

Projektszám: 88öu2	HUF 1.931.600 EUR 120
Pályázó neve: Prof. Dr. Gyires Klára	Intézménye: Semmelweis Egyetem, Általános Orvosi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet
Projektpartner neve: Prof. Dr. Peter Holzer	Intézménye: Medizinische Universität Graz, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
Pályázat címe: α2-Adrenozeptoren und Imidazolin I1-Rezeptoren in NSAR-induzierten Dünndarm-Ulzera	

A projekt jellege: (kérjük bejelölni)

- Workshop, konferencia
- Publikáció, tananyag
- **Kutatási együttműködés**
- Oktatási program

Beszámoló/Eredmények

Irodalmi háttér

Régóta ismert, hogy a nem-szteroid gyulladásgátlók (NSAID-ok), melyek a leggyakrabban felírt gyógyszerek közé tartoznak, a gyomor és duodenum nyálkahártyájának károsodását okozzák. Ez részben savas karakterüknek köszönhető, másrészt COX gátló hatásuknak, melynek következtében gátolják a prosztaglandinok szintézisét és gátolják azok nyálkahártyát védő hatását. Számos tanulmány igazolta, hogy savszekréció gátló gyógyszerek, elsősorban proton pumpa gátlók (PPI-k) együttes adásával az NSAID-ok károsító hatása jelentősen csökkenthető a gyomorban és duodenumban (Hawkey et al., 1998; Graham et al., 2002).

A modern diagnosztikus eljárások (pl. video kapszula endoszkópia) bevezetésével és elterjedésével azonban világossá vált, hogy az NSAID-ok a vékonybél alsóbb szegmenseiben is képesek fekélyeket okozni, mégpedig gyakrabban, mint azt korábban gondolták (Goldstein et al., 2007). Graham és munkatársainak (2005) tanulmánya például kimutatta, hogy a krónikusan NSAID-ot szedő betegek 71%-ában alakult ki vékonybél-károsodás. Ezek a fekélyek vérzéshez, anémiához, okkult vérvesztéshez és malabszorpcióhoz vezethetnek, és különösen lényeges, hogy kialakulásuk alig befolyásolható savszekréció gátlókkal (Sato and Takeuchi, 2012), sőt, egyes vizsgálatok alapján az utóbbiak még fokozhatják is a károsodás mértékét (Wallace et al., 2011). Ezeket figyelembe véve nagy szükség van új gyógyszerek kifejlesztésére, melyekkel hatásosan gátolható lenne az NSAID-ok nemcsak gyomor-, hanem bélfekélyeket okozó hatása.

A projekt célkitűzése

Az α 2-adrenoceptorok (α 2-AR-ok) fontos szabályozó szerepe a gasztrointesztinális (GI) rendszerben régóta ismert (Blandizzi 2007), és szintén bizonyított, hogy mind a perifériás, mind a centrális α 2-AR-ok aktiválása fokozza a gyomor nyálkahártya védekező mechanizmusát (Gyires et al., 2000a, 2000b, 2007; Zádori et al., 2011). Ezen receptorok potenciális szerepét az NSAID-ok által indukált bélfekélyek kialakulásában azonban eddig nem vizsgálták.

Ezenkívül mind imidazolin receptorokat (IR-ok), mint ezek feltételezett endogén ligandjait (pl. clonidin displacing substance, agmatin) kimutatták a GI rendszerben (Hou et al., 1987; Molderings et al., 1998; Raasch et al., 1995; Wikberg et al., 1991), és több tanulmány is felveti annak lehetőségét, hogy I1 és I2 receptorok egyaránt befolyásolhatják a GI nyálkahártya integritását (Glavin and Smyth, 1995; Zádori et al., 2014), azonban eddig ezen receptorok szerepét az NSAID-ok által indukált bélfekélyek kialakulásában nem vizsgálták.

