

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Sigma-1 receptor mediálta protektív mechanizmus vizsgálata TNBS-indukálta patkány colitis modellben

Almási Nikoletta

Témavezető:

Dr. Kupai Krisztina
tudományos főmunkatárs

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék



Szeged

2021

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék.....	2
2. Rövidítések jegyzéke	4
3. Bevezetés	7
3.1. Az immunrendszer és a gyulladás	7
3.2. A gasztrointesztinális rendszer és immunrendszere	8
3.3. A gyulladással járó bélbetegségek	9
3.4. Az IBD patogenezeise	10
3.4.1. Genetikai tényezők, környezeti faktorok és immunológiai folyamatok IBD-ben	10
3.4.2. Az oxidatív stressz szerepe az IBD patogenezisében	14
3.5. Az IBD terápiás lehetőségei	16
3.6. Az IBD állatkísérletes modellezése.....	19
3.7. A sigma receptorok felfedezése és biológiája.....	20
3.8. A σ IR jellemzése és funkciója	21
3.9. A σ IR-hoz kötődő ligandok.....	22
3.10. A σ IR szerepe gyulladásban és oxidatív stresszben.....	24
4. Célkitűzések	25
5. Anyagok és módszerek.....	26
5.1. Anyagok összeállítása	26
5.2. Sigma-1 receptor vizsgálata in vitro receptorkötési kísérletekben	26
5.2.1. Patkány colon membrán homogenizátum preparálása	26
5.2.2. Radioligandum kötődési vizsgálat	27
5.3. Kísérleti elrendezés és a TNBS-indukálta colitis modell.....	27
5.4. Lézio meghatározása	29
5.5. A pro-inflammatorikus MPO enzim aktivitásának mérése	30
5.6. A σ IR, az UCHL-1, az iNOS, az NF κ -B p65, valamint a HMGB1 expressziójának vizsgálata Western blottal	30
5.7. IL-6, eNOS, 3-NT és a Prdx1, -2, -4, -6 szintjének meghatározása ELISA módszerrel	31
5.8. A SOD aktivitás meghatározása colonban	31
5.9. A HO enzim aktivitásának meghatározása TNBS colitisben	32
5.10. A GSH szintjének meghatározása TNBS-indukálta patkány colitisben	33
5.11. Fehérjemeghatározás	33

5.12. Statisztikai analízis	33
6. Eredmények	35
6.1. <i>In vitro</i> σ 1R radioligandum kötődési tesztek a colonszövetben	35
6.2. σ 1R moduláció hatása a gyulladás kiterjedtségére TNBS modellben	36
6.3. Az FLV kezelés hatásának vizsgálata a σ 1R expressziójára TNBS-indukálta colitisben	39
6.4. Az MPO enzim aktivitásának és az IL-6 citokin szintjének változása σ 1R moduláció hatására ..	39
6.5. σ 1R ligandok hatásának vizsgálata az NF- κ B p65-ös alegységének és a HMGB1 fehérje expressziójára TNBS colitisben	40
6.6. A σ 1R-hoz köthető kezelések hatásának vizsgálata a NOS enzimrendszerre TNBS-indukálta gyulladásban	41
6.7. A σ 1R agonista és antagonisták hatásának vizsgálata az UCHL-1 expressziójára és a HO enzim aktivitására TNBS colitisben	43
6.8. σ 1R ligandkezelés hatása az oxidatív stressz marker 3-NT szintjére TNBS modellben.....	44
6.9. A GSH szintjének változása, valamint a SOD enzim aktivitásának vizsgálata σ 1R aktiváció hatására patkány colitisben	45
6.10. A σ 1R agonista és antagonisták hatásának vizsgálata a Prdx izoformáira TNBS modellben	46
7. Diskusszió	48
9. Tartalmi összefoglaló	57
10. Summary	60
11. Köszönetnyilvánítás.....	63
12. Irodalomjegyzék	64
13. Tudományos közlemények listája	73

2. Rövidítések jegyzéke

3-NT: 3-nitrotirozin

5-ASA: 5-amino-szalicilsav

5-HT: 5-hidroxi-triptamin

ANOVA: varianciaanalízis (analysis of variance)

ARE: antioxidáns válaszelemek

BiP: binding immunoglobulin protein

B_{max}: maximális kötési kapacitás

BSA: szarvasmarha szérum albumin

CD: Crohn betegség

cNOS: konstitutív nitrogén-monoxid-szintáz

CO: szén-monoxid

CU: colitis ulcerosa

DAMP: veszély asszociált mintázat

DMSO: dimetil-szulfoxid

DMT: dimetiltriptamin

DSS: dextrán-nátrium-szulfát

DTG: ditolilguanidin

DTNB: 5,5-ditio-bisz-2-nitrobenzoésav

DTT: ditioneitol

EGTA: etilén-glikol-tetraecetsav

eNOS: endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz

ER: endoplazmatikus retikulum

EtOH: etanol

FLV: fluvoxamin

GALT: bélhez kapcsolódó limfoid szövet

GI: gasztrointesztinális rendszer

Gpx: glutation peroxidáz

GR: glutation reduktáz

GSH: glutation

H₂O₂: hidrogén-peroxid

HEPES: N-[2-hidroxietyl] piperazin-N'-[2-etánszulfonsav]
HETAB: hexadeciltrimetilammónium-bromid
HMGB1: high mobility group box 1
HO: hemoxigenáz
HO-1: hemoxigenáz-1
HO-2: hemoxigenáz-2
HOCl: hipoklórossav
i.c.: intracolónális
i.p.: intraperitoneális
IBD: gyulladáshos bélbetegségek (Inflammatory Bowel Diseases)
IL-1, -6, -8, -10, -12, -23: interkeukin-1, -6, -8, -10, -12, -23
iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz
IP₃R: inozitol-1,4,5-trifoszfát receptor
IRE1: inozitol-függő enzim-1
K_d: egyensúlyi disszociációs állandó
K_i: gátló konstans
KO: knockout
LPS: lipopoliszacharid
MALT: mucosához kapcsolódó limfoid szövet
MAM: mitokondrium-asszociált endoplazmatikus retikulum (ER) membrán
MPO: mieloperoxidáz
NF-κB: nukleáris faktor-kappa B
nNOS: neuronális nitrogén-monoxid-szintáz
NO: nitrogén-monoxid
NO⁻: nitroxil-anion
NOS: nitrogén-monoxid-szintáz
Nrf2: nukleáris faktor eritroid 2-vel összefüggő faktor 2
O²⁻: szuperoxid anion
OD: optikai denzitás
OH⁻: hidroxil anion
ONOO⁻: peroxinitrit

PAMP: patogén asszociált molekuláris mintázat
PBS: foszfát puffer
PMSF: fenilmetilszulfonil-fluorid
Prdx: peroxiredoxin
Prdx1-6: peroxiredoxin 1-6
PRR: mintázat felismerő receptor
ROS: reaktív oxigén gyökök
SA4503: cutamesine
SASP: szulfaszalazin
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
SEM: standard error of mean
SERT: szerotonin transzporter
SOD: szuperoxid-dizmutáz
SSRI: szerotonin visszavétel gátló
TCA: trikarbonsav
TG: transzgén
Th1: helper T1 sejt
Th17: helper T17 sejt
Th2: helper T2 sejt
TM: transzmembrán
TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav
TNF- α : tumor nekrozis faktor alfa
TNP: trinitrofenil
TRX: thioredoxin
UCHL-1: ubiquitin C-terminális hidroláz L1
 β -ME: β -merkaptoetanol
 β -NADPH: β -nikotinamid-adenin-dinukleotid-2'-foszfát
 σ 1R: sigma-1 receptor
 σ 2R: sigma-2 receptor
 σ 3R: sigma-3 receptor
 σ R: sigma receptorok

3. Bevezetés

3.1. Az immunrendszer és a gyulladás

Az immunrendszer a szervezet védekező mechanizmusa a testet érintő károsodások és toxikus anyagok ellen. Az evolúció során kétféle mechanizmus alakult ki a veleszületett vagy natív és a szerzett vagy adaptív immunitás [1]. A veleszületett immunitás alapja a szervezet saját és nem saját sejtei közötti differenciálás, amelyet a patogén asszociált molekuláris mintázat (PAMP), a veszély asszociált mintázat (DAMP), valamint a mintázat felismerő receptorok (PRR) tesznek lehetővé [2]. Az adaptív immunrendszer a veleszületett immunrendszerre épülve, specifikus sejtek működésén alapulva immunválaszt indít, valamint immunmemóriát kialakítva hatékonyabb védekezést tesz lehetővé.

