

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A kén-hidrogén protektív hatásmechanizmusainak vizsgálata TNBS-
indukált patkány colitis modellben**

Török Szilvia Ágnes

Témavezető:

Dr. Kupai Krisztina

tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék



2022

Szeged

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke	4
3. Bevezetés.....	8
3.1. Az immunrendszer és a gyulladás	8
3.2. A gasztrointesztinális rendszer és immunrendszere	9
3.3. A gyulladásos bélbetegségek jellemzése	9
3.4. Az IBD epidemiológiája	11
3.5. Az IBD patogenezise	11
3.5.1. Genetikai, környezeti, mikrobiális tényezők és immunológiai folyamatok IBD-ben	11
3.5.2. Az oxidatív stressz szerepe az IBD patogenezisében	15
3.5.3. A hemoxigenáz enzimrendszer	17
3.6. A NETózis	20
3.6.1. A neutrofilek általános jellemzése	20
3.6.2. A NETózis felfedezése	21
3.6.3. A NETózis folyamata	22
3.7. Az IBD terápiája	25
3.8. Az IBD állatkísérletes modellezése.....	29
3.9. A kén-hidrogén (H ₂ S).....	29
3.9.1. A H ₂ S biológiai szerepének felfedezése.....	29
3.9.2. A H ₂ S endogén képződése, bomlása és raktározása biológiai rendszerekben	30
3.9.3. A H ₂ S biológiai szerepe, anti-inflammatorikus hatása	32
3.9.4. H ₂ S donorok.....	34
4. Célkitűzések	36
5. Anyagok és módszerek.....	37
5.1. Felhasznált állatok	37
5.2. Anyagok összeállítása	37
5.3. A TNBS által kiváltott patkány colitis modell és a H ₂ S donor kezelések kísérletes elrendezése	37
5.4. A gyulladás mértékének meghatározása colonban	39
5.5. A pro-inflammatorikus MPO enzim aktivitásának meghatározása.....	39
5.6. A TNF- α és a HO-1 szintjének meghatározása ELISA módszerrel.....	39
5.7. A HO enzim aktivitásának meghatározása colonban	40
5.8. A H ₂ S termelő enzimek, a NETózis markerek, valamint az inflammatorikus mediátorok expressziójának vizsgálata Western blot módszerrel	40

5.9. Fehérjetartalom mérése Bradford módszerrel.....	42
5.10. Statisztikai analízis	42
6. Eredmények	43
6.1. A H ₂ S termelő enzimek: a CSE és CBS expressziójának alakulása TNBS-indukált colitis modellben	43
6.2. A különböző dózisu H ₂ S donor kezelés hatása a gyulladás kiterjedtségének mértékére TNBS-indukált colitis modellben	43
6.3. Az MPO enzim aktivitásának változása a H ₂ S kezelések hatására TNBS-indukált colitis modellben	45
6.4. Az exogén H ₂ S hatása az anitoxidáns HO-1 enzim szintjére és a HO aktivitásra TNBS által indukált gyulladásban	46
6.5. Lézió kiterjedtségének vizsgálata a HO-1 inhibitor SnPP kezelést követően TNBS-indukált colitis modellben	47
6.6. A PAD4 és a citH3 NETózis markerek expressziójának változása H ₂ S kezelés hatására TNBS-indukált gyulladásban.....	48
6.7. Az MPO, mint NET komponens expressziójának változása H ₂ S kezelést követően colitis modellben	49
6.8. A H ₂ S donor kezelés hatása a gyulladásos mediátorok: a HMGB1 és az NF-κB p65-ös alegységének expressziójára.....	50
6.9. A pro-inflammatórikus citokin TNF-α szintjének változása H ₂ S donor kezelést követően colonban.....	51
6.10. Az UCHL-1 expressziójának változása H ₂ S kezelést követően TNBS-indukált colitis modellben	52
7. Diskusszió	54
8. Tartalmi összefoglaló	62
9. Summary	65
10. Köszönetnyilvánítás.....	68
11. Irodalomjegyzék	69
12. Tudományos közlemények listája	81

2. Rövidítések jegyzéke

3MST: 3-merkaptopiruvát-szulfurtanszferáz

5-ASA: 5-amino-szalicilsav

AAT/CAT: aszpartát-/cisztein-aminotranszferáz

Akt: protein kináz B

AMPK: AMP-aktivált protein-kináz

ANOVA: varianciaanalízis (analysis of variance)

AP-1: aktivátor protein-1

ARE: antioxidáns válaszelem

ATP: adenzin-5'-trifoszfát

Bach1: BTB and CNC homology protein 1

BSA: szarvasmarha szérum albumin

cAMP: ciklikus adenzin-monofoszfát

CBS: cisztationin β -szintáz

CCL2: CC kemokin ligand 2

CD: Crohn betegség

citH3: citrullinált hiszton H3

cGMP: ciklikus guanozin-monofoszfát

CMC: karboximetil-cellulóz

CO: szén-monoxid

COX2: ciklooxygenáz 2

CSE: cisztationin γ -liáz

CU: colitis ulcerosa

CXCL8: C-X-C kemokin ligand 1

DADS: diallil-diszulfid

DAMP: veszély asszociált mintázat

DSS: dextrán-nátrium-szulfát

DTT: ditiotreitól

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

ERK: extracelluláris szignál által regulált kináz

EtOH: etanol

GALT: bélhez kapcsolódó limfoid szövet

GI: gasztrointesztinális rendszer
Gpx: glutation peroxidáz
GSDMD: gasdermin D
GSH: glutation
H₂O₂: hidrogén-peroxid
H₂S: kén-hidrogén
HCO₃⁻: hidrogén-karbonát
HEPES: N-(2-hidroxietyl) piperazin-N'-(2-etánszulfonsav)
HETAB: hexadeciltrimetilammónium-bromid
HIF1 α : hipoxia indukálta faktor 1 alfa
HMGB1: high mobility group box 1
HO: hemoxigenáz
HO-1: hemoxigenáz-1
HO-2: hemoxigenáz-2
HO-3: hemoxigenáz-3
HOCl: hipoklórossav
HRP: tormaperoxidáz
i.c.: intracolónális
IBD: gyulladásoos bélbetegségek (Inflammatory Bowel Diseases)
IFN γ : interferon γ
IL-1, -4, -5, -6, -10, -12, -13, -17, -18, -21, -22, -23: interkeukin-1, -4, -5, -6, -10, -12, -13, -17, -18, -21, -22, -23
iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz
i.p.: intraperitónéális
 κ B: inhibítor kappa B
Keap1: Kelch-féle ECH-asszociált fehérje 1
LPS: lipopoliszacharid
MAPK: mitogén-aktivált protein kináz
MEK: mitogén aktivált/extracelluláris szignál regulált kináz kináz
MMP: metalloproteináz
MMX: multimátrix
MPO: mieloperoxidáz
Na₂S: nátrium-szulfidot
NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

NaHS: nátrium-hidroszulfidot
NE: neutrofil elasztáz
NET: neutrofil extracelluláris csapda (Neutrophil Extracellular Trap)
NF- κ B: nukleáris faktor kappa B
NO: nitrogén-monoxid
NO \cdot : nitroxil-anion
NOS: nitrogén-monoxid-szintáz
NOX: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-oxidáz
Nrf2: nukleáris faktor eritroid 2-vel összefüggő faktor 2
NSAID: nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek
O $^{2-}$: szuperoxid anion
OD: optikai denzitás
OH \cdot : hidroxil anion
ONOO \cdot : peroxinitrit
PAD: peptidil-arginin-deimináz
PAD2: peptidil-arginin-deimináz 2
PAD4: peptidil-arginin-deimináz 4
PAMP: patogén asszociált molekuláris mintázat
PI3K: foszfatidilinozitol 3-kináz
PMA: forbol-12-mirisztát-13-acetát
PMSF: fenilmetilszulfonil-fluorid
PKC: protein kináz C
PRR: mintázat felismerő receptor
ROS: reaktív oxigén származékok
RNS: reaktív nitrogén származékok
SAM: S-adenozil-metionin
SASP: szulfaszalazin
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
S.E.M.: standard error of mean
SnPP: ón-protoporfirin
SOD: szuperoxid-dizmutáz
SQR: szulfid-kinon-reduktáz
Stat3: Signal transducer and activator of transcription protein 3
SUMO: small ubiquitin-like modifier

TBS-T: Tween20 tartalmú Tris-pufferelt sóoldat
Th1: helper T1 sejt
Th2: helper T2 sejt
Th17: helper T17 sejt
TLR: toll-like receptor
TLR2: toll-like receptor 2
TLR4: toll-like receptor 4
TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav
TNF- α : tumor nekrozis faktor α
UCHL-1: ubiquitin C-terminális hidroláz L1
ZPP: cink-protoporfirin
 β -NADPH: β -nikotinamid-adenin-dinukleotid-2'-foszfát

3. Bevezetés

3.1. Az immunrendszer és a gyulladás

Az immunrendszer feladata a szervezet saját és idegen struktúráinak megkülönböztetése, illetve a szervezet védelme a behatoló kórokozók, káros anyagok, illetve a saját sérült sejtjei és molekulái ellen. Ezt a védelmi funkciót a veleszületett (natív) és a szerzett (adaptív) immunitás látja el. Káros stimulus hatására elsőként a veleszületett immunitás sejtjei (monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, granulociták, hízósejtek és természetes ölősejtek) aktiválódnak. Ilyen vészjelek a szervezetbe kerülő mikrobák, illetve az őket felépítő anyagok, az úgynevezett patogén asszociált molekuláris mintázatok (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), valamint a sérülések és a kóros folyamatok, vagyis a veszély asszociált mintázatok (danger-associated molecular pattern, DAMP), melyeket az immunsejtek a mintázat felismerő receptoraikkal (PRR) ismernek fel [1]. A szerzett immunitás aktivációja a veleszületett immunitásra épül, immunsejtjei (T és B sejtek) specifikus antigéneket ismernek fel és indukciót követően a válaszreakció több nap alatt jön létre. Immunsejtjeinek egy része memóriasejtté differenciálódik lehetővé téve ismételt fertőzés alkalmával a gyorsabb és hatékonyabb immunválaszt [2].

A gyulladás a szervezet fertőzésekre, toxikus anyagokra és szöveti sérülésekre adott válasza. Az akut gyulladásos folyamatok során a PAMP/DAMP felismerését követően a makrofágok, a dendritikus sejtek vagy a hízósejtek inflammatórikus mediátorokat szabadítanak fel. Ide tartoznak a pro-inflammatórikus (gyulladáskeltő) citokinek, mint például a tumor nekrozis faktor α (TNF- α), az interleukin (IL)-1, -6 és a kemokinek, mint a CC kemokin ligand 2 (CCL2) és a C-X-C kemokin ligand 1 (CXCL8). Az aktiválódott immunsejtek által termelt mediátorok további immunsejteket, mint például fagocitáló neutrofil granulocitákat (neutrofilek) aktiválnak és toboroznak a gyulladás helyszínére. A fokozott citokin termelés gyulladásos szignalizációs útvonalak indukálásával hozzájárul a védekező mechanizmusok kialakulásához [3]. A káros behatás hosszabb idejű jelenléte esetén a veleszületett immunitás antigénprezentáló sejtjei aktiválják a szerzett immunitás T és B sejtjeit, amelyek specifikus immunválaszt hoznak létre. Azonban, ha az immunrendszer indukcióját kiváltó stimulus állandósul vagy az immunsejtek nem képesek eliminálni, illetve kontrollálatlan gyulladásos és autoimmun folyamatok (autoreaktív T sejtek) jelennek meg a szervezetben, szövetkárosodás léphet fel és számos krónikus gyulladásos betegség kialakulásához vezethet [4].

3.2. A gasztrointesztinális rendszer és immunrendszere

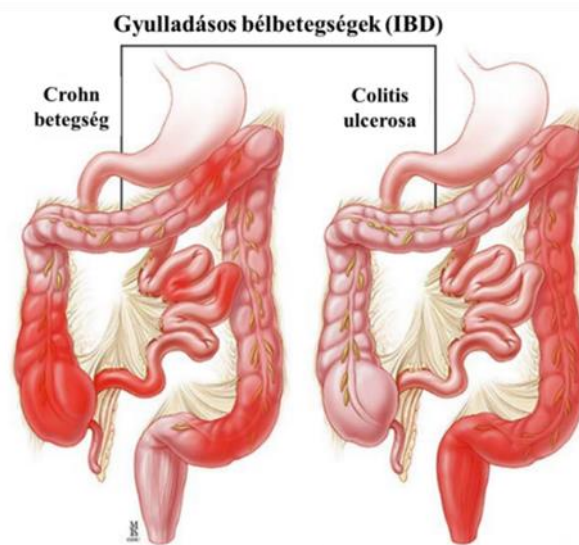
A gasztrointesztinális (GI) rendszer a szájnyílástól a végbélnyílásig tart. A GI traktus falát a nyelőcső alsó harmadától kezdve szövettanilag 4 fő réteg alkotja, melyek a lumentől kifelé haladva a következők: a tunica mucosa, a tunica submucosa, a tunica muscularis és a tunica serosa. A mucosát vagy nyálkahártyát az epithélium, a lamina propria és egy vékony simaizomréteg alkotja. A submucosa laza rostos kötőszövetből, a musculáris réteg pedig körkörös és hosszanti simaizomrétegekből áll. A külső serosa réteg kötőszövetből és laphámsejtekből épül fel. A submucosában helyezkedik el a plexus submucosus (Meissneri-féle idegfonat), a körkörös és hosszanti izomréteg között pedig a plexus myentericus (Auerbach-féle idegfonat), az enterális idegrendszer részei [5].

A GI rendszer a táplálék felvétele, emésztése és a tápanyagok felszívása mellett a szervezet legnagyobb immunszerve is. Az intesztinális mucosa folyamatosan ki van téve a táplálkozás során bekerült idegen anyagoknak, antigéneknek és mikroorganizmusoknak. A homeosztázis fenntartását a bélhez kapcsolódó limfoid szövet (GALT) biztosítja [6]. Feladata egyrészt a kórokozók elleni védelem, másrészt a táplálék antigének, illetve a kommenzális mikroorganizmusok tolerálása és a túlzott immunválasz megakadályozása. A gyulladásos betegségek kialakulását indukáló genetikai és környezeti tényezők hatására azonban sérül a bél epithéliális barriere, ami lehetővé teszi a patogének, antigének transzlokációját. Ennek következtében gyulladásos folyamatok indulnak el a bél falában, amely krónikussá válhat. Továbbá, a bél immunrendszerének zavara, a normál bélflórával szembeni tolerancia megszűnése szintén kóros folyamatokat indukál [7].

3.3. A gyulladásos bélbetegségek jellemzése

A gyulladásos bélbetegségek (Inflammatory Bowel Diseases, IBD) a GI rendszert érintő, krónikus lefolyású gyulladásos kórképek összefoglaló neve. Az IBD két leggyakrabban előforduló formája a Crohn betegség (CD) és a colitis ulcerosa (CU). Az IBD diagnosztikája komplex folyamat, amely magában foglalja az anamnézis felvételét, laboratóriumi és hisztológiai vizsgálatokat, képalkotó-, illetve endoszkópos eljárásokat. A differenciáldiagnosztika célja a CD és CU elkülönítése, továbbá az IBD megkülönböztetése egyéb betegségektől, mint például az irritábilis bélszindróma, a laktóz intolerancia és egyéb autoimmun kórképek [8, 9]. A CD és CU tünetei és lefolyásuk tekintetében hasonlóak, azonban különböző epidemiológiai adatokkal és klinikai manifesztációkkal jellemezhetők.

Mindkét betegség esetében megfigyelhető tünetek a krónikus hasmenés, a hasi fájdalom, a súlyvesztés és a láz, valamint a gyulladásos folyamatok következtében kialakuló ödémás, fekélyes elváltozások. A betegségek időszakos megjelenésűek, a relapszusok és remissziók ciklikus váltakozása jellemzi [10, 11]. A CD esetében a gyulladás a GI traktus bármely szakaszát érintheti, a szájnyílástól kezdve az anusig. Leggyakrabban az ileum disztális területén, illetve a colonban jelentkezik [12]. A gyulladás nem összefüggő, az érintett területek között ép bélszakaszok ún. „skip léziók” is előfordulnak. Továbbá, a gyulladás transzmurális jellegű, vagyis a bélfal minden rétegét érinti. A betegség során szövetmegvastagodás, fibrotikus szűkületek jelenhetnek meg, valamint ha a gyulladás átnyúlik a serosa rétegen az érintett bélszakasz összetapadhat más bélszakaszokkal vagy esetleg belső szervekkel, ami súlyos szövődményekhez, sipolyok (fisztulák), sipolyjáratok vagy tályogok képződéséhez vezethet [13]. A CU esetében a gyulladás összefüggő, a colonra lokalizálódik rectum érintettséggel és csak a mucosa, esetleg a submucosa rétegét érinti (1. ábra). A CD-vel ellentétben a súlyos szövődmények kialakulásának esélye kisebb. Jellemző tünete a hasmenés és a véres, nyákos széklet. Kiterjedt, súlyos betegség esetén előfordulhat komoly vérzés és a vastagbél kóros kitágulása [14]. A hosszútávon fennálló (8-10 év) CU-ban és a vastagbelet érintő CD-ben szenvedő pácienseknél megnő a daganatos elváltozások kialakulásának kockázata is. Az IBD esetében a gyulladásos folyamatok következtében a bélrendszeren kívül ún. extraintesztinális manifesztációk is megjelenhetnek, mint például az ízületi arthritisek és arthralgiák, bőrbetegségek, látási zavarok és a szklerotizáló cholangitis [11].



1. ábra. A gyulladásos bélbetegségek két fő típusa

(Forrás: <https://www.colorectalcentre.co.uk/inflammatory-bowel-disease.html>, módosítva)

3.4. Az IBD epidemiológiája

Az IBD előfordulása jelentősen megemelkedett az elmúlt évtizedekben és egyre inkább globális egészségügyi problémát jelent. Epidemiológiai adatok alapján a betegség prevalenciája (a betegség gyakorisága egy adott időpontban az adott populációban) jelenleg a gazdaságilag fejlett országokban a legmagasabb, – Észak-Amerika, Észak- és Nyugat-Európa, valamint Ausztrália területén – akár a 0,5%-ot is elérheti. Az IBD incidenciája (az új megbetegedések gyakorisága egy adott időpontban) ugyanakkor stagnálni látszik ezekben az országokban. Az újonnan iparosodott, fejlődő országokban (Dél-Amerika, Kelet-Európa, Ázsia és Afrika területén) a betegség prevalenciája ugyan még alacsony, azonban az incidenciája gyorsan növekszik [15, 16]. Az IBD kialakulása és diagnózisa elsősorban 15 és 30 éves kor közé tehető, azonban mind a CD, mind a CU esetében 50 és 70 éves kor között kisebb arányban egy második csúcspont is megfigyelhető [17]. A CU inkább nem esetében hasonló gyakorisággal fordul elő, míg a CD jellemzően a nőket érinti [8, 18].

3.5. Az IBD patogenezeise

3.5.1. Genetikai, környezeti, mikrobiális tényezők és immunológiai folyamatok IBD-ben

Annak ellenére, hogy az IBD intenzív kutatások tárgyát képezi, etiológiája még nem teljesen ismert. Egyre inkább tisztázott azonban, hogy a betegség multifaktoriális eredetű, több tényező – a genetikai predispozíció, bizonyos környezeti faktorok, immun diszreguláció, illetve a mikrobiom – egymással kölcsönhatva vesz részt az IBD kialakulásában [19, 20]. Jelenlegi ismereteink szerint a genetikailag fogékony egyéneknél bizonyos környezeti tényezők hatására fokozott T-sejtes immunválasz jön létre a bélflóra egy része ellen [21].

A genetikai hajlam jelentőségét az IBD patogenezisében a családi előfordulás gyakoriságának elemzése, illetve az ikervizsgálatok bizonyították. Családon belüli esetek aggregációja alapján kimutatták, hogy az IBD-ben szenvedő betegek 5-23%-ának van a betegséggel érintett közvetlen rokona [22]. Ikertanulmányok során megfigyelték, hogy az egypetéjű ikreknél gyakoribb a betegség együttes megjelenése, a CD esetében 30-40%, CU esetén 10-15%. Kétpetéjű ikreknél a betegségek kevesebb, mint 10%-ában jelentkeznek mindkét egyénben [22-24]. A genetikai elemzések számos olyan gént azonosítottak, melyek mutációja és polimorfizmusa szerepet játszhat az IBD patogenezisében [23, 25]. A genetikai variánsok egy része az IBD mindkét formájában előfordul, más része csak CD vagy CU specifikus [26]. A CD-vel kapcsolatban a NOD2/CARD gén, valamint az autofágiával kapcsolatos ATG16L1 és IRGM gének mutációi mutattak összefüggést. Az IL23R gén

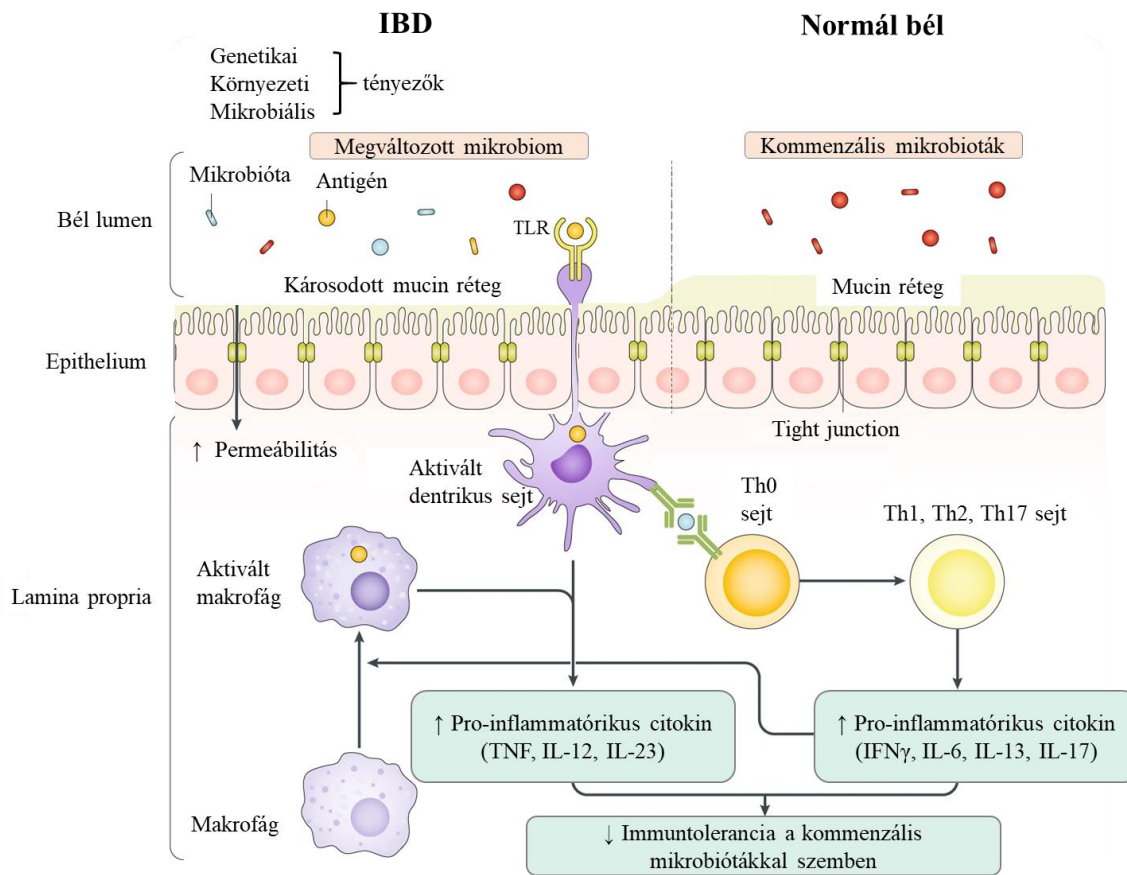
variációi szintén jelentős szerepet játszanak az IBD és egyéb autoimmun betegségek patogenezisében [19, 27].

A genetikai hajlam mellett, a környezeti faktorok is jelentős szerepet játszanak az IBD kialakulásában. A betegség patogenezise szempontjából kockázati tényezőnek tekinthető többek között a dohányzás, a helytelen táplálkozás, bizonyos gyógyszerek fogyasztása és a stressz. Ezek közül leginkább a dohányzás és az IBD kapcsolatát vizsgálták. Számos kutatás igazolta, hogy a dohányzók körében magasabb a CD kialakulásának kockázata, ezzel ellentétben CU esetén a dohányzás csökkenti a betegség iniciációjának esélyét, valamint kedvezően befolyásolja annak lefolyását: a relapszusok, a szteroid kezelések és a kolektómia arányának redukálásával [28-30]. Az étrenddel kapcsolatban a magas cukor- és zsírtartalmú ételek bevitelét, az alacsony zöldség- és gyümölcsfogyasztást, valamint az adalékanyagok használatát hozták összefüggésbe az IBD kialakulásának magas kockázatával [31-33]. Továbbá, a csecsemőkori anyatejes táplálás hiánya szintén növeli a bélbetegségek kialakulásának rizikóját [34]. Egyes tanulmányok alacsony D vitamin szintet mutattak ki az IBD-ben szenvedő páciensek esetén [35], a D vitamin szupplementációja pedig jótékony hatással lehet a betegség lefolyására [36]. A gyógyszeres kezelések közül az antibiotikumok használata kiemelt kockázatot jelenthet az IBD szempontjából, mivel csökkentheti a bélflóra diverzitását. Az első életévben alkalmazott antibiotikum terápia negatívan befolyásolhatja a mikrobiom és a bél immunrendszerének fejlődését, ami később az IBD kialakulásához vezethet [37]. Bizonyított tény, hogy a nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (NSAID) rendszeres és hosszútávú alkalmazása növeli a mind a CD, mind az CU kockázatát, illetve fekélyes elváltozásokat okozhat a GI rendszerben [38, 39]. Fokozott rizikót jelenthet még a fogamzásgátlók használata is [40]. Ezenkívül, az ún. higiénia hipotézis szerint az urbanizáció következményeként csökkent az egyéneket érő mikrobiális expozíció, ami szintén összefüggésbe hozható az IBD-vel [41].

Továbbá, a normál vagy megváltozott bélflórára adott nem megfelelő immunválasz is hozzájárul az IBD kialakulásához. Számos tanulmány igazolta az IBD-ben szenvedő páciensek megváltozott mikrobiom összetételét a normál állapothoz képest [42, 43]. Az egészséges bélflórában a Firmicutes és Bacteroides törzsek dominálnak, míg CD esetében ezek mennyisége csökkent, továbbá CU-ban a Clostridium fajok redukciója és fokozott *Escherichia coli* (*E. coli*) előfordulás figyelhető meg [44]. A fentebb említett környezeti tényezők közül a helytelen étrend, az antibiotikum terápia, a higiénés körülmények javulása, valamint az anyatejes táplálás hiánya mind negatívan befolyásolhatják a mikrobiális flóra diverzitását. Az IBD kialakulásával kapcsolatban számos patogén részvétele is felmerült, mint például a *Mycobacterium avium*

paratuberculosis [45], a *Listeria monocytogenes* [46] és az *E. coli* [44], azonban etiológiai szerepük nem egyértelműen bizonyított [47].

A GI rendszer immunológiai folyamatai és mediátorai jelentős szerepet játszanak az IBD patogenezisében. Az IBD mindkét típusánál megfigyelhető a veleszületett és a szerzett immunitás diszfunkciója, melynek hatására rendellenes immunválasz jön létre. Az immunsejtek túlzott aktivációja következtében a pro- és anti-inflammatórikus mediátorok közötti egyensúly felborul és a gyulladásos folyamatok irányába tolódik el. A gyulladáskeltő citokinek, többek között az IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-23 és a TNF- α expressziója gyulladásos kaszkádot indít el és a mucosa krónikus gyulladásához és szöveti károsodáshoz vezet [48]. A szerzett immunitás specifikus válaszreakciója nagyban függ a T sejtek számától és típusától. Az IL-12 által indukált helper T1 (Th1) sejtek nagy mennyiségben termelnek interferon γ -t (IFN γ), míg a helper T2 (Th2) sejtek IL-4-et, IL-5-öt és IL-13-at szabadítanak fel. Sokáig úgy gondolták, hogy a CD-re a rendellenes Th1 immunválasz jellemző, a CU-t pedig a Th2 által indukált gyulladással hozták összefüggésbe. Azonban, egyes tanulmányok eredményei alapján ez az elmélet megdőlni látszik, mivel a helper T17 (Th17) sejtek szerepe is felmerült az IBD-vel kapcsolatban [49]. Ezek a sejtek indukciót követően IL-17A, IL-17F, IL-21 és IL-22 citokineket szabadítanak fel, melyek fokozott expresszióját mind a CD, mind a CU esetében kimutatták [50, 51]. Az IBD patogenezisének vázlatát a 2. ábra szemlélteti.



2. ábra. A gyulladásos bélbetegségek (IBD) patogenezeise

TLR: toll-like receptor, Th: T helper sejt, TNF: tumor nekrozis faktor, IL: interleukin, IFN γ : interferon γ
(Forrás: Khalili és mtsai., 2018, módosítva [52])

Számos gyulladásos mediátor részvétele igazolt az IBD kialakulásában. Az egyik ilyen mediátor a high mobility group box 1 (HMGB1) nem-hiszton fehérje, amely több fiziológiás és patológiás folyamatban részt vesz. A nekrotikus sejtekből vagy az aktivált makrofágokból az extracelluláris térbe felszabaduló HMGB1 a veleszületett és szerzett immunitás sejtjeinek aktiválásával immunválaszt indukál [53]. A HMGB1 diszregulációját számos rendellenességgel összefüggésbe hozták, elsősorban gyulladásos és daganatos megbetegedésekkel [53]. Tanulmányok igazolták, hogy IBD-ben szenvedő páciensek esetében a széklet HMGB1 szintje korrelál a mucosális gyulladás mértékével, ezért biomarkerként szolgálhat a betegség súlyosságát, valamint az alkalmazott terápia hatékonyságát illetően [54].

A nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) egy komplex szerkezetű transzkripciós faktor, amely fontos regulátor szerepet játszik a gyulladásos folyamatok kialakulásában és fokozott aktivációját számos gyulladásos betegségben igazolták, köztük IBD esetében is [55]. Normál körülmények között az NF- κ B az inhibitor kappa B (I κ B) represszorhoz kötődve inaktív állapotban található a citoplazmában. Különböző gyulladást kiváltó stimulus hatására az I κ B

leválik és a transzkripció faktor p50-p65-ös heterodimerje a sejtmagba transzlokálódik, ahol specifikus gének promotor régiójához kötődve indukálja azok transzkripcióját, ezáltal szignalizációs útvonalak iniciációját. Az NF- κ B aktivációja szabályozza számos gyulladáshoz, immunregulátor, anti-apoptotikus, sejtciklus szabályozó gén transzkripcióját [56]. Gyulladásos folyamatokban gyulladáskeltő citokinek, kemokinek, adhézión molekulák, mátrix metalloproteinázok (MMP), a ciklooxygenáz 2 (COX2) és az indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) expresszióját indukálja [57]. Az IBD patogenezisében betöltött pro-inflammatorikus szerepe mellett azonban az NF- κ B protektív hatással is bír, mivel hozzájárul az intesztinális epithélium integritásának megőrzéséhez és az immun homeosztázis fenntartásához. Ebből adódóan, habár az NF- κ B gátlása hatékonyan csökkenti a gyulladást IBD esetében, terápiás alkalmazása vitatott [58].