A jelen projekt célja annak vizsgálata volt, hogy α 2-adrenoceptor/imidazolin I1 receptor ligandokkal befolyásolható-e az NSAID-ok által okozott bélkárosodás kialakulása.

Kísérleti módszerek

Állatok és etikai engedély

180-220 g hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat szabályozott hőmérsékletű és páratartalmú, 12 órás fény/sötétség ciklusú állatházban tartottuk, a Semmelweis Egyetem Etikai Bizottsága által meghatározott irányelveknek megfelelően, mely az Európai Bizottság 86/609/EEC direktíváján alapul. Az állatok táplálékfelvételét és vízfogyasztását nem korlátoztuk. A kísérletek során törekedtünk az állatok szenvedését minimalizálni. A kísérletekhez szükséges etikai engedélyt az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács hagyta jóvá (Élelmiszerlánc-Biztonsági, Növény- és Talajvédelmi Főosztály, Ügyiratszám: PEI/001/1493-4/2015).

NSAID-indukálta bélfekély

A bélfekélyek kialakulását egyszeri dózisú indomethacinnal indukáltuk (20 mg/kg per os, 0.5 ml/100 g volumenben, methylcellulose-ban szuszpendálva), a fekélyek makroszkópos kiértékelése pedig 2 (illetve az első kísérletben 3) nappal az indomethacin beadását követően történt. A makroszkópos pontszám az alábbi paraméterekből tevődött össze: ascites (0-4 pont), összenövések (0-4 pont) és nyálkahártya fekélyek / plakkok (0-4 pont). A pontokat összeadva a teljes makroszkópos pont 0-tól 12-ig terjedt.

A bélgyulladás mértékének további analizéséhez a vékonybél rövidülését is meghatároztuk. Az állatok túlaltatását követően a teljes vékonybelet eltávolítottuk és annak hosszát lemértük. Ügyeltünk arra, hogy a bél nyúlását/feszülését elkerüljük.

Az állatok testsúlyát a kezelés teljes időtartama során naponta meghatároztuk.

Vegyületek adása

Az α 2-AR és I1R agonista clonidint és moxonidint (0.01-1 mg/kg), valamint az α 2-AR antagonistá yohimbint (2 mg/kg) intraperitoneálisan (i.p.) adagoltuk, 0.5 ml/100 g volumenben, egy nappal az indomethacin adását megelőzően, valamint azt követően naponta egyszer, egészen az állatok feldolgozásáig (a protokollt ld. a melléklet 1. ábráján).

A vékonybél TNF- α szintjének mérése

A vékonybél eltávolítását és hosszának lemerését követően a bélfalból mintákat fagyasztottunk le folyékony nitrogénben, majd -80°C -on tároltuk a feldolgozásig. A szöveti TNF- α szintet enzim-kapcsolt immunoszorbens módszerrel (ELISA, Invitrogen, Camirillo, CA) határoztuk meg. Röviden, a mintákból és a biotinilált anti-TNF- α -ból 100-100 μl -t adtunk a 96 lyukú lap celláiba, majd körülbelül 2 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően a cellákat kimostuk, majd 100 μl streptavidin-HRP-t adtunk hozzájuk és 30 percig szobahőn inkubáltuk. Az inkubálás után 100 μl kromogént adtunk a cellákhoz, majd a reakció leállítását követően az abszorbanciát 450 nm-en kiértékeljük.

A minták összfehérje mennyiségét a bicinchoninic acid (BCA) módszerrel határoztuk meg, bovine serum albumint (BSA) használtunk standardnak, a TNF- α mennyiségét pedig pg/mg fehérje mennyiségben adtuk meg.

Vegyületek

A clonidin hydrochlorid és yohimbín hydrochlorid a Sigma Chemical Co-tól lett rendelve (St. Louis, Mo, USA), a moxonidin hydrochloride a Tocris Bioscience-től (Bristol, UK), míg a Pierce BCA Protein Assay Kit és Pierce BSA standard a Thermo Fisher Scientific Inc.-től (Waltham, MA USA).