Az immunrendszer károsító stimulusra adott válasza a gyulladás, amelynek célja a stimulus eltávolítása és a sebgyógyuláshoz vezető folyamatok elindítása [3]. Gyulladásos reakciót kiválthatnak többek között patogének, károsodást szenvedett, sérült sejt, toxikus anyagok vagy sugárzás [4]. Szöveti szinten a gyulladást az alábbi 5 tünet jellemzi az adott területen: pirosság, duzzanat, hő, fájdalom és funkcióvesztés. A gyulladásos folyamat során lokálisan nő az erek permeabilitása, a stimulus leukociták toborzását és akkumulációját indukálja, valamint gyulladásos mediátorok szabadulnak fel [5].

A gyulladásos folyamat kialakulásához számos sejt és mediátor koordinált működése szükséges. Szöveti sérülés hatására a károsodott epithél és endothél sejtek specifikus anyagokat, citokineket, kemokineket és növekedési hormonokat szabadítanak fel, amelyek indukálják a gyulladásos kaskádot [3]. A citokinek és a kemokinek gyulladásos effektor molekulák, amelyeknek az információ-továbbításban és az immunválasz szabályozásában van fontos szerepük [6]. Megkülönböztetünk pro-inflammatórikus, vagyis gyulladást keltő, valamint anti-inflammatórikus gyulladáscsökkentő citokineket. A citokinek citokin receptorokhoz kötődve indukálnak különböző jelátviteli utakat. Pro-inflammatórikus folyamatokat indukáló citokinek többek között az interleukin-1, -6, -8, -12, -23 (IL-1, -6, -8, -12, -23) és a tumor nekrosis faktor α (TNF- α), anti-inflammatórikus pedig az interleukin-10 (IL-10) [7].

A neutrofil granulociták az immunsejtek egyik fontos csoportját képezik, mivel a gyulladásos kaskád kiváltotta védekezés kezdeti szakaszában gyorsan indukálódnak és működésükkel, valamint az antigén prezentáló sejtek segítségével, aktiválják a T- és B-sejteket (T- és B-limfocitákat), a szerzett immunitás fő mediátorait [8]. A szerzett immunitás lassabban

alakul ki és fókuszáltabb védekező mechanizmust tesz lehetővé. A T-sejtek különböző funkcionális szubpopulációi ismertek, amelyek a sejtfelszínen expresszált glikoproteinekkal differenciálhatók [9]. A citotoxikus vagy másnéven killer T-sejtek CD8⁺ glikoproteint expresszálnak és elsődleges feladatuk a szervezet vírusfertőzött vagy daganatos sejtjeinek eliminálása [10]. Működésüket, a T-sejtek egy másik csoportja, a CD4⁺ expresszázó helper T-sejtek segítik [11]. A T-sejteken expresszázó T-sejt receptorok felismerik az idegen anyagot, és iniciálják a specifikus gyulladást. A kiváltott válasz lehet a citotoxikus T-sejtek aktivációja, a B-sejtek antitest termelésének stimulálása, valamint helyi gyulladást okozó válasz indukálása [12].

3.2. A gasztrointesztinális rendszer és immunrendszere

A gasztrointesztinális (GI) rendszer a szájnyílástól a ánuszig tart. [13]. A GI traktust a nyelőcső alsó harmadától a rektumig 4 fő szövetréteg alkotja. Ezek a lumen felőli oldaltól kifelé a mucosa, a plexus submucosus, a musculáris réteg, valamint a serosa [14]. A mucosa vagy nyálkahártya rétegét egysejtsoros epithélium, a lamina propria, valamint vékony simaizomréteg alkotja [15]. A plexus submucosus a mucosa réteg alatti laza rostos kötőszövetből és a Meissner-féle idegfonatból áll [16]. A musculáris réteg többrétegű simaizomszövetből, hosszanti és körkörös izmokból, valamint az Auerbach-féle idegfonatból épül fel. A serosa vagy savós hártya a legkülső réteg, amely kötőszövetből és hámrétegből áll [17].

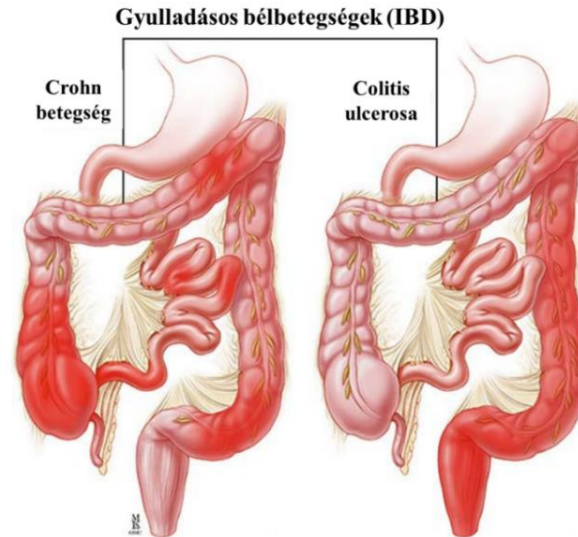
A bélrendszer az emésztésben és a tápanyagok felszívásában betöltött szerepe mellett a szervezet legnagyobb nyirokszerve is. A felszívás a mucosán keresztül történik, így a bélrendszer ezen részei találkoznak a legtöbb idegen anyaggal, antigénnel és mikroorganizmussal. A mucosához kapcsolódó limfoid szövet (MALT) a szervezet egészében diffúzan jelenlévő struktúra, amely lehetővé teszi a szervezetbe kerülő anyagok vizsgálatát, valamint az azok elleni gyors fellépést, ezzel fenntartva az immunhomeosztázist. A MALT több részre osztható szöveti elhelyezkedése alapján, amelyből esetünkben a bélhez kapcsolódó limfoid szövet (GALT) és a vékonybél Peyer plakkjai a legfontosabbak [18].

Mivel a GI rendszer a táplálkozás miatt rengeteg idegen anyagnak van kitéve, ezért az intesztinális mucosa gyakran az ún. fiziológias gyulladás állapotában van [19]. A különböző gyulladást okozó betegségekre hajlamosító gének mutációi és polimorfizmusai, valamint a betegség iniciációját indukáló környezeti tényezők hatására azonban patológiás, krónikus gyulladást

folyamat alakulhat ki a szervezetben [20]. A krónikus gyulladás idült lefolyású, kialakulhat az akut gyulladás folyamányaként, ha a károsító stimulus nem eltávolítható vagy autoimmun folyamatként [3]. Míg az akut gyulladás védekező mechanizmusnak tekinthető, a krónikus gyulladás káros patológiás elváltozásokhoz vezethet. Számos betegség krónikus gyulladással asszociált, mint például az asztma [21], valamint egyéb autoimmun vagy immun-asszociált betegségek, mint a pikkelysömör [22], az 1-es típusú diabétesz [23], valamint a gyulladással járó bélbetegségek [24].

3.3. A gyulladással járó bélbetegségek

A gyulladással járó bélbetegségek (Inflammatory Bowel Diseases (IBD)) a GI traktus krónikus gyulladással járó kórképeinek gyűjtőneve. Az IBD két fő típusa a Crohn betegség (CD) és a colitis ulcerosa (CU), amelyek differenciáldiagnózisa klinikai vizsgálatok, radiológiai eltérések és endoszkópos vizsgálat alapján lehetséges [25]. A CD és CU számos tünetben hasonlóságot mutat, azonban a gyulladás manifesztációja az egyik alapvető különbség a két típus között. Míg CD esetében a GI traktus egésze érintett lehet a gyulladással járó léziók kialakulásában, addig a CU csak a vastagbélre korlátozódik. CD esetében a gyulladás transzmurális, a bél minden rétegét érintő, CU-nál azonban szuperficiális jellegű, amely csak a mucosa rétegét érinti [26] (1. ábra). Mindkét betegség esetében jellemző a relapsus-remisszió (fellángolás-tünetmentes időszak) ciklikus váltakozása [27]. Továbbá CD esetében akár a serosa rétegéig érő súlyosabb gyulladás hatására a sérült bélszakasz összetapadhat vékonybél- vagy más vastagbélszakaszokkal, illetve egyéb belső szervekkel is. Az összetapadás során sipoly keletkezik, amely rendellenes járatot jelent a különböző szervek között [28]. A sipoly veszélye, hogy a baktériumokat tartalmazó béltartalom átjuthat az összetapadt egyéb szervekbe vagy a hasüregbe, ahol akár hasi tályog kialakulását is indukálhatja.