Továbbá, egyre inkább tisztázott, hogy az ubiquitin C-terminális hidroláz L1 (UCHL-1) deubiquitináló enzim szerepet játszik a gyulladáscsökkentő folyamatokban [59, 60]. Az enzim fő feladata az ubiquitin (Ub) monomerek generálása, a proteasómális degradációra megjelölt poliubiquitinált fehérjékről az Ub lánc hasítása, valamint a szabad Ub monomerek megkötése révén azok lizoszómális lebontástól való védelme [61]. Ezenkívül, vaszkuláris simaizomsejtekben kimutatták, hogy az UCHL-1 csökkenti a TNF- α által indukált NF- κ B aktivációt az I κ B deubiquitinálásán keresztül, elkerülve annak proteasómális degradációját [62]. Munkacsoportunk korábbi kísérlete igazolta, hogy az UCHL-1 expressziójának indukálása protektív hatású patkány colitis modellben [60].

3.5.2. Az oxidatív stressz szerepe az IBD patogenezisében

Az oxidatív stressz szintén fontos szerepet játszik az IBD kialakulásában és progressziójában, jelentősen hozzájárul a gyulladáshoz, illetve a sejt- és szövetkárosodáshoz [63]. Oxidatív stressz során az oxidáns-antioxidáns homeosztázis felborul, az egyensúly az oxidánsok irányába tolódik el a védekező antioxidáns rendszerekkel szemben. A sejtek oxigén metabolizmusa során folyamatosan keletkeznek reaktív oxigén származékok (ROS) a szervezetben, többek között olyan szabadgyökök, mint a szuperoxid anion (O_2^-), a hidroxilgyök (OH^\cdot), valamint a nem gyök típusú hidrogén-peroxid (H_2O_2) és a hipoklórossav (HOCl). Továbbá, a nitrogén metabolizmusa révén reaktív nitrogén származékok (RNS) képződnek, ide tartoznak a nitroxil-anion (NO^-) és a peroxinitrit ($ONOO^-$) [64]. Az endogén ROS/RNS-ek az intracelluláris organellekben, elsősorban a mitokondriumban, de a citoszolban és az extracelluláris mátrixban is termelődnek többek között a nikotinamid-

adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH)-oxidázok (NOX), peroxidázok, xantin oxidázok, COX, NOS, valamint a mieloperoxidáz (MPO) enzimek által katalizált kémiai reakciókban [65]. Habár ezeknek a reaktív intermediereknek főleg patológiás jelentőséget tulajdonítanak, megfelelően alacsony koncentrációban számos jelátviteli folyamatban töltnek be fontos szerepet, többek között a fehérje foszforilációban, a transzkripció faktorok aktiválásában, a differenciálódásban és az apoptózisban [66]. A fokozott ROS/RNS képződés azonban a redox egyensúly zavarához vezet súlyos strukturális és funkcionális károsodást okozva számos sejtalkotóban, makromolekulában, különös tekintettel a membrán lipidekben, fehérjékben és a DNS-ben. Az oxidatív stressz elsődleges káros hatása a lipidperoxidáció, melynek során megváltozik a transzmembrán enzimek, transzporterek, receptorok, illetve egyéb membránfehérjék normál működése, melynek következtében fokozódik a membrán permeabilitása, felborul a sejt homeosztázisa. A ROS/RNS-ek a fehérjék hidroxilációja, karboxilációja vagy nitrációja révén módosítják azok funkcióját, valamint kiválthatják a fehérjék degradációját [67]. Az oxidatív stressz mind a nukleáris, mind a mitokondriális DNS-t károsíthatja, ami különböző léziókhöz, génmutációkhoz, illetve akár malignus transzformációhoz vagy sejthalálhoz is vezethet [68]. Továbbá, a ROS/RNS-ek különböző kinázok és transzkripció faktorok, mint például az NF- κ B és az aktivátor protein-1 (AP-1) aktiválásával befolyásolják a pro-inflammatorikus citokinek expresszióját, amellyel gyulladást indukálnak. Az NF- κ B által indukált citokinek, mint a TNF- α és az IL-1 hozzájárulnak a transzkripció faktor további aktiválásához [69], valamint maguk is képesek az endogén ROS termelést indukálni súlyosbítva ezzel a gyulladást és a szöveti károsodás mértékét [64]. Az MMP-k aktiválásával [70], illetve inhibitorainak inaktiválásával, a szabadgyökök szintén károsítják a szöveteket [71]. Továbbá, a ROS-ek részt vesznek a fagocitáló immunsejtek aktiválásában, infiltrációjában és akkumulációjában a gyulladást területen [64]. Az immunsejtek további ROS és gyulladást citokin termelésével növelik azok koncentrációját. Oxidatív stresszt számos környezeti faktor is indukálhat, mint az UV sugárzás, a dohányzás, az alkohol, a gyógyszerek, a táplálékkal bevitt transz-zsírsavak, valamint egyes adalékanyagok, amelyek nagy mennyiségben mind hozzájárulhatnak a mucosális barrier károsodásához és az IBD kialakulásához [72].

A homeosztázis fenntartását, a reaktív intermedierek eliminálását az antioxidáns rendszerek végzik. Antioxidáns hatással rendelkezik számos a táplálékból, például zöldségekből, gyümölcsökből származó ásványi anyag (pl. cink, szelén), vitamin (pl. E- és C-vitamin) [64], valamint a flavonoidok [73]. További nem-enzimatikus antioxidáns endogén termékek a glutation (GSH), a metallothionein, az albumin, a bilirubin, az ubiquinol (redukált

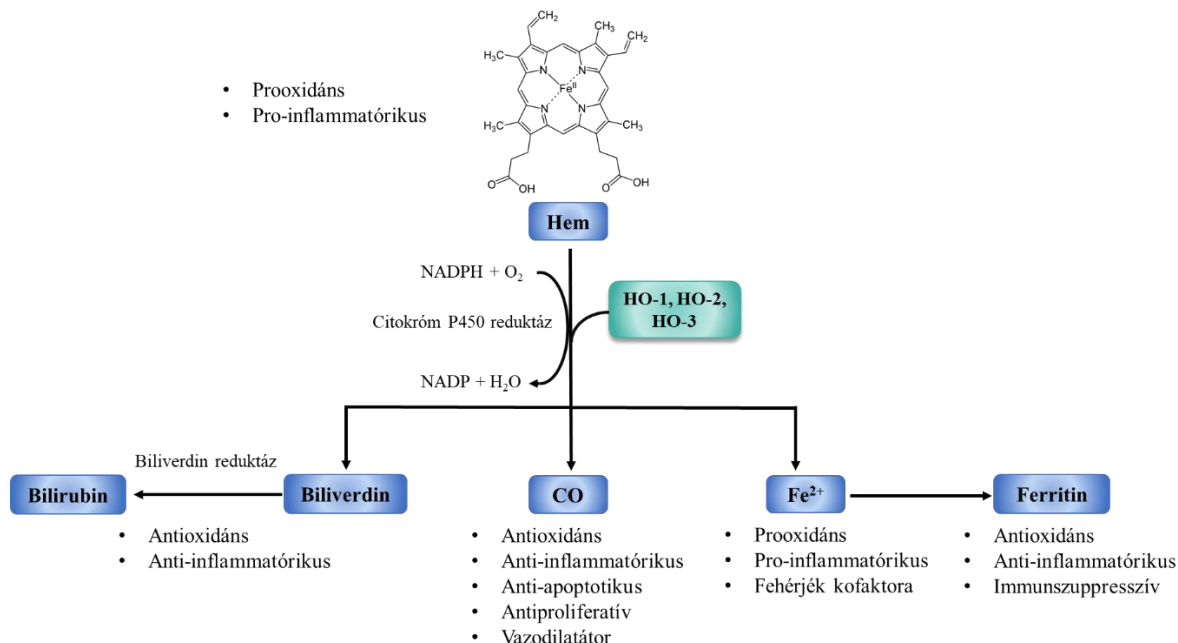
koenzim Q10) és a transferrin [64]. A szervezet oxidatív stressz elleni védelmét elsősorban az antioxidáns enzimek biztosítják. Ide tartozik a O_2^- -t oxigénné és H_2O_2 -dá redukáló superoxid-dizmutáz (SOD), a H_2O_2 vízzé és oxigénné történő átalakulását végző kataláz, valamint a glutation peroxidáz (GPx), amely az általa katalizált reakcióban a GSH-t alakítja át oxidált glutation-diszulfiddá [65].

Tanulmányok igazolták, hogy az IBD korai szakaszában fokozódik a reaktív szabadgyökök termelődése és mennyiségük a betegség súlyosságával és progressziójával korrelál. Ezzel párhuzamosan csökken az antioxidáns enzimek, illetve antioxidánsok szintje [74, 75]. Az oxidatív stressz hatására sérül az intesztinális barrier, amely ennek következtében átjárhatóvá válik az opportunistá patogének számára [76]. Továbbá az oxidatív stressz hozzájárul az IBD jellemző tüneteinek, a hasmenésnek a kialakulásához [77], valamint a fekélyek, súlyosabb esetben az extraintesztinális manifesztációk, mint a fisztulák és az arthritis megjelenéséhez [78]. Mindemellett a ROS-ok DNS károsító hatásának szerepe van a IBD-asszociált daganatos megbetegedések kialakulásában is [79].

3.5.3. A hemoxigenáz enzimrendszer

A hemoxigenázok (HO) jelentős antioxidáns és anti-inflammatórikus hatással bíró enzimek, amelyek a hem degradációját katalizálják. A hem egy vas tartalmú porfirin vázas szerves molekula, ami a vas raktározása mellett számos fontos biológiai funkciót betöltő fehérje prosztetikus csoportját képezi. A hem fehérjék közé tartoznak például az oxigén szállítását, illetve tárolását végző hemoglobin és mioglobin, az elektrontranszport láncban és redox katalízisben részt vevő citokrómok, valamint a ROS-ok katalizálásában fontos katalázok, peroxidázok és oxidázok [80]. A hemet tartalmazó fehérjék degradációja és a hemolízis során keletkezett szabad hem nagy mennyiségben felhalmozódva azonban prooxidáns és pro-inflammatórikus tulajdonságú [81]. A HO enzimek sejtvédő hatásukat egyrészt a felesleges hem lebontásával, másrészt protektív tulajdonságokkal rendelkező termékek generálásával fejtik ki. A HO enzimek által katalizált oxidációs reakcióban a hemből ekvimoláris mennyiségű szén-monoxid (CO), vasion (Fe^{2+}) és biliverdin keletkezik. A biliverdint a biliverdin reduktáz tovább alakítja bilirubinná (3. ábra) [82]. A folyamat során keletkezett CO a szervezet egyik fontos jelátviteli molekulájaként számos élettani folyamatban vesz részt antioxidáns, vazodilatátor [83], anti-apoptotikus [84], illetve anti-inflammatórikus hatása révén [85]. A biliverdin és a bilirubin (alacsony koncentrációban) többek között a szabadgyökök (O_2^- , ONOO $^-$) direkt semlegesítése [86], valamint a gyulladáshoz vezető útvonalak gátlása révén fejtik ki

protektív hatásukat [87]. A szabad Fe^{2+} prooxidáns [64] és gyulladáskeltő tulajdonságú [88], ugyanakkor számos létfontosságú fehérje kofaktora. A felszabaduló Fe^{2+} a ferritinhez kötődik, ami a vas raktározásán kívül szintén fontos antioxidáns, anti-inflammatorikus és immunuszuppresszív hatású [89] (3. ábra).



3. ábra. A HO enzimek által katalizált hem degradáció

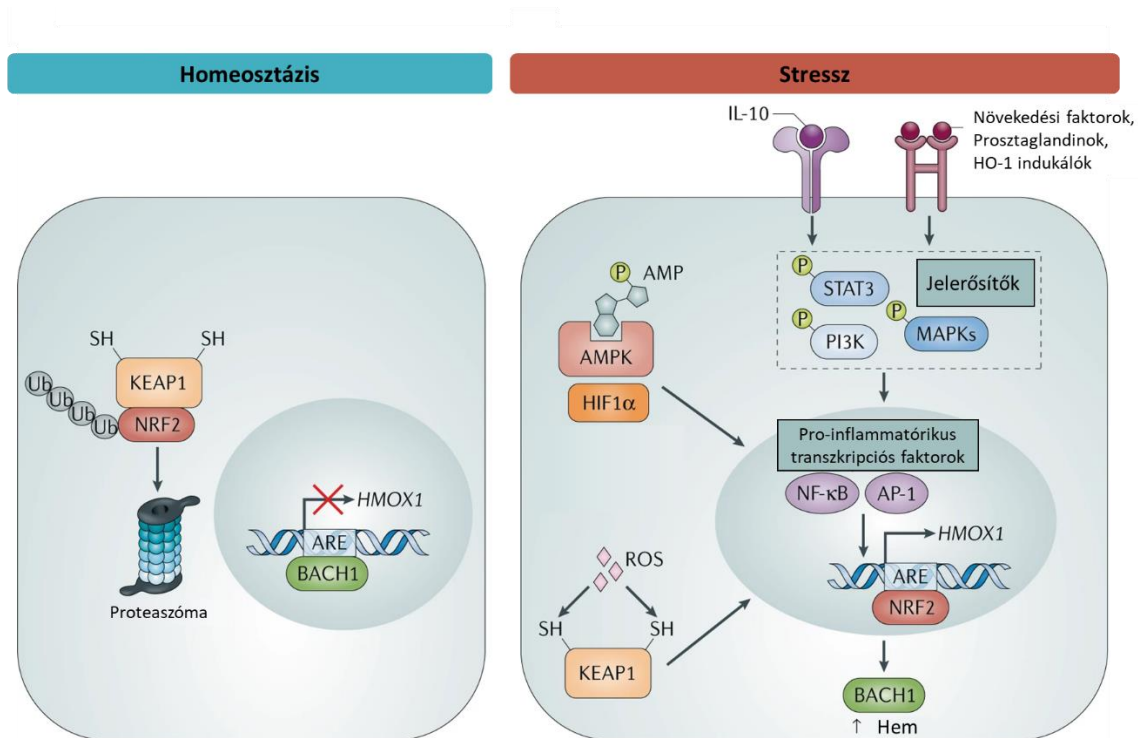
HO-1,-2,-3: Hemoxigenáz-1,-2,-3, CO: szén-monoxid, NADPH: β -nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát

(Forrás: Casales és mtsai., 2021, módosítva [90])

A hem lebontását végző HO enzimek 3 izoformája ismert: (1) a Hsp32 hőszokkfehérjeként is ismert indukálható HO-1, (2) a konstitutívan expresszálandó HO-2, (3) valamint a szintén konstitutív HO-3. A HO-3 feltételezhetően a HO-2 transzkriptjéből származó pszeudogén, amelynek katalitikus aktivitása alacsonyabb és fiziológiai folyamatokban betöltött szerepe még nem teljesen tisztázott [89]. A HO enzimek expressziója és aktivitása eltérő a különböző sejtekben és szövetekben. Fiziológias körülmények között a HO-2 izoforma dominál az agyban, a herékben, a májban, a vesékben és a kardiovaszkuláris rendszerben, míg a HO-1 szintje alacsony vagy hiányzik, csak a lépben és a májban található nagyobb mennyiségben, ahol a vörösvértestek szétesése során felszabaduló hem bontását katalizálja [91]. A HO-2 felelős elsősorban a celluláris hem homeosztázis és a redox folyamatok fenntartásáért, az indukálható HO-1 pedig a citoprotektív hatásért [92].

A HO-1 expresszióját és aktivitását számos tényező indukálhatja, mint az enzim szubsztrátja, a hem, az oxidatív stressz, a különböző pro-inflammatorikus citokinek, a nehézfémterhelés, a hipoxia és a hipertermia. Expressziója elsősorban transzkripció szinten

szabályozott, amelyben a nukleáris faktor eritroid 2-vel összefüggő faktor 2 (Nrf2), a Kelch-féle ECH-asszociált fehérje 1 (Keap1) és a BTB and CNC homology protein 1 (Bach1) játszanak szerepet [82]. Alapállapotban az Nrf2 a Keap1-hez kötődik a citoplazmában, amely gátolja az Nrf2 aktivitását azáltal, hogy elősegíti annak proteasómális ubiquitinálódását és degradációját. Továbbá, a Bach1 represszor a HO-1 gén, a *HMOX1* promoter régiójában található antioxidáns válaszelemhez kötődve (antioxidant response element (ARE)) gátolja a gén transzkripcióját. Oxidatív stressz, illetve a megnövekedett citotoxikus hem koncentráció hatására a hemet kötő Bach1 disszociál a *HMOX1* promoter ARE szegmenséről, valamint a Keap1 cisztein oldalláncainak módosulását követően az Nrf2 felszabadul a gátlás alól. Az Nrf2 a sejtmagba vándorol, ahol ARE-hoz kötődve indukálja a gén transzkripcióját [93]. Habár az Nrf2 és a Bach1 a HO-1 expressziójának elsődleges regulátorai, számos gyulladássos mediátor által aktivált szignalizációs útvonal, például a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK), a foszfatidilinozitol 3-kináz (PI3K), a Stat3 (Signal transducer and activator of transcription protein 3), a tirozin kináz és a protein kináz jelátviteli útvonalak, valamint transzkripció faktor, mint az NF- κ B, az AP-1, a hipoxia indukálta faktor 1 alfa (HIF1 α) is kiválthatja a *HMOX1* transzkripcióját. [93]. A HO-1 expressziójának szabályozását a 4. ábra szemlélteti. A HO-1 emelkedett szintjét számos gyulladássos betegség mellett az IBD esetében is kimutatták [83, 94]. Továbbá, az enzim aktivitásának gátlása cink- (ZPP) vagy ón-protoporfirinnel (SnPP) a gyulladás mértékének növekedését eredményezte kísérletes colitis modellben [95, 96]. Protektív hatásának köszönhetően a HO-1 célzott indukciója potenciális terápiának tekinthető az IBD kezelésében [94].



4. ábra. A hemoxigenáz-1 (HO-1) expressziójának szabályozása

Keap1: Kelch-féle ECH-asszociált fehérje 1, Nrf2: nukleáris faktor eritroid 2-vel összefüggő faktor 2, Bach1: BTB and CNC homology protein 1, ROS: reaktív oxigén származékok, IL-10: interleukin-10, ARE: antioxidáns válaszelem NF-κB: nukleáris faktor-kappa B, AP-1: aktivátor protein-1, AMPK: AMP-aktivált protein-kináz, HIF1α: hipoxia indukálta faktor 1 alfa, Stat3: Signal transducer and activator of transcription protein 3, PI3K: foszfatidilinozitol 3-kináz, MAPKs: mitogén aktivált protein kinázok
(Forrás: Campbell és mtsai., 2021, módosítva [93])

3.6. A NETózis

3.6.1. A neutrofilek általános jellemzése

A neutrofilek a legnagyobb számban előforduló terminálisan differenciált fehérvérsejtek a keringésben. A jellegzetes szegmentált sejtmaggal és neutrálisan festődő citoplazmatikus granulumokkal rendelkező, rövid élettartamú sejtek a csontvelőben keletkeznek, majd a véráramba kerülnek, míg végül programozott sejthalállal pusztulnak el. A veleszületett immunitás sejtselemeiként a szervezet első vonalbeli védelmét jelentik a patogénekkal szemben, valamint jelentős szerepet játszanak a gyulladásos folyamatok és mind a veleszületett, mind az adaptív immunválasz szabályozásában [97]. Fertőzésre vagy gyulladásra utaló szignálok hatására a neutrofilek az érfalon keresztül az intersticiális térbe kilépve a gyulladás helyére vándorolnak. Számos sejtfelszíni receptorral rendelkeznek, ilyenek a különböző PRR-ok, mint például a toll-like receptorok (TLR), az immunoglobulinnal vagy komplement

komponensekkel opszonizált patogéneket felismerő Fc γ és komplement receptorok, illetve a citokin receptorok. Az említett receptorokkal felismerik és megkötik a patogéneket, a sejtkárosodás során felszabaduló anyagokat és a különböző immunsejtek (például makrofágok) által kibocsátott gyulladáshoz kapcsolódó citokineket, kemokineket. Az aktivált neutrofilek maguk is képesek pro-inflammatórikus mediátorokat felszabadítani, amelyekkel további neutrofileket és más immunsejteket toboroznak a helyszínre, erősítve ezzel a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokat [98]. A receptorkötődést követően a neutrofilek többféle módszerrel veszik fel a harcot a kórokozók ellen. A fagocitózis során a bekebelezett mikrobákat a neutrofilek citoplazmatikus granulumaikban található különböző antimikrobiális enzimekkel és fehérjékkel semmisítik meg. A neutrofilek által termelt ROS-ok szintén hatékonyak a kórokozókkal szemben. Továbbá, a degranuláció során a neutrofilek egyes granulumaikat az extracelluláris térbe ürítik, amivel a nagyobb méretű patogének ellen is hatékonyak [98, 99]. Emellett, a neutrofilek újonnan felfedezett és intenzíven kutatott effektor funkciója a neutrofil extracelluláris csapdák (neutrophil extracellular traps, NETs) létrehozása és az extracelluláris térbe történő felszabadítása, a NETózis, amellyel megkötik és elpusztítják a kórokozókat [100].

3.6.2. A NETózis felfedezése

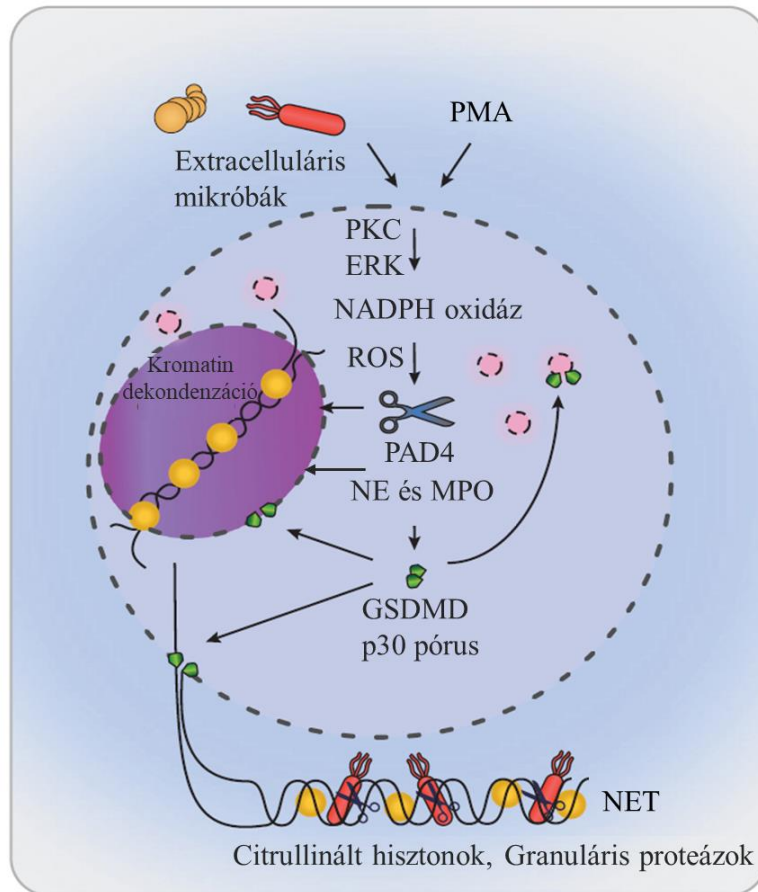
Sokáig úgy gondolták, hogy a neutrofilek elsősorban az apoptózis vagy nekrozis következtében pusztulnak el, azonban Takei és mtsai. [101] 1996-ban felfedeztek egy ezektől különböző új sejthalál formát. A neutrofilek vizsgálata során forbol-12-mirisztát-13-acetáttal (PMA) történő stimuláció hatására az eddig ismert sejthalál folyamatoktól eltérő morfológiai változásokat tapasztaltak; az aktivált neutrofilek kromatinja dekonzenzációzott, a nukleáris membrán feloldódott, míg a többi citoplazmatikus organelum ép maradt, majd 3 óra elteltével a sejtmembrán permeabilitása megnőtt. Ezt követően Brinkmann és mtsai. [100] 2004-ben további részleteket tártak fel a folyamatról. Munkájuk során megfigyelték, hogy a neutrofilek az IL-8, PMA vagy lipopoliszacharid (LPS) indukálta aktivációt követően, NOX működése mellett DNS-ből, hisztonokból és antimikrobiális fehérjékből álló hálószerű struktúrát, neutrofil extracelluláris csapdákat (Neutrophil Extracellular Traps, NETs) hoznak létre és szabadítanak fel az extracelluláris térbe a patogének eliminálására, amely végül a neutrofilek pusztulásával jár. A folyamatot NETózisnak nevezték el. Ezek a korai tanulmányok a NETózist egy aktív folyamatnak tekintették, ami nem köthető az addig ismert sejthalál folyamatokhoz. Fuchs és mtsai. [102] 2007-ben azonban igazolták, hogy csak a haldokló neutrofilek képeznek NET-et az aktiválást követő 2-4 órában, ennek megfelelően a NETózis a sejthalál egy új útvonulának

tekinthető. A NET képződést később további sejtek esetében is leírták, például eozinofil és bazofil granulocitákban [103], hízósejtekben [104] és makrofágokban [105]. Ezt figyelembe véve nevezték át a folyamatot ETózisnak, és ennek megfelelően nevezzük a neutrofilek ET képzését NETózisnak [106]. Az eredetileg leírt ún. „klasszikus” vagy „öngyilkos” NET képződést alapvetően NOX-függő folyamatnak tartották, amely az enzim hiányában nem képes aktiválódni [102]. Azonban az elmúlt években számos tanulmány rávilágított, hogy a NET kialakulása NOX-független módon, Ca^{2+} beáramlás és mitokondriális ROS termelés hatására is indukálódhat [107, 108]. Továbbá, ellentétben a korábbi tanulmányokkal, miszerint a NETózis több órát igénylő folyamat, Clark és mtsai. [109] 2007-ben arról számoltak be, hogy a NET képződés mindössze 30 perc alatt bekövetkezett TLR4 receptor aktiválásán keresztül indukált trombocita-neutrofil kötődés hatására, miközben a neutrofilek megőrizték integritásukat. Hasonló eredményt tapasztaltak *in vitro* körülmények között *Staphylococcus aureus* baktériummal inkubált neutrofil granulocitáknál, ahol a NET képződés már 10 perc elteltével megfigyelhető volt és a folyamat 1 óra alatt, NOX-független módon végbement [110]. Később, a NETózisnak ezt a formáját nevezték el „nem-öngyilkos” NETózisnak [111]. Ezenkívül, Yousefi és mtsai. eozinofilekben [112], majd neutrofilekben [113] kimutatták a NETózis egy olyan formáját, amely során mitokondriális DNS szabadul fel az extracelluláris térbe anélkül, hogy a sejt halálát okozná. A nem-öngyilkos NETózis felfedezése bizonyította, hogy a NET képzés folyamata nem feltétlenül jár együtt a sejt halálával, így ebben az esetben a „NETózis” elnevezés még vitatott [114].

3.6.3. A NETózis folyamata

A NET képződését számos inger kiválthatja, többek között különböző mikrobiális fertőzések, pro-inflammatórikus citokinek (IL-8, TNF- α) [100, 115], trombocita [116] és endoteliális sejt [117] aktiváció, mononátrium-urát kristályok [103], NO [118], H_2O_2 [119] és autoantitestek [120]. A NETózis során kialakuló hálószerű struktúra alapját a DNS szálak és a hisztonok képezik. Ehhez kapcsolódnak a neutrofil granulociták elsődleges, másodlagos és harmadlagos citoplazmatikus granulumainak antimikrobiális hatású fehérjéi. Ide tartoznak többek között a neutrofil elasztáz (NE), az MPO, a katepszin G, a proteináz 3, az α -defenzin (elsődleges granulum), a laktoferrin, a pentraxin 3 (másodlagos granulum), a zselatináz, a peptidoglikán felismerő fehérjék (harmadlagos granulum), illetve a citoplazmatikus kalprotektin és a peroxiszómában található kataláz [121].

A NETózisnak jelenleg két típusát írták le részletesebben, a „klasszikus” vagy „öngyilkos” NETózist, és a „nem öngyilkos” NETózist, azonban a pontos mechanizmusok még nem teljesen ismertek. A klasszikus NETózis indukcióját a neutrofilek TLR, Fc γ , komplement, valamint citokin receptorainak ligandkötése váltja ki. Ennek hatására az endoplazmatikus retikulumból Ca²⁺ szabadul fel a citoplazmába és protein-kináz C (PKC) szignalizációs útvonal aktiválódik. A NOX egyik regulátor alegységének foszforilációja lehetővé teszi az enzim citoszólikus és membránköttött alegységeiből álló funkcionális komplex létrejöttét, ami O²⁻, majd H₂O₂ képződéshez vezet. A H₂O₂-ot az MPO enzim HOCl-vá alakítja és további ROS-ok képződnek [122]. A fokozott ROS mennyiség következtében a nukleáris és granuláris membránok integritása megszűnik és a sejtmagi, a granuláris, valamint a citoplazmatikus tartalmak keverednek. A neutrofilek azurofil granulumaiban tárolt NE és MPO felszabadulnak. A citoszolban az NE az F-aktin hasításával a citoszkeleton szétesését és a neutrofilek immobilizációját okozza. Ezt követően az NE és az MPO a sejtmagba vándorolnak, ahol az NE a hiszton fehérjék hasításával hozzájárul a kromatin dekondenzálásához. Az MPO feladata, hogy segítse az NE felszabadulását a granulumokból, a sejtmagba jutását, valamint fokozza az NE proteolitikus aktivitását. Továbbá, a megnövekedett Ca²⁺ mennyiség aktiválja a fehérjék citrullinációját katalizáló Ca²⁺-függő peptidil-arginin-deimináz (PAD) enzimsalád egyik tagját a PAD4 enzimet, amely a sejtmagba kerülve a hiszton fehérjék arginin oldalláncát citrullinálja. A poszt-transzlációs módosítás következtében a fehérjék elvesztik a DNS-hez való kötődéshez szükséges pozitív töltésüket, ami elősegíti a kromatin dekondenzációt, ezáltal a NET képződését. A citoplazmába kerülő DNS szálakhoz további citoplazmatikus és granuláris fehérjék kapcsolódnak, végül a kialakult NET a gasdermin D (GSDMD) által formált pórusokon keresztül az extracelluláris térbe kerül, ahol megköti és elpusztítja a kórokozókat. A folyamat végül a neutrofil halálához vezet [123]. A klasszikus NETózis mechanizmusát az 5. ábra szemlélteti. A NETózisnak ez a típusa az aktivációt követő 2-4 óráig tart. A NET képződésben egyes enzimek, mint a PAD4 [123], a NOX [124] vagy a PKC [125] esszenciális részvétele a mai napig vitatott. Kimutatták, hogy a c-Raf, a mitogén aktivált/extracelluláris szignál regulált kináz kináz (MEK), az extracelluláris szignál által regulált kináz (ERK) és a protein kináz B (Akt) kinázok szintén részt vesznek a NET képződésben [125].