Statisztikai analízis

Az adatokat átlag \pm S.E.M.-ben adtuk meg. A statisztikai analizéshez egyutas ANOVA módszert alkalmaztunk Newman-Keuls post-hoc teszttel, vagy (nem parametriás értékek esetén) Kruskal-Wallis tesztet Dunn's teszttel. Kétutas ismételt méréses ANOVA-val hasonlítottuk össze a csoportok súlyvesztésének időbeli alakulását. A túlélési rátákat Kaplan Meier tesztel határoztuk meg. $p < 0.05$ valószínűségű különbséget tekintettünk szignifikánsnak.

Eredmények

(az ábrákat ld. a mellékletben)

1. Elsőnek a clonidin hatását vizsgáltuk az indomethacin által indukált bélfekélyek kialakulására, mely vegyület hasonló affinitással rendelkezik az α 2-AR-ok és imidazolin I1R-ok iránt (Smith és Aston-Jones, 2011). Az eredeti munkatervnek megfelelően a fekélyek kiértékelése 3 nappal az indomethacin adását követően történt. Amint azt a 2. ábra mutatja,

az indomethacin jelentős bélgyulladászt indukált, szignifikáns súlyvesztéssel (2A), ascitessel, összenövésekkel és fekélyekkel (2B), valamint jelentős bélrövidüléssel (2C). A clonidin önmagában (azaz a methylcellulose-zal kezelt csoportban) semmilyen elváltozást nem okozott. Indomethacinnal együttadva nem befolyásolta az állatok súlyvesztését, és bár tendenciaszerűen csökkentette a makroszkópos pontot és bélrövidülést, a különbség nem volt szignifikáns.

Ugyanakkor, amint azt a 2D ábra mutatja, 3 nappal az indomethacin adását követően az állatok túlélése extrém alacsony volt mind a fizsó+indomethacinnal, mind a clonidin 1 mg/kg+ indomethacinnal kezelt csoportban (25% és 12.5 %). Ezért módosítottuk az eredeti protokollt és az állatok leölése illetve belek feldolgozása a továbbiakban 2 nappal az indomethacin adását követően történt.

2. A módosított protokollal kimutattuk, hogy a clonidin szignifikánsan gátolja az indomethacin által okozott vékonybél-károsodást. Érdekes módon a vegyület hatásosabbnak bizonyult alacsonyabb dózistartományban (0.1 mg/kg), vagyis a dózis-hatás görbéje harang alakú, akárcsak számos neuropeptid gasztroprotektív hatása esetén (Gyires és Zádori, 2014). Amint a 3. ábra mutatja, a clonidin nem befolyásolta az állatok súlyvesztését, de jelentősen csökkentette mind a makroszkópos pontot (3B), mind a bélrövidülést (3C). Ezenfelül szintén szignifikánsan csökkentette a pro-inflammatorikus citokin TNF- α szintjét a bélben (4. ábra).

3. A következő lépésben a clonidint az α 2-AR antagonistá yohimbinnel kombináltuk, mely nem kötődik az imidazolin I1 receptorokhoz (Szabó, 2002). A yohimbin önmagában adva nem befolyásolta az indomethacin által indukált bélfekélyek kialakulását, azonban szinte teljesen meggátolta a clonidin védőhatását (3. ábra).

4. Végezetül a moxonidin hatását vizsgáltuk, mely nagyobb affinitással rendelkezik az imidazolin I1R-ok iránt, mint az α 2-AR-ok iránt (Smith és Aston-Jones, 2011). Hasonló protektív hatást vártunk, mint a clonidin esetében, de érdekes módon a moxonidin nem gátolta a bélfekélyek kialakulását, sőt, az indomethacin által okozott súlyvesztést tovább fokozta (Fig. 5).