1. ábra. A gyulladásoos bélbetegségek (IBD) 2 fő típusa

(Forrás: https://www.hopkinsmedicine.org/inflammatory_bowel_disease_center/about_ibd/)

Epidemiológiai kutatások alapján az IBD a nyugati, fejlett országokban elterjedtebb és az utóbbi évtizedben stagnálást mutat, míg a fejlődő országokban a betegség incidenciája egyre nő [29]. Világszerte a CU incidenciája régiótól függően évente 0,5-24,5 új eset 100.000 főre vonatkoztatva, míg CD esetében 0,1-16 új eset/100.000 fő [30]. A betegség kezdete és diagnóza CU esetében a 20-35. életév köré tehető, CD azonban jellemzően akár 10 évvel korábban is jelentkezhet [31]. Továbbá mindkét típus esetében megfigyelhető egy „második hullám” a betegség kialakulásában az 55-65 éves korosztályban [32].

3.4. Az IBD patogenezeise

3.4.1. Genetikai tényezők, környezeti faktorok és immunológiai folyamatok IBD-ben

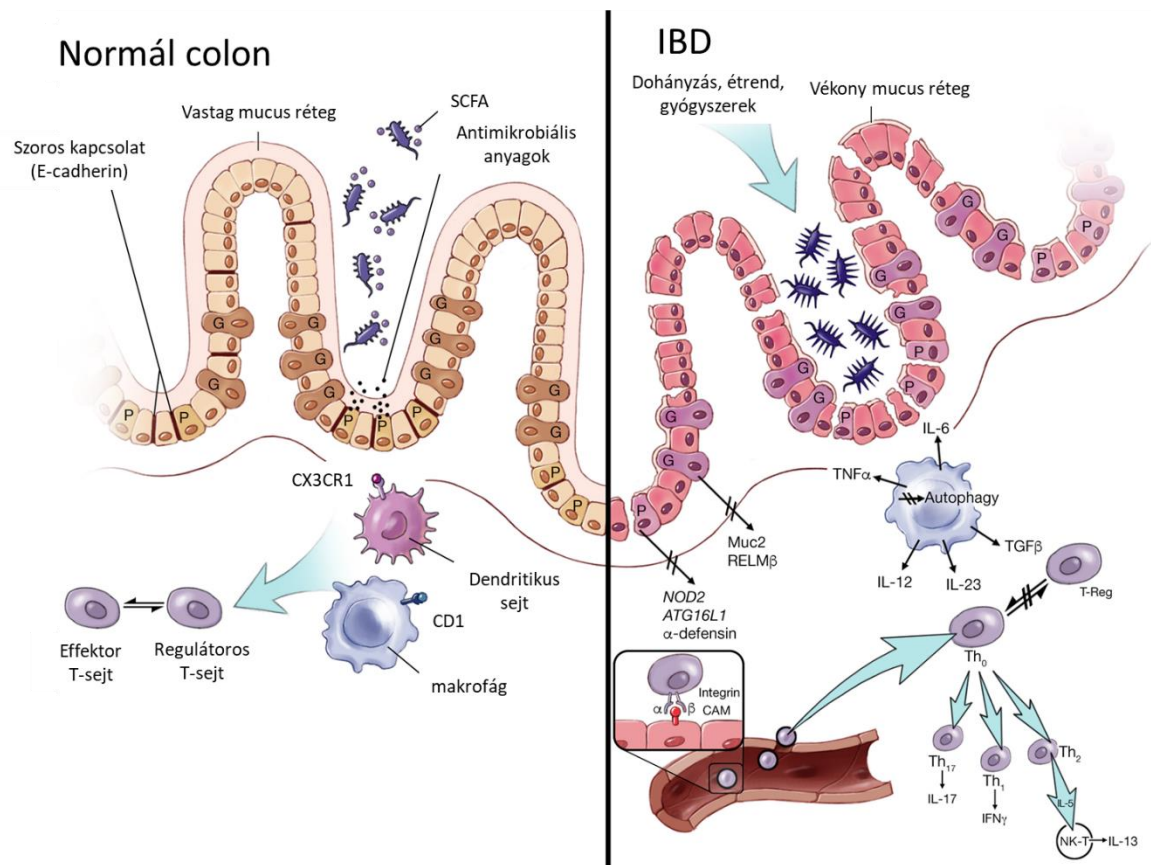
Annak ellenére, hogy az IBD intenzíven kutatott terület, pontos patogenezeise még nem teljesen ismert. Egyre inkább tisztázott azonban, hogy a betegség kialakulásában genetikai faktorok, környezeti tényezők, különböző immunológiai folyamatok, immundiszreguláció, valamint a szervezet mikrobiomja játszik közre [33]. A jelenleg elfogadott elmélet szerint az IBD kialakulását vagy reaktiválódását genetikailag fogékony egyéneknél bizonyos környezeti faktorok precipitálják és túlműködő T-sejtes immunválaszt indítanak el a szervezet mikrobiomjának egy része ellen [34].

Az IBD patogenezisében a genetikai hajlam jelentőségét indikálja számos ikertanulmány, valamint a családon belüli halmozódás. Ikervizsgálatok során megfigyelték, hogy egypetéjű ikreknél CD esetében 30-40%-ban, CU esetén 6-14%-ban, míg kétpetéjű ikreknél CD esetében 7%-ban, CU esetében pedig 3%-ban mutatták a betegség tüneteit a vizsgált személyek [35, 36]. Mindemellett a családon belüli esetek aggregációja alapján is megerősíthető a genetikai hajlam megléte, mivel IBD-ben szenvedő betegek 5-23%-ának van a betegségben szintén érintett elsőfokú rokona [37]. IBD-re irányuló genetikai kutatások során felmerült számos gén, amelyek mutációi és polimorfizmusai szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában. Ilyen gén például a bakteriális fehérjék felismeréséért és eliminálásuk iniciációjáért felelős NOD2/CARD15 [38], az epitheliális integritást szabályozó DLG5 [39], valamint a P-glikoprotein xenobiotikum transzportert kódoló MDR1 [40].

A genetikai fogékonyság mellett számos környezeti tényezőről kiderült, hogy fontos lehet a betegség kialakulásában. Az IBD patomechanizmusa szempontjából releváns környezeti tényezőnek tekinthetők a különböző prenatális események, számos gyermekkorban szerzett fertőzés, a saját mikrobiom, fogamzásgátló gyógyszerek és nem-szteroid gyulladáscsökkentők szedése, a dohányzás, a stressz, valamint a helytelen táplálkozás és étrend [41, 42]. Egyre inkább tisztázott, hogy a patogén mikroorganizmusok közül a *Mycobacterium avium paratuberculosis*-nak [43], a *Listeria monocytogenes*-nek [44], valamint az *Escherichia coli*-nak van fontos szerepe [45]. Továbbá megfigyelhető, hogy a szervezet saját mikrobiomja is iniciálhatja az IBD mindkét fenotípusának kialakulását vagy fellobbanását [46]. A mikrobiom jelentőségét alátámasztja az a megfigyelés is, miszerint a különböző probiotikumok szedése számos esetben csökkenti a humán IBD, valamint a kísérletes colitis súlyosságát egyaránt [47]. Egyes kutatások arról számoltak be, hogy a betegség kialakulásában szerepe lehet még az anyatejes táplálás hiányának [48], valamint az ún. higiénia hipotézis szerint a gyermekkori túlzott antibiotikum alkalmazásnak és az alacsony baktérium- és vírusexpozíciónak is [49].

Az IBD patogenezisében számos immunológiai folyamat és mediátor szerepe is megemlíthető. Mind CD, mind CU betegekben megfigyelhető a veleszületett és a szerzett immunitás túlzott aktivációja [50]. IBD-ben a pro-inflammatórikus IL-6, IL-12, IL-23 és TNF- α citokinek megnövekedett szintje, valamint a nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) emelkedett aktivációja figyelhető meg a gyulladt szövetekben [51]. Az NF- κ B egy komplex szerkezetű pro-inflammatórikus transzkripciós faktor, amely normál körülmények között az inhibitor kappa B

(I κ B) represszor által gátolva van. Gyulladásos stimulus hatására a represszor disszociál a komplexről és az NF- κ B p65-p50-es heterodimér része a sejtmagba transzportálódva számos pro-inflammatorikus jelátviteli útvonal indukcióját inicializálja [52]. Az NF- κ B gátlása kísérletes körülmények között csillapította a colitist [53], azonban ennek terápiás relevanciája vitatott, mert a gyulladásos folyamatok indukálása mellett, az NF- κ B-nek fontos szerepe van az epitheliális homeosztázis fenntartásában is [54]. Kezdetben úgy vélték, hogy CD esetében a helper T 1 (Th1) [55], míg CU esetében a helper T 2 (Th2) sejtek felelősek a betegség kialakulásáért és progressziójáért [56]. Ez a dogma azonban megdőlni látszik, mivel állatkísérletes modellekben kiderült, hogy a folyamat ennél bonyolultabb, valamint felmerült a helper T 17 (Th17) sejtek és a regulátoros T-sejtek szerepe is a betegség mindkét típusánál (2. ábra) [57].



