasztroenterológiai Társaság, Visegrád, 2007.

21. Horvát Gy., Simon H., Kiss Zs.: A monolobáris Caroli betegség (előadás). Magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-magyarországi Szakcsoport Tudományos Ülése, Kazincbarcika, 2010.
22. Bojcev S., Almási A., Simon H., Perjési P., Fischer E.: A metabolikus aktivitás vizsgálata a vékonybél különböző szegmentjeiben (Poszter). Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2012.
23. Fischer T., Almási A., Bojcev S., Simon H., Fischer E., Perjési P.: A gyógyszer-metabolizmus vizsgálata a vékonybélben perfúziós és recirculációs módszerrel (poszter). Membrán-Transzport Konferencia, Sümeg, 2015.
24. Simon H., Fischer T., Almási A., Perjési P., Fischer E.: A vékonybél xenobiotikumokat elimináló tevékenysége Crohn -betegség modelben patkányban (poszter). Membrán–Transzport Konferencia, Sümeg, 2016.
25. Fischer T., Almási A., Bojcev Sz., Perjési P., Fischer E., Simon H.: A máj metabolikus és exkréciós tevékenysége Crohn-betegség modellben patkányban (poszter). Membrán–Transzport Konferencia, Sümeg, 2016.