5. ábra. A „klasszikus” NETÓzis folyamata

PMA: forbol-12-mirisztát-13-acetát, PKC: protein kináz C, ERK: extracelluláris szignál által regulált kináz, NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát, ROS: reaktív oxigén származékok, PAD4: peptidil-arginin-deimináz 4, NE: neutrofil elasztáz, MPO: mieloperoxidáz, GSDMD: gasdermin D

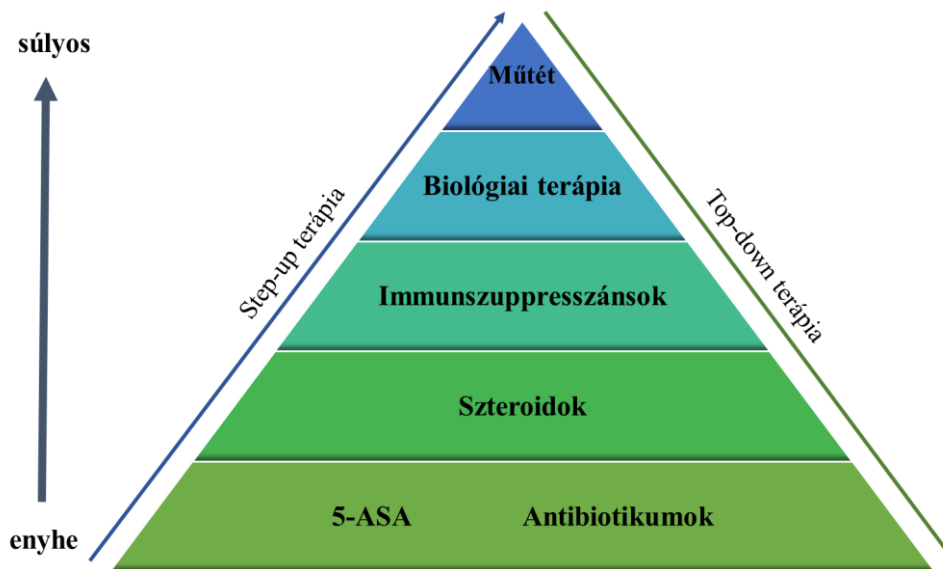
(Forrás: Burgener és Schroder, 2022, módosítva [126])

A nem-öngyilkos NETÓzis esetében azonban a neutrofilek életben maradnak, mag nélküli citoplasztokká alakulnak, amelyek megőrzik mobilitásukat és számos korábbi funkciójukat, többek között a fagocitózist [111]. A folyamat a klasszikus NETÓzishoz képest sokkal gyorsabban létrejön (5-60 perc) [127]. A baktériumok, bakteriális eredetű termékek és komplement fehérjék a TLR2, TLR4 vagy komplement receptorok aktiválásán keresztül indukálják a NET képződését, amelyben a DNS nukleáris [110] vagy mitokondriális [113] eredetű is lehet, valamint NOX-függő és NOX független módon is történhet. A folyamat során a keletkezett NET a nukleáris membránból kiváló kis vezikulákba kerül, melyek vezikuláris transzporttal a plazmamebránhoz szállítódnak és a plazmamebrán sérülése nélkül az extracelluláris térbe ürülnek [127]. Ezt a NETÓzis formát inkább fertőzések kapcsán feltételezik, mint steril gyulladásnál, mivel a neutrofilek megőrzik effektor funkcióikat [128].

Míg a kezdeti tanulmányok a NETóvizist, mint a veleszületett immunitás fertőzésekre adott hatékony választ vizsgálták, újabb kutatások arra utalnak, hogy szerepet játszhat különböző kórképek patogenezisében, mint a metabolikus, kardiovaszkuláris, daganatos és autoimmun megbetegedések. A NETóvizis során az intracelluláris fehérjék és a DNS extracelluláris térbe kerülve potenciális autoantigéneket jelenthetnek az immunrendszer számára, valamint a felszabaduló DAMP-ok felerősíthetik a folyamatban lévő immunreakciókat [128].

3.7. Az IBD terápiaja

Az IBD mai tudásunk szerint nem gyógyítható. A CD és az CU kezelése részben eltérő, de mindkét esetben a terápia elsődleges célja a tüneti kezelés, a remisszió indukciója és fenntartása, az intesztinális- és extraintesztinális szövődmények gyógyítása, a műtéti beavatkozások elkerülése és a további progresszió megakadályozása. A megfelelő kezelés kiválasztása számos tényezőtől függ: a gyulladás anatómiai elhelyezkedésétől, kiterjedésétől, a tünetek súlyosságától, egyéb GI vagy szisztémás rendellenességek jelenlététől, illetve a páciens életkorától [129]. Az IBD terápiajában kétféle modell különböztethető meg. Az egyik a hagyományos „step-up” szemlélet, a másik az új alternatívát jelentő „top-down” modell. A „step-up” terápia esetén a kezelés az enyhébb hatású gyógyszerek alkalmazásával kezdődik és a kezelésre adott válaszoktól, mellékhatásoktól, illetve a betegség súlyosságától függően térnek át a következő, egyre erősebb gyógyszerek használatára. A „top-down” leépítő terápia súlyos IBD-ben szenvedő betegek esetében alkalmazható, a diagnózist követően a biológiai terápiával kezdik a kezelést és az enyhébb hatású gyógyszerek felé haladnak a remisszió fenntartásáig (6. ábra) [130].



6. ábra. A gyulladásoos bélbetegségek terápiájában alkalmazott gyógyszerfípusok és beavatkozások

5-ASA: 5-amino-szalicilsav

(Forrás: <http://www.ibdclinic.ca/treatment/>, módosítva)

Az IBD terápiája során 4 fő gyógyszerfípuscsoportot alkalmaznak. Az aminoszalicilátok az enyhe és középsúlyos CU esetén első vonalbeli kezelésként alkalmazhatók a betegség remissziójának indukálására és fenntartására. Orálisan vagy az orális és rektális készítmények kombinációjában is adagolhatók, továbbá előnyük, hogy protektív hatásukat helyileg, a gyulladt bélszakaszon fejtik ki [129]. Elsőként a szulfaszalazin (SASP) hatékonyságát igazolták az CU kezelésében [131]. A készítmény aktív hatóanyaga az 5-amino-szalicilsav (5-ASA, mesalazin), amely azokötéssel szulfapiridinhez kapcsolódik. Az orálisan adagolt SASP-ot a vastagbélbe érve a bélbaktériumok azoreduktáz enzimei az azokötések hasításával 5-ASA-ra és szulfapiridinre bontják, így az aktív hatóanyag csak a vastagbélben szabadul fel. Az 5-ASA protektív hatását többek között a gyulladáskeltő mediátorok, mint az NF- κ B és ezáltal a pro-inflammatórikus citokin termelődés gátlásán [132], illetve a szabadgyökök megkötésén [133] keresztül fejt ki. A SASP okozta káros mellékhatásokért feltehetően a szulfapiridin felelős (fejfájás, hemolitikus anémia, dermatitis) [13, 134]. Azóta már több olyan gyógyszer is kifejlesztettek, amelyek célja az 5-ASA terápiás hatásának megtartása és hatékony eljuttatása a vastagbélbe, mindezt a szulfapiridin negatív mellékhatásai nélkül. Ilyen lehetőségek például a mesalazin pH-szenzitív, bélben oldódó polimerrel (Asacol) vagy egy multimátrix-szal (MMX) (Lialda) történő bevonása, vagy a hatóanyag mikrogranulumba csomagolása (Pentasa). Ezek késleltetett vagy folyamatos hatóanyagleadást tesznek lehetővé. Az olsalazin esetében a mesalazin molekula azo kötéssel egy másik mesalazinhoz kapcsolódik (Dipentum), a balsalazid

esetében pedig egy semleges hordozóhoz kötve (Colazide) az aktív 5-ASA a szulfaszalazinhoz hasonlóan az azokötések hasításával szabadul fel [135].

A kortikoszteroidok a legerősebb gyulladáscsökkentő hatású készítmények, széles körben alkalmazzák akut, közepesen súlyos és súlyos tünetek esetében a betegség fellángolásának csökkentésére és a remisszió indukciójára [13]. Előnyük, hogy gyulladáscsökkentő hatásukat gyorsan kifejtik, azonban a betegség fenntartó kezelésére súlyos mellékhatásaik miatt nem javasoltak. Hosszútávú alkalmazásuk oszteoporózis, hiperglikémia, hipertenzió vagy gyomorfekély kialakulásához vezethet [136, 137]. A szisztémásan ható szteroidok közül a prednizolon és a metilprednizolon terjedt el az IBD kezelésében. A betegség súlyosságától függően adagolható orálisan, rektálisan és intravénásan, illetve magában vagy 5-ASA készítményekkel kombinálva is alkalmazható a remisszió indukciójára és fenntartására. Az ajánlott terápiás dózis elérését követően a szteroid mennyiségét fokozatosan csökkenteni kell, majd a lehetséges komoly mellékhatások miatt célszerű teljesen elhagyni. A szteroidterápia pozitív eredményei ellenére azonban nem minden beteg reagál megfelelően a kezelésekre. A szteroid dependens pácienseknél a javulást követően a dózis csökkentésével vagy a szer elhagyásával a tünetek rövid időn belül újra megjelennek. A súlyos mellékhatások csökkentése érdekében fejlesztették ki a második generációs kortikoszteroidokat, ilyen készítmény például a budezonid. A mesalazin készítményekhez hasonlóan a lokális hatás, illetve a káros hatások mérséklése érdekében a szteroidok esetében is alkalmazhatnak különböző hordozó technológiákat, például MMX bevonatot (budezonid MMX) vagy nanopartikulumokat [137].

A szteroid dependens vagy intoleráns pácienseknél, illetve a remisszió fenntartása érdekében immunszuppresszánsok alkalmazása javasolt. Ezek a készítmények az T-sejtek aktivációjának blokkolásán keresztül fejtik ki gyulladáscsökkentő hatásukat, azonban az immunrendszer elnyomásával megnő az opportunista fertőzések kockázata [10]. Az IBD terápiájában a legelterjedtebb immunmodulátorok a tiopurinok: az azatiopurin és aktív metabolitja a 6-merkaptopurin. Hátrányuk, hogy a lassú hatáskezdet miatt aktív betegségfolyás esetén inkább csak kiegészítő kezelésként alkalmazhatók [138]. Továbbá, a terápia során felléphetnek mellékhatások például tüdőgyulladás, ízületi gyulladás, láz, súlyosabb esetben akár hepatitis, pancreatitis vagy leukopenia, melyek azonban a gyógyszeres kezelés befejezésével általában megszűnnek [139]. A metotrexát tiopurinokhoz hasonló indikációkban választható immunszuppresszáns, elsősorban a tiopurinok hatástalansága, illetve intolerancia esetén. Hatékonysága CD-ben szenvedő pácienseknél igazolódott a remisszió indukciójában és fenntartásában [140]. Enyhe mellékhatásként hányinger, hosszútávon leukopenia, hepatotoxicitás vagy tüdőgyulladás jelentkezhet [139]. A ciklosporin terápia

súlyos, refrakter CU esetén a remisszió indukciójában, valamint a kolektómia késleltetésében vagy elkerülésében bizonyult hatásosnak [141]. Az IBD terápiás lehetőségei közül azonban a ciklosporin használata a legkevésbé biztonságos súlyos mellékhatásai miatt [139].

Az IBD kezelésében jelentős előrelépést jelentett a biológiai terápiák bevezetése. Alkalmazásuk a hagyományos kezelésekre nem reagáló, közepesen súlyos és súlyos lefolyású IBD-ben javasolt. A biológiai szerek legtöbbször olyan antitestek, amelyek célzottan a gyulladásos kaszkád valamely elemének gátlásán keresztül fejtik ki terápiás hatásukat. A klinikumban jelenleg TNF- α -gátlókat, integringátlókat, valamint az IL-12 és IL-23 citokineket blokkoló szereket használnak. Az IBD kezelésében leggyakrabban alkalmazott IgG1 típusú anti-TNF- α monoklonális antitestek a humán-egér kiméra infliximab és a humán fehérjéből előállított adalimumab [142]. Ez utóbbi előnye, hogy teljesen humán eredetéből adódóan a készítménnyel szembeni allergiás reakciók ritkábbak, ellenben egyéb autoimmun betegségeket indukálhat [143]. Az anti-TNF- α szerek közé tartoznak még a certolizumab pegolt és a golimumabot. Az elmúlt években a TNF- α -gátló szerekkel kapcsolatban egyre inkább megnövekedett a bioszimiler gyógyszerek szerepe az IBD terápiájában. Ezek a referencia-készítményekkel közel azonos molekulaszervezettel és biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, azonban lényegesen költséghatékonyabb alternatívát jelentenek. További biológiai terápiás szerek az antiintegrinek csoportjába tartozó vedolizumab, valamint a Th sejtek differenciálódását elősegítő IL-12 és IL-23 citokinek p40-es alegységét blokkoló humán IgG1 κ monoklonális antitest, az ustekinumab [142]. A kezelés hatékonyságának növelése érdekében a biológiai terápiát gyakran immunszuppresszánsokkal kombinálva alkalmazzák [144]. A biológiai szerek, elsősorban az anti-TNF- α kezelések során tapasztalt hátránya, hogy gyógyszerellenes antitestek képződését indukálhatják a szervezetben, amely a kezelés mellett állapotromláshoz is vezethet [145]. A biológiai terápia további hátránya, hogy használatuk során megnő a fertőzések megbetegedések kockázata [8].

Az utóbbi évtizedekben a sebészeti beavatkozások aránya az immunszuppresszánsok és a biológiai terápia alkalmazásának emelkedésével párhuzamosan csökkent [146], azonban ezzel kapcsolatban ok-okozati összefüggést nem mutattak ki [147]. A sebészeti beavatkozások célja a súlyos szövődmények, perforációk, fisztulák, szűkületek kezelése, valamint a kórosan gyulladt bélszakaszok eltávolítása [148].

Annak ellenére, hogy az IBD kezelésében alkalmazott új gyógyszerek száma folyamatosan növekszik, nem minden esetben hatékonyak. Ezért a betegség patomechanizmusának további tanulmányozása, valamint potenciális terápiás célpontok és új kezelési lehetőségek kifejlesztése szükséges.

3.8. Az IBD állatkísérletes modellezése

Az IBD patogenezisének megértésében, valamint az IBD kezelésére irányuló új, potenciális terápiás gyógyszerek hatásmechanizmusának feltárásában és kifejlesztésében kulcsszerepet játszanak a különböző állatmodellek. Az IBD tanulmányozására alkalmas állatmodellek a gyulladás kialakulása alapján több kategóriába sorolhatók. Megkülönböztetünk spontán kialakuló; veleszületett, spontán génmutációs modelleket; adoptív transzfermodelleket, mint a CD45RB, CD8 transzfer modell [149]; genetikailag módosított állatmodelleket, például a IL-7 transzgen vagy IL-10^{-/-}, NOD2^{-/-} és IL-23^{-/-} knockout egérmodellek [150], valamint kémiai úton indukált bélgyulladás állatmodelleket [149]. Ezek közül a kémiai indukción alapuló terjedtek el széles körben költséghatékonyságuk, jó reprodukálhatóságuk és a gyulladás indukciójának viszonylagos egyszerűsége miatt. A leggyakrabban alkalmazott kémiai ágensek többek között a 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS), a dextrán-nátrium-szulfát (DSS), az oxazolon, illetve az ecetsav [151]. Jelen tanulmányunkban TNBS-indukált patkány colitis modellt használtunk, melyet elsőként Morris és mtsai. dolgoztak ki 1989-ben [152]. Az eljárás során a TNBS-t etanolban oldva, egyszeri dózisban, intracolónálisan juttatják be az állat rektumán keresztül a disztális vastagbélbe, ahol gyulladást indukál. Az etanol nem csak a vivőanyag szerepét tölti be a folyamatban, hanem a nyálkahártya károsításával lehetővé teszi a TNBS számára a bélszövet mélyebb rétegeibe történő bejutást. A TNBS egy haptén tulajdonságú trinitrofenil csoporttal látja el a colon saját vagy a mikrobiom fehérjéit, amelyek ezáltal immunogénné válnak az immunrendszer számára és Th-1 közvetítette immunválaszt váltanak ki. Ennek hatására fokozódik a CD4⁺ T sejtek infiltrációja a bélszövetben, valamint gyulladáskeltő citokinek – TNF- α , IL-6, IL-1 β – szabadulnak fel az aktivált makrofágokból [153]. A TNBS kezelést követő 3. npra már kialakul az állatok súlyvesztésével járó, a bélfal minden rétegét érintő gyulladás, szövetmegvastagodással és a fekélyes elváltozásokkal [154]. A TNBS modell a Th-1-függő immunválasz aktiválásával és a transzmurális gyulladás kialakulásával jól reprezentálja a humán CD megjelenési formáit, lokalizációját tekintve azonban a CU-ra hasonlít [152].

3.9. A kén-hidrogén (H₂S)

3.9.1. A H₂S biológiai szerepének felfedezése

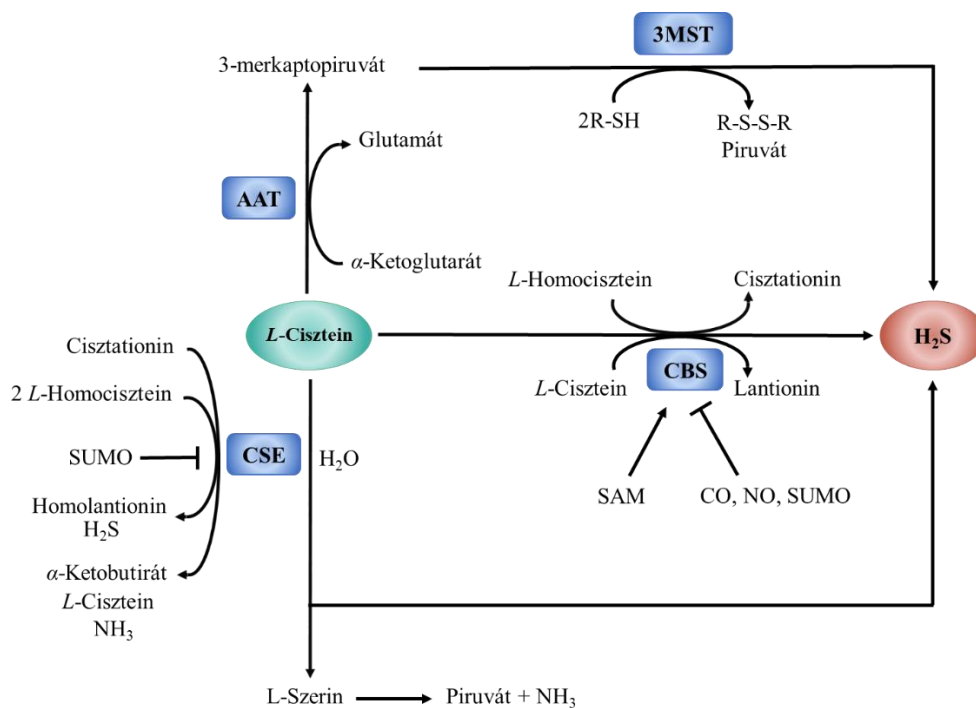
A H₂S szintelen, jellegzetesen „záptojás” szagú toxikus gáz, amellyel kapcsolatos kezdeti tanulmányok elsősorban a környezetre, illetve a szervezetre ártalmas tulajdonságaira és hatásmechanizmusára fókuszáltak [155, 156]. A H₂S az ember számára a 0,1-1 ppm (parts per

million) koncentrációban már érzékelhető, 50-100 ppm között már akut mérgezés lép fel neurológiai, kardiovaszkuláris, illetve légzőszervrendszeri zavarokkal. Ha a környezeti H₂S koncentráció eléri a 100-150 ppm-et a szaglóideg lebénul, ezáltal az ember nem érzékeli a további esetleges mérgezés veszélyét. 500 ppm feletti H₂S súlyosan károsítja a központi idegrendszert, gyors eszméletvesztéshez és légzésleálláshoz vezet [157]. A H₂S toxikus hatása elsősorban a mitokondriális sejtlégzés gátlásával, az elektrontranszport láncban részt vevő citokróm-C-oxidáz enzim blokkolásán keresztül valósul meg [156]. A 70-es és 80-as években azonban többek között Stipanuk és mtsai. [158] is beszámoltak az emlős szövetekben történő endogén H₂S termelődésért felelős enzimekről (cisz-tationin γ -liáz (CSE), cisztationin β -szintáz (CBS), 3-merkaptopiruvát-szulfurtanszferáz (3MST)), valamint a szintézis lehetséges útvonalairól, azonban ezek a tanulmányok megmaradtak a biokémiai leírás szintjén. Később, három egymástól független tanulmány is jelentős mennyiségű H₂S-t mutatott ki patkány, illetve humán agyszövetben [159-161], amelyek felvetették a H₂S endogén termelésének lehetséges fiziológiai vagy patofiziológiai folyamatokban betöltött szerepét. Ezen a területen a legnagyobb áttörést Abe és Kimura [162] 1996-os tanulmánya jelentette, amelyben a H₂S-t, mint fontos neuromodulátort írták le. Az elmúlt két évtized kutatási eredményei alapján ma már egyre inkább tisztázott, hogy a H₂S, az NO-hoz és a CO-hoz hasonlóan, jelentős sejten belüli folyamatokat szabályozó jelátviteli gázmolekula (gazo-transzmitter) [163, 164]. A gazo-transzmitterek olyan kis molekulák, melyek szabadon átdiffundálnak a biológiai membránokon, képződésük enzimatiszós úton, szabályozottan történik, jól definiált specifikus funkciókkal, illetve celluláris és molekuláris célpontokkal rendelkeznek [164].

3.9.2. A H₂S endogén képződése, bomlása és raktározása biológiai rendszerekben

Az endogén H₂S szintézise enzimatiszós és nem enzimatiszós úton is megvalósul a szervezetben, azonban elsősorban transzszulfurációs és transzaminációs útvonalakon, a cisztein aminosav metabolizmusa során keletkezik, melyet legalább három különböző enzimrendszer katalizál [165]. Ezek a piridoxál-5'-foszfát-függő CSE és CBS, valamint az aszpartát-/cisztein-aminotranszferáz (AAT/CAT) közreműködésével a 3MST. Annak ellenére, hogy a reakciók kiindulási szubsztrátja mindhárom enzim esetében a cisztein, az enzimkinetika tulajdonságaik különbözőek, beleértve az eltérő kosubsztrátok használatát, az enzimaktivitást, valamint az aktiváció és inhibíció mechanizmusát. Ennek figyelembe vételével a H₂S szintézis útvonala nemcsak a CSE:CBS:AAT/3MST enzimek relatív koncentrációjának arányától, hanem számos, a reakcióban részt vevő komponens, mint az enzimek szubsztrátjai, illetve az enzimek

aktivitását moduláló faktorok jelenlététől is függ [165]. A szervezetben a CSE és a CBS az elsődleges H₂S-termelő enzimek, melyek főleg a citoszolban lokalizálódnak, míg a 3MST a mitokondriumban és a citoszolban egyaránt megtalálható [166]. A H₂S szintézis fő útvonala függ a szöveti elhelyezkedéstől is, ugyanis az enzimek kifejeződése eltérő a különböző szervekben. A CBS főleg az agyban és az idegszövetekben fordul elő nagyobb mennyiségben, míg a CSE a vaszkuláris rendszerben és egyéb perifériális szervekben, mint a GI traktus, a tüdő, a szív, a máj és a vesék. A 3MST szintén megtalálható a legtöbb szervben [167]. A H₂S szintézis fő enzimátikus útvonalait a 7. ábra mutatja be. A H₂S lebontása a mitokondriumban történik elsősorban a szulfid-kinon-reduktáz (SQR) enzim által katalizált oxidációs reakciók révén [165].



7. ábra. A kén-hidrogén (H₂S) szintézis fő enzimátikus útvonalai

CSE: cisztationin- γ -liáz, CBS: cisztationin- β -szintáz, 3-MST: 3-merkaptopiruvát-szulfurtraszferáz, AAT: aszpartát-aminotranszferáz, SAM: S-adenozil-metionin, CO: szén-monoxid, NO: nitrogén-monoxid, SUMO: small ubiquitin-like modifier,

(Forrás: Péter Nagy, 2015, módosítva [165])

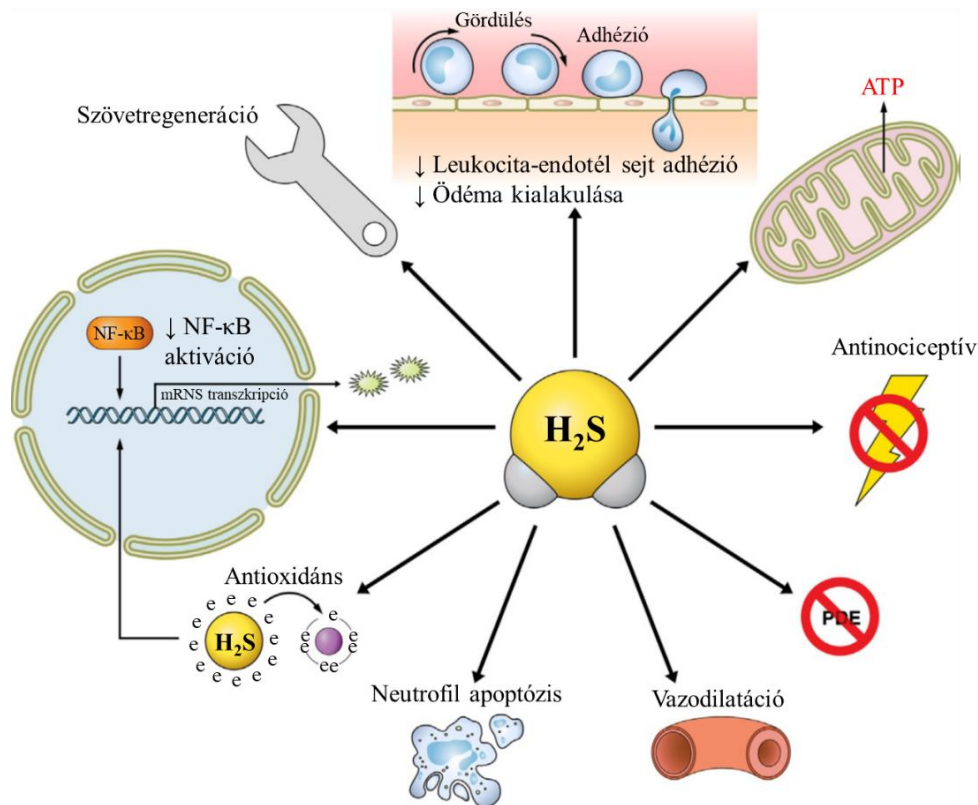
A H₂S jelentős része biomolekulákhoz kötődve tárolódik biztosítva ezzel, hogy a szabad H₂S koncentráció a toxikus szint alatt maradjon. A kötődés reverzibilis, ennek köszönhetően a biológiai folyamatokhoz szükséges H₂S koncentráció felszabadítható. Tanulmányok igazolták, hogy a legtöbb biológiai rendszerben az elérhető H₂S mennyiségének kevesebb, mint 1%-a található szabad formában, ami az endogén H₂S raktárak nagy pufferkapacitására utal [168].

Patkány bélrendszerében mindhárom H₂S termelő enzim expresszióját kimutatták [169]. A CBS a mucosa simaizomréteg, a submucosa, illetve a lamina propria sejteiben lokalizálódik és az ileumban és a colonban expresszálódik nagyobb mennyiségben. A CSE diffúz megjelenésű és inkább a duodenum, illetve a jejunum szakaszokon jellemző [170]. Az H₂S-t szintetizáló enzimek mellett a colon bélbaktériumai működésük során kis mennyiségben szintén termelnek H₂S-t, de ennek nagy része fekális anyagokhoz kötődik. A szabad molekulákat az intesztinális epithélium SQR enzime a mitokondriumban tioszulfáttá és szulfáttá alakítja adenozin-5'-trifoszfát (ATP) generálása mellett. Ezáltal megakadályozza a magas H₂S koncentráció kialakulását, az ATP pedig energiaforrást jelent a colon sejtei számára [171].

3.9.3. A H₂S biológiai szerepe, anti-inflammatórikus hatása

A H₂S jelentős mediátor szerepet játszik számos jelátviteli útvonalban. Molekuláris célpontjai a különböző biokémiai és fiziológiai folyamatokat szabályozó ioncsatornák, receptorok, enzimek és fehérjék. A H₂S által vezérelt jelátviteli folyamatok elsősorban a cisztein tartalmú funkcionális vagy regulátor fehérjék S-szulfhidrállásán, a tiol csoportok perszulfidá alakításán keresztül valósulnak meg. Továbbá, a H₂S metalloproteinek prosztetikus csoportjával interakcióba lépve befolyásolja a fehérjék működését. Az NO-val kölcsönhatva a H₂S részt vesz a fehérjék S-nitrolizációjában, illetve az NO szintézis modulálásával befolyásolja annak szignalizációs útvonalait [172]. Fiziológias koncentrációban a H₂S citoprotektív, antioxidáns, vazodilatátor, anti-inflammatórikus, valamint anti-apoptótikus hatású. A GI rendszerben a H₂S szerepet játszik a normál simaizom működésben [173], a mucosális védelemben [174] és az epitheliális szekréció stimulálásában [175]. A H₂S gyulladáscsökkentő hatása különböző mechanizmusokon keresztül valósul meg (8. ábra). Gyulladás során az első lépés a leukociták (például neutrofilek, limfociták) toborzása a sérülés helyszínére. A H₂S csökkenti a leukociták adhézióját a vaszkuláris endotéliumhoz, megakadályozva a leukociták infiltrációját, valamint az ödéma kialakulását. Ezenkívül indukálja a neutrofilek apoptózisát [176]. A H₂S számos inflammatórikus mediátor szintjének modulálásával szintén hozzájárul a gyulladás csökkentéséhez. Gátolja a transzkripció faktor NF- κ B aktivációját, melynek következtében csökkenti a pro-inflammatórikus citokinek, kemokinek és enzimek, mint az iNOS expresszióját [177]. Valamint a H₂S aktiválja az endogén antioxidáns rendszereket, többek között a SOD, a GPx [178] és HO [177] enzimeket, valamint a GSH-t [179]. A H₂S közvetlen antioxidáns hatása a ROS-ok és a ONOO⁻ [180] eliminálása,

de ez az antioxidáns enzimek indukálása mellett feltehetőleg nem jelentős [181]. Az ATP-szenzitív K^+ csatorna Kir6.1 alegységének szulfhidrállása a csatorna nyitását eredményezi és a kialakult hiperpolarizáció a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák aktiválásával vazodilatációhoz vezet [182]. A csatorna aktiválása a nem-vaszkuláris simaizomsejtekben is relaxációt idéz elő. A foszfodiészterázok gátlásával a H_2S növeli az intracelluláris ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP) és/vagy a ciklikus guanosin-monofoszfát (cGMP) szintjét, ami szintén hozzájárul a vazodilatációhoz [183]. A H_2S szövetregeneráló hatása többek között a vazodilatáció, a COX2 expressziójának növelése, valamint az angiogenezis elősegítése révén érvényesül [171]. A legtöbb sejten, különösen a GI epitheliális sejteken, a H_2S , mint elektron donor részt vesz az ATP generálásában.



8. ábra. A kén-hidrogén (H_2S) anti-inflammatórikus hatásai

NF- κ B: nukleáris faktor kappá B, ATP: adenosin-5'-trifoszfát, PDE: foszfodiészterázok

(Forrás: Gemic és Wallace, 2015, módosítva [184])

Az utóbbi években felmerült, hogy a H_2S hozzájárulhat a NET képződés csökkentéséhez is [185, 186]. Mindezen pozitív hatások felvetik a H_2S terápiás alkalmazásának lehetőségét a gáztranszmitter szintjének modulálásán keresztül számos betegség esetében.