2. ábra. Az IBD patogenezisének vázlatja

IL-6, -12, -13, -17, -23: interleukin-6, -12, -13, -17, -23, TGF- β : transzformáló növekedési faktor β , TNF- α : tumor nekrozis faktor α , NK-T: természetes ölő sejt, Th0, Th1, Th2, Th17: helper T 0, -1, -2, -17 sejt, IFN γ : interferon γ

(Forrás: GP Ramos és mtsai., 2019 [57])

Továbbá számos gyulladásos markerről feltételezik, hogy megnövekedett expressziója szerepet játszhat az IBD patogenezisében. Ilyen marker a high mobility group box 1 (HMGB1) transzkripciót szabályozó nem-hisztin fehérje, amely nekrotikus szövet esetében nagy mennyiségben megtalálható az extracelluláris térben és gyulladásos folyamatot indukál [58]. Legutóbbi kutatások a székletben mért HMGB1 szintet a bél gyulladásának jellemzésére javasolják, amely ezzel a gyulladás nem-invazív markere lehet IBD-s betegekben. Továbbá a széklet HMGB1 szintjének vizsgálatával a terápiás kezelések hatásossága is monitorozható [59].

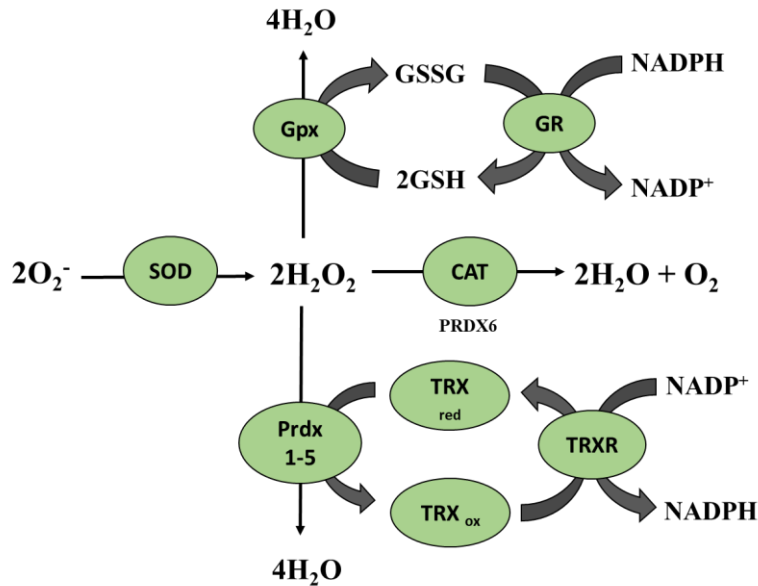
Az IBD kialakulásában és progressziójában felmerült a nitrogén-monoxid (NO) gázotranszmittert termelő nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) enzimek szerepe is [60]. A NOS enzimek 3 izoformája különíthető el, amelyek elnevezésére kétféle nevezéktan ismert. Az egyik esetben az elnevezés a termelő szövet vagy stimulus alapján történik. Így megkülönböztetünk gyulladásos folyamatok hatására indukálható (iNOS), endothél sejtek által termelt endotheliális (eNOS), valamint neuronokban termelő neuronális (nNOS) izoformát. A másik nevezéktan esetében az expresszió alapján beszélhetünk indukálható (iNOS), valamint konstitutívan expresszálódó NOS enzimekről (cNOS), amely csoportba az eNOS és nNOS enzimek sorolandók [61]. Gyulladásos folyamatokban az iNOS enzim expressziója és aktivitása növekedést mutat, míg az eNOS és nNOS izoformáknál alacsonyabb expresszió figyelhető meg. Erre a jelenségre magyarázatként szolgálhat, hogy az eNOS és nNOS enzimek kis mennyiségben termelnek NO-t, amely alapvetően gyulladáscsökkentő tulajdonságú, azonban kóros állapotokban az NO nagy mennyiségű termelődése az iNOS izoforma által pro-inflammatórikus szignálként gyulladásos folyamatot indukál [62].

Az ubiquitin C-terminális hidroláz L1 (UCHL-1) egy a proteaszómális lebontás során nélkülözhetetlen deubiquitináló enzim [63]. Működése során a sejt ubiquitin homeosztázisában és az ubiquitin reciklizációjában van kiemelten fontos szerepe, ugyanis a proteaszómális degradációra kijelölt poliubiquitinált fehérjékről monoubiquitin egységeket lehasítva újrahasznosíthatóvá teszi az ubiquitint, amellyel szabályozza a proteaszómális lebontást [64]. Mindemellett, ér simaizomsejtekben történő vizsgálatok során kiderült, hogy az UCHL-1 feltehetőleg anti-inflammatórikus hatással is rendelkezik, mivel megnövekedett expressziója csökkentette a pro-inflammatórikus NF- κ B szintjét [65].

3.4.2. Az oxidatív stressz szerepe az IBD patogenezisében

Az IBD patogenezisében a gyulladáshoz vezető folyamatok mellett egyre inkább tisztázott, hogy az oxidatív stressz is igen fontos szerepet játszik [66]. Oxidatív stressz esetén felborult egyensúlyt tapasztalunk a prooxidáns és az antioxidáns molekulák között. A gyulladáshoz vezető folyamat során infiltrálódó fagocitáló immunsejtek működésükkel szabadgyököket termelnek, amelyek a prooxidáns folyamatok felé tolják el az egyensúlyt [67]. Ebben a környezetben felborul a sejtek homeosztázisa, sérülnek a makromolekulák és ez a mucosális barrier károsodásához és a permeabilitás növekedéséhez vezet, amely tovább gyorsítja a gyulladáshoz vezető folyamatot [66]. A szabadgyökök közül legnagyobb jelentősége az oxigén metabolizmusa során képződő reaktív oxigén gyököknek (ROS) van. ROS többek között a szuperoxid anion ($O_2^{\cdot-}$), a hidroxil anion ($OH^{\cdot-}$), valamint a hidrogén-peroxid (H_2O_2) [68]. Szabadgyök tulajdonsággal rendelkeznek még a nitrogén metabolizmusa során képződő, nitrogén reaktív formái, mint a nitroxil-anion ($NO^{\cdot-}$), a peroxinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) és a hipoklórossav ($HOCl$) [69]. A szabadgyökök elsődleges támadáspontjai a peptidek, a proteinek, a lipidek, valamint a DNS [70]. Az oxidatív stressz számos betegség kialakulását indukálja, szöveti kvantifikálására a fehérjék tirozin oldalláncán történő módosulás alapján, a 3-nitrotirozin (3-NT) szintjének meghatározásával lehet következtetni [71]. IBD esetében megnövekedett ROS-produkció tapasztalható, amely nemcsak annak patomechanizmusában, hanem az IBD-asszociált daganatos megbetegedések kialakulásában és progressziójában is fontosnak bizonyul [72].

A szervezetben képződő ROS-ok semlegesítéséért az antioxidáns rendszer a felelős. Az antioxidáns rendszer részét képezi számos endogén anyag, mint például a bilirubin, a koenzim Q10 [73], valamint a szervezet fő thiol tartalmú kismolekulású celluláris antioxidánsa, a glutation (GSH) [74]. Továbbá jelentősek még a különböző táplálékkal bevitt vitaminok, mint a C és E vitamin, valamint a különböző fémkötő proteinek, többek között az albumin, a metallothionein és a ferritin [73]. Az antioxidáns rendszer működését számos enzim segíti, mint a $O_2^{\cdot-}$ -t H_2O_2 -dá alakító szuperoxid-dizmutáz (SOD), majd a keletkező H_2O_2 -t vízzé és oxigénné alakító kataláz, a glutation peroxidáz (Gpx), amely katalizált reakciója során a GSH-t oxidált GSSG-vé alakítja, valamint a peroxiredoxin (Prdx) enzimek [75] (3. ábra).