Megbeszélés

Eredményeink elsőként igazolják hogy az NSAID-ok által okozott bélfekélyek kialakulása hatékonyan gátolható a kevert α 2-AR/I1R agonista clonidin-nal. Érdekes módon a hasonló receptorális profillal rendelkező moxonidin nem volt képes hasonló védőhatást indukálni. A két vegyület között különbség, hogy a clonidin hasonló affinitással rendelkezik az α 2-AR-ok és I1R-ok iránt, míg a moxonidin nagyobb (kb 40-szeres) affinitással bír az utóbbi receptorok iránt (Smith és Aston-Jones, 2011). Végezetül, a clonidin védőhatása yohimbinnel gátolható volt, mely az α 2-AR-ok antagonistája és nem kötődik I1R-okhoz (Szabó, 2002). Ezen eredményekből az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. Az α 2-AR-ok és I1R-ok feltehetően ellentétes hatást okoznak a bélben, nevezetesen az előbbieket gátolják, míg utóbbiak fokozzák az NSAID-ok által okozott bélfekélyek kialakulását,
2. a clonidin közepes dózisa (0.1 mg/kg) esetében az α 2-AR-ok aktivációjából fakadó védőhatás dominál, azonban nagyobb dózis (1 mg/kg) esetén a védőhatás csökken, az I1R-ok aktivációja miatt,
3. a moxonidin mindhárom tesztelt dózisban elsősorban az I1R-okat aktiválja, melyek elfedik az α 2-AR-ok által okozott potenciális védőhatást.

A fenti hipotézisünket a 6. ábra foglalja össze. Fontos azonban megemlíteni, hogy további vizsgálatok szükségesek egyéb ligandokkal a hipotézis alátámasztásához.

Irodalomjegyzék

- Blandizzi C. (2007) *Neurochem Int.* 51, 282-288.
Glavin G.B. and Smyth D.D. (1995) *Br J Pharmacol.* 114, 751-754.
Goldstein .L. et al. (2007) *Aliment Pharmacol Ther.* 25, 1211-1222.
Graham D.Y. et al. (2002) *Arch Intern Med.* 162, 169-175.
Graham D.Y. et al. (2005) *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3, 55-59.

Gyires K. et al. (2000a) Eur.J.Pharmacol. 396, 131-135.
Gyires K. et al. (2000b) Neuropharmacology 39, 961-968.
Gyires K. et al. (2007) Neurochem.Int. 51, 289-296.
Gyires K. and Zádori Z.S. (2014) Curr Opin Pharmacol. 19, 24-30.
Hawkey C.J. et al. (1998) N Engl J Med. 338, 727-734.
Houi N. et al. (1987) Eur J Pharmacol. 144, 67-76.
Molderings G.J., et al. (1998) J Pharmacol Exp Ther. 285, 170-177.
Raasch W. et al. (1995) Life Sci. 56, 2319-2330.
Sato H. and Takeuchi K. (2012) Curr Med Chem. 19, 82-89.
Smith R.J. and Aston-Jones G. (2011) Biol Psychiatry 70, 712-719.
Szabó B. (2002) Pharmacology & Therapeutics 93, 1- 35.
Wallace J.L. et al. (2011) Gastroenterology 141, 1314-1322.
Wikberg J.E. et al. (1991) Eur J Pharmacol. 193, 335-340.
Zádori Z.S. et al. (2011). Eur.J Pharmacol. 669, 115-120.
Zádori Z.S. et al. (2014) Brain Res Bull 108, 51-59.

Publikáció

Zádori Z.S. , Tóth V.E., Fehér Á., Holzer P., Gyires K. Analysing the role of alpha2- and imidazoline receptors in the pathomechanism of NSAID-induced intestinal ulcers. 57th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, 2015. 05. 30 – 2015. 06. 02., Siófok

The results will also be published in an international journal (paper is under preparation).