Protektív hatásai mellett azonban a fiziológiástól eltérő H_2S koncentráció kóros folyamatokat indukálhat. Számos betegség hozható összefüggésbe a H_2S szint változásával, mint, a diabétesz [187], a szepszis [188], a Down szindróma [189], az iszkémiás szívbetegség [190] vagy az Alzheimer kór [191].

3.9.4. H_2S donorok

Az elmúlt évek kutatásai egyre több bizonyítékot tártak fel a H_2S fiziológias és patofiziológias folyamatokban betöltött szerepéről. A gázotranszmitter pontos funkcióinak, illetve hatásmechanizmusainak feltérképezése érdekében különböző farmakológiai eszközöket alkalmaznak, amelyek lehetővé teszik a H_2S biológiai körülmények közötti, *in vitro* és *in vivo* kísérletekben történő tanulmányozását. Ilyen vegyületek az ún. H_2S donorok, amelyek meghatározott körülmények között közvetlenül szabadítanak fel a H_2S -t vagy az olyan prekursorok (L-cysteine, N-acetylcysteine) és inhibitorok (DL-propargilglicin, β -cianoalanin), melyek az endogén szintézis modulálásán keresztül fejtik ki hatásukat [192]. A H_2S donorokat több kategóriába sorolhatjuk, ezek a természetben előforduló növényi kivonatok, a szervesetlen szulfid sók, valamint a kémiaiilag előállított szintetikus vegyületek.

A természetben előforduló H_2S donorok a hagymafélék és káposztafélék családjába tartozó egyes zöldségfélék. Ezek közül a fokhagymából származó vegyületek protektív hatása tanulmányozott a legjobban [193].

A szervesetlen szulfid sókat, mint a nátrium-szulfidot (Na_2S) és a nátrium-hidroszulfidot ($NaHS$) évekig alkalmazták a biológiai kutatásokban, azonban ezek nem mimikálják megfelelően az endogén H_2S szintézist. A szulfid sók vizes közegben rögtön hidrolizálódnak, amely gyors H_2S felszabadulást idéz elő a vérben és a szövetekben, hirtelen magas, a fiziológias szintet meghaladó koncentrációt eredményezve, majd pedig gyors csökkenés tapasztalható. Így a H_2S viszonylag rövid ideig képes kifejteni hatását, továbbá a kontrolálhatatlan H_2S felszabadulás és koncentráció jelentősen befolyásolhatja a kísérleti eredményeket, akár súlyos károsodást is okozva [194]. Ezen hátrányok kiküszöbölése érdekében egyre több, a H_2S -t lassan felszabadító vegyületet állítanak elő. Ide tartoznak többek között a tionáló Lawesson reagens (2,4-bisz(4-metoxifenil)-1,3,2,4-ditiadifoszfetán-2,4-diszulfid), valamint származéka, a GYY4137 és annak analógjai, melyek protektív hatását számos tanulmány igazolta [195-197].

A H_2S donorok kísérletes alkalmazásának eddigi eredményei, illetve a szintetikus donorok folyamatos innovációja hozzájárulnak a gázotranszmitter fiziológiájának jobb

megértéséhez, valamint a H₂S-alapú terápiaák klinikumban történő alkalmazásának lehetőségéhez.

4. Célkitűzések

Az IBD multifaktorális eredetű immunmediált kórkép, mely előfordulásának gyakorisága világszerte emelkedik és egyre inkább globális egészségügyi problémát jelent. Az élethosszig tartó betegség során fellépő tünetek, az aktív és nyugalmi állapotok váltakozása jelentősen befolyásolják az IBD-ben szenvedők életminőségét. A tünetek enyhítésére irányuló jelenlegi kezelések annak ellenére, hogy hatékonyan csökkentik a gyulladást, súlyos mellékhatásokkal járhatnak. A H₂S, mint gazotranszmitter, fontos regulátor molekula a szervezetünkben, amely kedvező hatásai révén új terápiás lehetőségeket hordozhat magában.

Ennek figyelembe vételével kísérleteink során a következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Hogyan változik az endogén H₂S termelő enzimek, a CSE és a CBS expressziója a TNBS által kiváltott gyulladás következtében patkány colonszövetben?
2. A H₂S donor Lawesson reagens kezelés csökkenti-e a TNBS által indukált gyulladást patkány colonban, illetve mely dózisok tekinthetők hatékonyak?
3. Milyen molekuláris mechanizmusok vesznek részt a H₂S donor protektív hatásának kialakításában TNBS colitis modellben?
 - Hogyan befolyásolja a H₂S donor a gyulladással kapcsolatos mediátorok expresszióját?
 - A H₂S donor a HO enzimrendszer aktiválásán keresztül fejt-e ki gyulladáscsökkentő hatását?
 - A NETózis szerepet játszik-e a TNBS-indukált patkány colitis patogenezisében és a H₂S donor hatással van-e a NET képződésre?

5. Anyagok és módszerek

5.1. Felhasznált állatok

Vizsgálatainkat a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelvek (NIH Publikáció No. 85-23), az Európai Parlament és Tanács 2010. évi rendeletében szereplő irányelvek (2010/63/EU), valamint a magyar törvényi szabályozás (XXVIII/1998.) és a 40/2013. II. 14. kormányrendelet figyelembe vételével végeztük. A kísérletek elvégzéséhez szükséges engedély száma: XX./4799/2015.

Kísérleteink során hím, 200-400 g-os, Wistar patkányokat használtunk fel, amelyeket a Toxi-Coop Zrt.-től (Budapest, Magyarország) szereztünk be. Az állatokat ellenőrzött körülmények között (hőmérséklet $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relatív páratartalom $55 \pm 10\%$, 12 órás nappal és sötét ciklus) tartottuk és *ad libitum* standard patkány tápot és csapvizet kaptak.

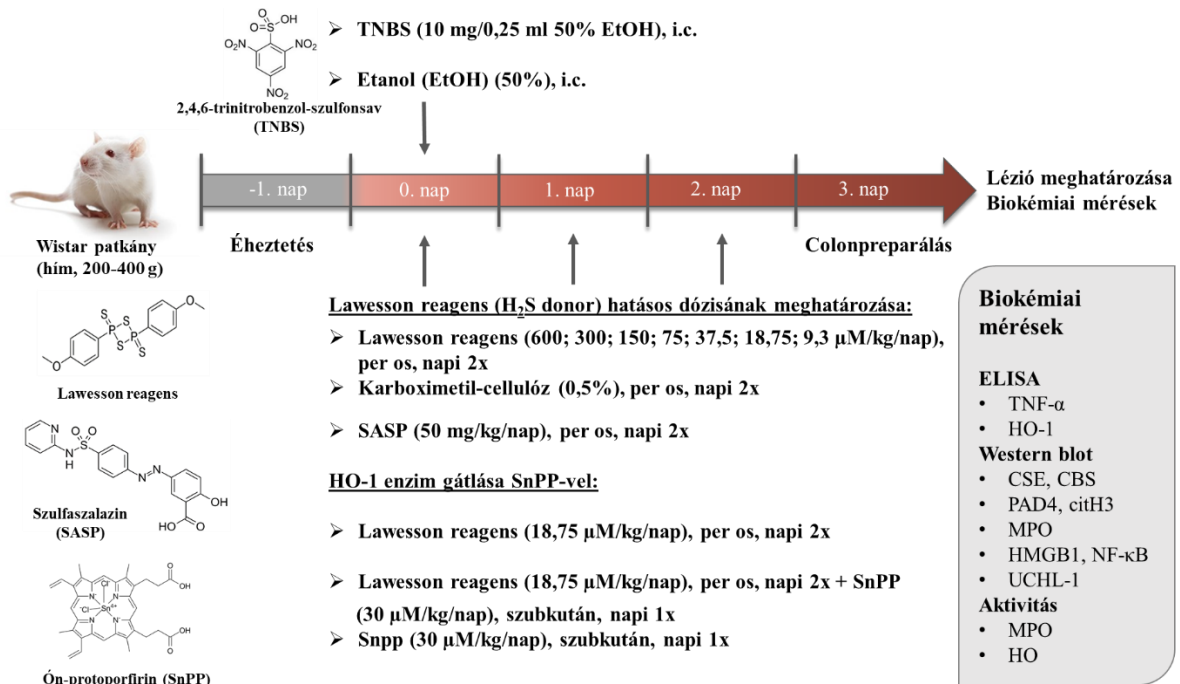
5.2. Anyagok összeállítása

A kísérletes colitis modell létrehozásához 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsavat (TNBS) alkalmaztunk, amelyet 50%-os etanolban (EtOH) oldottunk. H_2S donorként 0,5%-os karboximetil-cellulózból (CMC) szuszpendált Lawesson reagenst használtunk. A pozitív kontroll szulfaszalazint (SASP), valamint a HO-1 enzim gátlására alkalmazott ón-protoporfirint (SnPP) fiziológiás sóoldatban (0,9%) oldottuk. Az anyagokat közvetlenül a kezelések előtt készítettük el. A kísérlet során alkalmazott vegyszereket a Sigma-Aldrich Kft., (St. Louis, MO, USA) az SnPP-t a Frontier Specialty Chemicals (Logan, UT, USA) forgalmazza. Az anesztézia fiziológiás sóoldatban oldott (0,9%) tiopentállal (Thiopental Braun, B. Braun Medical, Barcelona, Spanyolország) történt.

5.3. A TNBS által kiváltott patkány colitis modell és a H_2S donor kezelések kísérletes elrendezése

Egyhetes akklimatizációt követően az állatokat véletlenszerűen 3 csoportra osztottuk: (1) abszolút kontroll – nem kapott kezelést; (2) EtOH csoport – 50% EtOH kezelés, a TNBS oldószere; (3) TNBS csoport – 10 mg TNBS 0,25 ml 50%-os EtOH-ban oldva. A kísérletes colitist Morris és mtsai. [152] által leírt TNBS módszer alapján indukáltuk. Az állatok 16 órás éheztetés után 0,25 ml TNBS-t vagy 50%-os etanolt kaptak intracolónálisan (i.c.) egy 8 cm hosszú polietilén kanül segítségével egyszeri dózisban, enyhe altatás alatt (tiopental, intraperitóneálisan (i.p.), 40 mg/kg). Ezt követően a TNBS-sel kezelt állatokat további

csoporthoz osztottuk és 3 napon keresztül, naponta kétszer az alábbi szerekkel kezeltük per os: (1) Lawesson reagens, mint H₂S donor – 600; 300; 150; 75; 37,5; 18,75; 9,3 µM/kg/nap dózisokban; (2) CMC – 0,5%, Lawesson reagens vivőanyaga; (3) SASP, mint pozitív kontroll – 50 mg/kg/nap, fiziológias sóoldatban oldva. Kísérleteinket két részletben végeztük el 5-16 állat/csoport elemszámmal, összesen 150 patkányt felhasználva. A HO-1 enzim H₂S donor mediálta protekcióban betöltött szerepének felderítésére a HO-1 enzim aktivitását szelektív inhibitorával, az SnPP-vel gátoltuk. A kísérlet során a gyulladás kiváltását követően az állatok az előző vizsgálatban meghatározott protektív H₂S donor dózis (18,75 µM/kg/nap) mellett naponta egyszer 30 µM/kg/nap koncentrációjú SnPP-t kaptak szubkután. Megvizsgáltuk magának az inhibitornak a hatását is a bélszövetre, ennek érdekében normál, egészséges állatokat kezeltünk SnPP-vel. Az alkalmazott SASP és SnPP dózisokat munkacsoportunk korábbi eredményei alapján választottuk ki [95]. Az állatokat a TNBS kezelést követő 72 óra elteltével tiopentállal (i.p., 100 mg/kg) termináltuk, a colon végbéltől számított 8 cm-es szakaszát eltávolítottuk, hosszában felvágtuk, majd hideg fiziológias sóoldatban átmostuk, kifeszítettük és lefényképeztük (Panasonic DMC-TZ6, Osaka, Japán) a planimetriás kiértékeléshez. Ezt követően a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -80°C-on tároltuk a biokémiai mérésekig. Kísérleti elrendezésünket a 9. ábra szemlélteti.



9. ábra. Kísérleti elrendezés és a mért paraméterek

i.c.: intracolónális, H₂S: kén-hidrogén, TNF-α: tumor nekrozis faktor α, HO-1: Hemoxigenáz-1, CSE: cisztationin-γ-liáz, CBS: cisztationin-β-szintáz, PAD4: peptidil-arginin-deimináz 4, citH3: citrullinált hiszton H3, MPO: mieloperoxidáz, HMGB1: high mobility group box 1, NF-κB: nukleáris faktor kappa B, UCHL-1: ubiquitin C-terminális hidroláz L1

5.4. A gyulladás mértékének meghatározása colonban

A gyulladás kiterjedtségének makroszkópos analízisét a laboratóriumunk által kifejlesztett planimetriás szoftver (Stat_2_1_1) segítségével végeztük a kísérlet végén készült bélfotók alapján. A programmal meghatároztuk a gyulladt területek nagyságát, melyet százalékosan fejeztünk ki a teljes 8 cm-es bélszakaszok területéhez viszonyítva.

5.5. A pro-inflammatorikus MPO enzim aktivitásának meghatározása

Az MPO enzim aktivitása a gyulladós folyamatok egyik jellemző paramétere. Az MPO enzim főleg a neutrofil granulocitákban termelődik, aktivitása korrelál a neutrofil infiltrációval, a gyulladás mértékével. Az enzim aktivitásának méréséhez a bélszövetet 250 mg szövet/ml hideg, 0,5% hexadeciltrimetilammónium-bromidot (HETAB) tartalmazó foszfát pufferben (50 mM, pH 6) homogenizáltuk kézi homogenizátorral (Ultra-Turrax T25, IKA Labortechnik, Staufen, Németország) 2 x 30 másodpercig, 13500 fordulat/perc sebességgel, jégen. A sejtmembrán további feltárása érdekében a homogenizátumokat folyékony nitrogénben és 37°C-os vízfürdőben négyszer fagyasztás-olvasztás ciklusnak tettük ki. A mintákat 15 percig, 10000 g-n és 4°C-on centrifugáltuk, majd a méréshez a felülúszókat használtuk tovább. Az MPO enzim aktivitásának meghatározásához egy 96-lyukú plateben 280 µl 0,167 mg/ml *O*-dianizidin-dihidrokloridot tartalmazó foszfát pufferhez (50 mM, pH 6) 12 µl felülúszót adtunk. A reakciót 10 µl 0,03%-os hidrogén-peroxiddal indítottuk el. A mérés során peroxidázt használtunk standardként (0 - 0,5 U/ml). Az optikai denzitást (OD) 90 másodperces rázatást követően 490 nm-en spektrofotométerrel (Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA) mértük. Az MPO enzim aktivitását mU/mg fehérjében fejeztük ki.

5.6. A TNF- α és a HO-1 szintjének meghatározása ELISA módszerrel

A gyulladáskeltő citokin TNF- α (Hycult Biotechnology B.V., Uden, Hollandia) és az antioxidáns enzim HO-1 (Sunred Biological Technology Co., Ltd, Shanghai, Kína) szöveti szintjeinek meghatározását szendvics ELISA módszerrel végeztük. A TNF- α szint méréséhez a mintákat 250 mg szövet/ml pufferben (300 mmol/l NaCl, 15 mmol/l Tris, 2 mmol/l MgCl₂, 2 mmol/l Triton X-100, 20 ng/ml pepstatin A, 20 ng/ml leupeptin, 20 ng/ml aprotinin; pH 7,4) homogenizáltuk 2 x 30 másodpercig, 13500 fordulat/perc sebességgel, jégen, kézi homogenizátorral (Ultra-Turrax T25, IKA Labortechnik, Staufen, Németország). A homogenizátumokat 30 percig jégre helyeztük, majd kétszer centrifugáltuk (10 perc, 14000 g,

4°C). A szöveti HO-1 szint meghatározásához a mintákat foszfát pufferben (pH 7,4) 2 x 10 másodpercig homogenizáltuk, majd 20 percig, 3000 rpm-en és 4°C centrifugáltuk. A továbbiakban a felülúszót használtuk. A méréseket a gyártók által mellékelt protokollok alapján végeztük 96-lyukú plate-ben. Az OD-t 450 nm-en mértük spektrofotométerrel (Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories Hercules, CA, USA). Az eredményeket a TNF- α esetében pg/mg fehérjében, a HO-1 esetében pedig ng/ml-ben fejeztük ki.

5.7. A HO enzim aktivitásának meghatározása colonban

A HO enzim aktivitását Tenhunen és mtsai. [198] által kidolgozott módszer módosított változatával határoztuk meg. A módszer során a hem átalakulásakor keletkező bilirubin szintjét mértük spektrofotometriával. Az enzimaktivitás méréséhez a colon mintákat 2 x 30 másodpercig, 13 500 fordulat/perc sebességgel, jégen homogenizáltuk kézi homogenizátorral (Ultra-Turrax T25, IKA Labortechnik, Staufen, Németország) 2 ml pufferben (10 mM N-(2-hidroxietyl) piperazin-N'-(2-etánszulfonsav) (HEPES), 32 mM szacharóz, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0,1 mM etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), 10 μ g/ml tripszin inhibitor, 10 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin; pH 7,4). Ezt követően a homogenizátumokat 30 percig, 20000 g-n és 4°C-on centrifugáltuk. A mérés során 75 μ l felülúszót adtunk 750 μ l végtérfogatú reakcióelegyhez (2 mM glükóz-6-foszfát, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz, 15 μ M hemin, biliverdin reduktáz forrásként 120 μ g/ml patkánymáj-citoszol, 2 mM MgCl₂ x 6H₂O, 100 mM KH₂PO₄ és proteáz inhibitor koktél), majd a reakciót 50 μ l (150 μ M) β -NADPH hozzáadásával indítottuk el. A mintákat sötétben, 37°C-on inkubáltuk 60 percen keresztül, majd jégre helyezve leállítottuk a reakciót. A vak minták nem tartalmaztak β -NADPH-t. A mérés során bilirubin oldatot (58,47 μ g/ml; 10 μ M) alkalmaztunk standardként. Az OD értékeket 465 és 530 nm-en mértük. A képződött bilirubin mennyiségét a β -NADPH-t tartalmazó és a vak minták optikai denzitásának egységnyi fehérjetartalomra vonatkoztatott különbségéből határoztuk meg (nM bilirubin/óra/mg fehérje).

5.8. A H₂S termelő enzimek, a NETózis markerek, valamint az inflammatorikus mediátorok expressziójának vizsgálata Western blot módszerrel

A fehérjék expressziójának változásait Western blot módszerrel mutattuk ki. A mérésekhez 30 mg fagyasztott, porított colon szövetet homogenizáltunk a CSE és CBS enzimek esetében 100 mM nátrium-foszfátot (pH 7,4), 0,2% Triton X-100-et, 1 mM β -merkaptotetanolt, 1% proteáz inhibitor koktélt, 25 μ g/ml fenilmetilszulfonil-fluoridot (PMSF), 10 μ g/ml

leupeptint és 20 µg/ml aprotinint tartalmazó lízis pufferben, a PAD4, citrullinált hiszton H3 (citH3), MPO, HMGB1, NF-κB p65 és az UCHL-1 esetében PMSF-fel kiegészített (a végtérfogat 1/10-e) RIPA pufferben (0,5 M Tris-HCl, pH 7,4, 1,5M NaCl, 2,5% dezoxikólsav, 10% NP-40, 10 mM EDTA, Merck Millipore, Burlington, USA). A homogenizálást 3 x 10 másodpercig, jégen, ultraszonikálóval (Ultrasonic Homogenizer UP-100H, Hielscher, Teltow, Németország) végeztük, majd a homogenizátumokat 10 percig, 12000 rpm-en és 4°C-on centrifugáltuk. A további mérésekhez a felülúszókat használtuk, amelyekben a fehérjekoncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg. Az elektroforézishez a mintákból egységesen 50 µg összfehérje mennyiséget kevertünk be redukáló pufferrel, majd 95°C-on denaturáltuk a fehérjéket 5 percig. Minden mintát azonos térfogatban (20 µl) vittünk fel és futtattunk 10%-os nátrium-dodecil-szulfát (SDS)-poliakrilamid gélen, 90 V-on. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk 2,5 órán keresztül, 35 V feszültségen. A transzferálás eredményességét Ponceau festéssel ellenőriztük, majd Tween20 tartalmú Tris-pufferelt sóoldatban (TBS-T, pH 7,4, 0,05% Tween 20) történő mosást követően a membránokat 5%-os tejben vagy a citH3 esetében 5%-os szarvasmarha szérum albumin (BSA) oldatban blokkoltuk (egy éjszakán keresztül, 4°C) az aspecifikus antitestkötődés csökkentése érdekében. 3 x 10 perces mosás után a membránokat a következő elsődleges ellenanyagokkal inkubáltuk: anti-CSE (1:1000, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, ab136604), anti-CBS (1:1000, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, ab96252), anti-PAD4 (1:1000, Proteintech, Rosemont, IL, USA, 17373-1-AP), anti-citH3 (1:750, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, ab5103), anti-MPO (1:1000, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, ab208670), anti-HMGB1 (1:1000, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, ab79823), anti-NF-κB p65 (1:500, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, ab16502), anti-UCHL-1 (1:500, Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, ab108986). Az antitesteket 1%-os tejben vagy BSA-ban hígítottuk, melyben a membránokat 2 órán át, szobahőmérsékleten vagy a PAD4 és az MPO esetében egy éjszakán keresztül, 4°C-on inkubáltuk. Újabb TBS-T-vel történő mosást (3 x 10 perc) követően a membránokat az elsődleges ellenanyagoknak megfelelően egérben vagy nyúlban termeltetett tormaperoxidáz (HRP)-konjugált másodlagos antitesttel (1:5000, DAKO, Agilent, Santa Clara, CA, USA) inkubáltuk, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A kísérletek során várható jeleket kemilumineszcens szubsztráttal (ECL Plus Substrate, Amersham Pharmacia Biotech, Egyesült Királyság vagy Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Merck Millipore, Burlington, USA) tettük láthatóvá és géldokumentációs rendszerrel (UVITEC, Cambridge, Egyesült Királyság) detektáltuk. A felvételeket Quantity One 4.5 szoftver segítségével analizáltuk. Ezt követően a membránokat sztrippeltük és a felvitt fehérjemennyiség

meghatározásaként β -aktinra specifikus elsődleges ellenanyaggal (1:10000, Abcam, Cambridge, UK, ab20272), majd anti-egér HRP-konjugált másodlagos ellenanyaggal (1:5000, DAKO, Agilent, Santa Clara, CA, USA) inkubáltuk. Az eredményeket relatív expresszióban fejeztük ki β -aktinra normalizálva.

5.9. Fehérjetartalom mérése Bradford módszerrel

A minták összfehérje tartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg. A mérés során BSA standard sort (0-12 $\mu\text{g/ml}$) használtunk. A hígított mintákból (1250-2000x desztillált vízzel) 20 μl -t pipettáztunk 980 μl desztillált vízhez, majd mind a standard sorhoz, mind a mintákhoz 200-200 μl Bradford reagenst adtunk. A mintákat 96-lyukú plate-be pipettáztuk és az OD-t 595 nm-en spektrofotometriával mértük. A fehérjekoncentrációt mg/ml-ben fejeztük ki.

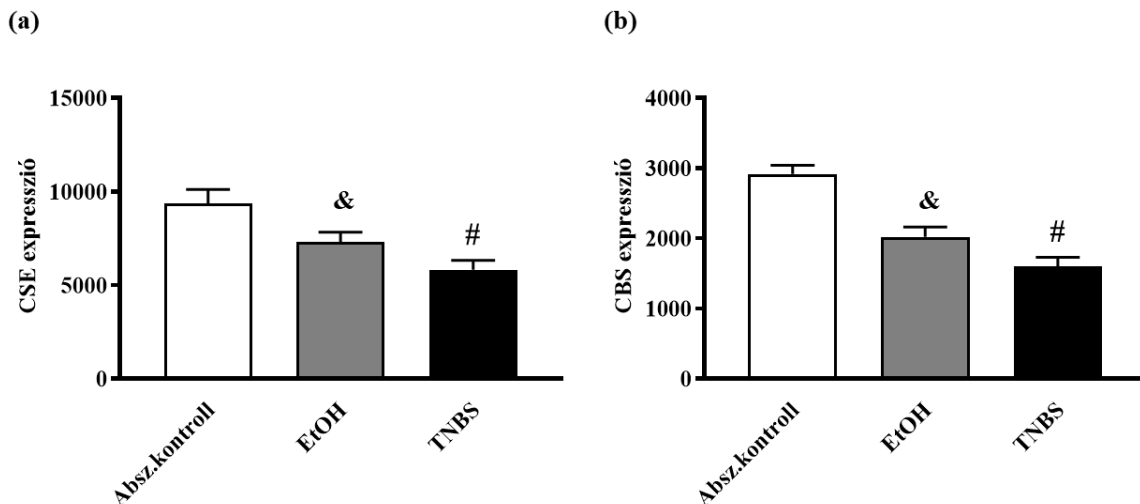
5.10. Statisztikai analízis

Eredményeinket átlag + S.E.M.-ben (standard error of mean) ábráztuk. A statisztikai elemzést SigmaPlot 12.0 for Windows szoftverrel (Systat Software Inc., San Jo-se, CA, USA) végeztük. Az adatokat kétmintás t-teszttel vagy egyutas varianciaanalízissel (ANOVA), majd Tukey vagy Holm–Sidak post hoc teszttel értékeltük ki. Eredményeinket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha a valószínűség (p) értéke kisebb, mint 0,05.

6. Eredmények

6.1. A H₂S termelő enzimek: a CSE és CBS expressziójának alakulása TNBS-indukált colitis modellben

Kísérletünk során megvizsgáltuk hogyan változik a H₂S szintéziséért felelős enzimek, a CSE és a CBS expressziója a gyulladás kiváltását követően a vastagbélben (10. a., b. ábra). Eredményeink azt mutatták, hogy a TNBS vivőanyaga, az 50%-os EtOH és a TNBS kezelés is szignifikánsan csökkentette a CSE enzim expresszióját a colon szövetekben az abszolút kontroll csoporthoz képest (7320,43 ± 506,35 és 5835,47 ± 497,34 vs. 9370,77 ± 752,22 expresszió). A CBS enzim expressziója ehhez hasonlóan változott, az EtOH és a TNBS csoportokban is szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a kontroll csoport értékeihez viszonyítva (2022,67 ± 137,95 és 1602,92 ± 127,72 vs. 2917,17 ± 123,9 expresszió).



10. ábra. A H₂S szintetizáló enzimek, a (a) CSE és a (b) CBS expressziójának változása gyulladás indukcióját követően

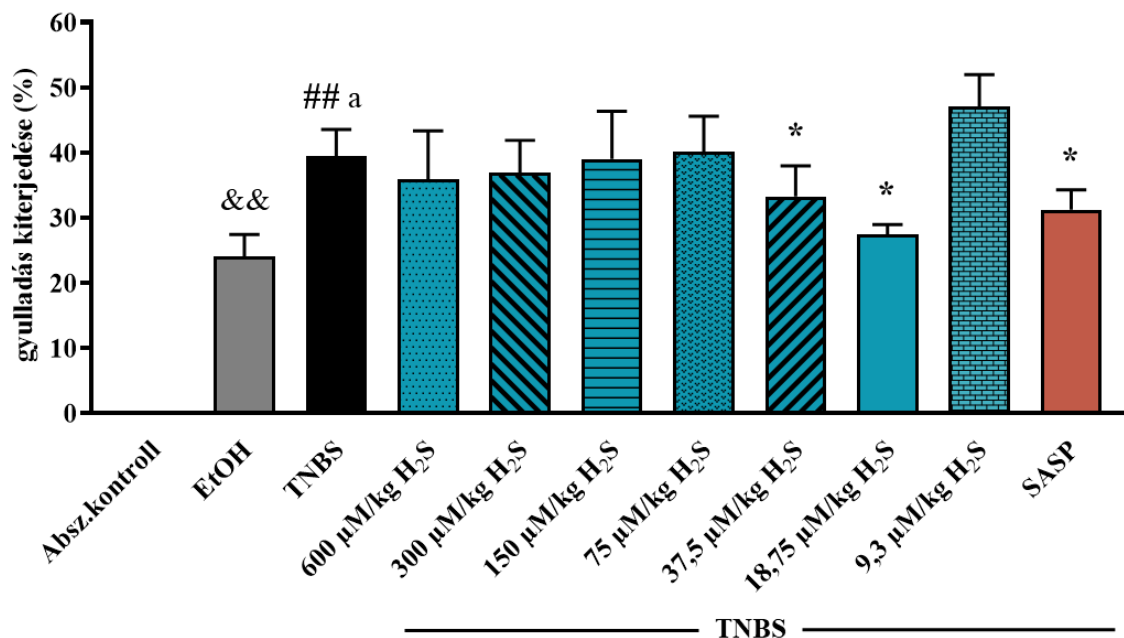
Átlag + SEM; n= 4-7/csoport; & < 0,05 abszolút kontroll vs. EtOH; # < 0,05 abszolút kontroll vs. TNBS; CSE: cisztationin γ -liáz, CBS: cisztationin β -szintáz, EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav

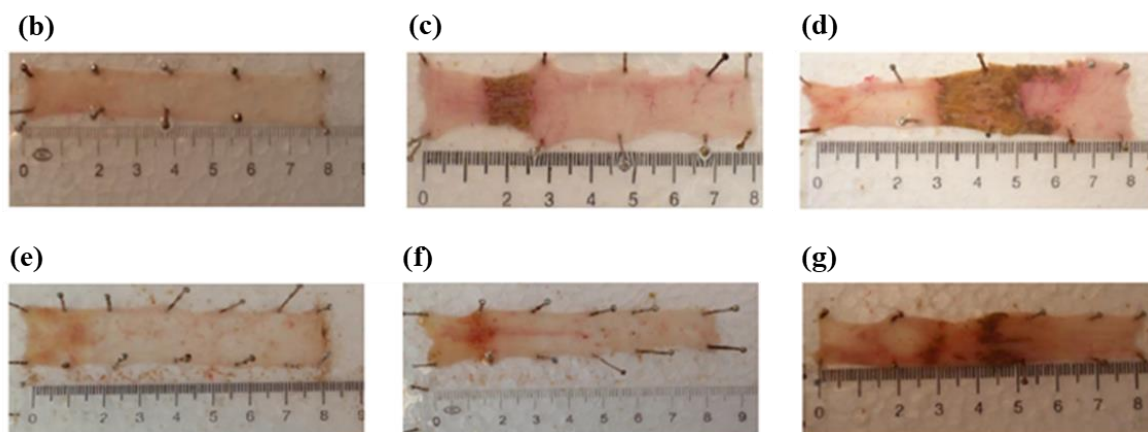
6.2. A különböző dózisu H₂S donor kezelés hatása a gyulladás kiterjedtségének mértékére TNBS-indukált colitis modellben

A H₂S donor Lawesson reagens bélgyulladásra gyakorolt hatásának meghatározása érdekében 50%-os EtOH-ban oldott TNBS intracolónális beadásával colitist indukáltunk az állatokban. Ezt követően különböző dózisu Lawesson reagenssel vagy pozitív kontrollként SASP-al kezeltük az állatokat naponta kétszer, per os, majd 72 óra elteltével meghatároztuk a gyulladás mértékét. A TNBS vivőanyaga, az 50%-os EtOH önmagában is fekélyesedést okozott

a bélfal mucosa barrierjének károsításával ($24,12 \pm 3,33\%$). Azonban a TNBS sokkal súlyosabb, a vizsgált terület közel 40%-át érintő haemorrhagiás és nekrotikus léziót, szövetmegvastagodást idézett elő ($39,39 \pm 4,18\%$). A különböző dózisokban alkalmazott H₂S donor esetében harang alakú dózis-hatás görbét kaptunk. Eredményeink azt mutatták, hogy a 37,5 és a 18,75 $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{nap}$ dózisok szignifikánsan csökkentették a gyulladás százalékos kiterjedtségét a TNBS csoporthoz képest ($33,28 \pm 4,68$ és $27,39 \pm 1,54$ vs. $39,39 \pm 4,18\%$). Ezeknél nagyobb, illetve kisebb dózisok már nem befolyásolták a gyulladás mértékét. A makroszkópos eredményeink alapján a 18,75 $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{nap}$ dózisú H₂S donor kezelés volt a leghatékonyabb a gyulladással szemben, így a további kísérleteinkben ezt a dózist alkalmaztuk. A CMC önmagában nem befolyásolta a gyulladás kiterjedtségét, bizonyítva ezzel, hogy a protektív hatás valóban a Lawesson reagensből felszabaduló H₂S eredménye. A klinikumban is alkalmazott és kísérletes colitis állatmodellben elfogadott pozitív kontroll SASP szignifikánsan csökkentette a gyulladás mértékét a TNBS csoporthoz képest ($31,24 \pm 3,04$ vs. $39,39 \pm 4,18\%$). A különböző kezelések hatását a TNBS-indukált gyulladásra a 11. a. ábra, a reprezentatív fotókat a 11. b-g. ábra szemlélteti.