3. ábra. Az antioxidáns védekező rendszer fő elemei és katalizált reakcióik

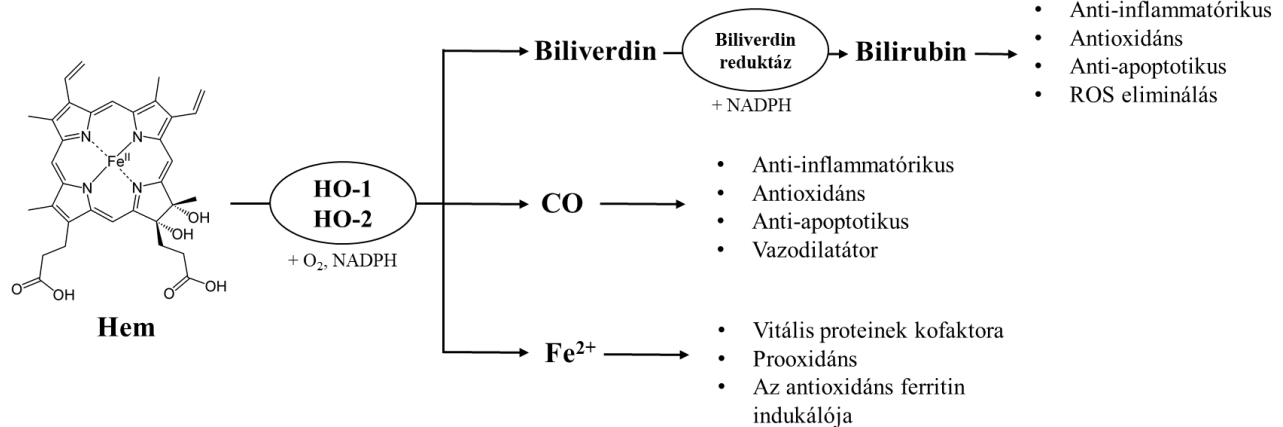
O_2^- : szuperoxid anion, SOD: szuperoxid-dizmutáz, H_2O_2 : hidrogén peroxid, Gpx: glutation peroxidáz, GSH: glutation, GSSG: oxidált glutation, GR: glutation reduktáz, CAT: kataláz, Prdx1-6: peroxidredoxin 1-6, TRX_{ox}, red: tioredoxin, TRXR: tioredoxin reduktáz, NADPH: β -nikotinamid-adenin-dinukleotid foszfát

(Forrás: Hamada és mtsai., 2014 [75])

A Prdx enzimek katalitikus cisztein oldalláncot tartalmaznak és a tioredoxint (TRX) oxidálják. A Prdx enzimes család 6 izoformája ismert emlősökben (Prdx1-6) [76]. A Prdx enzimek alapvetően antioxidáns tulajdonságú fehérjék, azonban számos egyéb ellentmondásos funkciójukról is beszámoltak. Szerepük lehet többek között a sejtnövekedés regulálásában, a differenciációban, valamint az apoptózisban is [77]. Gyulladásos folyamatokban a Prdx-1 [78], -2 [79], -4 [80] és -6-os izoformák [81] szerepe merült fel.

A szervezet egyik további fontos antioxidáns és anti-inflammatorikus hatású enzime, a hemoxigenáz (HO), amely a hem biodegradációját katalizálja. A HO enzim 2 fő izoformája ismert, az indukálható HO-1 és a konstitutív HO-2 [82]. Különböző gyulladást kiváltó faktorok, mint a hipoxia, az oxidatív stressz, különböző citokinek, a lipopoliszacharid (LPS) és a nehézfémek aktiválják az enzim expresszióját [83]. A HO enzimek által katalizált reakciót a 4. ábra szemlélteti. A folyamat során a hemből biliverdin, szén-monoxid (CO), valamint Fe^{2+} keletkezik. A keletkező biliverdint a biliverdin reduktáz bilirubinná alakítja, amely gyulladáscsökkentő, antioxidáns és anti-apoptotikus tulajdonságú. A keletkező CO, az egyik fő gáztranszmitter a szervezetben, amely vazodilatátor, gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatású.

Továbbá a prooxidáns tulajdonságú Fe^{2+} számos vitális protein kofaktora, valamint aktiválja a ferritin antioxidáns molekulát [84]. A HO-1 indukció protektív szerepét számos gyulladásos folyamatban és állatmodellben bizonyították [85, 86].



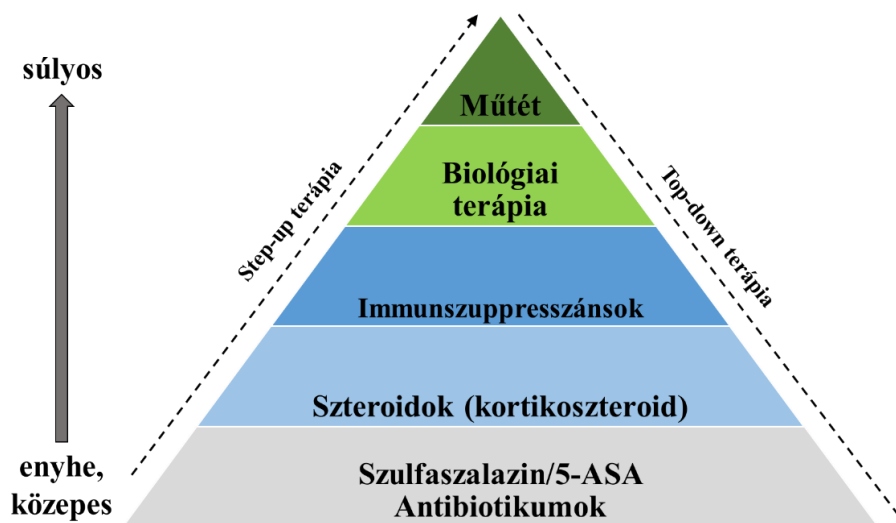
4. ábra. A hemoxigenáz enzim által katalizált reakció

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

(Forrás: Chiang és mtsai., 2019, módosítva [84])

3.5. Az IBD terápiás lehetőségei

Az IBD terápiája során kétféle szemléletet különböztetünk meg (5. ábra). Az egyik a „step-up”, a másik a „top-down” terápia. A „step-up” terápia a hagyományos, felépítő, amely során az enyhébb gyógyszeres kezeléstől kezdve alkalmazzák a terápiás szereket egészen a műtéti beavatkozásig. „Top-down” vagy leépítő terápia esetén, amely például fiatalkori agresszív betegség kezelésére javasolt, a kezelést a biológiai terápiával kezdik, és lefelé haladva folytatják a gyógyszerek alkalmazását fenntartó kezelésként. Ekkor a fenntartó kezelés tartós és a cél a szövődmények kialakulásának megelőzése [87].

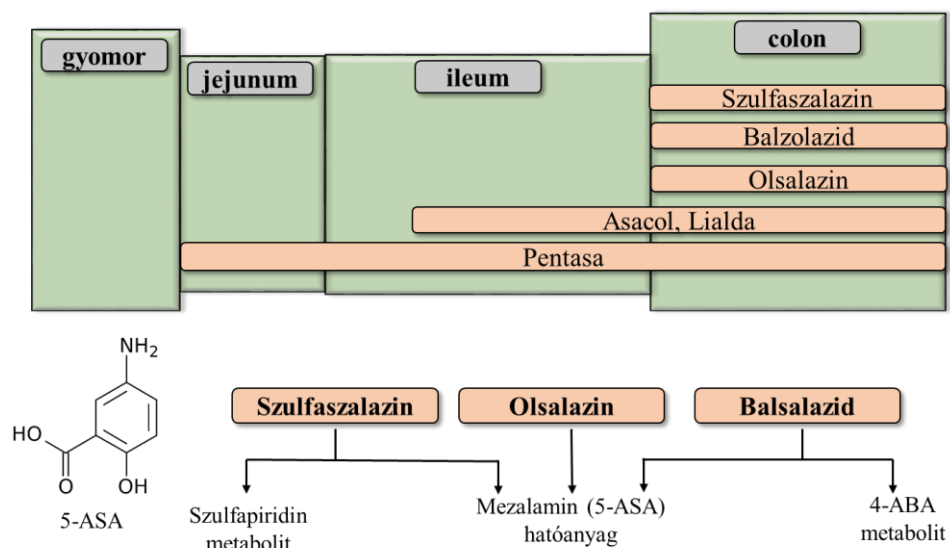


5. ábra. A gyulladásos bélbetegségek kezelésére alkalmazott gyógyszercsoportok és beavatkozások

5-ASA: 5-amino-szalicilsav

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

Jelenleg, az IBD ellen irányuló terápia 4 fő gyógyszertípusra osztható. Enyhe és közepes tünetek esetén, az első alkalmazandó szer a szalicilsav származékok csoportja, elsősorban az 5-amino-szalicilsav (5-ASA) és a szulfaszalazin (SASP) [88] (6. ábra). Az 5-ASA származékok előnye, hogy orálisan és beöntés formájában is hatékonyak bizonyulnak, valamint protektív hatásukat nem szisztémásan, hanem helyileg fejtik ki a gyulladt területen. A SASP orálisan alkalmazva a szájüregben történő minimális abszorpció után hatását főleg a colonban fejtik ki, mivel az ott kolonizáló baktériumok azo reductázai képesek hasítani a SASP két csoportja, a szulfapiridin és az 5-ASA közötti azo kötések, így felszabadítva az aktív hatóanyagot [89]. A colonban felszabadult 5-ASA gátló hatását helyileg fejtik ki számos gyulladást keltő faktorra és pro-inflammatorikus citokinre. A gyulladás lokalizálódása alapján beszélhetünk késleltetett 5-ASA formulálásról is, amely során Pentasa esetében az 5-ASA hatóanyagot kis mikrogranulumokba csomagolva juttatják be a szervezetbe, ennek köszönhetően a felszívódás a vékonybélben történik meg. Asacol esetében az 5-ASA hatóanyagot pH szenzitív resinnel látják el, amely a disztális ileum és a proximális colon területén, a megfelelő 7-es pH-n disszociál róla, így az 5-ASA ott fejtik ki a hatását. A Lialda esetében a resint multimátrix magba csomagolják, amely elnyújtottabb 5-ASA felszabadulást eredményez [90]. Továbbá beöntés formájában alkalmazzák a Rowasa készítményt, amely a colon utolsó szakaszában kialakult gyulladás ellen hatásos [91].