Projektszám: 88öu2	HUF 1.931.600 EUR 120
Pályázó neve: Prof. Dr. Gyires Klára	Intézménye: Semmelweis Egyetem, Általános Orvosi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet
Projektpartner neve: Prof. Dr. Peter Holzer	Intézménye: Medizinische Universität Graz, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
Pályázat címe: α2-Adrenozeptoren und Imidazolin I1-Rezeptoren in NSAR-induzierten Dünndarm-Ulzera	

Art der Förderung:

- Workshop, Konferenz
- Publikation, Lehrmaterial
- **Forschungsprojekt**
- Unterrichtsprojekt

Bericht

Background

It is well-established that non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), which are among the most widely used medicines, induce gastroduodenal mucosal damage. This is partly due to their acidic character, but also comes from their ability to inhibit the COX pathway of prostaglandin synthesis and abrogate a number of prostaglandin dependent defence mechanisms. Several studies demonstrated that co-prescription of antisecretory drugs, especially that of proton pump inhibitors (PPIs), effectively reduces the development of NSAID-induced ulcers in the upper gastrointestinal (GI) tract (Hawkey et al., 1998; Graham et al., 2002).

However, the development and introduction of new diagnostic tools (e.g. video capsule endoscopy) have revealed that NSAIDs also damage the mucosa in lower parts of the small intestine, and these intestinal ulcerations are more common than earlier thought (Goldstein et al., 2007). The study of Graham et al. (2005) for example demonstrated that small bowel injury was evident in 71% of chronic non-selective NSAID users. These ulcers can cause bleeding, anemia, occult blood loss or malabsorption and, more importantly, they cannot be effectively treated with antisecretory agents (Sato and Takeuchi, 2012); some studies even suggest aggravation caused by these drugs (Wallace et al., 2011). Since there is no drug that can completely prevent or treat NSAID enteropathy, it is an urgent need to develop such a compound.

The rationale of the project

The important regulatory role of α 2-adrenoceptors (α 2-ARs) on GI functions is well-documented (Blandizzi 2007), and there is evidence that activation of both peripheral and central α 2-ARs enhances gastric mucosal defense (Gyires et al., 2000a, 2000b, 2007; Zádori et al., 2011). However, the possible role of α 2-ARs in the development of NSAID-induced intestinal ulcers has not been investigated thus far. Moreover, both endogenous imidazoline receptor (IR) ligands (clonidine displacing substance, agmatine) and IRs have been identified throughout the GI tract (Houi et al., 1987; Molderings et al., 1998; Raasch et al., 1995; Wikberg et al., 1991), and several lines of evidence suggest that activation of either imidazoline-1 receptors (I1Rs) or I2Rs modulates GI mucosal integrity (Glavin and Smyth, 1995; Zádori et al., 2014), but to date no study has been conducted to assess whether IR ligands can influence the development of NSAID-induced intestinal ulceration.

Therefore, in the present study we aimed to analyze whether α 2-adrenoceptor/imidazoline I1 receptor ligands are able to ameliorate the development of NSAID-induced intestinal lesions in rats, besides their well-known gastroprotective action.

Experimental procedures

Animals and ethical considerations

180-220 g male Wistar rats were used. The animals were housed in a temperature- and humidity-controlled room at a 12-h light/dark cycle under conditions of animal housing and experimentation according to ethical guidelines issued by the Ethical Board of Semmelweis University, based on EC Directive 86/609/EEC. Food and water were available ad libitum. All procedures conformed to the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, and all efforts were made to minimize the suffering of animals. The experiment was approved by the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation and permitted by the government (Food Chain Safety and Animal Health Directorate of the Central Agricultural Office, Permit no. PEI/001/1493-4/2015).

NSAID-induced intestinal ulcers

Intestinal lesions were induced by a single dose of indomethacin (20 mg/kg per os, in a volume of 0.5 ml/100 g, suspended in methylcellulose) and were evaluated 2 or, in the first experiment, 3 days after the challenge macroscopically. The macroscopic score covered the following parameters: ascites (0-4 score), adhesions (0-4 score) and mucosal ulcerations / plaques (0-4 score). The scores in each category were summed up, resulting in a total score between 0 and 12.