(a)

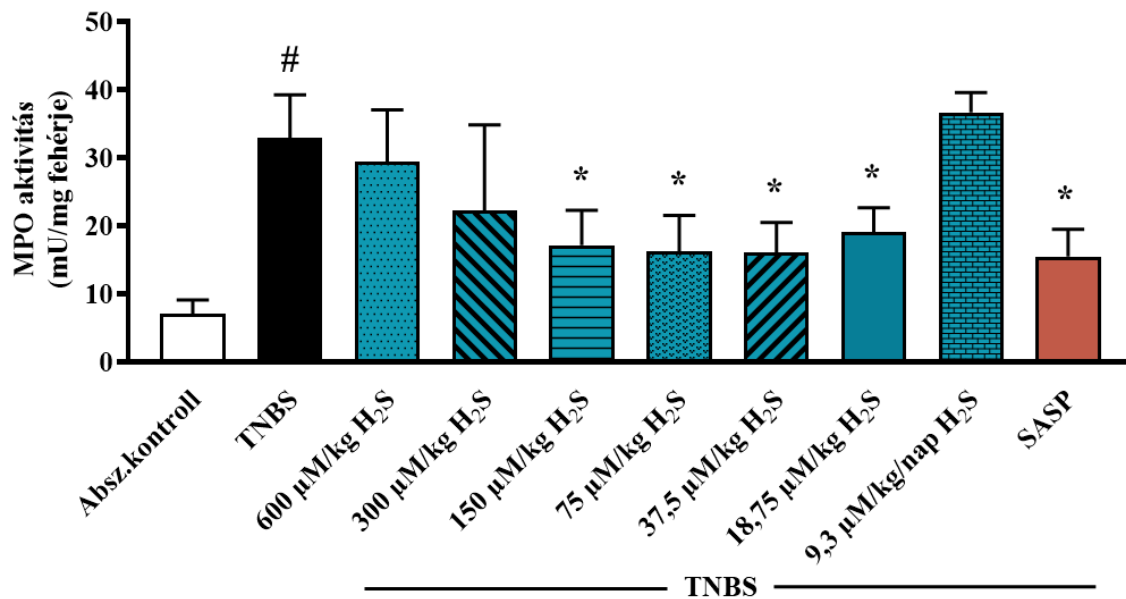




11. ábra. (a) A különböző dózisu H₂S donor kezelések hatása a gyulladás kiterjedtségére TNBS-indukált colitis modellben. Reprezentatív képek a patkány colonban kialakult gyulladásról a különböző csoportokban: (b) abszolút kontroll, (c) 50% etanol (EtOH), (d) 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS), (e) TNBS + 37,5 μM/kg/nap H₂S donor Lawesson reagens (H₂S), (f) TNBS + 18,75 μM/kg/nap H₂S donor Lawesson reagens (H₂S), (g) TNBS + szulfaszalazin (SASP, pozitív kontroll)
 Átlag + SEM; n= 4-11/csoport; && < 0,001 abszolút kontroll vs. EtOH; ## < 0,001 abszolút kontroll vs. TNBS; a < 0,05 EtOH vs. TNBS, * < 0,05 TNBS vs. TNBS + kezelések

6.3. Az MPO enzim aktivitásának változása a H₂S kezelések hatására TNBS-indukált colitis modellben

A gyulladási marker MPO enzim aktivitását az oxidált *O*-dianizidin mennyiségéből határoztuk meg spektrofotometriás méréssel. Az enzim aktivitása a TNBS-indukált gyulladás következtében szignifikánsan megemelkedett az abszolút kontroll csoporthoz képest ($32,99 \pm 6,2$ vs. $7,09 \pm 2,02$ mU/mg fehérje). A különböző dózisu H₂S donor kezelések szignifikánsan csökkentették az enzimaktivitást a 150 μM/kg/nap ($17,13 \pm 5,16$ mU/mg fehérje), 75 μM/kg/nap ($16,28 \pm 5,24$ mU/mg fehérje), 37,5 μM/kg/nap ($16,12 \pm 4,36$ mU/mg fehérje) és a 18,75 μM/kg/nap ($19,07 \pm 3,5$ mU/mg fehérje) esetében a TNBS csoporthoz ($32,99 \pm 6,2$ mU/mg fehérje) viszonyítva. A 300 μM/kg/nap dózis esetében is jelentős csökkenést tapasztaltunk, azonban a különbség nem volt szignifikáns. Továbbá a 9,3 μM/kg/nap kisebb dózisu H₂S donor már nem befolyásolta az MPO aktivitását a TNBS csoporthoz képest (12. ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy molekuláris szinten a H₂S donor kezelés több dózisban is szignifikáns csökkenést okozott a TNBS által megnövelt gyulladási marker aktivitásában, azonban csak a 37,5 μM/kg/nap és a 18,75 μM/kg/nap dózisok esetében tapasztaltunk makroszkóposan is megjelenő gyulladás csökkenését a colon szövetekben (11. ábra). A pozitív kontroll SASP kezelés szintén szignifikánsan csökkentette az MPO aktivitását a TNBS csoporthoz viszonyítva ($15,49 \pm 4$ vs. $32,99 \pm 6,2$ mU/mg fehérje).



12. ábra. A mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitásának változása a különböző dózisu H₂S donor kezelés hatására TNBS-indukált colitisben

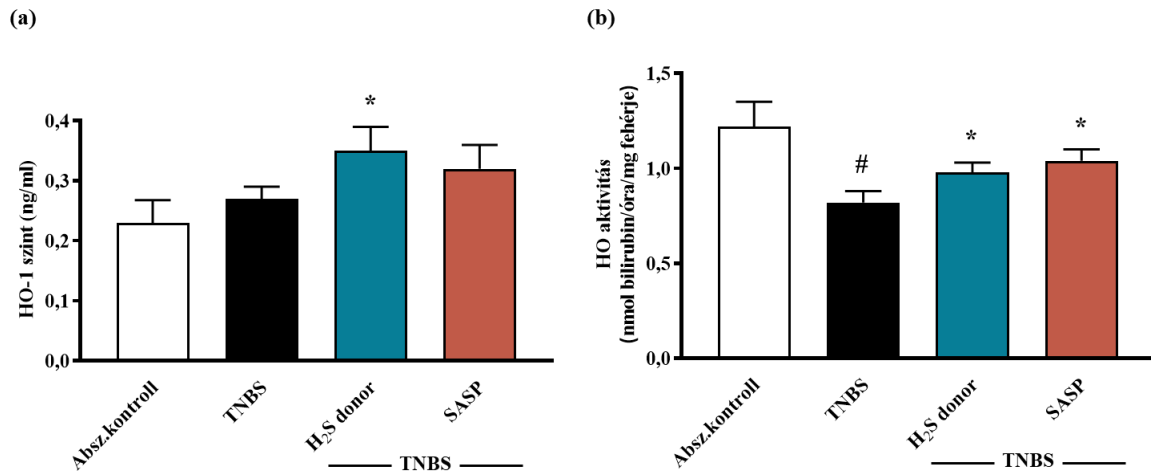
Átlag + SEM; n= 5-7/csoport; # < 0,05 abszolút kontroll vs. TNBS; * < 0,05 TNBS vs. TNBS + kezelések
 TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, H₂S: H₂S donor Lawesson reagens, SASP: szulfasalazin

6.4. Az exogén H₂S hatása az antioxidáns HO-1 enzim szintjére és a HO aktivitásra TNBS által indukált gyulladásban

Az antioxidáns HO-1 enzim szintjének ELISA módszerrel történő meghatározása alapján azt tapasztaltuk, hogy az enzim szintje emelkedett a TNBS kezelés hatására az abszolút kontroll csoporthoz képest, a különbség azonban statisztikailag nem volt szignifikáns ($0,26 \pm 0,02$ vs. $0,23 \pm 0,04$ ng/mg fehérje). A 18,75 µM/kg/nap dózisu Lawesson reagens kezelés további szignifikáns emelkedést eredményezett a HO-1 enzim szintjében a colon szövetekben a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,35 \pm 0,04$ vs. $0,26 \pm 0,02$ ng/mg fehérje). Továbbá, a pozitív kontrollként alkalmazott SASP szintén növelte ($0,32 \pm 0,04$ vs. $0,26 \pm 0,02$ ng/mg fehérje) az enzimszintet, azonban a változás nem volt szignifikáns.

A HO enzim aktivitására a reakció során képződött bilirubin mennyiségéből következtettünk. Eredményeink alapján elmondható, hogy az enzim aktivitása a colitis indukcióját követően, az enzim szintjével ellentétben, szignifikánsan csökkent az abszolút kontroll csoporthoz képest a colon szövetekben ($0,81 \pm 0,06$ vs. $1,22 \pm 0,13$ nmol bilirubin/óra/mg fehérje). Az orálisan alkalmazott 18,75 µM/kg/nap dózisu H₂S donor és a

SASP azonban szignifikánsan megemelte a HO enzim aktivitását a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,97 \pm 0,05$ és $1,03 \pm 0,05$ vs. $0,81 \pm 0,06$ nmol bilirubin/óra/mg fehérje). A HO enzimmel kapcsolatos eredményeink a 13. a. és b. ábrán láthatók.



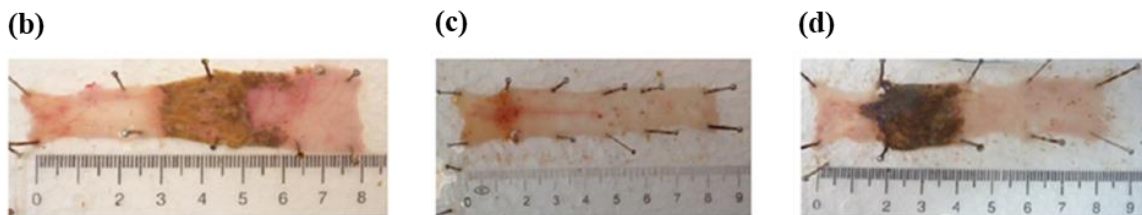
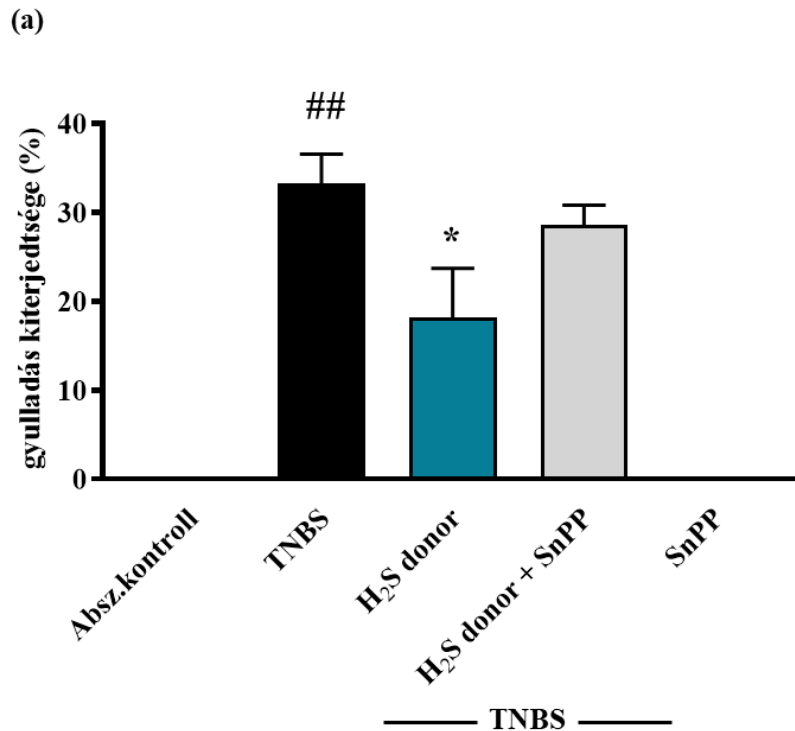
13. ábra. A H₂S donor kezelés hatásának vizsgálata a (a) hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim szintjére és a (b) HO enzimek aktivitására

Átlag + SEM; n= 5-8/csoport; # < 0,05 abszolút kontroll vs. TNBS; * < 0,05 TNBS vs. TNBS + kezelések

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, H₂S donor: Lawesson reagens, SASP: szulfaszalazin

6.5. Lézió kiterjedtségének vizsgálata a HO-1 inhibitor SnPP kezelést követően TNBS-indukált colitis modellben

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a HO-1 enzim szerepét a H₂S donor által kiváltott protekcióban és szignál transzdukcióban, a colitis indukcióját követően az állatokat a per os alkalmazott védő hatású 18,75 μ M/kg/nap dózsisú H₂S donorral párhuzamosan a HO-1 enzim aktivitását gátló SnPP-vel is kezeltük szubkután, majd meghatároztuk a gyulladást okozó lézió mértékét (14. a-d. ábra). Eredményeink alapján elmondható, hogy a 18,75 μ M/kg/nap dózsisú H₂S donor kezelés szignifikánsan csökkentette a gyulladást okozó lézió mértékét a colon szövetekben a TNBS csoporthoz képest ($18,18 \pm 5,54$ vs. $33,28 \pm 3,32\%$), a protektív hatás azonban az inhibitorral való együttes kezelést követően megszűnt. Az SnPP önmagában nem okozott gyulladást az állatok vastagbéljében.



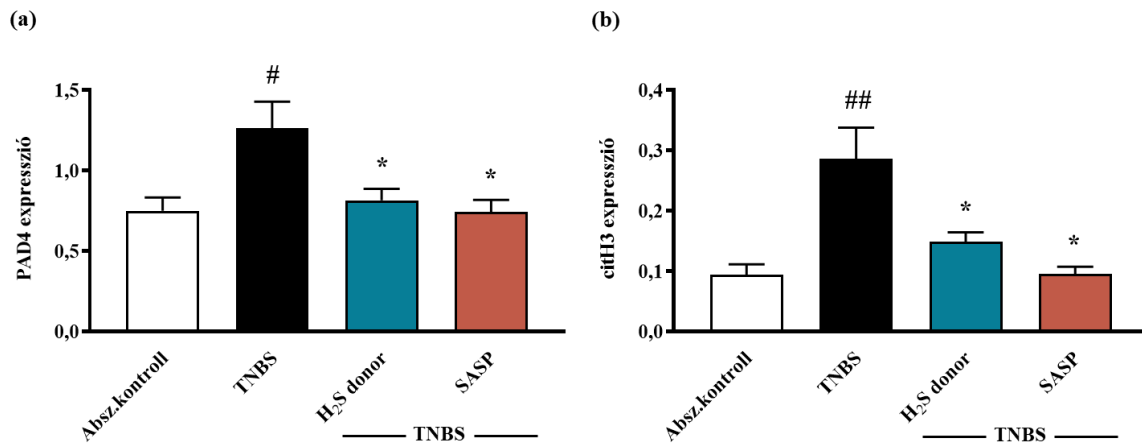
14. ábra. (a) A gyulladás kiterjedtségének változása H₂S donor kezelés, illetve a hemoxigenáz-1 inhibitor ón-protoporfirin (SnPP) hatására. Reprezentatív képek a patkány colonban kialakult gyulladásról a különböző csoportokban: **(b)** 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS), **(c)** TNBS + H₂S donor Lawesson reagens (H₂S donor), **(d)** TNBS + H₂S donor + ón-protoporfirin (SnPP)
 Átlag + SEM; n= 6/csoport; ## < 0,001 abszolút kontroll vs. TNBS; * < 0,05 TNBS vs. TNBS + H₂S donor kezelés

6.6. A PAD4 és a citH3 NETózis markerek expressziójának változása H₂S kezelés hatására TNBS-indukált gyulladásban

A protekció molekuláris biológiai hátterének tisztázása érdekében új kísérletsorozatban megvizsgáltuk a NETózis potenciális szerepét. A NETózis során a PAD4 enzim és az általa citrullinált hiszton H3 fehérje expressziója fokozódik, amelyek a NET képződés markereiként szolgálnak. Eredményeink alapján megállapítható, hogy TNBS kezelést követően a PAD4 enzim expressziója szignifikánsan megemelkedett a gyulladt bélszövetekben a kezeletlen kontroll csoporthoz viszonyítva ($0,75 \pm 0,08$ vs. $1,26 \pm 0,16$ relatív expresszió). A protektív

hatású H₂S szignifikánsan csökkentette a PAD4 enzim expresszióját a TNBS csoporthoz képest ($0,82 \pm 0,07$ vs. $1,26 \pm 0,16$ relatív expresszió). Továbbá, a pozitív kontrollként alkalmazott SASP szintén szignifikánsan redukálta az enzim szintjét a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,74 \pm 0,07$ vs. $1,26 \pm 0,16$ relatív expresszió), az expresszió közel azonos volt a kontroll csoport értékeivel (15. a. ábra).

A PAD4 enzim eredményeinek megfelelően, a citH3 expressziója esetében is hasonló tendenciát tapasztaltunk (15. b. ábra). TNBS hatására a citH3 expressziója szignifikáns növekedést mutatott az abszolút kontroll csoporthoz képest ($0,09 \pm 0,02$ vs. $0,29 \pm 0,05$ relatív expresszió), azonban, mind a H₂S donor, mind a SASP kezelés szignifikánsan csökkentette a citH3 expresszióját a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,15 \pm 0,02$ és $0,09 \pm 0,01$ vs. $0,29 \pm 0,05$ relatív expresszió).



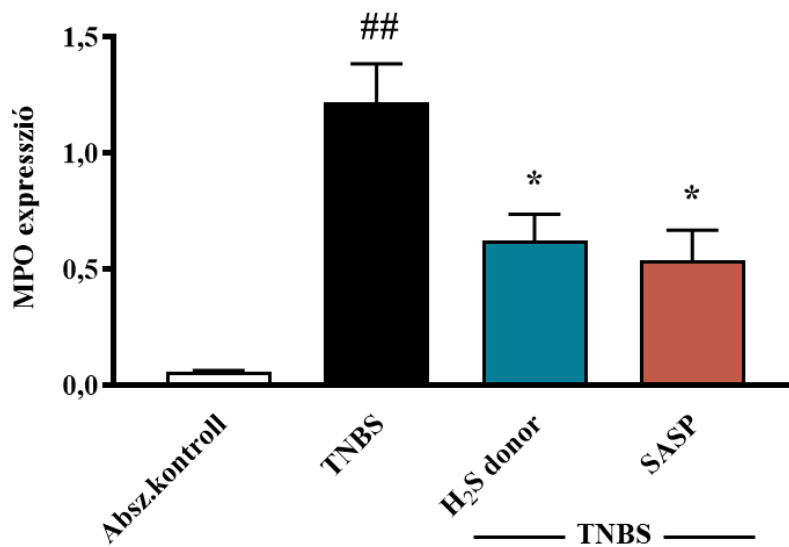
15. ábra. A H₂S donor kezelés hatásának vizsgálata a NETózis marker (a) peptidil-arginin-deimináz 4 (PAD4) enzim és a (b) citrullinált hiszton H3 (citH3) expressziójára TNBS-indukált colitisben. Átlag + SEM; n= 5-13/csoport; # < 0,05 abszolút kontroll vs. TNBS; ## < 0,001 abszolút kontroll vs. TNBS; * < 0,05 TNBS vs. TNBS + kezelések

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, H₂S donor: Lawesson reagens, SASP: szulfaszalazin

6.7. Az MPO, mint NET komponens expressziójának változása H₂S kezelést követően colitis modellben

Az MPO enzim jelentős szerepet játszik a NET képződés folyamatában is. Az 12. ábrán látható, hogy a TNBS kezelés a szöveti MPO aktivitás, több mint négyszeres növekedését eredményezte az abszolút kontroll csoporthoz képest, a protektív hatású, 18,75 µM/kg/nap dózisú H₂S donor pedig szignifikánsan csökkentette az enzim aktivitását a TNBS csoporthoz viszonyítva.

Az MPO enzim expressziója az aktivitásához hasonlóan alakult a különböző csoportokban. Western blot eredményeink azt mutatták (16. ábra), hogy az MPO expressziója szignifikánsan megemelkedett a colitis indukcióját követően az abszolút kontroll csoporthoz képest ($0,06 \pm 0,01$ vs. $1,22 \pm 0,17$ relatív expresszió). A Lawesson reagensből felszabaduló H_2S , valamint a SASP kezelés pedig az enzim expressziójának szignifikáns csökkenését eredményezte a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,62 \pm 0,11$ és $0,54 \pm 0,13$ vs. $1,22 \pm 0,17$ relatív expresszió).



16. ábra. A H_2S donor kezelés hatása a mieloperoxidáz (MPO) enzim szöveti kifejeződésére TNBS colitisben

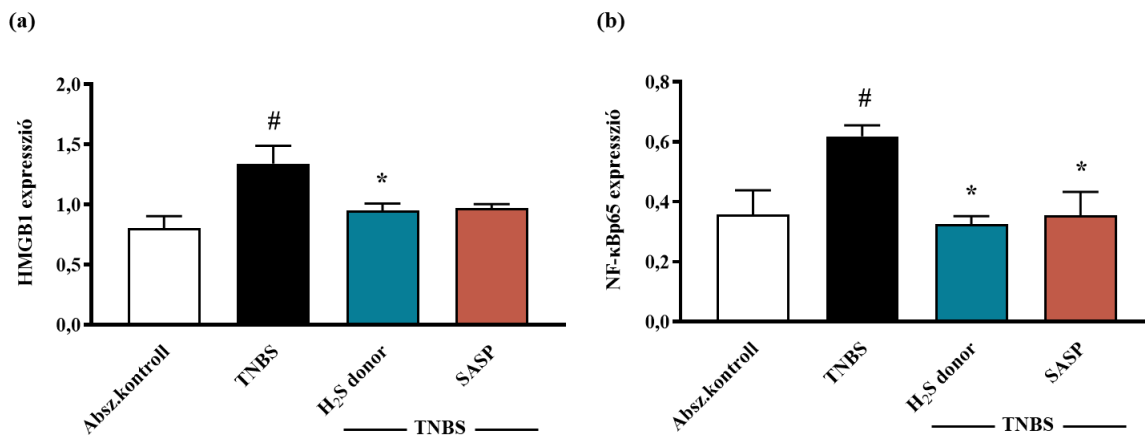
Átlag + SEM; n= 5-11/csoport; ## < 0,001 abszolút kontroll vs. TNBS; * < 0,05 TNBS vs. TNBS + kezelések

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, H_2S donor: Lawesson reagens, SASP: szulfaszalazin

6.8. A H_2S donor kezelés hatása a gyulladási mediátorok: a HMGB1 és az NF- κ B p65-ös alegységének expressziójára

Pro-inflammatórikus mediátorok közül a HMGB1 expressziója a TNBS-indukált gyulladás következtében szignifikánsan megemelkedett az abszolút kontroll csoporthoz képest ($0,80 \pm 0,10$ vs. $1,34 \pm 0,15$ relatív expresszió). A protektív hatású $18,75 \mu\text{M/kg/nap}$ dózisú H_2S donor kezelés pedig szignifikánsan csökkentette a HMGB1 szintjét a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,95 \pm 0,06$ vs. $1,34 \pm 0,15$ relatív expresszió). A SASP kezelés szintén csökkentette a gyulladási marker expresszióját a TNBS értékeihez képest, a változás azonban statisztikailag nem volt szignifikáns (17. a. ábra).

A gyulladáskeltő transzkripciós faktor NF- κ B jelentős szerepet játszik az IBD patogenezisében. A 17. b. ábrán látható, hogy a TNBS kezelés szignifikánsan növelte az NF- κ B p65-ös alegységének expresszióját az abszolút kontroll csoporthoz képest ($0,36 \pm 0,08$ vs. $0,62 \pm 0,05$ relatív expresszió). A H₂S donor, illetve a pozitív kontrollként alkalmazott SASP azonban a p65-ös alegység szöveti expressziójának szignifikáns csökkenését eredményezte a TNBS csoporthoz képest ($0,33 \pm 0,03$ és $0,35 \pm 0,08$ vs. $0,62 \pm 0,05$ relatív expresszió).



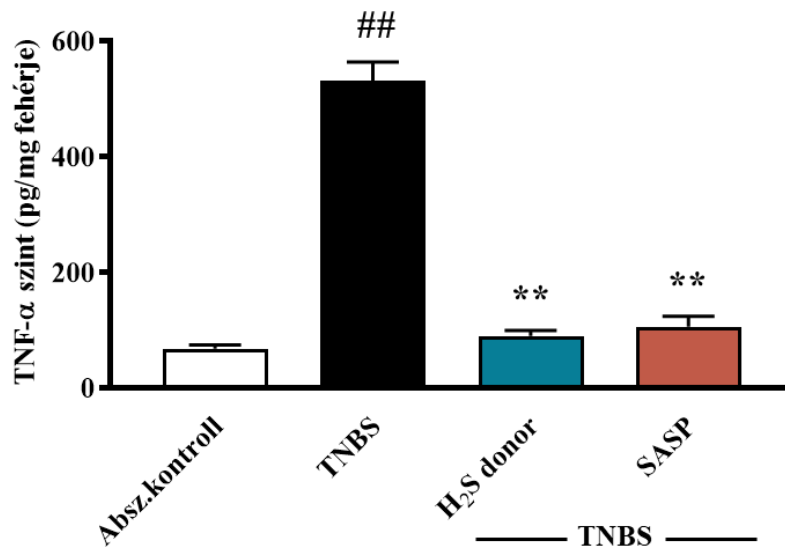
17. ábra. A gyulladós mediátorok, a (a) high mobility group box 1 (HMGB1) és a (b) nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) p65-ös alegységének expresszió változása H₂S donor kezelés hatására TNBS-indukált colitisben

Átlag + SEM; n= 5-12/csoport; # < 0,05 abszolút kontroll vs. TNBS; * < 0,05 TNBS vs. TNBS + kezelések

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, H₂S donor: Lawesson reagens, SASP: szulfaszalazin

6.9. A pro-inflammatorikus citokin TNF- α szintjének változása H₂S donor kezelést követően colonban

A gyulladáskeltő citokin TNF- α szintjének változásai a 18. ábrán láthatók. Eredményeink alapján elmondható, hogy a citokin szintje a kísérletes colitis indukcióját követően szignifikánsan megemelkedett az abszolút kontroll csoporthoz képest ($67,67 \pm 6,75$ vs. $531,67 \pm 31,9$ pg/mg fehérje). A gyulladós lézió alapján leghatásosabbnak ítélt $18,75 \mu\text{M/kg/nap}$ dózisú H₂S donor szignifikánsan csökkentette a gyulladós kaszkád ezen komponensének felszabadulását a bélszövetben a TNBS csoporthoz viszonyítva ($89,95 \pm 9,42$ vs. $531,67 \pm 31,9$ pg/mg fehérje). Továbbá, a pozitív kontrollként alkalmazott SASP kezelés szintén szignifikáns csökkenést eredményezett a citokin szintjében a TNBS csoporthoz képest ($105,78 \pm 17,7$ vs. $531,67 \pm 31,9$ pg/mg fehérje).



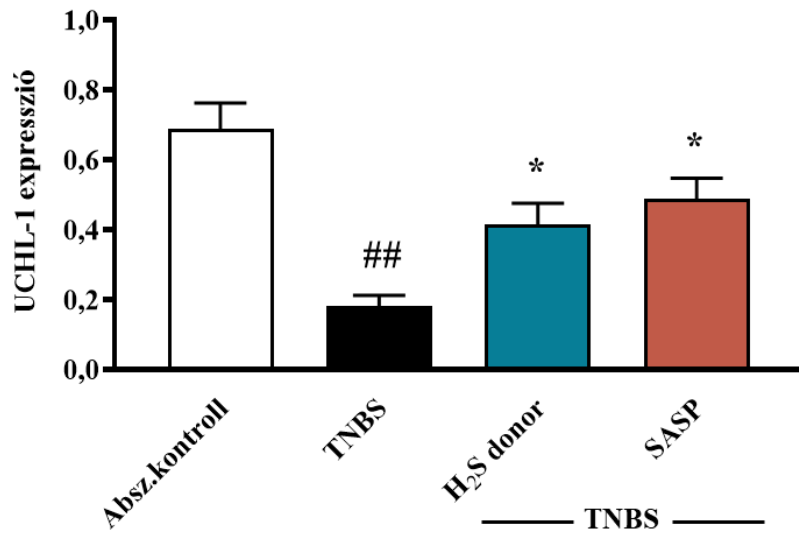
18. ábra. A pro-inflammatorikus citokin tumor nekrosis faktor α (TNF- α) szintjének változása H₂S donor kezelést követően TNBS-indukált colitisben

Átlag + SEM; n= 4-8/csoport; ## < 0,001 abszolút kontroll vs. TNBS; ** < 0,001 TNBS vs. TNBS + kezelések

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, H₂S donor: Lawesson reagens, SASP: szulfaszalazin

6.10. Az UCHL-1 expressziójának változása H₂S kezelést követően TNBS-indukált colitis modellben

Kísérletünk során megvizsgáltuk a különböző kezelések hatását az UCHL-1 deubiquitináz enzim expressziójára (19. ábra) is. Western blot eredményeink azt mutatták, hogy a TNBS által indukált gyulladás következtében szignifikánsan lecsökkent az enzim expressziója a colon szövetekben a kezeletlen kontroll csoporthoz képest ($0,69 \pm 0,07$ vs. $0,18 \pm 0,03$ relatív expresszió). Azonban a $18,75 \mu\text{M}/\text{kg}/\text{nap}$ dózisú H₂S donor, illetve a SASP kezelés hatására szignifikáns emelkedést tapasztaltunk az UCHL-1 expressziójában a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,42 \pm 0,06$ és $0,49 \pm 0,06$ vs. $0,18 \pm 0,03$ relatív expresszió).