6. ábra. A szalicilsav származékok felszívódásának helye és módja a GI traktusban

5-ASA: 5-amino-szalicilsav, 4-ABA: 4-abszcizinsav

(Forrás: Sellin, Pasricha és mtsai. 2006)

A kortikoszteroidokat már súlyosabb esetekben alkalmazzák, ha a szalicilsav származékok hatástalannak bizonyulnak. A kortikoszteroidok a legerősebb gyulladáscsökkentők, hatásukat szisztémásan fejtik ki [92]. Elsősorban az akut rohamok kezelésére alkalmazzák, mert hosszútávú használatuk súlyos mellékhatásokat okoz, osteoporózishoz, hiperglikémiához, hipertenzióhoz, gyomorfekély kialakulásához, valamint fertőzésekkel szembeni nagyobb fogékonysághoz vezethetnek [93]. Ilyen készítmény például a Prednisolon és a Medrol.

Az alkalmazott gyógyszerek 3. típusa az immunszuppresszánsok, amelyek az immunsejtek gátlásával csökkentik a gyulladást. Hátrányuk, hogy igen lassan fejtik ki hatásukat, amíg a szervezet a csökkenő immunsejtszám miatt sokkal fogékonyabb különböző fertőző betegségekre [94]. Immunszuppresszáns készítmény az Imuran és a Methotrexat.

A következő terápiás lehetőség az IBD kezelésére a biológiai terápia. Az első ilyen terápia a CD kezelésére kifejlesztett anti-TNF- α terápia, amely esetében a monoklonális anti-TNF- α antitest hozzákötődik a szervezetben előforduló TNF- α -hoz, ezzel semlegesíti azt, valamint meggátolja bekötődését a TNF- α receptorokhoz [95]. Az anti-TNF- α terápiák közül kettőt alkalmaznak ma Magyarországon, az infliximabot és az adalimumabot [96]. Az infliximab egy kiméra antitest, amely 75% emberi és 25% egér komponensekből áll [97], míg az adalimumab teljesen humán készítmény, így ezzel szemben az allergiás reakciók is ritkábbak

[98]. Az anti-TNF- α terápiák hátránya, hogy a kezelésre a betegek közel 40%-a nem reagál, illetve előfordulhat a szervezetben antitest képződés az anti-TNF- α ellen, ezzel csökkentve a hatékonyságot [99]. Továbbá az anti-TNF- α terápia alkalmazása során a beteg érzékenyebb lehet különböző fertőzésekre.

A betegek többségénél a műtéti beavatkozás is elkerülhetetlen. Műtéti beavatkozás során a sipoly kezelése, valamint a súlyosan gyulladt bélszakaszok eltávolítása a cél [100]. Mivel az IBD jelenleg nem gyógyítható betegség, így a terápia során az elsődleges cél a beteg remisszióban tartása, valamint a különböző intesztinális és extraintesztinális tünetek enyhítése.

3.6. Az IBD állatkísérletes modellezése

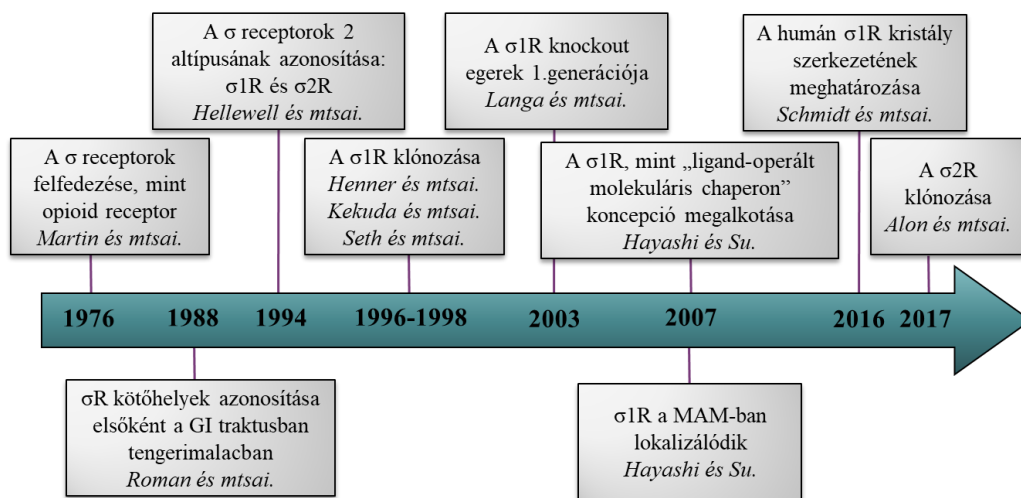
Az IBD vizsgálatára alkalmas állatmodelleket alapvetően 5 csoportra oszthatjuk. Megkülönböztetünk kémiai indukción alapuló modelleket, amelyet 2,4,6-trinitrobenzolszulfonsavval (TNBS), dextrans-nátrium-szulfáttal (DSS), oxazolonnal vagy ecetsavval váltanak ki [101]; immunológiai modelleket, mint a Salmonella-indukálta colitis [102]; spontán kialakuló állatmodelleket; gén knockout (KO) modelleket, mint az IL-10^{-/-}, NOD2^{-/-} és IL-23^{-/-} egerek, valamint transzgén (TG) modelleket, amelyek közül gyakran alkalmazott az IL-7 TG egér, a keratin 8^{-/-} és a N-cadherin egér [103]. Ezen állatmodellek közül a kémiai indukción alapuló módszerek költséghatékonyságuk és viszonylag könnyű reprodukálhatóságuk miatt az egyik leginkább alkalmazott eljárások. Kísérleteink során a TNBS colitis modellt alkalmaztuk, amelyet Morris és mtsai. fejlesztettek ki [104]. Az eljárás során a TNBS-t etanolban disszolválva juttatják be egyszeri intracolónális (i.c.) kezeléssel az állat rektumán keresztül. Az etanol nem csak disszolvensként szolgál a folyamatban, hanem felsérti a colon mucosa rétegét, amelynek hatására a TNBS bejut a bélszövet mélyebb rétegeibe és haptén tulajdonságú trinitrofenil (TNP) csoportokkal látja el a colon saját sejtjeit vagy a bél mikrobiom elemeit [105]. A folyamat hatására a hapténált molekulák immunogénné válnak az immunrendszer számára és immunválasz indul ellenük [106]. Az aktivált sejtípusok és a gyulladás kiterjedtségét tekintve a TNBS modell a humán CD-re hasonló állapotot idéz elő, Th1-sejt aktivációval és transzmurális gyulladással, azonban a gyulladás lokalizációját tekintve colitis alakul ki [107]. TNBS modell esetében a fekélyes elváltozások viszonylag gyorsan, már a TNBS kezelést követő 24 órában megjelennek, amelyre az állatok súlyvesztéséből lehet következtetni [108].