The reduction of the length of the small intestine was used as another parameter to assess intestinal inflammation. After death, the whole small intestine was excised and its length was measured. Care was taken not to stretch the intestine.

The body weight of rats was measured daily during the course of the treatment.

Drug treatments

The α 2-AR and I1R agonists clonidine and moxonidine (0.01-1 mg/kg), as well as the α 2-AR antagonist yohimbine (2 mg/kg) were injected intraperitoneally (i.p.), in a volume of 0.5 ml/100 g, one day before the administration of indomethacin, and then once daily until the sacrifice of animals (see Figure 1 for the protocol in the attachment).

Measuring intestinal TNF- α levels

After removal of the intestine and measurement of its length, full-thickness pieces of the intestine were excised, shock-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until assay. The tissue content of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was measured by enzyme linked-immunosorbent assay (ELISA; Invitrogen, Camirillo, CA). Briefly, 100 μl of each sample and the biotinylated anti-TNF- α were added in duplicate to the 96-well plate and incubated for approximately 2 hours at room temperature. Following the 2 hour treatment, the plates were washed and 100 μl of the streptavidin-HRP was added for 30 minutes at room temperature. After the 30 minute incubation, 100 μl of the stabilized chromogen was added to each well and 100 μl of stop solution was added to stop the reaction. The absorbance was detected at 450 nm.

The total protein in the supernatant was determined by the bicinchoninic acid (BCA) assay with bovine serum albumin (BSA) as a standard, and the level of TNF- α was expressed as pg per mg of total protein.

Materials

Clonidine hydrochloride and yohimbine hydrochloride were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA), moxonidine hydrochloride from Tocris Bioscience (Bristol, UK), while Pierce BCA Protein Assay Kit and Pierce BSA standard from Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical analysis of the data was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test, or (in the case of nonparametric values) Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. Two-way repeated measures ANOVA was employed to compare the time course of weight losses between different groups. The survival rate differences between groups were compared by using Kaplan Meier test. A probability of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

(see Figures and legends in the attachment)

1. First we analyzed the effect of clonidine (which possesses similar affinity for α_2 -ARs and imidazoline I1Rs (Smith and Aston-Jones, 2011)) on the development of indomethacin-induced intestinal ulcers, and according to the original workplan, we evaluated the intestinal lesions 3 days after the oral administration of indomethacin. As Fig. 2 shows, indomethacin induced marked intestinal inflammation in the animals with significant weight loss (2A), ascites, intestinal adhesions and ulcers (2B), and also markedly reduced the length of intestines (2C). Clonidine *per se* (i.e. in rats treated with methylcellulose) did not have any effect. When given together with indomethacin, it failed to influence the weight loss, but tended to decrease the macroscopic score and bowel shrinkage induced by indomethacin, however, these effects did not reach statistical significance.

On the other hand, as Fig 2D demonstrates, 3 days after the injection of indomethacin the rate of survival was extremely low in both the saline+indomethacin-treated and clonidine 1 mg/kg+indomethacin-treated groups (25% and 12.5 %, respectively). Thus, we modified the protocol and sacrificed the animals thereafter on the 2nd day after the indomethacin challenge.

2. With the modified protocol we were able to demonstrate that clonidine significantly reduces the development of indomethacin-induced small bowel injury. Interestingly, it was more effective in the lower dose range (0.1 mg/kg): thus, its dose-response curve proved to be bell-shaped, similarly to the gastroprotective effect of numerous neuropeptides (Gyires and Zádori, 2014). As Fig 3 shows, clonidine did not influence the weight loss of animals, but markedly decreased their macroscopic inflammatory score (3B) and the indomethacin-induced reduction of intestine length (3C). Furthermore, it also decreased significantly the intestinal level of the pro-inflammatory cytokine TNF- α (Fig. 4).