19. ábra. Az ubiquitin C-terminális hidroláz L1 (UCHL-1) expresszió változása H₂S donor kezelést követően TNBS-indukált colitis modellben

Átlag + SEM; n= 5-10/csoport; ## < 0,001 abszolút kontroll vs. TNBS; * < 0,05 TNBS vs. TNBS + kezelések
 TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, H₂S donor: Lawesson reagens, SASP: szulfaszalazin

7. Diszkusszió

Az IBD olyan GI rendszert érintő, krónikus lefolyású, immunmediált megbetegedés, amelyre jellemző a relapszusok és remissziók ciklikus váltakozása. Az epidemiológiai adatok alapján az IBD prevalenciája világszerte folyamatosan emelkedik [15]. Jelenleg számos terápiás lehetőség létezik, melyek elsődleges célja a tüneti kezelés, azonban ezek nem minden esetben hatékonyak. A gyógyszerek hosszú távú alkalmazása gyakran súlyos mellékhatásokkal jár [134, 199], valamint számos terápia rezisztens esettel találkozhatunk a klinikumban. Jelen tanulmányunkban a H₂S kezelés gyulladáscsökkentő hatását és lehetséges hatásmechanizmusait vizsgáltuk TNBS-indukált patkány colitis modellben, különös tekintettel az antioxidáns HO enzimrendszerre, gyulladási markerekre és a NETózisra. Kísérletünk során megállapítottuk, hogy colitis során a H₂S termelő enzimek (CSE és CBS) expressziója csökkent. A különböző koncentrációjú H₂S donor kezelések közül a 18,75 µM/kg/nap dózis csökkentette a legnagyobb mértékben a gyulladás kiterjedtségét a colonszövetekben, a különböző gyulladási markerek és mediátorok szintjét, valamint növelte az anti-inflammatórikus hatású UCHL-1 enzim expresszióját. A protektív hatású H₂S kezelés hatására az antioxidáns HO enzim szintjének és aktivitásának emelkedését tapasztaltuk, amely védő hatás az enzim gátlásával megszűnt, feltételezve ezzel a HO enzim szerepét a H₂S-mediálta protekcióban. Eredményeink alapján továbbá feltételezhető, hogy a H₂S anti-inflammatórikus hatása a gyulladás következtében megemelkedett NETózis markerek szintjének csökkentése révén, a NET képződés gátlásával is megvalósulhat. Eredményeink új lehetőségeket és terápiás célpontokat jelenthetnek a H₂S-alapú kezelés IBD-ben történő alkalmazásában.

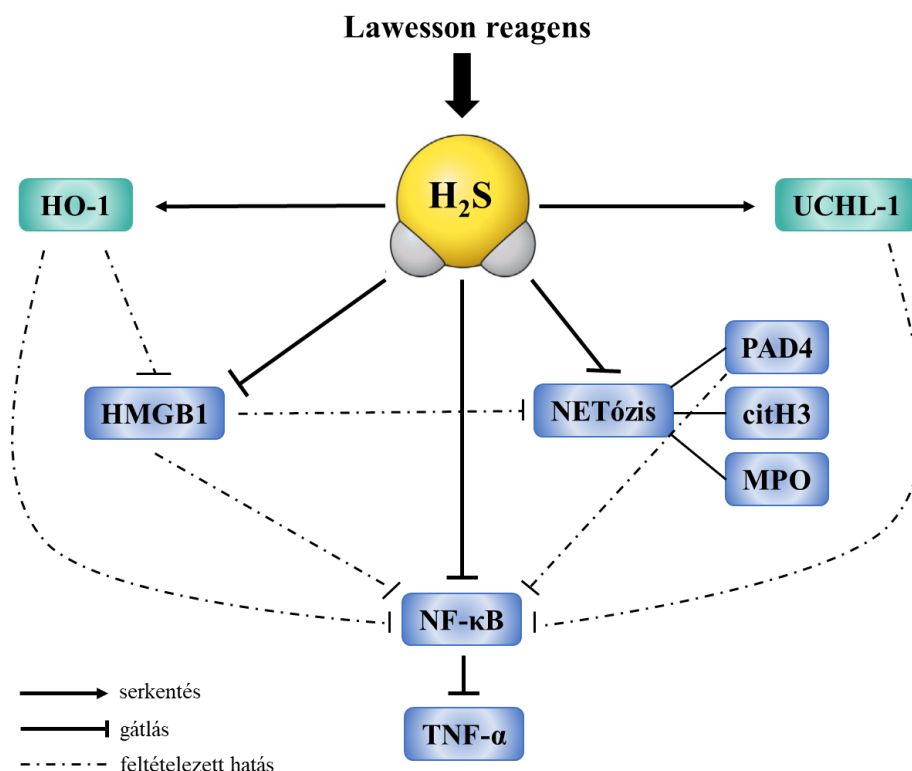
A korábban leginkább toxikus hatásáról ismert H₂S-ről kiderült, hogy fontos gáztranszmitter a szervezetünkben és biológiai folyamatokban betöltött szerepének tanulmányozása egyre nagyobb figyelmet kapott az elmúlt években [162, 200]. Komplex hatásai révén a H₂S számos fiziológiás és patofiziológiás folyamatot szabályoz [166, 188, 201]. Fiziológiás koncentrációban citoprotektív, antioxidáns, vazodilatátor, anti-inflammatórikus, illetve anti-apoptotikus hatású. Gyulladáscsökkentő hatása egyre inkább tisztázott IBD-ben, amely megvalósulhat többek között az ATP-szenzitív K⁺ csatorna aktiválásával vazodilatáción keresztül a gyulladási területek vérellátásának javításával [202], a leukocita adhézión és migráción, valamint az ödéma kialakulásának csökkentésével [176]. A H₂S védelmet nyújt a bél iszkémia-reperfúziós károsodásával szemben [178], elősegíti a baktériumok fagocitózist, illetve a makrofágok „M2” fenotípusba történő differenciálódását [203]. Ezenkívül, a H₂S beindítja a gyomor és a duodenum hidrogén-karbonát (HCO₃⁻) szekrécióját, amely a gyomorsav

semlegesítésével mérsékli a gyulladási folyamatok során fellépő káros hatásokat [204]. A H₂S oxidációjának kulcsfontosságú enzime az SQR. A bélnyálkahártya fekélyes elváltozása során az SQR expressziója jelentősen csökken, ezáltal csökken az endogén H₂S katabolizmusa a károsodás helyén, hozzájárulva a fekély gyógyulásához és a gyulladás mérsékléséhez [169].

A mucosális H₂S szintéziséért 3 enzim: a CSE, a CBS és a 3-MST felelősek. Kísérleteink során TNBS-indukált patkány colitis modellben vizsgáltuk a CSE és CBS enzimek kifejeződését. Méréseink azt mutatták, hogy mind a CSE, mind a CBS expressziója szignifikánsan lecsökkent a gyulladás indukcióját követően a bélszövetben a kontroll csoporthoz képest, amely következményesen befolyásolhatja a lokálisan felszabaduló endogén H₂S mennyiségét. Eredményeink megfelelnek Wallace és mtsai. [205] megfigyeléseinek, amelyek szerint a CSE és CBS enzimek expressziója jelentősen mérséklődött a gyulladt colonszövetben. Az enzimek expresszióját a colitis indukcióját követő több időpontban is meghatározták és a legalacsonyabb szintet 72 óra elteltével mérték. Kísérletünk során a colon minták preparálása a gyulladás kiváltását követően szintén 72 órával történt.

A fekélyes elváltozások kialakulása az IBD egyik jellemző tünete, amely a CD esetében a GI rendszer bármely szakaszát érintheti transzmurális gyulladást okozva, CU esetében pedig csak a vastagbélre lokalizálódik és a mucosa vagy felületesen a submucosa réteget érinti [13]. A TNBS modell a CD-re jellemző transzmurális gyulladást okoz, azonban lokalizációját tekintve a colitisre hasonlít, csak a colont érinti [154]. Jelen kísérletünkben a TNBS kezelés hatására súlyos, a vizsgált területek közel 40%-át érintő haemorrhagiás és nekrotikus szöveti gyulladást, fekélyesedést, illetve szövetmegvastagodást figyeltünk meg. Eredményeink megfelelnek Ghatule és mtsai. [206] által a súlyossági skála, valamint a colon tömegének növekedése alapján levont következtetéseinek, melyek szerint a TNBS által kiváltott gyulladás a patkányok vastagbélének ödémásodásához, nekrozisához és fekélyes elváltozásához vezetett. Kísérletünk során a különböző dózisu H₂S donorral történő kezelés harang alakú dózis-hatást mutatott. A két protektív hatású H₂S donor dózis szignifikánsan csökkentette a gyulladás súlyosságát és a fekélyesedés kiterjedtségét a TNBS által kiváltott patkány vastagbélgyulladásban. Továbbá, a 18,75 µM/kg/nap dózisu H₂S donor gyulladáscsökkentő hatékonysága a pozitív kontrollként alkalmazott, klinikumban is használt SASP védő hatását is meghaladta. Eredményeink megfelelnek Chen és mtsai. [207] által tapasztaltaknak, akik munkájuk során szintén arról számoltak be, hogy a NaHS kezelés csökkentette a gyulladást és a szövetkárosodást DSS-indukált egér colitisben. A napjainkban széleskörűen alkalmazott NSAID-ok GI rendszert károsító hatásait számos vizsgálat bizonyította [39, 208], ezen negatív hatások a gyógyszercsoport hosszútávú alkalmazásának fő korlátai. Azonban egyre inkább

tisztázott, hogy a H₂S donormolekulák, illetve a gyulladáscsökkentő farmakonok H₂S-nel vagy előanyagaival történő módosulatai, hatékonyan csökkentik a gyulladást, mindezt kevesebb mellékhatás mellett [209-211]. Jelenleg több kutatás folyik olyan NSAID-ok fejlesztésére melyek a hagyományos gyulladáscsökkentő hatásaik mellett, módosított molekulájukból H₂S is felszabadítanak [212, 213]. Ilyen készítmények például az S-aszpirin, az S-diklofenák és az S-naproxen [214]. Több tanulmányban igazolták, hogy a H₂S-t felszabadító NSAID, a naproxen származék ATB-346 szintén csökkenti a fájdalmat és a gyulladást, hasonlóan mint maga a naproxen, de lényegesen kevesebb károsodást okozva a GI rendszerben [215, 216]. Továbbá, az ATB-346 fázis II. klinikai vizsgálatban is hatásosnak bizonyult [217]. Ezenkívül Fiorucci és mtsai. [218] ATB-429-cel (a mesalazin H₂S-származéka) kezelt colitis állatmodellben megfigyelték, hogy a gyulladt szövetekben jelentősen csökkent a granulociták szintje, illetve számos gyulladáskeltő citokin (IL-1, IL-8, IL-12 és TNF- α) expressziója, miközben az anti-inflammatorikus IL-10 citokin expressziója nem változott. Az ATB-429 a mesalazinnal ellentétben, gyengébben szívódik fel, így nincs szükség olyan hordozóra, amely késlelteti a felszívódást, hogy az aktív hatóanyag a vastagbélben szabaduljon fel. Továbbá, ezáltal az orálisan adagolt ATB-429 az egész GI traktus területén képes csillapítani a nyálkahártya gyulladását [184]. Ezenkívül Blackler és mtsai. [193] megfigyelték, hogy diallil-diszulfiddal (DADS), mint H₂S donorral végzett kezelés védelmet nyújt a NSAID naproxen okozta enteropathia ellen. Annak ellenére, hogy a H₂S protektív hatását számos tanulmány igazolta, a protekció pontos mechanizmusa még nem teljesen ismert. Kísérleteink során a H₂S gyulladáscsökkentő hatásának háttérében álló mechanizmusok feltérképezése érdekében vizsgált paramétereket és eredményeinket a 20. ábra foglalja össze.



20. ábra. A kén-hidrogén (H₂S) feltételezett gyulladáscsökkentő mechanizmusai eredményeink alapján

HO-1: Hemoxigenáz-1, UCHL-1: ubiquitin C-terminális hidroláz L1, HMGB1: high mobility group box 1, NF-κB: nukleáris faktor kappa B, TNF-α: tumor nekrozis faktor α, PAD4: peptidil-arginin-deimináz 4, citH3: citrullinált hiszton H3, MPO: mieloperoxidáz

A pro-inflammatórikus MPO enzim aktivitása a gyulladásos folyamatok korai indikátoraként elfogadott biomarker. Az enzim elsősorban a neutrofil granulociták azurofil granulumaiban található, aktivitása pedig korrelál a neutrofil infiltrációval, a gyulladás mértékével. Kísérletünkben a TNBS kezelés szignifikáns emelkedést eredményezett az MPO enzim aktivitásában az abszolút kontroll csoporthoz képest, összhangban a makroszkóposan megfigyelhető gyulladás kiterjedtségével. Azonban ezt a fokozódott enzimaktivitást a H₂S donor több dózisa is szignifikánsan csökkentette, amely alapján feltételezzük, hogy a protekció molekuláris szinten elkezdődött.

Egyre inkább tisztázott, hogy az oxidatív stressz is fontos szerepet játszik az IBD patogenezisében [65]. Az egyik jelentős antioxidáns és anti-inflammatórikus hatású enzim a szervezetben a HO-1, amely a prooxidáns hatású hem átalakulását katalizálja. Kísérletünk során megvizsgáltuk, hogy a HO enzim szerepet játszik-e a H₂S-mediálta protekcióban TNBS által kiváltott colitisben. Eredményeink alapján elmondható, hogy a H₂S donor kezelés növelte a HO enzim aktivitását és a HO-1 szintjét, ami a gyulladás csökkenéséhez vezetett. A H₂S a HO-1

expressziójának indukálását feltehetően az Nrf2 transzkripció faktor aktiválásán keresztül valósítja meg [219]. Eredményeink összhangban vannak kutatócsoportunk korábbi megfigyeléseivel, miszerint a HO enzim aktiválása csökkenti a gyulladás mértékét TNBS-indukált colitisben [95]. Erbil és mtsai. [220] TNBS modellben szintén igazolták, hogy a gyulladás HO-1 expressziót indukálhat a vastagbélben, ezáltal védelmet nyújtva a káros folyamatokkal szemben. Wang és mtsai. [221] eredményeik alapján azt feltételezték, hogy a TNBS hatására megemelkedett HO-1 expresszió feltehetően a ROS termelés növekedésének tudható be. Kísérletünk során a protektív hatás pozitív kontrolljaként SASP-ot alkalmaztunk. A SASP, valamint metabolitja az 5-ASA az egyik standard terápiás szer az IBD kezelésében, a hatását a vastagbélben fejti ki. Horváth és mtsai. [222] TNBS-indukált colitis modellben igazolták, hogy az 5-ASA kezelés gyulladáscsökkentő hatását részben a HO-1 enzim aktiválásán keresztül fejti. Kísérletünkben az állatokat a H₂S donor mellett SnPP-vel, a HO-1 inhibitorával kezeltük annak vizsgálata érdekében, hogy esetünkben a H₂S a gyulladáscsökkentő hatását a HO enzimrendszer kifejeződésén keresztül valósítja-e meg. Eredményeink alátámasztották hipotézisünket, mivel a H₂S protektív hatása megszűnt a HO-1 inhibitor jelenlétében. Kísérletünkhöz hasonlóan a HO-1 védő szerepét Zhong és mtsai. [96] is igazolták DSS-indukált colitis modellben, az enzim gátlásával (SnPP) a gyulladás mértéke változatlan maradt.

A neutrofilek effektor funkciója a fagocitózison, a citokin- és ROS-termelésen kívül a NET képzés és felszabadítás [121]. Az IBD-re a gyulladás helyén intenzív neutrofil infiltráció jellemző [223], és egyre több tanulmány igazolja, hogy a NETózis szerepet játszik az IBD patogenezisében [224, 225]. Therrien és mtsai. [226] kimutatták, hogy a neutrofilek előfordulása és aktiválódása megnövekedett a gyulladt és károsodott vastagbélben, ami korrelál a betegség súlyosságával. A NET komponensek jelenlétét Tao Li és mtsai. [225] igazolták IBD-ben szenvedő betegek plazmájában. Munkájuk során szignifikánsan megemelkedett plazma DNS és MPO-DNS komplex szinteket tapasztaltak aktív és inaktív CU vagy CD betegekben egészséges kontroll csoportokhoz viszonyítva. Ezen felül jelentős citH3 expressziót figyeltek meg az érintett betegek szövetmintáiban. Dinallo és mtsai.-nak [227] eredményei további bizonyítékot nyújtanak a NET képződés jelenlétére IBD-ben. Vizsgálatuk során a NET komponensek fokozott expressziója mellett immunfluoreszcens festéssel is igazolták az MPO, az NE és a citH3 együttes lokalizációját a DNS-sel colitisben szenvedő betegekből származó mintákban. Jelen kísérletünkben a H₂S donor, Lawesson reagens hatását vizsgáltuk a NET komponensek expressziójára TNBS-indukált patkány vastagbélgyulladásban. A gyulladásos folyamatok során keletkezett ROS által aktivált PAD4 enzim hiszton fehérjék specifikus arginin

láncait citrullinálja, elősegítve ezzel a kromatin dekondezálódását és a NET kialakulását [228]. Western blot eredményeink alapján elmondható, hogy a gyulladás indukcióját követően az enzim expressziója megemelkedett a colonszövetben. A PAD4 változásával összhangban a citH3 szintén fokozott expressziót mutatott TNBS kezelés hatására. A hiszton poszttranszlációs módosítása kromatin dekondezációt indukál a sejtmagban. A NET képződés során MPO és NE enzimek is felszabadulnak az azurofil granulumból, amelyek a sejtmagba vándorolnak és hozzájárulnak a kromatin további dekondezációjához. Saját eredményeink megerősítik az irodalmi adatokat, miszerint az MPO enzim aktivitása és expressziója jelentősen megemelkedik a gyulladt szövetekben. A H₂S donor kezelés hatására azonban mindhárom általunk vizsgált NET komponens expressziója szignifikánsan lecsökkent. Eredményeink egybeesnek Zhang és mtsai. [229] által tapasztaltakkal. Kutatásuk során a PAD4 enzimet kódoló gén fokozott expresszióját, jelentős citH3 expressziót és az MPO enzim emelkedett aktivitását mutatták ki TNBS-indukált egér colitisben. A NET jelenlétét immunhisztokémiával és immunfluoreszcens festéssel is igazolták, amely során a gyulladt szövetekben a neutrofilek által képzett hálószerű struktúrát figyeltek meg. Chumanevich és mtsai. [230] szintén emelkedett PAD2 és PAD4 szintet mutattak ki DSS-indukált egér colitis modellben, illetve colitisben szenvedő betegek colon mintáiban. Mindkét kutatócsoport egy PAD4 aktivitását gátló szerrel, a Cl-amidinnal kezelte az állatokat a gyulladás indukcióját követően, ami csökkentette a NET képződést és a gyulladás mértékét mind a DSS- [230], mind a TNBS-indukált egér colitisben [229]. Számos állatmodellben igazolták, hogy a Cl-amidin több betegség súlyosságát is mérsékelte, mint például a rheumatoid arthritis [231], a szisztémás lupus erythematosus [232] és a daganatos elváltozások [233]. A NET képződés gátlására irányuló kísérletükben Deng és mtsai. [234] citH3 monoklonális antitesttel történő kezelés hatására a gyulladásos válaszreakciók és a NET csökkenését tapasztalták LPS által kiváltott szeptikus sokk egérmódelben. A H₂S vonatkozásában Yang és mtsai. [185] a H₂S donor Na₂S NETózisra gyakorolt hatását vizsgálták diabéteszes egereken. Munkájuk során kimutatták, hogy a H₂S donor csökkentette a NET képződést, amely elősegítette a diabéteszes sebek gyógyulását. Jelen kutatásunk NETózissal kapcsolatos eredményei összhangban vannak a fentebb említett megfigyelésekkel és felvetik a NET képződésben részt vevő komponensek, elsősorban a PAD4 és a citH3 biomarkerként való alkalmazásának lehetőségét IBD-ben szenvedő betegek esetében, továbbá, hogy a H₂S-alapú terápia a NETózis gátlása révén is jelentősen hozzájárulhat a gyulladásos folyamatok csökkenéséhez és a fekélyes elváltozások mérsékléséhez.

Az IBD patogenezisében számos gyulladásos mediátor, citokin, illetve kemokin játszik szerepet [48]. Ennek érdekében munkánk során megvizsgáltuk, hogy a H₂S donor kezelés

milyen hatással van a pro-inflammatórikus mediátorok a HMGB1 és az NF- κ B p65 alegységének expressziójára, a gyulladáskeltő citokin TNF- α szintjére, valamint az anti-inflammatórikus hatással is rendelkező UCHL-1 expressziójára. A HMGB1-gyel kapcsolatban jelen tanulmányunk alátámasztotta laborunk korábbi eredményeit [60], amelyben szintén magas HMGB1 expressziót tapasztaltunk a gyulladt colonszövetekben. A H₂S donor kezelés hatására a gyulladáshoz vezető faktor szintje szignifikánsan lecsökkent. Eredményeink alapján Maeda és mtsai. [235] szintén arra a következtetésre jutottak, hogy a HMGB1 expressziója megemelkedik DSS-indukált colitis egérmodellben, azonban anti-HMGB1 antitesttel történő gátlás esetén a gyulladás mértéke csökken. Tsoyi és mtsai. [236] munkájuk során bizonyították, hogy a HO-1 és metabolitja, a CO a HMGB1 gátlásán keresztül fejtik ki protektív hatásukat szepszis modellben. Ezek alapján feltételezhető, hogy kísérletünkben a H₂S donor a HO enzimrendszer aktiválásával is hozzájárulhatott a HMGB1 szint csökkenéséhez. A NET képződéssel kapcsolatban Tadie és mtsai. [237] igazolták, hogy a HMGB1 a TLR4-en keresztül fokozza a NETózis folyamatát, hozzájárulva ezzel a gyulladáshoz és a szövetkárosodáshoz. Továbbá Zhao és mtsai. [186] a H₂S és a NETózis kapcsolatának vizsgálatával patkány hiperhomociszteinémia modellben kimutatták, hogy a H₂S NET képződésre kifejtett gátló hatását a HMGB1 szint csökkentésén keresztül valósítja meg, mely eredmények összhangban vannak jelen munkánk megfigyeléseivel. A HMGB1 a RAGE és TLR receptorokhoz kötődve a MAPK útvonal aktiválásával gyulladáshoz vezet: hozzájárul az NF- κ B aktivációjához és transzlokációjához, illetve ezen keresztül a pro-inflammatórikus citokinek termeléséhez [238]. Az NF- κ B a gyulladáshoz vezető folyamatok egyik kulcsfontosságú mediátora, fokozott aktivációja jellemző az IBD-ben szenvedő betegekre is [239]. Vizsgálatunk során az NF- κ B expressziójának szignifikáns emelkedését figyeltük meg a TNBS által indukált gyulladásban, amely a protektív dózisú Lawesson reagenssel történő kezelést követően szignifikáns csökkenést mutatott. Eredményeink megfelelnek a szakirodalomban leírtaknak, melyek szerint a H₂S közvetett módon, az antioxidáns HO-1 expressziójának növelésével megakadályozza az NF- κ B aktivációját és transzlokációját szabályozó I κ B- α alegység degradációját, foszforilációját, ezáltal a gyulladáshoz vezető reakciók indukálását [177, 240]. Sun és mtsai. [241] igazolták, hogy a NET képződésben is fontos szerepet játszó PAD4 enzim citrullinálja az NF- κ B p65 alegységet, fokozva annak importin α 3-hoz való kötődését és transzlokációját a sejtmagba, ezáltal a pro-inflammatórikus citokinek, mint például az IL-1 β és a TNF- α termelését. A fentebb említett eredményeink alapján feltételezhető, hogy a H₂S a PAD4-mediált citrullináció, valamint a HMGB1 gátlásán keresztül is csökkentheti az NF- κ B aktivációját. Az NF- κ B számos pro-inflammatórikus jelátviteli útvonalat indukál, köztük a pro-

inflammatorikus citokinek termelődését [55]. Az IBD patogenezisében az egyik jelentős gyulladáskeltő citokin a TNF- α [48]. Kísérletünk során a TNBS által kiváltott gyulladás következtében a TNF- α szintje jelentősen megemelkedett a colonban, amely megfelel a korábbi kísérletünkben igazoltaknak [242]. H₂S kezelés hatására azonban a citokin szintje közel az egészséges kontroll csoportban mért értékre csökkent. Balaha és mtsai. [243] DSS-indukált vastagbélgyulladás modellben megfigyelték, hogy a fokhagymaolajjal, mint H₂S-donorral történő kezelés jelentősen mérsékelheti a gyulladás súlyosságát és csökkentheti számos kulcsfontosságú gyulladással marker, köztük a TNF- α és az MPO expressziós szintjét és aktivitását. Továbbá, Wallace és mtsai. [205] a vastagbélgyulladás mértékének jelentős csökkenésével összefüggésben az i.c. adagolt H₂S donorok hatására csökkent TNF- α mRNS- és fehérjeszintet mutattak ki patkány colitis modellben. Bai és mtsai. [244] CU-ban szenvedő páciensek szövetmintáiból származó *in vitro* kísérlet során arról számoltak be, hogy a DADS (fokhagymából nyerhető szerves kénvegyület) jelentős csökkenést idézett elő a TNF- α expressziójában. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a pro-inflammatorikus citokinek csökkent szintje a H₂S NF- κ B és HMGB1 gátló hatásának következménye.

Az UCHL-1 a proteaszomális lebontásban betöltött jelentős szerepe mellett, mint lehetséges anti-inflammatorikus mediátor, az I κ B- α stabilizálása révén képes blokkolni az NF- κ B aktivációját [62]. Jelen kísérletünk során az UCHL-1 alacsony expresszióját figyeltük meg a TNBS által kiváltott vastagbélgyulladásban, amely megerősíti laborunk korábbi eredményeit [60]. H₂S donor kezelés hatására ez a csökkent enzim expresszió szignifikánsan megemelkedett, amely alapján feltételezhető, hogy a H₂S az anti-inflammatorikus hatású UCHL-1 szint növelésén, ezáltal a gyulladással mediátor NF- κ B gátlásán keresztül is kifejteti protektív hatását.

Összeségében elmondható, hogy a H₂S kezelés hatékonyan csökkenti a gyulladás mértékét és hozzájárul a szövetregenerálódáshoz kísérletes colitisben. Protektív hatása feltételezhetően az antioxidáns és anti-inflammatorikus hatású HO-1 enzim aktiválásán, a NET képződés gátlásán, valamint a gyulladással mediátorok modulálásán keresztül is megvalósulhat. Eredményeink hozzájárulnak a H₂S által közvetített protekció hatásmechanizmusának pontosabb megismeréséhez, továbbá segíthetik új, H₂S alapú terápiás lehetőségek kifejlesztését az IBD kezelésében.

8. Tartalmi összefoglaló

A gyulladásoos bélbetegségek (Inflammatory Bowel Diseases, IBD) a gasztrointesztinális (GI) rendszert érintő, krónikus lefolyású, fellángolások (relapszusok) és nyugalmi állapotok (remissziók) váltakozásával járó immunmediált kórképek. Két leggyakrabban előforduló típusa a Crohn betegség (CD) és a colitis ulcerosa (CU), amelyek tüneteik és lefolyásuk alapján hasonlóak, azonban kialakulásuk és klinikai megjelenésük eltérő. Annak ellenére, hogy az IBD intenzíven kutatott terület, etiológiája még nem teljesen ismert. Egyre inkább tisztázott azonban, hogy az IBD multifaktoriális eredetű, több tényező – genetikai és környezeti faktorok, immunológiai folyamatok, illetve a mikrobiom – egymással kölcsönhatva vesz részt a betegségek kialakulásában. Továbbá, az utóbbi években előtérbe került az oxidatív stressz, valamint az aktivált neutrofilek újonnan leírt effektor funkciója a neutrofil extracelluláris csapda (Neutrophil Extracellular Trap, NET) képződés, a NETózis szerepe is az IBD patogenezisében. Mai tudásunk szerint az IBD nem gyógyítható betegség. A jelenleg alkalmazott terápiák elsődleges célja a tüneti kezelés, a remisszió indukciója és fenntartása, a szövődmények gyógyítása, a műtéti beavatkozások elkerülése, valamint a további progresszió megakadályozása. Ezek a kezeléseek azonban nem minden esetben hatékonyak és számos, akár súlyos mellékhatásokat okozhatnak. Mindezek alapján szükséges a betegség patomechanizmusának további tanulmányozása, valamint új, potenciális terápiás célpontok felfedezése és kezelési lehetőségek kifejlesztése.

Az utóbbi két évtized kutatási eredményei alapján egyre inkább tisztázott, hogy az alapvetően toxikus hatásairól ismert kén-hidrogén (H_2S) a szervezetben is előforduló, jelátviteli folyamatokat szabályozó gázmolekula (gazostranzmitter). Az endogén H_2S szintézise elsősorban enzimatisus úton a cisztein aminosav metabolizmusá révén valósul meg, melyet elsődlegesen három enzimrendszer katalizál. Ezek a piridoxál-5'-foszfát-függő cisztationin γ -liáz (CSE) és a cisztationin β -szintáz (CBS), valamint az aszpartát-/cisztein-aminotranszferáz (AAT/CAT) közreműködésével a 3-merkaptopiruvát-szulfurtanszferáz (3MST). Tanulmányok igazolták, hogy a H_2S számos fiziológiai és patofiziológiai folyamatban részt vesz. Fiziológias körülmények között a H_2S citoprotektív, antioxidáns, vazodilatátor, anti-inflammatórikus, valamint anti-apoptótikus hatású. A GI rendszerben hozzájárul a normál simaizom működéshez, a mucosális védelem fenntartásához, valamint az epitheliális szekréció stimulálásához.

Doktori kutatómunkám során a H_2S anti-inflammatórikus hatásmechanizmusainak feltérképezését tűztük ki célul 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS)-indukált patkány colitis

modellben. Kísérletünk első részében arra a kérdésre kerestük a választ, hogy hogyan változik az endogén H₂S szintéziséért felelős enzimek, a CSE és a CBS expressziója a TNBS által kiváltott gyulladás hatására a colonszövetben. Ezt követően célunk volt a H₂S donor Lawesson reagens protektív dózisának meghatározása a gyulladás kiterjedtsége alapján. A leghatékonyabb dózis alkalmazásával arra kerestünk választ, hogy milyen molekuláris mechanizmusok állhatnak a H₂S gyulladáscsökkentő hatásának hátterében. Kísérleteink során célul tűztük ki először az antioxidáns és anti-inflammatórikus hemoxigenáz (HO)-1 szerepének vizsgálatát a H₂S által közvetített protekcióban TNBS-indukált colitis modellben. A HO-1 részvételét feltételeztük, abban az esetben, ha a HO-1 inhibitor ón-protoporfirin (SnPP) adagolása megszüntette a H₂S-mediált gyulladáscsökkenést. További célunk volt kideríteni, hogy a NETózis szerepet játszik-e az IBD patogenezisében, illetve hogy a H₂S donor kezelés milyen hatással van a NETózis markerekre. Ezenkívül megvizsgáltuk hogyan befolyásolja a H₂S donor a különböző gyulladásos mediátorok expresszióját.