3.7. A sigma receptorok felfedezése és biológiája

A sigma receptorok (σ R) intracelluláris chaperon tulajdonságú fehérjék, amelyek a mitokondrium-asszociált endoplazmatikus retikulum (ER) membránban (MAM) lokalizálódnak [109]. A σ R felfedezése Martin és mtsai. 1976-ban végzett kutatásához köthető [110], amelyben krónikus gerincfájdalom modellben vizsgálták különböző farmakonok hatásait kutyákban. Megfigyeléseik alapján a morfin a μ opioid (μ -szindróma), a ketazocin a κ opioid (κ -szindróma), az SKF-10,047 (N-allylnormetazocin) által kiváltott hatást pedig az akkor még az opioid receptorok egy harmadik feltételezett típusának, a σ R-nak tulajdonították (σ szindróma). A naloxon egy általános opioid receptor gátló, amely az SKF-10,047 σ R-on keresztül kifejtett hatását nem gátolta, ezzel felvetve, hogy a receptor feltehetőleg mégsem sorolandó az opioid receptorok közé [111]. A σ R felfedezését követően később igazolták, hogy valóban nem sorolható a hagyományos opioid receptorok közé, hanem önálló receptor osztályt alkot. Opioid antagonisták alkalmazásával későbbi kísérletek rávilágítottak, hogy a téves klasszifikációt az SKF-10,047 ligand komplex farmakológiája okozhatta. A (-)-SKF-10,047 sztereoiszomér a μ és κ receptorokhoz kötődik, a (+)-SKF-10,047 izomér pedig a σ R-hoz kötődve váltott ki hatást az opioid antagonistá jelenlététől függetlenül [112, 113]. Mivel Martin és mtsai. racém elegyben alkalmazták az SKF-10,047 ligandot, emiatt a σ R opioid receptor tulajdonságúnak tűnt. Ezután az orphan receptorok közé sorolták a σ R-t mindaddig, amíg a dimetiltriptamint (DMT), mint endogén ligandját, sikerült azonosítani [114]. A σ R-ok kutatásával kapcsolatos mérföldköveket a 7. ábra szemlélteti.

σ R-ok nagy mennyiségben expresszálódnak a központi idegrendszer minden agyi régiójában, valamint számos perifériás szövetben [111]. Alapvető funkciójuk az inozitol-1,4,5-trifoszfát receptoron (IP₃R) keresztüli Ca²⁺ homeosztázis regulálása, valamint a σ R aktiválása védelmet nyújt az ER számára oxidatív stresszel szemben [115]. Különböző stressz vagy agonista ligandkötődés hatására a receptor a MAM-ból a plazmamembránba és a nukleáris membránba transzlokálódik, így fejtve ki protektív hatását az egész sejtben [116, 117]. A σ R-okat alapvetően két csoportra oszthatjuk, a σ 1R és a σ 2R-ra, azonban egyre inkább valószínűsíthető egy harmadik altípus, a σ 3R megléte is, amelyet eddig még csak patkányban sikerült izolálni [111]. A σ R-ok altípusainak elkülönítése a specifikus kötőhelyeik, a különböző farmakonok iránti szelektivitási mintázatuk és a molekulatömegük alapján történik. A σ 1R 25 kDa-os [113], a σ 2R pedig 18 kDa-os fehérje [118]. A σ 1R számos betegségben merült fel terápiás célpontként, mint a

neurodegeneratív betegségek [119], különböző daganatos megbetegedések [120], valamint a gyulladással járó kórképek esetében [121].



7. ábra. A sigma receptorral (σ R) kapcsolatos kutatás mérföldkövei

σ R: sigma receptor, GI: gasztrointesztinális, MAM: mitokondrium-asszociált endoplazmatikus retikulum membrán

(Forrás: Luz Romero és Enrique Portillo-Salido, 2019, módosítva [122])

3.8. A σ 1R jellemzése és funkciója

A σ 1R egy 223 aminosavból álló konzervált chaperon tulajdonságú fehérje [111]. Génje a SIGMAR1 (vagy OPRS1) emberben a 9-es kromoszóma p13-as karján, rágcsálókban pedig a 4-es kromoszómán lokalizálódik. A SIGMAR1 gén közel 7 kb hosszú, 4 exont és 3 intron régiót tartalmaz. Szekvenciája nem tartalmaz TATA-boxot, azonban CCAATC és GC box található upstream a transzkripció kezdőponttól egérben [123]. Érdekes módon a σ 1R nem mutat szekvencia homológiát semmilyen más emlős fehérjével, azonban 60% aminosav egyezést mutat a *Saccharomyces cerevisiae*-ben megtalálható ERG2 által kódolt C-8 szterol izomerázzal. A σ 1R klónozásakor kiderült, hogy a szekvencia homológia ellenére, a σ 1R nem rendelkezik szterol izomeráz aktivitással [124].

A σ 1R hidrofobicitási analízis alapján 3 hidrofób doménnel rendelkezik, amelyből 2 transzmembrán (TM) domén [111]. A harmadik hidrofób domén, valamint 2 anionos aminosav, az Asp126 és a Glu172 intakt jelenléte szükséges a σ 1R ligandkötéséhez [125]. A σ 1R a MAM-ban lokalizálódik, mind a C-, mind az N-terminális vége az ER lumenében található. Aktivációja

során a receptor az ER-ből a plazmamembránba és a nukleáris membránba transzlokálódik. Az aktivációt kiválthatja különböző ER-stresszt vagy oxidatív stresszt indukáló faktor, valamint a $\sigma 1R$ -specifikus ligandok kötődése [113]. A $\sigma 1R$ alapvetően steady-state állapotban van, mivel a MAM-ban komplexet képez egy másik chaperon fehérjével, a binding immunoglobulin proteinnel (BiP), amely gátolt állapotban tartja a receptort [126]. Ha az ER-ben a Ca^{2+} szint csökken, akkor a BiP leválik a $\sigma 1R$ -ről így a receptor aktiválódik és hozzákötődik az ER-lokalizált IP_3R -hoz. A $\sigma 1R$ - IP_3R stabil komplexet képez, amelynek hatására Ca^{2+} áramlik a mitokondriumba. A mitokondriumban a megnövekedett Ca^{2+} szint indukálja a trikarbonsav (TCA) ciklust, amelynek hatására sejt-hipermetabolizáció és neuroprotektív folyamatok indulnak el [127].

3.9. A $\sigma 1R$ -hoz kötődő ligandok

A receptor-ligand interakció dinamikus folyamat, amelynek hatására szignáltranszdukciós útvonal indulhat. A receptor és ligandja között nem kovalens másodlagos kötés alakul ki, amely reverzibilis kapcsolatot tesz lehetővé [128]. A hatáserősség és a ligandok affinitása a receptorhoz dózis-hatás görbével, valamint az adott szövet receptor denzitása (receptor sűrűség) szaturációs kísérlettel jellemezhető. A receptor és ligandja közötti reverzibilis kötés radioaktívan jelölt ligandummal vizsgálható, a kötés erőssége pedig a leszorítási koncentráció alapján határozható meg. A kötés erősségét az egyensúlyi disszociációs állandóval (K_d) és a gátló konstanssal (K_i) jellemezhetjük, a receptor sűrűséget pedig a maximális kötési kapacitás (B_{max}) jelöli. A K_i nM-ban kifejtett érték, amely minél alacsonyabb, annál erősebb a receptor-ligand kötődés [129]. A receptor-ligand kötődés indukálta hatás szempontjából megkülönböztetünk alapvetően agonista és antagonistá ligandot. Agonista az a ligand, amely receptorkötődés hatására biológiai választ indít el. Agonista lehet a receptor saját endogén ligandja, valamint az agonista ligand hatását mimikálni képes exogén anyag is. Antagonista az a ligand, amely a receptor által kifejtett hatást vagy az agonista kötődését meggátolja [130].

A $\sigma 1R$ aktivált állapotban oligomerizációra képes és egyre inkább tisztázott, hogy az oligomerizációs állapota befolyásolja a receptor aktivitását. Dimer állapotban a receptor aktív állapotban van, nagyobb oligomerizációs stádiumokban azonban inaktív állapotba kerül [131]. Továbbá a már említett BiP chaperon is szabályozza a $\sigma 1R$ aktivitását. A $\sigma 1R$ -specifikus ligandok feltehetőleg a $\sigma 1R$ oligomerizációs stádiumán és a BiP disszociációján vagy a komplex

stabilizálásán keresztül fejtik ki hatásukat [127]. Megfigyelték ugyanis, hogy agonista hatására az alacsonyabb dimer állapotok, valamint a BiP disszociációja tapasztalható, ezzel szemben az antagonistá jelenléte magasabb oligomerizációs stádiumok kialakulását indukálja, valamint stabilizálja a σ 1R-BiP-komplexet [126, 132].

Érdekes módon a σ 1R-hoz rengeteg ligandféleség kötődik nagy affinitással, mint például különböző benzomorfan-származékok, antipszichomimetikumok, antihisztaminok, antidepresszánsok és antifungális szerek [113]. Éppen ezért a σ 1R szerepének vizsgálata kihívást jelent a kutatás során, mivel a magas liganddiverzitás számos egyéb mellékhatással is járhat. A ligandok sokféleségét, affinitását a σ 1R és σ 2R-hoz, valamint a σ és egyéb receptorokra kifejtett hatását a 8. ábra szemlélteti.

