

ROZPRAWA DOKTORSKA

Aktywność układu opioidowego i kanabinoidowego w patogenezie i terapii wybranych chorób zapalnych i czynnościowych układu pokarmowego

mgr Andrzej Wasilewski

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna

Kopromotor: dr hab. Mariusz Sacharczuk, prof. nadzw. IGHZ

Zakład Biochemii

Wydział Lekarski



Łódź 2017

Streszczenie

Wstęp: Choroby zapalne i czynnościowe układu pokarmowego, takie jak nieswoiste choroby zapalne jelit (NChZJ), zespół jelita drażliwego (ang. *irritable bowel syndrome*; IBS) i zespół cyklicznych wymiotów (ang. *cyclic vomiting syndrome*; CVS) stanowią grupę przewlekłych, idiopatycznych zaburzeń, którym towarzyszą przewlekłe lub nawracające objawy. Z powodu nie do końca poznanej etiologii leczenie tych zaburzeń charakteryzuje się ograniczoną skutecznością. Rak jelita grubego (ang. *colorectal cancer*; CRC) stanowi drugi co do częstości nowotwór złośliwy u kobiet i trzeci u mężczyzn, a jego rokowanie zależy od stadium choroby i zastosowanego leczenia.

Endogenny układ opioidowy (ang. *endogenous opioid system*; EOS) i endogenny układ kanabinoidowy (ang. *endocannabinoid system*; ECS) składają się z endogennych ligandów, receptorów oraz enzymów biorących udział w ich biosyntezie i degradacji. EOS i ECS odgrywają ważną rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych i patofizjologicznych; w przewodzie pokarmowym kontrolując m.in. perystaltykę jelit i procesy absorpcji oraz sekrecji wody i elektrolitów.

Cel naukowy: Celem rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie związku pomiędzy zróżnicowaniem aktywności EOS i ECS a jego wpływem na motorykę przewodu pokarmowego, przeznabłonkowy transport jonów w jelicie cienkim i grubym oraz wzrost i przeżywalność komórek nowotworowych linii Colo-205. Zbadano również rolę zróżnicowanej aktywności EOS i ECS w patogenezie i terapii chorób zapalnych i czynnościowych układu pokarmowego.

Materiały i metody: Do badań w obrębie EOS wykorzystano dwie linie myszy selekcjonowane rozbieżnie w kierunku wysokiej (ang. *high analgesia*; HA) i niskiej (ang. *low analgesia*; LA) analgezji postresowej (ang. *stress-induced analgesia*; SIA), które charakteryzują się odpowiednio wrodzoną hiperaktywnością i normoaktywnością układu opioidowego. Do badań wykorzystano wybranych agonistów i antagonistów receptorów opioidowych, wykazujących działanie ośrodkowe (morfina, nalokson) lub obwodowe (loperamid, metylojodek naloksonu). Dokonano oceny wpływu wybranych agonistów i antagonistów na motorykę przewodu pokarmowego myszy linii HA i LA *in vivo* oraz scharakteryzowano ich efekt w warunkach fizjologicznych i patofizjologicznych. Oceniono również wpływ agonistów i antagonistów na przez nabłonkowy transport jonów w jelicie cienkim i grubym *in vitro* z wykorzystaniem komórek Ussinga. Do badań w obrębie ECS wykorzystano związki PF-3845, JZL-184 i RHC-80267, będące inhibitorami hydrolazy amidów kwasów tłuszczowych (ang. *fatty acid amide hydrolase*; FAAH), lipazy monoacyloglicerolu (ang. *monoacylglycerol lipase*; MAGL) i lipazy diacyloglicerolu (ang. *diacylglycerol lipase*; DAGL), biorących udział w syntezie i degradacji kanabinoidów. Oceny działania wybranych inhibitorów dokonano *in vitro* z wykorzystaniem komórek Ussinga oraz w ludzkim modelu komórkowym gruczołakoraka okrężnicy (linia Colo-205). Badanie wariantów polimorficznych w obrębie EOS i ECS wykonano na ludzkim materiale genetycznym uzyskanym z próbek śliny pacjentów z CVS, przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym – Real-Time PCR i oligonukleotydowych sond znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym, odpowiednio VIC/FAM na końcu 5’.