3. In the next step we combined clonidine with the α_2 -AR antagonist yohimbine, which is devoid of any effect on imidazoline I1 receptors (Szabó, 2002). We found that yohimbine did not influence the development of indomethacin-induced ulcers *per se*, but it completely prevented the protective effect of clonidine (Fig. 3).

4. Finally, we evaluated the effect of moxonidine which has higher affinity for imidazoline I1Rs than for α_2 -ARs (Smith and Aston-Jones, 2011). We expected a similar beneficial effect as in the case of clonidine, but interestingly moxonidine failed to inhibit the development of indomethacin-induced intestinal damage, and it even aggravated the weight loss of animals (Fig. 5).

Discussion

This study demonstrates for the first time that NSAID-induced intestinal damage can be effectively inhibited by the mixed α_2 -AR/I1R agonist clonidine. Interestingly, this protection could not be achieved by moxonidine, which has a similar, but not identical, receptor selectivity profile. While clonidine has comparable affinity for the α_2 -ARs and I1Rs, moxonidine has higher affinity (~ 40-fold) for the latter one (Smith and Aston-Jones, 2011). Finally, the protective effect of clonidine was almost completely inhibited by the α_2 -AR antagonist yohimbine, which has no relevant effect on I1Rs (Szabó, 2002). From these results we drew the following conclusions:

1. α_2 -ARs and I1Rs may have opposite effects in the intestines, namely activation of α_2 -ARs confers protection, while activation of I1Rs aggravates NSAID-induced intestinal damage,
2. the α_2 -AR-mediated protection dominates, when clonidine is given in medium dose (0.1 mg/kg), but this protection declines, when a higher dose (1 mg/kg) is used, due to the activation of I1Rs,
3. moxonidine in all tested doses activates I1Rs, which masks its potential protective effect mediated by α_2 -ARs.

Fig. 6 summarizes our concept based on the results. However, further studies with other ligands are necessary to confirm this hypothesis.

References

- Blandizzi C. (2007) *Neurochem Int.* 51, 282-288.
Glavin G.B. and Smyth D.D. (1995) *Br J Pharmacol.* 114, 751-754.
Goldstein L. et al. (2007) *Aliment Pharmacol Ther.* 25, 1211-1222.
Graham D.Y. et al. (2002) *Arch Intern Med.* 162, 169-175.
Graham D.Y. et al. (2005) *Clin Gastroenterol Hepatol.* 3, 55-59.
Gyires K. et al. (2000a) *Eur.J.Pharmacol.* 396, 131-135.
Gyires K. et al. (2000b) *Neuropharmacology* 39, 961-968.
Gyires K. et al. (2007) *Neurochem.Int.* 51, 289-296.
Gyires K. and Zádori Z.S. (2014) *Curr Opin Pharmacol.* 19, 24-30.
Hawkey C.J. et al. (1998) *N Engl J Med.* 338, 727-734.
Houli N. et al. (1987) *Eur J Pharmacol.* 144, 67-76.
Molderings G.J., et al. (1998) *J Pharmacol Exp Ther.* 285, 170-177.
Raasch W. et al. (1995) *Life Sci.* 56, 2319-2330.
Satoh H. and Takeuchi K. (2012) *Curr Med Chem.* 19, 82-89.
Smith R.J. and Aston-Jones G. (2011) *Biol Psychiatry* 70, 712-719.
Szabó B. (2002) *Pharmacology & Therapeutics* 93, 1- 35.
Wallace J.L. et al. (2011) *Gastroenterology* 141, 1314-1322.
Wikberg J.E. et al. (1991) *Eur J Pharmacol.* 193, 335-340.
Zádori Z.S. et al. (2011). *Eur.J Pharmacol.* 669, 115-120.
Zádori Z.S. et al. (2014) *Brain Res Bull* 108, 51-59.