Kísérleteinket hím Wistar patkányokon végeztük. A humán gyulladásos bélbetegség kísérletes modellezésére TNBS által kiváltott colitis modellt alkalmaztunk, amely specifikus Th1-függő immunválaszt indukál és transzmurális gyulladást idéz elő a patkány colonjában. Az állatok 16 órás éheztetést követően, enyhe altatásban egy 8 cm hosszú polietilén kanül segítségével intracolónálisan (i.c.) 10 mg, 50%-os etanolban oldott TNBS-t kaptak. A H₂S anti-inflammatórikus hatásának vizsgálata érdekében a gyulladás indukciója után az állatokat a H₂S donorként alkalmazott Lawesson reagens eltérő dózisaival kezeltük orálisan, naponta kétszer 3 napig. A kialakult lézió kiterjedtségét makroszkópos analízissel határoztuk meg. A hatásos dózis kiválasztását követően a H₂S-mediált protekció molekuláris hátterének feltérképezése érdekében különböző paramétereket mértünk. Megvizsgáltuk a HO-1 enzim szintjének és aktivitásának változását H₂S kezelés hatására a gyulladás kiváltását követően. Majd a HO-1 szerepének igazolására a H₂S által közvetített védelemben az enzim aktivitását SnPP-vel gátoltuk és meghatároztuk a gyulladás mértékét. A NETózis markerek közül megvizsgáltuk a peptidil-arginin-deimináz 4 (PAD4), a citrullinált hiszton H3 (citH3) és a mieloperoxidáz (MPO) expressziójának alakulását a különböző kezelések hatására. Továbbá, a gyulladásos markerek közül vizsgáltuk az MPO enzim aktivitását, a tumor nekrosis faktor α (TNF- α) szintjét, valamint a high mobility group box 1 (HMGB1), a nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) p65-ös alegység és az ubiquitin C-terminális hidroláz L1 (UCHL-1) kifejeződését a colonban.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a H₂S szintéziséért felelős enzimek, a CSE és CBS kifejeződése szignifikánsan alacsonyabb volt TNBS kezelést követően a colonszövetben az abszolút kontroll csoporthoz képest. A különböző koncentrációjú H₂S donor Lawesson

reagenssel történő kezelés során a 37,5 és 18,75 $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{nap}$ dózisok esetében tapasztaltunk szignifikáns csökkenést a lézió százalékos kiterjedtségében. A legnagyobb mértékben a 18,75 $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{nap}$ dózis mérsékelte a gyulladást, így a biokémiai méréseinket ebből a csoportból származó mintákkal végeztük. A HO-1 enzim szintje és a HO aktivitás szignifikánsan megemelkedett a H_2S donor kezelést követően a TNBS csoporthoz képest. A Lawesson reagens és a HO-1 inhibitor SnPP együttes adagolása megszüntette a H_2S gyulladáscsökkentő hatását, igazolva, hogy a H_2S a HO-1 enzim modulálása révén fejti ki protektív hatását. Továbbá, a H_2S donor kezelés szignifikánsan csökkentette a NET képződés folyamatában részt vevő PAD4, citH3 és MPO fokozott expresszióját, amely alapján feltételezzük, hogy a H_2S védő hatása a NETózis gátlásán keresztül is megvalósul. Ezenkívül, a hatásos dózisban alkalmazott H_2S donor kezelés hatására szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a gyulladással kapcsolatos markerek esetében a TNBS csoporthoz képest: az MPO enzim aktivitásában, a pro-inflammatórikus citokin $\text{TNF-}\alpha$ szintjében, valamint a HMGB1 és $\text{NF-}\kappa\text{B}$ p65-ös alegységének expressziójában. Továbbá szignifikáns növekedést tapasztaltunk az anti-inflammatórikus hatású UCHL-1 kifejeződésében.

Összeségében megállapítható, hogy a H_2S kezelés hatékonyan csökkenti a gyulladást és hozzájárul a szövetregenerálódáshoz kísérletes colitis esetében. Protektív hatásának hátterében feltételezhetően az antioxidáns és anti-inflammatórikus hatású HO-1 enzimrendszer aktiválása, a NET képződés gátlása, valamint a gyulladással kapcsolatos mediátorok modulálása állhat. Eredményeink hozzájárulnak a H_2S által közvetített protekció hatásmechanizmusának pontosabb megismeréséhez, továbbá új terápiás lehetőségek kifejlesztését jelenthetik az IBD kezelésében.

9. Summary

Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are immune-mediated diseases affecting the gastrointestinal (GI) system, alternating between relapses and remissions. The two most common types are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), which are similar in terms of their symptoms and course, but their development and clinical appearance are different. Although IBD is an intensively researched area, its pathophysiology is still not known. However, it is increasingly clear that IBD has multifactorial origin, several factors interact with each other in the development of these diseases, such as genetic and environmental factors, immunological processes, and the microbiome. Furthermore, the role of oxidative stress and the newly described effector functions of active neutrophils, the formation of extracellular trap (Neutrophil Extracellular Trap, NET) in the pathogenesis of IBD has also been highlighted in recent years. To the best of our knowledge, there is no definitive cure for IBD currently. The primary goals of the available therapies are symptomatic treatment, induction and maintenance of remission, treatment of complications and avoidance of surgical interventions and further progression. However, these treatments are not effective in all cases and can cause many side effects. To avoid them, it is therefore necessary to further investigate the pathomechanism of the disease, as well as to discover new potential therapeutic targets and develop treatment options.

Based on results of the last two decades, it has become increasingly clear that hydrogen sulfide (H_2S), known for its toxic effects, is a gas molecule (gasotransmitter) that also occurs in the body and regulates signaling processes. The endogenous H_2S is mainly generated enzymatically through the metabolism of the amino acid cysteine, which is catalyzed by three enzyme systems. These are pyridoxal-5'-phosphate-dependent cystathionine γ -lyase (CSE) and cystathionine β -synthase (CBS), as well as aspartate/cysteine aminotransferase (AAT/CAT) and 3-mercaptopyruvate-sulfurtransferase (3MST). Several investigations revealed that H_2S is involved in many physiological and pathophysiological processes. Under physiological conditions, H_2S has cytoprotective, antioxidant, vasodilator, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. In the GI system, it contributes to normal smooth muscle function, maintenance of mucosal protection, and stimulation of epithelial secretion.

In my doctoral thesis, we aimed to examine the anti-inflammatory mechanisms of H_2S in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced rat colitis model. In the first part of our experiment, the expression of endogen H_2S synthesizing enzymes (CSE and CBS) was tested in the colon. Then, our aim was to determine the protective dose of the H_2S donor Lawesson's

reagent based on the extent of colonic inflammation. Using the most effective dose, we searched for the molecular mechanisms behind the anti-inflammatory effect of H₂S. During our experiments, we first aimed to investigate the role of the antioxidant and anti-inflammatory heme oxygenase (HO)-1 in H₂S-mediated protection in TNBS-induced colitis. The participation of HO-1 was presumed if the administration of HO-1 inhibitor tin protoporphyrin (SnPP) abolished H₂S-induced anti-inflammatory effect. Our further aim was to investigate whether the H₂S donor is able to influence the expression of various inflammatory mediators and NETosis in TNBS-induced rat colitis.

Male Wistar rats were used in our experiments. To model human IBD, TNBS-induced colitis was used, which induces a specific Th-1-dependent immune response and induces transmural inflammation in the rat colon. Following 16 hours of fasting, animals were injected with 10 mg of TNBS dissolved in 50% ethanol intracolonicly (i.c.) with an 8 cm long soft polyethylene tube under mild anesthesia. To investigate the anti-inflammatory effect of H₂S, animals were treated orally with different doses of Lawesson's reagent as an H₂S donor, twice daily for 3 days. The extent of lesions was determined by macroscopic analysis. After selecting the effective dose, various parameters were measured to clarify the molecular background of the H₂S-mediated protection. Changes in the level and activity of the HO-1 enzyme was detected. Then, to prove its role in the protection of H₂S, the activity of the enzyme was inhibited with SnPP and the extent of inflammation was determined. Among NETosis markers the expression of peptidyl-arginine deiminase 4 (PAD4), citrullinated histone H3 (citH3) and myeloperoxidase (MPO) were examined. Furthermore, among inflammatory markers the activity of MPO, the level of tumour necrosis factor α (TNF- α), as well as the expression of high mobility group box 1 (HMGB1), p65 subunit of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL-1) were examined in the colon.

Based on our results, the expression of the enzymes responsible for H₂S synthesis, CSE and CBS, were significantly lower in the colon tissue after TNBS treatment compared to the control group. During the treatment with different concentrations of the H₂S donor Lawesson's reagent, a significant decrease was observed in the extent of the lesions in the case of 37.5 and 18.75 μ M/kg/day doses. The dose of 18.75 μ M/kg/day moderated inflammation to the greatest extent, so we performed our biochemical measurements with samples from this group. The HO-1 level and HO enzyme activity were significantly increased after H₂S treatment. The combined administration of Lawesson's reagent and HO-1 inhibitor SnPP eliminated the anti-inflammatory effect of H₂S, confirming that H₂S exerts its protective effect by modulating the HO-1 enzyme. Furthermore, H₂S donor treatment reduced significantly the expression of

PAD4, citH3 and MPO, which are involved in the process of NET formation. Based on these results we presume that the H₂S donor also has a protective effect by inhibiting NETosis. In addition, resulting in the H₂S donor treatment applied at the effective dose, we observed a significant decrease in the following inflammatory markers compared to the TNBS group: the activity of MPO enzyme, the level of pro-inflammatory cytokine TNF- α , the expression of HMGB1 and NF- κ B p65 subunit. We also found a significant increase in the expression of UCHL-1, which has an anti-inflammatory effect.

In summary, our findings show that H₂S treatment effectively reduces inflammation and contributes to the regeneration of colonic tissue in experimental colitis. The protective effects of H₂S are presumably exerted through activation of the antioxidant and anti-inflammatory HO-1 enzyme system, the inhibition of NET formation, and the modulation of inflammatory mediators. Our current results contribute to a better understanding of the mechanism of H₂S-mediated protection, additionally may lead to the development of new therapeutic options in the treatment of IBD.

10. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani tanszékvezetőnknek és kutatócsoportunk vezetőjének Dr. Varga Csabának, aki helyet biztosított számomra a laborban, valamint támogatott és hasznos tanácsokkal látott el munkám során.

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Kupai Krisztinának szakmai iránymutatásáért, tanácsaiért, építő kritikáiért, valamint bizalmáért és türelméért. Külön szeretném megköszönni Dr. Almási Nikolettának a laboratóriumi munkában nyújtott felbecsülhetetlen segítségét.

Továbbá köszönettel tartozom laborunk egykori és jelenlegi munkatársainak: Dr. Amin Al-awarnak, Dr. Hegyköziné Dr. Veszélka Médeának, Dr. Pósa Anikónak, Dr. Szalai Zitának, Dr. Szűcs Gergőnek, Dr. Szabó Renátának, Csonka Anettnak, Daruka Lejlának, Magyar Ferencnek, Magyariné Dr. Berkó Anikónak, Matvon Denisenek, Nagyné Hoffmann Alexandrának segítségükért, Niksic-Juhász Katalinnak és Veketyné Váradi Margitnak az adminisztrációs, Homolya Ernőnek az informatikai segítségért, valamint az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi dolgozójának a barátságos légkörért.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon hálás vagyok családom és barátaim lelkes biztatásáért és támogatásáért.

11. Irodalomjegyzék

1. Langan D, Rose NR, Moudgil KD: **Common innate pathways to autoimmune disease.** *Clin Immunol* 2020, **212**:108361.
2. Chaplin DD: **Overview of the immune response.** *J Allergy Clin Immunol* 2010, **125**(2 Suppl 2):S3-23.
3. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L: **Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs.** *Oncotarget* 2018, **9**(6):7204-7218.
4. Medzhitov R: **Inflammation 2010: new adventures of an old flame.** *Cell* 2010, **140**(6):771-776.
5. Reed KK, Wickham R: **Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro.** *Semin Oncol Nurs* 2009, **25**(1):3-14.
6. Cieza RJ, Cao AT, Cong Y, Torres AG: **Immunomodulation for gastrointestinal infections.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012, **10**(3):391-400.
7. Schenk M, Mueller C: **The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008, **22**(3):391-409.
8. Walsh A, Mabee J, Trivedi K: **Inflammatory bowel disease.** *Prim Care* 2011, **38**(3):415-432; vii.
9. Tontini GE, Vecchi M, Pastorelli L, Neurath MF, Neumann H: **Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives.** *World J Gastroenterol* 2015, **21**(1):21-46.
10. Podolsky DK: **Inflammatory bowel disease.** *N Engl J Med* 2002, **347**(6):417-429.
11. Rubin DC, Shaker A, Levin MS: **Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer.** *Front Immunol* 2012, **3**:107.
12. Baumgart DC, Sandborn WJ: **Crohn's disease.** *Lancet* 2012, **380**(9853):1590-1605.
13. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH: **Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease.** *Clin Microbiol Rev* 2002, **15**(1):79-94.
14. Danese S, Fiocchi C: **Ulcerative colitis.** *N Engl J Med* 2011, **365**(18):1713-1725.
15. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Wu JCY, Chan FKL *et al*: **Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies.** *Lancet* 2017, **390**(10114):2769-2778.
16. Kaplan GG: **The global burden of IBD: from 2015 to 2025.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015, **12**(12):720-727.
17. Hanauer SB: **Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities.** *Inflamm Bowel Dis* 2006, **12** Suppl 1:S3-9.
18. Greuter T, Manser C, Pittet V, Vavricka SR, Biedermann L, on behalf of Swiss Ibdnet aowgotSSoG: **Gender Differences in Inflammatory Bowel Disease.** *Digestion* 2020, **101** Suppl 1:98-104.
19. Zhang YZ, Li YY: **Inflammatory bowel disease: pathogenesis.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**(1):91-99.
20. Ananthakrishnan AN: **Epidemiology and risk factors for IBD.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015, **12**(4):205-217.
21. Sartor RB: **Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis.** *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006, **3**(7):390-407.
22. Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J: **The history of genetics in inflammatory bowel disease.** *Ann Gastroenterol* 2014, **27**(4):294-303.
23. Khor B, Gardet A, Xavier RJ: **Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease.** *Nature* 2011, **474**(7351):307-317.
24. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K: **Family and twin studies in inflammatory bowel disease.** *World J Gastroenterol* 2006, **12**(23):3668-3672.
25. Cooney R, Jewell D: **The genetic basis of inflammatory bowel disease.** *Dig Dis* 2009, **27**(4):428-442.

26. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA *et al*: **Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease.** *Nature* 2012, **491**(7422):119-124.
27. Naser SA, Arce M, Khaja A, Fernandez M, Naser N, Elwasila S, Thanigachalam S: **Role of ATG16L, NOD2 and IL23R in Crohn's disease pathogenesis.** *World J Gastroenterol* 2012, **18**(5):412-424.
28. Cosnes J: **Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004, **18**(3):481-496.
29. Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L: **Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly?** *World J Gastroenterol* 2007, **13**(46):6134-6139.
30. Boyko EJ, Perera DR, Koepsell TD, Keane EM, Inui TS: **Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis.** *Scand J Gastroenterol* 1988, **23**(9):1147-1152.
31. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, Israel D, Mack D, Ghadirian P, Deslandres C *et al*: **Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children.** *Am J Gastroenterol* 2007, **102**(9):2016-2025.
32. Ananthakrishnan AN, Khalili H, Konijeti GG, Higuchi LM, de Silva P, Korzenik JR, Fuchs CS, Willett WC, Richter JM, Chan AT: **A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis.** *Gastroenterology* 2013, **145**(5):970-977.
33. Zuo T, Kamm MA, Colombel JF, Ng SC: **Urbanization and the gut microbiota in health and inflammatory bowel disease.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018, **15**(7):440-452.
34. Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S: **Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis.** *Am J Clin Nutr* 2004, **80**(5):1342-1352.
35. Mouli VP, Ananthakrishnan AN: **Review article: vitamin D and inflammatory bowel diseases.** *Aliment Pharmacol Ther* 2014, **39**(2):125-136.
36. Hlavaty T, Krajcovicova A, Payer J: **Vitamin D therapy in inflammatory bowel diseases: who, in what form, and how much?** *J Crohns Colitis* 2015, **9**(2):198-209.
37. Shaw SY, Blanchard JF, Bernstein CN: **Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease.** *Am J Gastroenterol* 2010, **105**(12):2687-2692.
38. Ananthakrishnan AN, Higuchi LM, Huang ES, Khalili H, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT: **Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study.** *Ann Intern Med* 2012, **156**(5):350-359.
39. Wallace JL: **NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies.** *Br J Pharmacol* 2012, **165**(1):67-74.
40. Khalili H, Higuchi LM, Ananthakrishnan AN, Manson JE, Feskanich D, Richter JM, Fuchs CS, Chan AT: **Hormone therapy increases risk of ulcerative colitis but not Crohn's disease.** *Gastroenterology* 2012, **143**(5):1199-1206.
41. Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G: **Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature.** *World J Gastroenterol* 2008, **14**(2):165-173.
42. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, Frangeul L, Nalin R, Jarrin C, Chardon P, Marteau P *et al*: **Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach.** *Gut* 2006, **55**(2):205-211.
43. Andoh A, Imaeda H, Aomatsu T, Inatomi O, Bamba S, Sasaki M, Saito Y, Tsujikawa T, Fujiyama Y: **Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis.** *J Gastroenterol* 2011, **46**(4):479-486.
44. Martinez C, Antolin M, Santos J, Torrejon A, Casellas F, Borrueal N, Guarner F, Malagelada JR: **Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission.** *Am J Gastroenterol* 2008, **103**(3):643-648.
45. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Collins MT: **Population-based case control study of seroprevalence of Mycobacterium paratuberculosis in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(3):1129-1135.

46. Miranda-Bautista J, Padilla-Suarez C, Bouza E, Munoz P, Menchen L, Marin-Jimenez I: **Listeria monocytogenes infection in inflammatory bowel disease patients: case series and review of the literature.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2014, **26**(11):1247-1252.
47. Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J: **Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ?** *World J Gastroenterol* 2006, **12**(12):1829-1841.
48. Neurath MF: **Cytokines in inflammatory bowel disease.** *Nat Rev Immunol* 2014, **14**(5):329-342.
49. Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, MacDonald TT, Corazza GR: **New pathogenic paradigms in inflammatory bowel disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2012, **18**(2):368-371.
50. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, Kitazume MT, Nakazawa A, Sugita A, Koganei K *et al*: **IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease.** *Gut* 2008, **57**(12):1682-1689.
51. Sarra M, Monteleone I, Stolfi C, Fantini MC, Sileri P, Sica G, Tersigni R, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G: **Interferon-gamma-expressing cells are a major source of interleukin-21 in inflammatory bowel diseases.** *Inflamm Bowel Dis* 2010, **16**(8):1332-1339.
52. Khalili H, Chan SSM, Lochhead P, Ananthakrishnan AN, Hart AR, Chan AT: **The role of diet in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2018, **15**(9):525-535.
53. Wang S, Zhang Y: **HMGB1 in inflammation and cancer.** *J Hematol Oncol* 2020, **13**(1):116.
54. Palone F, Vitali R, Cucchiara S, Pierdomenico M, Negroni A, Aloï M, Nuti F, Felice C, Armuzzi A, Stronati L: **Role of HMGB1 as a suitable biomarker of subclinical intestinal inflammation and mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease.** *Inflamm Bowel Dis* 2014, **20**(8):1448-1457.
55. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC: **NF-kappaB signaling in inflammation.** *Signal Transduct Target Ther* 2017, **2**.
56. Greten FR, Karin M: **The IKK/NF-kappaB activation pathway-a target for prevention and treatment of cancer.** *Cancer Lett* 2004, **206**(2):193-199.
57. Tak PP, Firestein GS: **NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases.** *J Clin Invest* 2001, **107**(1):7-11.
58. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, Huth M, Nikolaev A, Neufert C, Madison B *et al*: **Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation.** *Nature* 2007, **446**(7135):557-561.
59. Gu Y, Ding X, Huang J, Xue M, Zhang J, Wang Q, Yu H, Wang Y, Zhao F, Wang H *et al*: **The deubiquitinating enzyme UCHL1 negatively regulates the immunosuppressive capacity and survival of multipotent mesenchymal stromal cells.** *Cell Death Dis* 2018, **9**(5):459.
60. Almasi N, Torok S, Dvoracko S, Tomboly C, Csonka A, Barath Z, Murlasits Z, Valkusz Z, Posa A, Varga C *et al*: **Lessons on the Sigma-1 Receptor in TNBS-Induced Rat Colitis: Modulation of the UCHL-1, IL-6 Pathway.** *Int J Mol Sci* 2020, **21**(11).
61. Hurst-Kennedy J, Chin LS, Li L: **Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 in tumorigenesis.** *Biochem Res Int* 2012, **2012**:123706.
62. Takami Y, Nakagami H, Morishita R, Katsuya T, Cui TX, Ichikawa T, Saito Y, Hayashi H, Kikuchi Y, Nishikawa T *et al*: **Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1, a novel deubiquitinating enzyme in the vasculature, attenuates NF-kappaB activation.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, **27**(10):2184-2190.
63. Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M: **Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause?** *Dig Dis Sci* 2007, **52**(9):2015-2021.
64. Kruidenier L, Verspaget HW: **Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous?** *Aliment Pharmacol Ther* 2002, **16**(12):1997-2015.

65. Tian T, Wang Z, Zhang J: **Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies.** *Oxid Med Cell Longev* 2017, **2017**:4535194.
66. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A: **Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health.** *Oxid Med Cell Longev* 2017, **2017**:8416763.
67. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ: **Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation.** *Biochem J* 1997, **324 (Pt 1)**:1-18.
68. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM: **Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis.** *Mutat Res* 2010, **704(1-3)**:152-159.
69. Janssen-Heininger YM, Macara I, Mossman BT: **Cooperativity between oxidants and tumor necrosis factor in the activation of nuclear factor (NF)-kappaB: requirement of Ras/mitogen-activated protein kinases in the activation of NF-kappaB by oxidants.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999, **20(5)**:942-952.
70. Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS: **Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability.** *J Clin Invest* 1996, **98(11)**:2572-2579.
71. Frears ER, Zhang Z, Blake DR, O'Connell JP, Winyard PG: **Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by peroxynitrite.** *FEBS Lett* 1996, **381(1-2)**:21-24.
72. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE: **Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases.** *Physiol Rev* 2014, **94(2)**:329-354.
73. Salaritabar A, Darvishi B, Hadjiakhoondi F, Manayi A, Sureda A, Nabavi SF, Fitzpatrick LR, Nabavi SM, Bishayee A: **Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review.** *World J Gastroenterol* 2017, **23(28)**:5097-5114.
74. Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ *et al*: **Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease.** *Dig Dis Sci* 1996, **41(10)**:2078-2086.
75. Yuksel M, Ates I, Kaplan M, Arikan MF, Ozin YO, Kilic ZMY, Topcuoglu C, Kayacetin E: **Is Oxidative Stress Associated with Activation and Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease?** *J Med Biochem* 2017, **36(4)**:341-348.
76. Tomasello G, Mazzola M, Leone A, Sinagra E, Zummo G, Farina F, Damiani P, Cappello F, Gerges Geagea A, Jurjus A *et al*: **Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2016, **160(4)**:461-466.
77. Dryden GW, Jr., Deaciuc I, Arteel G, McClain CJ: **Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy.** *Curr Gastroenterol Rep* 2005, **7(4)**:308-316.
78. Luceri C, Bigagli E, Agostiniani S, Giudici F, Zambonin D, Scaringi S, Ficari F, Lodovici M, Malentacchi C: **Analysis of Oxidative Stress-Related Markers in Crohn's Disease Patients at Surgery and Correlations with Clinical Findings.** *Antioxidants (Basel)* 2019, **8(9)**.
79. Herszenyi L, Miheller P, Tulassay Z: **Carcinogenesis in inflammatory bowel disease.** *Dig Dis* 2007, **25(3)**:267-269.
80. Reedy CJ, Gibney BR: **Heme protein assemblies.** *Chem Rev* 2004, **104(2)**:617-649.
81. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E: **Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes.** *Front Pharmacol* 2014, **5**:61.
82. Alam J, Cook JL: **Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway.** *Curr Pharm Des* 2003, **9(30)**:2499-2511.
83. Abraham NG, Kappas A: **Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase.** *Pharmacol Rev* 2008, **60(1)**:79-127.
84. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, Soares MP: **Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis.** *J Exp Med* 2000, **192(7)**:1015-1026.

85. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell RA, Choi AM: **Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway.** *Nat Med* 2000, **6**(4):422-428.
86. Jansen T, Daiber A: **Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase?** *Front Pharmacol* 2012, **3**:30.
87. Gibbs PE, Maines MD: **Biliverdin inhibits activation of NF-kappaB: reversal of inhibition by human biliverdin reductase.** *Int J Cancer* 2007, **121**(11):2567-2574.
88. Wessling-Resnick M: **Iron homeostasis and the inflammatory response.** *Annu Rev Nutr* 2010, **30**:105-122.
89. Costa DL, Amaral EP, Andrade BB, Sher A: **Modulation of Inflammation and Immune Responses by Heme Oxygenase-1: Implications for Infection with Intracellular Pathogens.** *Antioxidants (Basel)* 2020, **9**(12).
90. Martinez-Casales M, Hernanz R, Alonso MJ: **Vascular and Macrophage Heme Oxygenase-1 in Hypertension: A Mini-Review.** *Front Physiol* 2021, **12**:643435.
91. Maines MD: **The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997, **37**:517-554.
92. Maines MD: **The heme oxygenase system: update 2005.** *Antioxid Redox Signal* 2005, **7**(11-12):1761-1766.
93. Campbell NK, Fitzgerald HK, Dunne A: **Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1.** *Nat Rev Immunol* 2021, **21**(7):411-425.
94. Vijayan V, Mueller S, Baumgart-Vogt E, Immenschuh S: **Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract.** *World J Gastroenterol* 2010, **16**(25):3112-3119.
95. Varga C, Laszlo F, Fritz P, Cavicchi M, Lamarque D, Horvath K, Posa A, Berko A, Whittle BJ: **Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat.** *Eur J Pharmacol* 2007, **561**(1-3):164-171.
96. Zhong W, Xia Z, Hinrichs D, Rosenbaum JT, Wegmann KW, Meyrowitz J, Zhang Z: **Hemin exerts multiple protective mechanisms and attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis.** *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010, **50**(2):132-139.
97. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S: **Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity.** *Nat Rev Immunol* 2011, **11**(8):519-531.
98. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A: **Neutrophil function: from mechanisms to disease.** *Annu Rev Immunol* 2012, **30**:459-489.
99. Bian Z, Guo Y, Ha B, Zen K, Liu Y: **Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions.** *J Immunol* 2012, **188**(2):844-853.
100. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science* 2004, **303**(5663):1532-1535.
101. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F: **Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis.** *J Leukoc Biol* 1996, **59**(2):229-240.
102. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A: **Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.** *J Cell Biol* 2007, **176**(2):231-241.
103. Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M: **Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils, eosinophils, and basophils but not in mononuclear cells.** *Front Immunol* 2012, **3**:277.
104. von Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, Medina E: **Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation.** *Blood* 2008, **111**(6):3070-3080.

105. Nija RJ, Sanju S, Sidharthan N, Mony U: **Extracellular Trap by Blood Cells: Clinical Implications.** *Tissue Eng Regen Med* 2020, **17**(2):141-153.
106. Wartha F, Henriques-Normark B: **ETosis: a novel cell death pathway.** *Sci Signal* 2008, **1**(21):pe25.
107. Doua DN, Khan MA, Grasmann H, Palaniyar N: **SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015, **112**(9):2817-2822.
108. Ravindran M, Khan MA, Palaniyar N: **Neutrophil Extracellular Trap Formation: Physiology, Pathology, and Pharmacology.** *Biomolecules* 2019, **9**(8).
109. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD *et al*: **Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood.** *Nat Med* 2007, **13**(4):463-469.
110. Pilszczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M *et al*: **A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus.** *J Immunol* 2010, **185**(12):7413-7425.
111. Yipp BG, Kubes P: **NETosis: how vital is it?** *Blood* 2013, **122**(16):2784-2794.
112. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ *et al*: **Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense.** *Nat Med* 2008, **14**(9):949-953.
113. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU: **Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps.** *Cell Death Differ* 2009, **16**(11):1438-1444.
114. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW *et al*: **Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018.** *Cell Death Differ* 2018, **25**(3):486-541.
115. Lee KH, Kronbichler A, Park DD, Park Y, Moon H, Kim H, Choi JH, Choi Y, Shim S, Lyu IS *et al*: **Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review.** *Autoimmun Rev* 2017, **16**(11):1160-1173.
116. Carestia A, Kaufman T, Rivadeneyra L, Landoni VI, Pozner RG, Negrotto S, D'Atri LP, Gomez RM, Schattner M: **Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets.** *J Leukoc Biol* 2016, **99**(1):153-162.
117. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, Erne P, Hasler P, Hahn S, Resink TJ: **Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death.** *FEBS Lett* 2010, **584**(14):3193-3197.
118. Patel S, Kumar S, Jyoti A, Srinag BS, Keshari RS, Saluja R, Verma A, Mitra K, Barthwal MK, Krishnamurthy H *et al*: **Nitric oxide donors release extracellular traps from human neutrophils by augmenting free radical generation.** *Nitric Oxide* 2010, **22**(3):226-234.
119. Metzler KD, Goosmann C, Lubojemska A, Zychlinsky A, Papayannopoulos V: **A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis.** *Cell Rep* 2014, **8**(3):883-896.
120. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Grone HJ, Brinkmann V, Jenne DE: **Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis.** *Nat Med* 2009, **15**(6):623-625.
121. Mesa MA, Vasquez G: **NETosis.** *Autoimmune Dis* 2013, **2013**:651497.
122. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A: **Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps.** *J Cell Biol* 2010, **191**(3):677-691.
123. Vorobjeva NV: **Neutrophil Extracellular Traps: New Aspects.** *Moscow Univ Biol Sci Bull* 2020, **75**(4):173-188.