Wyniki badań: W badaniach z wykorzystaniem myszy linii HA i LA wykazano, że różnice w aktywności EOS odpowiadają za zmiany motoryki przewodu pokarmowego. W badaniach przy użyciu komórek Ussinga zaobserwowano prosekrecyjny efekt działania

loperamidu u myszy linii HA oraz prosekrecyjny efekt naloksonu u obu linii myszy, co wskazuje, że wrodzone różnice w aktywności EOS mogą wpływać na skuteczność terapii podczas leczenia opioidami. Ponadto wykazano, że hamowanie aktywności enzymów FAAH i MAGL wywołuje efekt antysekrecyjny. Hamowanie FAAH zmniejsza również żywotność, migrację i inwazyjność ludzkich komórek nowotworowych linii Colo-205. Udowodniono również bezpośrednią korelację między zmianami genetycznymi w genach kodujących receptory EOS i ECS a ryzykiem zachorowania na CVS oraz skutecznością stosowanej terapii.

Wnioski: Wykazano, że zróżnicowana aktywność endogennego układu opioidowego i kanabinoidowego może odgrywać ważną rolę w patofizjologii oraz przebiegu chorób zapalnych i czynnościowych przewodu pokarmowego. Ponadto wykazano, że modulowanie aktywności EOS i ECS może stanowić nowy cel farmakologiczny w leczeniu tych chorób.

Abstract

Background: Inflammatory and functional gastrointestinal (GI) disorders, including inflammatory bowel disease (IBD), irritable bowel syndrome (IBS) and cyclic vomiting syndrome (CVS) are a group of chronic idiopathic disorders accompanied by chronic or recurrent symptoms. Because of an unknown etiology, treatment of these disorders is characterized by limited efficacy. Colorectal cancer (CRC) is the second most common cancer in women and the third in men worldwide. Prognosis depends on the stage of the disease and the treatment used.

Endogenous opioid system (EOS) and endocannabinoid system (ECS) are composed of endogenous ligands, receptors and enzymes involved in their biosynthesis and degradation. The EOS and ECS play an important role in regulating many physiological and pathophysiological processes; in gastrointestinal tract they are responsible for controlling motility and absorption and secretion of water and electrolyte.

Aim of the study: The aim of this PhD thesis was to characterize the potential relationship between the divergent activities in the EOS and ECS and their influence on gastrointestinal motility, electrolyte equilibrium in ileal and colonic mucosae, and growth and survival of Colo-205 tumor cell line, and to investigate the role of differential EOS and ECS activity in the pathogenesis and treatment of inflammatory and functional diseases of the GI tract.

Materials and methods: In experiments regarding the EOS, two mouse lines bidirectionally selected for high (HA) and low (LA) stress-induced analgesia (SIA) that are characterized by hyper- and hypoactivity of the EOS were used. Opioid receptor agonists and antagonists acting centrally (morphine, naloxone hydrochloride) and peripherally (loperamide, naloxone methiodide) have been administered. The action of selected opioid

agonists and antagonists on GI motility of HA and LA mice was characterized under physiological and pathophysiological conditions. The effects of agonists and antagonists on changes in electrolyte equilibrium in the ileum and the colon in the Ussing chambers experiments were also determined. In experiments focusing on ECS, PF-3845, JZL-184 and RHC-80267 (fatty acid amide hydrolase (FAAH), mono- (MAGL) and diacylglycerol lipase (DAGL) inhibitors, respectively), that are involved in the synthesis and degradation of endocannabinoids were used. Evaluation of selected inhibitors was also performed in the human colon adenocarcinoma Colo-205 cells line. The polymorphic variant studies within EOS and ECS were performed on human genetic material obtained from saliva samples of CVS patients using real-time polymerase chain reaction (PCR) and VIC/FAM-labeled fluorescent dye oligonucleotide probes at the 5' end.

Results: In studies with HA and LA mice, it has been demonstrated that differences in EOS activity are responsible for changes in GI motility. In the Ussing chambers studies, the prosecretory action of loperamide and naloxone have been observed, suggesting that the divergent activity of the EOS may influence the efficacy of treatment with opioids. Concurrently, inhibition of FAAH and MAGL activity has been shown to produce an antisecretory effect. Inhibition of FAAH also reduced the viability, migration and invasiveness of the human colon adenocarcinoma Colo-205 cell line. Finally, a direct correlation between genetic alterations in the EOS and ECS receptor genes and the risk of CVS and the efficacy of the therapy were observed.

Conclusion: Individual differences in EOS and ECS activity may play an important role in the pathophysiology and course of inflammatory and functional diseases of the GI tract. The results also suggest that the modulation of EOS and ECS activity may be a new pharmacological target for the treatment of these disorders.