List of publications

Zádori Z.S. , Tóth V.E., Fehér Á., Holzer P., Gyires K. Analysing the role of alpha2- and imidazoline receptors in the pathomechanism of NSAID-induced intestinal ulcers. 57th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, 2015. 05. 30 – 2015. 06. 02., Siófok

The results will also be published in an international journal (paper is under preparation).

Abschlussbericht

Weitere Fragen zu den Ergebnissen:

1. Nutzung und Verbreitung der Ergebnisse:

Welchen konkreten Nutzen konnten Sie und Ihr Kooperationspartner aus dem Projekt gewinnen. Bitte denken Sie insbesondere an Publikationen, Experimente, gemeinsame Seminare, Sommerschools und/oder an eine anderweitige Umsetzung in die Praxis.

Both the Austrian and Hungarian partners have greatly profited from the joint project. Dr. Fehér and Dr. Tóth spent 5-5 days in Graz in order to improve the methodological quality of the studies. The senior members, Dr. Zádori, Prof. Gyires and Prof. Holzer visited the partner institutes to give lectures and to discuss the progression of the project. Dr. Zádori presented the results in the 57th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology. Moreover, the results of the joint project will be published in an international journal (the manuscript is under preparation).

2. Durchführung:

Welche konkrete Änderungen gegenüber der Planung ergaben sich hinsichtlich Inhalte und Mitarbeit/Anzahl der Teilnehmer während des Projektverlaufes?

According to the original proposal we planned to evaluate the development of intestinal ulcers 3 days after the oral administration of indomethacin, but due to the high rate of mortality we had to modify the protocol and use a shorter interval (2 days) between the induction and evaluation of ulcers. Secondly, we also planned to use AGN 192403, which according to the literature is a selective I1R antagonist. However, in two of our other projects it behaved as a partial agonist, therefore we decided not to combine it with clonidine and moxonidine.

3. Bewertung:

Bitte führen Sie besonders positive, aber auch negative Beobachtungen und Erfahrungen an. Ev. langfristige Auswirkungen Ihres Projektes?

Our results demonstrate for the first time that activation of α_2 -ARs can inhibit the development of indomethacin-induced intestinal injury in rats. This data suggests that α_2 -AR agonists may be useful tools in the treatment of NSAID-induced intestinal ulcers in humans as well, but further preclinical and clinical studies are required to prove it.

Interestingly, moxonidine failed to induce protection, which might be due to its higher affinity to imidazoline I1 receptors. Unfortunately, this remains merely a hypothesis, because due to the lack of highly selective I1 receptor antagonists in the frame of the present project we could not establish the exact role of these receptors in the pathomechanism of intestinal ulcers. (As described above, originally we planned to use AGN 192403 as a neutral I1R antagonist, but after the start of this project it turned out that this compound (in contrast to most studies) behaves as a partial agonist.) We plan to use various other compounds with different α_2 -AR/I1R selectivity to confirm our hypothesis.

4. Perspektiven:

Hat sich eine Fortführung der Kooperation ergeben?

- a. Welche geplante Fortführung gibt es?
- b. Welche konkrete Fortführung gibt es?

We plan to use various other compounds with different α_2 -AR/I1R selectivity to confirm our hypothesis. In the first step, we will combine clonidine and moxonidine with efaroxan, which is a mixed α_2 -AR/I1R antagonist (with higher selectivity for I1Rs).

5. Verbesserungsvorschläge:

Nenne Sie uns, Bitte, Verbesserungsvorschläge, wie Sie Ihre Arbeit oder wie wir unseren Service besser gestalten könnten?

We were absolutely satisfied with the Austrian-Hungarian Action Foundation and are planning to apply for further projects in the future.

Datum: 2015.07.27.

Prof. Dr. Klára Gyires
Antragsteller (Unterschrift)

Prof. Dr. Peter Holzer
Projektpartner (Unterschrift)