124. Kenny EF, Herzig A, Kruger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, Brinkmann V, Bernuth HV, Zychlinsky A: **Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways.** *Elife* 2017, **6**.
125. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, Hess S, Prinz H, Zychlinsky A, Waldmann H: **Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation.** *Nat Chem Biol* 2011, **7**(2):75-77.
126. Burgener SS, Schroder K: **Neutrophil Extracellular Traps in Host Defense.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2020, **12**(7).
127. Delgado-Rizo V, Martinez-Guzman MA, Iniguez-Gutierrez L, Garcia-Orozco A, Alvarado-Navarro A, Fafutis-Morris M: **Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview.** *Front Immunol* 2017, **8**:81.
128. Jorch SK, Kubes P: **An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease.** *Nat Med* 2017, **23**(3):279-287.
129. Ng SC, Kamm MA: **Therapeutic strategies for the management of ulcerative colitis.** *Inflamm Bowel Dis* 2009, **15**(6):935-950.
130. Wang C, Baer HM, Gaya DR, Nibbs RJB, Milling S: **Can molecular stratification improve the treatment of inflammatory bowel disease?** *Pharmacol Res* 2019, **148**:104442.
131. Azad Khan AK, Piris J, Truelove SC: **An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine.** *Lancet* 1977, **2**(8044):892-895.
132. Desreumaux P, Ghosh S: **Review article: mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid - new evidence.** *Aliment Pharmacol Ther* 2006, **24 Suppl 1**:2-9.
133. Dallegri F, Ottonello L, Ballestrero A, Bogliolo F, Ferrando F, Patrone F: **Cytoprotection against neutrophil derived hypochlorous acid: a potential mechanism for the therapeutic action of 5-aminosalicylic acid in ulcerative colitis.** *Gut* 1990, **31**(2):184-186.
134. Pithadia AB, Jain S: **Treatment of inflammatory bowel disease (IBD).** *Pharmacol Rep* 2011, **63**(3):629-642.
135. Gisbert JP, Gomollon F, Mate J, Pajares JM: **Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: a systematic review.** *Dig Dis Sci* 2002, **47**(3):471-488.
136. Dubois-Camacho K, Ottum PA, Franco-Munoz D, De la Fuente M, Torres-Riquelme A, Diaz-Jimenez D, Olivares-Morales M, Astudillo G, Quera R, Hermoso MA: **Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel diseases: From clinical practice to molecular biology.** *World J Gastroenterol* 2017, **23**(36):6628-6638.
137. Bruscoli S, Febo M, Riccardi C, Migliorati G: **Glucocorticoid Therapy in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Clinical Practice.** *Front Immunol* 2021, **12**:691480.
138. Sahasranaman S, Howard D, Roy S: **Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines.** *Eur J Clin Pharmacol* 2008, **64**(8):753-767.
139. Zenlea T, Peppercorn MA: **Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease.** *World J Gastroenterol* 2014, **20**(12):3146-3152.
140. Feagan BG, Alfadhli A: **Methotrexate in inflammatory bowel disease.** *Gastroenterol Clin North Am* 2004, **33**(2):407-420, xi.
141. Cohen RD, Stein R, Hanauer SB: **Intravenous cyclosporin in ulcerative colitis: a five-year experience.** *Am J Gastroenterol* 1999, **94**(6):1587-1592.
142. Danese S, Vuitton L, Peyrin-Biroulet L: **Biologic agents for IBD: practical insights.** *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015, **12**(9):537-545.
143. Perez-De-Lis M, Retamozo S, Flores-Chavez A, Kostov B, Perez-Alvarez R, Brito-Zeron P, Ramos-Casals M: **Autoimmune diseases induced by biological agents. A review of 12,731 cases (BIOGEAS Registry).** *Expert Opin Drug Saf* 2017, **16**(11):1255-1271.
144. Lin Z, Bai Y, Zheng P: **Meta-analysis: efficacy and safety of combination therapy of infliximab and immunosuppressives for Crohn's disease.** *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011, **23**(12):1100-1110.
145. Papamichael K, Gils A, Rutgeerts P, Levesque BG, Vermeire S, Sandborn WJ, Vande Casteele N: **Role for therapeutic drug monitoring during induction therapy with TNF antagonists in IBD:**

- evolution in the definition and management of primary nonresponse. *Inflamm Bowel Dis* 2015, **21**(1):182-197.
146. Rungoe C, Langholz E, Andersson M, Basit S, Nielsen NM, Wohlfahrt J, Jess T: **Changes in medical treatment and surgery rates in inflammatory bowel disease: a nationwide cohort study 1979-2011.** *Gut* 2014, **63**(10):1607-1616.
 147. Dittrich AE, Sutton RT, Haynes K, Wang H, Fedorak RN, Kroeker KI: **Incidence Rates for Surgery in Crohn's Disease Have Decreased: A Population-based Time-trend Analysis.** *Inflamm Bowel Dis* 2020, **26**(12):1909-1916.
 148. Sica GS, Biancone L: **Surgery for inflammatory bowel disease in the era of laparoscopy.** *World J Gastroenterol* 2013, **19**(16):2445-2448.
 149. Mizoguchi A: **Animal models of inflammatory bowel disease.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 2012, **105**:263-320.
 150. Prattis S, Jurjus A: **Spontaneous and transgenic rodent models of inflammatory bowel disease.** *Lab Anim Res* 2015, **31**(2):47-68.
 151. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS: **A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents.** *Korean J Physiol Pharmacol* 2014, **18**(4):279-288.
 152. Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL: **Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon.** *Gastroenterology* 1989, **96**(3):795-803.
 153. Silva I, Pinto R, Mateus V: **Preclinical Study in Vivo for New Pharmacological Approaches in Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of Chronic Model of TNBS-Induced Colitis.** *J Clin Med* 2019, **8**(10).
 154. Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I, Papalois A, Pikoulis E: **The TNBS-induced colitis animal model: An overview.** *Ann Med Surg (Lond)* 2016, **11**:9-15.
 155. Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH: **Toxicology of hydrogen sulfide.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992, **32**:109-134.
 156. Malone Rubright SL, Pearce LL, Peterson J: **Environmental toxicology of hydrogen sulfide.** *Nitric Oxide* 2017, **71**:1-13.
 157. Wang R: **Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed.** *Physiol Rev* 2012, **92**(2):791-896.
 158. Stipanuk MH, Beck PW: **Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat.** *Biochem J* 1982, **206**(2):267-277.
 159. Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Francom DM, Taylor JD, Dieken FP: **Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels.** *Biochem Pharmacol* 1989, **38**(6):973-981.
 160. Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, Taylor JD, Warenycia MW, Reiffenstein RJ, Dowling G: **Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports.** *J Anal Toxicol* 1989, **13**(2):105-109.
 161. Savage JC, Gould DH: **Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography.** *J Chromatogr* 1990, **526**(2):540-545.
 162. Abe K, Kimura H: **The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator.** *J Neurosci* 1996, **16**(3):1066-1071.
 163. Mustafa AK, Gadalla MM, Snyder SH: **Signaling by gasotransmitters.** *Sci Signal* 2009, **2**(68):re2.
 164. Wang R: **Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter?** *FASEB J* 2002, **16**(13):1792-1798.
 165. Nagy P: **Mechanistic chemical perspective of hydrogen sulfide signaling.** *Methods Enzymol* 2015, **554**:3-29.
 166. Kimura H: **Production and physiological effects of hydrogen sulfide.** *Antioxid Redox Signal* 2014, **20**(5):783-793.
 167. Kimura H: **Hydrogen sulfide: its production, release and functions.** *Amino Acids* 2011, **41**(1):113-121.

168. Nagy P, Palinkas Z, Nagy A, Budai B, Toth I, Vasas A: **Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples.** *Biochim Biophys Acta* 2014, **1840**(2):876-891.
169. Flannigan KL, Ferraz JG, Wang R, Wallace JL: **Enhanced synthesis and diminished degradation of hydrogen sulfide in experimental colitis: a site-specific, pro-resolution mechanism.** *PLoS One* 2013, **8**(8):e71962.
170. Martin GR, McKnight GW, Dickey MS, Coffin CS, Ferraz JG, Wallace JL: **Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract.** *Dig Liver Dis* 2010, **42**(2):103-109.
171. Wallace JL, Ferraz JG, Muscara MN: **Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury.** *Antioxid Redox Signal* 2012, **17**(1):58-67.
172. Zaichko NV, Melnik AV, Yoltukhivskyy MM, Olhovskiy AS, Palamarchuk IV: **Hydrogen sulfide: metabolism, biological and medical role.** *Ukr Biochem J* 2014, **86**(5):5-25.
173. Teague B, Asiedu S, Moore PK: **The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility.** *Br J Pharmacol* 2002, **137**(2):139-145.
174. Wallace JL: **Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract.** *Antioxid Redox Signal* 2010, **12**(9):1125-1133.
175. Ise F, Takasuka H, Hayashi S, Takahashi K, Koyama M, Aihara E, Takeuchi K: **Stimulation of duodenal HCO₃⁻ secretion by hydrogen sulphide in rats: relation to prostaglandins, nitric oxide and sensory neurones.** *Acta Physiol (Oxf)* 2011, **201**(1):117-126.
176. Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL: **Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation.** *FASEB J* 2006, **20**(12):2118-2120.
177. Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT: **Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide.** *Free Radic Biol Med* 2006, **41**(1):106-119.
178. Liu H, Bai XB, Shi S, Cao YX: **Hydrogen sulfide protects from intestinal ischaemia-reperfusion injury in rats.** *J Pharm Pharmacol* 2009, **61**(2):207-212.
179. Kimura Y, Goto Y, Kimura H: **Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria.** *Antioxid Redox Signal* 2010, **12**(1):1-13.
180. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK: **The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'?** *J Neurochem* 2004, **90**(3):765-768.
181. Scammahorn JJ, Nguyen ITN, Bos EM, Van Goor H, Joles JA: **Fighting Oxidative Stress with Sulfur: Hydrogen Sulfide in the Renal and Cardiovascular Systems.** *Antioxidants (Basel)* 2021, **10**(3).
182. Mustafa AK, Sikka G, Gazi SK, Steppan J, Jung SM, Bhunia AK, Barodka VM, Gazi FK, Barrow RK, Wang R *et al*: **Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels.** *Circ Res* 2011, **109**(11):1259-1268.
183. Bucci M, Papapetropoulos A, Vellecco V, Zhou Z, Pyriochou A, Roussos C, Roviezzo F, Brancaleone V, Cirino G: **Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, **30**(10):1998-2004.
184. Gemici B, Wallace JL: **Anti-inflammatory and cytoprotective properties of hydrogen sulfide.** *Methods Enzymol* 2015, **555**:169-193.
185. Yang CT, Chen L, Chen WL, Li N, Chen MJ, Li X, Zheng X, Zhao YZ, Wu YX, Xian M *et al*: **Hydrogen sulfide primes diabetic wound to close through inhibition of NETosis.** *Mol Cell Endocrinol* 2019, **480**:74-82.
186. Zhao X, Zhang L, Liu X, Zhao Z, Zhong X, Wang Y: **Exogenous hydrogen sulfide inhibits neutrophils extracellular traps formation via the HMGB1/TLR4/p-38 MAPK/ROS axis in hyperhomocysteinemia rats.** *Biochem Biophys Res Commun* 2021, **537**:7-14.
187. Szabo C: **Roles of hydrogen sulfide in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications.** *Antioxid Redox Signal* 2012, **17**(1):68-80.

188. Coletta C, Szabo C: **Potential role of hydrogen sulfide in the pathogenesis of vascular dysfunction in septic shock.** *Curr Vasc Pharmacol* 2013, **11**(2):208-221.
189. Belardinelli MC, Chabli A, Chadefaux-Vekemans B, Kamoun P: **Urinary sulfur compounds in Down syndrome.** *Clin Chem* 2001, **47**(8):1500-1501.
190. Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, Loke YY, Zhu YC, Huang SH, Tan CS, Whiteman M, Lu J, Moore PK: **Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats.** *J Appl Physiol (1985)* 2007, **102**(1):261-268.
191. Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H: **Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002, **293**(5):1485-1488.
192. Caliendo G, Cirino G, Santagada V, Wallace JL: **Synthesis and biological effects of hydrogen sulfide (H₂S): development of H₂S-releasing drugs as pharmaceuticals.** *J Med Chem* 2010, **53**(17):6275-6286.
193. Blackler RW, Motta JP, Manko A, Workentine M, Bercik P, Surette MG, Wallace JL: **Hydrogen sulphide protects against NSAID-enteropathy through modulation of bile and the microbiota.** *Br J Pharmacol* 2015, **172**(4):992-1004.
194. Zhao Y, Biggs TD, Xian M: **Hydrogen sulfide (H₂S) releasing agents: chemistry and biological applications.** *Chem Commun (Camb)* 2014, **50**(80):11788-11805.
195. Medeiros JV, Bezerra VH, Gomes AS, Barbosa AL, Lima-Junior RC, Soares PM, Brito GA, Ribeiro RA, Cunha FQ, Souza MH: **Hydrogen sulfide prevents ethanol-induced gastric damage in mice: role of ATP-sensitive potassium channels and capsaicin-sensitive primary afferent neurons.** *J Pharmacol Exp Ther* 2009, **330**(3):764-770.
196. Nicolau LA, Silva RO, Damasceno SR, Carvalho NS, Costa NR, Aragao KS, Barbosa AL, Soares PM, Souza MH, Medeiros JV: **The hydrogen sulfide donor, Lawesson's reagent, prevents alendronate-induced gastric damage in rats.** *Braz J Med Biol Res* 2013, **46**(8):708-714.
197. Li L, Whiteman M, Guan YY, Neo KL, Cheng Y, Lee SW, Zhao Y, Baskar R, Tan CH, Moore PK: **Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide.** *Circulation* 2008, **117**(18):2351-2360.
198. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R: **The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968, **61**(2):748-755.
199. Stallmach A, Hagel S, Bruns T: **Adverse effects of biologics used for treating IBD.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010, **24**(2):167-182.
200. Wallace JL, Wang R: **Hydrogen sulfide-based therapeutics: exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter.** *Nat Rev Drug Discov* 2015, **14**(5):329-345.
201. Szabo C: **Hydrogen sulphide and its therapeutic potential.** *Nat Rev Drug Discov* 2007, **6**(11):917-935.
202. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R: **The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener.** *EMBO J* 2001, **20**(21):6008-6016.
203. Dufton N, Natividad J, Verdu EF, Wallace JL: **Hydrogen sulfide and resolution of acute inflammation: A comparative study utilizing a novel fluorescent probe.** *Sci Rep* 2012, **2**:499.
204. Blackler RW, Gemici B, Manko A, Wallace JL: **NSAID-gastroenteropathy: new aspects of pathogenesis and prevention.** *Curr Opin Pharmacol* 2014, **19**:11-16.
205. Wallace JL, Vong L, McKnight W, Dickey M, Martin GR: **Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats.** *Gastroenterology* 2009, **137**(2):569-578, 578 e561.
206. Ghatule RR, Gautam MK, Goel S, Singh A, Joshi VK, Goel RK: **Protective effects of Aegle marmelos fruit pulp on 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced experimental colitis.** *Pharmacogn Mag* 2014, **10**(Suppl 1):S147-152.
207. Chen X, Liu XS: **Hydrogen sulfide from a NaHS source attenuates dextran sulfate sodium (DSS)-induced inflammation via inhibiting nuclear factor-kappaB.** *J Zhejiang Univ Sci B* 2016, **17**(3):209-217.
208. Wallace JL: **Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself?** *Physiol Rev* 2008, **88**(4):1547-1565.

209. Sparatore A, Santus G, Giustarini D, Rossi R, Del Soldato P: **Therapeutic potential of new hydrogen sulfide-releasing hybrids**. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2011, **4**(1):109-121.
210. Magierowski M, Magierowska K, Surmiak M, Hubalewska-Mazgaj M, Kwiecien S, Wallace JL, Brzozowski T: **The effect of hydrogen sulfide-releasing naproxen (ATB-346) versus naproxen on formation of stress-induced gastric lesions, the regulation of systemic inflammation, hypoxia and alterations in gastric microcirculation**. *J Physiol Pharmacol* 2017, **68**(5):749-756.
211. Marutani E, Ichinose F: **Emerging pharmacological tools to control hydrogen sulfide signaling in critical illness**. *Intensive Care Med Exp* 2020, **8**(1):5.
212. Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Fiorucci S: **Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat**. *Gastroenterology* 2007, **132**(1):261-271.
213. Liu L, Cui J, Song CJ, Bian JS, Sparatore A, Soldato PD, Wang XY, Yan CD: **H(2)S-releasing aspirin protects against aspirin-induced gastric injury via reducing oxidative stress**. *PLoS One* 2012, **7**(9):e46301.
214. Beltowski J: **Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine--An update**. *Pharmacol Rep* 2015, **67**(3):647-658.
215. Wallace JL, Caliendo G, Santagada V, Cirino G: **Markedly reduced toxicity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of naproxen (ATB-346)**. *Br J Pharmacol* 2010, **159**(6):1236-1246.
216. Blackler R, Syer S, Bolla M, Ongini E, Wallace JL: **Gastrointestinal-sparing effects of novel NSAIDs in rats with compromised mucosal defence**. *PLoS One* 2012, **7**(4):e35196.
217. Wallace JL, Nagy P, Feener TD, Allain T, Ditroi T, Vaughan DJ, Muscara MN, de Nucci G, Buret AG: **A proof-of-concept, Phase 2 clinical trial of the gastrointestinal safety of a hydrogen sulfide-releasing anti-inflammatory drug**. *Br J Pharmacol* 2020, **177**(4):769-777.
218. Fiorucci S, Orlandi S, Mencarelli A, Caliendo G, Santagada V, Distrutti E, Santucci L, Cirino G, Wallace JL: **Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis**. *Br J Pharmacol* 2007, **150**(8):996-1002.
219. Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, Pattillo CB, Kevil CG, Lefer DJ: **Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling**. *Circ Res* 2009, **105**(4):365-374.
220. Erbil Y, Giris M, Abbasoglu SD, Barbaros U, Yanik BT, Necefli A, Olgac V, Toker GA: **Effect of heme oxygenase-1 induction by octreotide on TNBS-induced colitis**. *J Gastroenterol Hepatol* 2007, **22**(11):1852-1858.
221. Wang WP, Guo X, Koo MW, Wong BC, Lam SK, Ye YN, Cho CH: **Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats**. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, **281**(2):G586-594.
222. Horvath K, Varga C, Berko A, Posa A, Laszlo F, Whittle BJ: **The involvement of heme oxygenase-1 activity in the therapeutic actions of 5-aminosalicylic acid in rat colitis**. *Eur J Pharmacol* 2008, **581**(3):315-323.
223. Wallace KL, Zheng LB, Kanazawa Y, Shih DQ: **Immunopathology of inflammatory bowel disease**. *World J Gastroenterol* 2014, **20**(1):6-21.
224. Bennike TB, Carlsen TG, Ellingsen T, Bonderup OK, Glerup H, Bogsted M, Christiansen G, Birkelund S, Stensballe A, Andersen V: **Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies**. *Inflamm Bowel Dis* 2015, **21**(9):2052-2067.
225. Li T, Wang C, Liu Y, Li B, Zhang W, Wang L, Yu M, Zhao X, Du J, Zhang J *et al*: **Neutrophil Extracellular Traps Induce Intestinal Damage and Thrombotic Tendency in Inflammatory Bowel Disease**. *J Crohns Colitis* 2020, **14**(2):240-253.
226. Therrien A, Chapuy L, Bsati M, Rubio M, Bernard G, Arslanian E, Orlicka K, Weber A, Panzini BP, Dorais J *et al*: **Recruitment of activated neutrophils correlates with disease severity in adult Crohn's disease**. *Clin Exp Immunol* 2019, **195**(2):251-264.
227. Dinallo V, Marafini I, Di Fusco D, Laudisi F, Franze E, Di Grazia A, Figliuzzi MM, Caprioli F, Stolfi C, Monteleone I *et al*: **Neutrophil Extracellular Traps Sustain Inflammatory Signals in Ulcerative Colitis**. *J Crohns Colitis* 2019, **13**(6):772-784.

228. Rohrbach AS, Slade DJ, Thompson PR, Mowen KA: **Activation of PAD4 in NET formation.** *Front Immunol* 2012, **3**:360.
229. Zhang T, Mei Y, Dong W, Wang J, Huang F, Wu J: **Evaluation of protein arginine deiminase-4 inhibitor in TNBS- induced colitis in mice.** *Int Immunopharmacol* 2020, **84**:106583.
230. Chumanevich AA, Causey CP, Knuckley BA, Jones JE, Poudyal D, Chumanevich AP, Davis T, Matesic LE, Thompson PR, Hofseth LJ: **Suppression of colitis in mice by Cl-amidine: a novel peptidylarginine deiminase inhibitor.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011, **300**(6):G929-938.
231. Willis VC, Gizinski AM, Banda NK, Causey CP, Knuckley B, Cordova KN, Luo Y, Levitt B, Glogowska M, Chandra P *et al*: **N-alpha-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis.** *J Immunol* 2011, **186**(7):4396-4404.
232. Knight JS, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, Zhao W, Smith CK, Hodgins JB, Thompson PR, Kaplan MJ: **Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/lpr mice.** *Ann Rheum Dis* 2015, **74**(12):2199-2206.
233. Wang Y, Li P, Wang S, Hu J, Chen XA, Wu J, Fisher M, Oshaben K, Zhao N, Gu Y *et al*: **Anticancer peptidylarginine deiminase (PAD) inhibitors regulate the autophagy flux and the mammalian target of rapamycin complex 1 activity.** *J Biol Chem* 2012, **287**(31):25941-25953.
234. Deng Q, Pan B, Alam HB, Liang Y, Wu Z, Liu B, Mor-Vaknin N, Duan X, Williams AM, Tian Y *et al*: **Citrullinated Histone H3 as a Therapeutic Target for Endotoxic Shock in Mice.** *Front Immunol* 2019, **10**:2957.
235. Maeda S, Hikiba Y, Shibata W, Ohmae T, Yanai A, Ogura K, Yamada S, Omata M: **Essential roles of high-mobility group box 1 in the development of murine colitis and colitis-associated cancer.** *Biochem Biophys Res Commun* 2007, **360**(2):394-400.
236. Tsoyi K, Lee TY, Lee YS, Kim HJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC: **Heme-oxygenase-1 induction and carbon monoxide-releasing molecule inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced high-mobility group box 1 release in vitro and improve survival of mice in LPS- and cecal ligation and puncture-induced sepsis model in vivo.** *Mol Pharmacol* 2009, **76**(1):173-182.
237. Tadie JM, Bae HB, Jiang S, Park DW, Bell CP, Yang H, Pittet JF, Tracey K, Thannickal VJ, Abraham E *et al*: **HMGB1 promotes neutrophil extracellular trap formation through interactions with Toll-like receptor 4.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013, **304**(5):L342-349.
238. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ: **The cytokine activity of HMGB1.** *J Leukoc Biol* 2005, **78**(1):1-8.
239. Atreya I, Atreya R, Neurath MF: **NF-kappaB in inflammatory bowel disease.** *J Intern Med* 2008, **263**(6):591-596.
240. Li L, Rose P, Moore PK: **Hydrogen sulfide and cell signaling.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011, **51**:169-187.
241. Sun B, Dwivedi N, Bechtel TJ, Paulsen JL, Muth A, Bawadekar M, Li G, Thompson PR, Shelef MA, Schiffer CA *et al*: **Citrullination of NF-kappaB p65 promotes its nuclear localization and TLR-induced expression of IL-1beta and TNFalpha.** *Sci Immunol* 2017, **2**(12).
242. Szalai Z, Szasz A, Nagy I, Puskas LG, Kupai K, Kiraly A, Berko AM, Posa A, Striffler G, Barath Z *et al*: **Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS-induced colitis in rats: role of NOS/HO/MPO system.** *Oxid Med Cell Longev* 2014, **2014**:925981.
243. Balaha M, Kandeel S, Elwan W: **Garlic oil inhibits dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in rats.** *Life Sci* 2016, **146**:40-51.
244. Bai AP, Ouyang Q, Hu RW: **Diallyl trisulfide inhibits tumor necrosis factor-alpha expression in inflamed mucosa of ulcerative colitis.** *Dig Dis Sci* 2005, **50**(8):1426-1431.

12. Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10028839

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. Kupai K., Almási N., Kósa M., Nemcsók J., Murlasits Z., **Török S.**, Al-Awar A., Baráth Z., Pósa A., Varga C. **H₂S confers colonoprotection against TNBS-induced colitis by HO-1 upregulation in rats.** *Inflammopharmacology* 2018, 26, pp. 479-489.

IF: 3,838

2. **Török S.**, Almási N., Valkusz Z., Pósa A., Varga C., Kupai K. **Investigation of H₂S Donor Treatment on Neutrophil Extracellular Traps in Experimental Colitis.** *International Journal of Molecular Sciences* 2021, 22, 12729.

IF: 6,208

Egyéb közlemények listája:

1. Kupai, Krisztina; Várkonyi, Tamás; **Török, Szilvia**; Gáti, Viktória; Czimmerer, Zsolt; Puskás, László G.; Szebeni, Gábor J. **Recent Progress in the Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes Mellitus in the Era of COVID-19 and Single Cell Multi-Omics Technologies.** *Life* 2022, 12, 1205

IF: 3,251

2. Almási, Nikoletta; Murlasits, Zsolt; Al-awar, Amin; Csonka, Ákos; Dvorácskó, Szabolcs; Tömböly, Csaba; **Török, Szilvia**; Bester, Dirk; Pósa, Anikó; Varga, Csaba; Kupai, Krisztina **Effects of aging on proteasomal-ubiquitin system, oxidative stress balance and calcium homeostasis in middle-aged female rat colon.** *Physiology International* 2021, 108, pp. 27-42.

IF: 1,697

3. Almási, Nikoletta; **Török, Szilvia**; Valkusz, Zsuzsanna; Tajti, Máté; Csonka, Ákos; Murlasits, Zsolt; Pósa, Anikó; Varga, Csaba; Kupai, Krisztina **Sigma-1 Receptor Engages an Anti-Inflammatory and Antioxidant Feedback Loop Mediated by Peroxiredoxin in Experimental Colitis.** *Antioxidants* 2020, 9, 1081

IF: 6,313

4. Almási, Nikoletta; **Török, Szilvia**; Dvorácskó, Szabolcs; Tömböly, Csaba; Csonka, Ákos; Baráth, Zoltán; Murlasits, Zsolt; Valkusz, Zsuzsanna; Pósa, Anikó; Varga, Csaba; Kupai, Krisztina **Lessons on the Sigma-1 Receptor in TNBS-Induced Rat Colitis: Modulation of the UCHL-1, IL-6 Pathway.** International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 4046

IF: 5,924

5. Szabó, Renáta; Börzsei, Denise; Karácsonyi, Zoltán; Gesztelyi, Rudolf; Nemes, Kolos; Magyariné Berkó, Anikó; Veszélka, Médea; **Török, Szilvia**; Kupai, Krisztina; Varga, Csaba; Juhász, Béla; Pósa, Anikó **Postconditioning like effect of exercise: new paradigm in experimental menopause.** American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 2019, 316, pp. H400-H407

IF: 3,864

6. Al-awar, Amin; Almási, Nikoletta; Szabó, Renáta; Ménesi, Rudolf; Szűcs, Gergő; **Török, Szilvia**; Pósa, Anikó; Varga, Csaba; Kupai, Krisztina **Effect of DPP-4 inhibitor sitagliptin against ischemia-reperfusion (I/R) injury in hyperlipidemic animals.** Acta Biologica Szegediensis, 2019, 62(2), pp. 180-189.

IF: 0,517

7. Al-Awar, Amin ; Almási, Nikoletta ; Szabó, Renáta ; Takacs, Istvan ; Murlasits, Zsolt ; Szűcs, Gergő ; **Török, Szilvia** ; Pósa, Anikó ; Varga, Csaba ; Kupai, Krisztina **Novel Potentials of the DPP-4 Inhibitor Sitagliptin against Ischemia-Reperfusion (I/R) Injury in Rat Ex-Vivo Heart Model.** International Journal of Molecular Sciences 2018, 19, 3226

IF: 4,183

8. Varga, Csaba; Veszélka, Médea; Kupai, Krisztina; Börzsei, Denise; Deim, Zoltán; Szabó, Renáta; **Török, Szilvia**; Priksz, Dániel; Gesztelyi, Rudolf; Juhász, Béla; Radák, Zsolt; Pósa, Anikó **The Effects of Exercise Training and High Triglyceride Diet in an Estrogen Depleted Rat Model: The Role of the Heme Oxygenase System and Inflammatory Processes in Cardiovascular Risk.** Journal of Sports Science and Medicine 2018, 17, pp. 580-588.

IF: 1,774

9. Heger, J; Bornbaum, J; Wurfel, A; Hill, C; Brockmann, N; Gaspar,R; Paloczi, J; Varga, ZV; Sarkozy, M; Bencsik, P; Csont, T; **Török, S**; Kojonazarov, B; Schermuly, RT; Böngler, K; Parahuleva, M; Ferdinandy, P; Schulz, R; Euler, G **JDP2 overexpression provokes cardiac dysfunction in mice**. Scientific Reports 2018, 8, 7647

IF: 4,011

10. Szabó, Renáta; Karácsonyi, Zoltán; Börzsei, Denise; Juhász, Béla; Al awar, Amin; **Török, Szilvia**; Magyariné Berkó, Anikó; Takács, István; Kupai, Krisztina; Varga, Csaba; Pósa, Anikó **Role of exercise induced cardiac remodeling in ovariectomized female rats**. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2018, 6709742

IF: 4,868

11. Almási, Nikoletta; Pósa, Anikó; Al-awar, Amin; **Török, Szilvia**; Baráth, Zoltán; Nemcsók, János; Murlasits, Zsolt; Istvan Nagy, Lajos; G Puskás, László; Varga, Csaba; Kupai, Krisztina **Differentially expressed microRNAs and their relation to gasotransmitters in TNBS-induced colitis in rat colon**. Academia Journal of Scientific Research 2017, 5, pp. 277-289.

12. Al-awar, Amin; Kupai, Krisztina; Almási, Nikoletta; Murlasits, Zsolt; **Török, Szilvia**; Bóta, András; Krész, Miklós; Berkó, Anikó; Pósa, Anikó; Varga, Csaba **Effect of long-term physical exercise on metabolic risk parameters in Overweight/Obese subjects: a network-based analysis approach**. Academia Journal of Scientific Research 2017, 5, pp. 419-427.

13. Al-awar, Amin; Kupai, Krisztina; Veszelka, Médea; Szűcs, Gergő; Attieh, Zouhair; Murlasits, Zsolt; **Török, Szilvia**; Pósa, Anikó; Varga, Csaba **Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models**. Journal of Diabetes Research 2016, 9051426

IF: 2,717

14. Kupai, K; Szabo, R; Veszelka, M; Al Awar, A; **Torok, S**; Csonka, A; Barath, Z; Posa, A; Varga, C. **Consequences of exercising on ischemia-reperfusion injury in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts: role of the HO/NOS system**. Diabetology and Metabolic Syndrome 2015, 7, 85

IF: 2,557

15. Pósa, Anikó; Szabó, Renáta; Kupai, Krisztina; Csonka, Anett; Szalai, Zita; Veszélka, Médea; **Török, Szilvia**; Daruka, Lejla; Varga, Csaba **Exercise training and calorie restriction influence the metabolic parameters in ovariectomized female rats.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2015, 787063

IF: 4,492

16. Szalai, Zita; Kupai, Krisztina; Veszélka, Médea; Pósa, Anikó; **Török, Szilvia**; Magyariné Berkó, Anikó; Baráth, Zoltán; A László, Ferenc; Varga, Csaba **Novel features of the rat model of inflammatory bowel disease based on 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid - induced acute colitis.** Acta Biologica Szegediensis 2014, 58, pp. 127-132.

IF: 0,45

17. Sarkozy, M; Fekete, V; Szucs, G; **Török, S**; Szucs, C; Barkanyi, J; Varga, ZV; Foldesi, I; Csonka, C; Konya, C; Csont, T; Ferdinandy, P. **Anti-diabetic effect of a preparation of vitamins, minerals and trace elements in diabetic rats: a gender difference.** BMC Endocrine Disorders 2014, 14, 72

IF: 2,37

18. Szucs, G; Murlasits, Z; **Török, S**; Kocsis, GF; Pálóczi, J; Görbe, A; Csont, T; Csonka, C; Ferdinandy, P. **Cardioprotection by Farnesol: Role of the Mevalonate Pathway.** Cardiovascular Drugs and Therapy 2013, 27, pp. 269-277.

IF: 2,952

19. Monostori, P; Kocsis, GF; Okros, Z; Bencsik, P; Czetenyi, O; Kiss, Z; Gellen, B; Bereczki, C; Ocsovszki, I; Pipis, J; Pálóczi, J; Sárközy, M; **Török, S**; Varga, IS; Kiss, I; Fodor, E; Csont, T; Ferdinandy, P; Túri, S. **Different administration schedules of darbepoetin alfa affect oxidized and reduced glutathione levels to a similar extent in 5/6 nephrectomized rats.** Clinical and Experimental Nephrology 2013, 17, pp. 569-574.

IF: 1,708

Összesített IF: 63,694