Ligand	Affinitás (σ 1R)	Affinitás (σ 2R)	Funkció (σ)	Egyéb hatás	Referencia
(+)-SKF10,047	++	+	Agonista	NMDA receptor ligand	[133]
(-)-SKF10,047	+	+	-	Opioid receptor ligand	[133]
(+)-pentazocin	++++	+	Agonista	n.a.	[133]
(-)-pentazocin	++	+	-	κ -pioid receptor ligand	[133]
PRE-084	++	+	Agonista	Antidepresszáns hatás	[134]
SA4503 (cutamesin)	++++	++	Agonista	Dopamin releasing neuron aktivátor	[133]
Fluvoxamin	++++	+	Agonista	Antidepresszáns SSRI	[135, 136]
DTG	+++	+++	Agonista	Szerotonerg hallucinogén	[137]
Haloperidol	++++	++++	Antagonista	Dopamin receptor blokkoló	[138, 139]
BD-1047	++++	+++	Antagonista	β -adrenerg receptor gátló	[134]
BD-1063	++++	++	Antagonista	ROS indukáló	[134, 140]
Rimcazol	++	++	Antagonista	Dopamin transzporter ligand	[141]
NE-100	++++	+++	Antagonista	n.a.	[133]
E-52862 (S1RA)	++++	+	Antagonista	Alacsony affinitás 5-HT _{2B} iránt	[142]

8. ábra. A sigma receptorokhoz kötődő ligandok affinitása és egyéb funkciói

A σ 1R és σ 2R ligandok iránti affinitásának ábrázolása az irodalmi adatok összevetése alapján (K_i értékek) alapján a következőképpen alakult: $K_i > 1000$ nM +; $K_i = 500-1000$ nM ++; $K_i = 30-500$ nM +++; $K_i < 30$ nM ++++; n.a. nincs adat

A σ 1R és σ 2R kötőhelyek nagy affinitású sztereoselektivitást mutatnak benzomorfan-származékok iránt. A σ 1R elsősorban a dextro (+) sztereoizomereket köti nagy affinitással az

SKF-10,047 és a pentazocin ligandok esetében egyaránt, míg a σ_2R kötőhelyek reverz sztereoszelektivitást mutatnak alacsonyabb kötődési affinitással. Továbbá a (-) sztereoizomerek opioid receptorokhoz nagyobb affinitással kötődnek [111]. Agonistaként kötődik még a σ_1R -hoz a PRE-084, a cutamesine (SA4503), valamint a ditolilguanidin (DTG), amelyeknél mellékhatásként feljegyeztek számos neurotranszmitter rendszerrel való kölcsönhatást, mint a szerotonerg vagy a dopaminerg rendszer [133, 134, 137]. A σ_1R -hoz szerotonin visszavétel gátló (SSRI) antidepresszánsok is kötődnek, amelyek közül a fluvoxamin (FLV) és a fluoxetin nagy affinitású σ_1R agonistáknak bizonyultak, ezzel felvetve a receptor szerepét skizofréniában [143] és depresszióban [144]. Az FLV a klinikumban gyakran alkalmazott gyógyszer a depresszió kezelésére. Hatását a szerotonin vagy másnéven 5-hidroxi-triptamin (5-HT) receptorokon keresztül fejt ki, a szerotonin neurotranszmitter visszavételének gátlásával, amely így tovább marad a szinaptikus térben [145]. A σ_1R antagonistáknak esetében is megfigyeltek számos mellékhatást, amelyeket a ligandok diverzitása okozhat. Antagonisták esetén a dopaminerg rendszerrel való kölcsönhatást, valamint β -adrenerg receptor gátló hatást figyeltek meg [134, 141]. σ_1R antagonisták közül a BD1063 és az NE-100 a leginkább alkalmazottak a kutatásban.

3.10. A σ_1R szerepe gyulladásban és oxidatív stresszben

A receptor szerepét felfedezését követően elsősorban a központi idegrendszer vonatkozásában vizsgálták, azonban később kiderült, hogy szerepe sokkal sokrétűbb és aktivációja fontos lehet a periférián és különböző gyulladással járó betegségekben is. Kezdetben megfigyelték, hogy a σ_1R -ra KO egerek életképesek és fertilisek [146], azonban depresszió-szerű fenotípust mutatnak [147]. Továbbá Pal és mtsai. σ_1R KO egerekben és antagonistákkal BD1063 kezelés hatására megnövekedett ROS szintet tapasztaltak [140]. Legújabb kutatások alapján kiderült, hogy a σ_1R overexpressziója anti-inflammatorikus hatást fejt ki LPS-indukálta gyulladásban és szepszis modellben. Továbbá a különböző σ_1R -specifikus agonisták kezelése, mint a (+)-pentazocin, szupresszálta a gyulladást LPS-indukálta retinális mikroglia aktiváció esetén [121]. Mindemellett feltételezhető, hogy a σ_1R aktiváció fiziológiai körülmények között kismértékű oxidatív stresszt indukál a mitokondriumban, de a patológiai oxidatív stresszhez szemben gyors protektív mechanizmusokat indukál [148].

4. Célkitűzések

Munkánk során célul tűztük ki a $\sigma 1R$ szerepének vizsgálatát TNBS-indukálta patkány colitis modellben.

Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Kifejeződik-e a $\sigma 1R$ a colonszövetben, valamint, hogy befolyásolják-e a receptor denzitását és expresszióját a TNBS modell indukálása és a különböző alkalmazott $\sigma 1R$ -asszociált kezeléseink?
- $\sigma 1R$ ligandok (agonista: FLV, antagonistá: BD1063) alkalmazása során mely dózisokat tekinthetjük effektívnek a TNBS-indukálta gyulladásra kifejtett hatásuk alapján?
- Valamint, hogy hogyan valósul meg az FLV hatásos dózisének alkalmazásával a protektív mechanizmus?

Kísérleti elrendezésünkben az FLV a $\sigma 1R$ aktiválását, a BD1063 antagonistá a $\sigma 1R$ csökkent aktivitását modellezi, a kombinációs kezelés során pedig az agonista és antagonistá szimultán beadásakor feltételeztük, hogy a biokémiai paraméterekben tapasztalt változás $\sigma 1R$ regulált, ha az antagonistá megszüntette az agonista-indukálta protekciót.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Anyagok összeállítása

A (+)-pentazocin, a haloperidol és a pufferösszetevők (Tris-HCl, inhibitorok) a Sigma-Aldrich Kft.-től származtak (Budapest, Magyarország). A [³H](+)-pentazocin radioligandum (1,98 TBq/mmol) a Kémiai Biológia laboratóriumában készült (Szegedi Biológiai Kutatóközpont, SZBK, Szeged). A tríciumjelölést egy saját tervezésű vákuumpumpával hajtották végre [149], majd a radioaktivitást Packard Tri-Carb 2100 TR folyadék szcintillációs készülékkel mérték (Packard, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) a PerkinElmer által gyártott Insta Gel szcintillációs koktéllal. A ligandumokat 1 mM dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk és -20°C-on tároltuk, majd hígítottuk a mérés során a reakciópufferrel. A TNBS-t a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be és 50%-os etanolban oldottuk. Az FLV (fluvoxamine maleate) a Sigma-Aldrich Kft.-től, a BD1063 a Tocris-től (Bio-Techne R&D Systems Kft., Budapest) származott. Az FLV-t 3%-os DMSO-ban, a BD1063-t fiziológiás sóoldatban (0,9%) oldottuk. A SASP-ot pozitív kontrollként használtuk és a Sigma-Aldrich Kft.-től szereztük be, valamint fiziológiás sóoldatban (0,9%) oldottuk. Anesztetikumként tiopentált alkalmaztunk (Thiopental Braun, 0,5 g, B. Braun Medical, Barcelona, Spanyolország), amelyet fiziológiás sóoldatban oldottunk fel.

5.2. Sigma-1 receptor vizsgálata in vitro receptorkötési kísérletekben

5.2.1. Patkány colon membrán homogenizátum preparálása

Állatkísérleteink során minden esetben figyelembe vettük és követtük a Magyar Egészségügyi Bizottság által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokollt (1998), valamint az Európai Unió Tanácsának 2010. évi rendeletének irányelveit (2010/63/EU). Az állatkísérletes munkára irányuló engedélyünk száma: XX./4799/2015.

Munkánk során hím 225-250 g-os Wistar Han (Hannover) patkányokat alkalmaztunk, amelyek a Toxicop Kft.-től származtak (Dunakeszi, Magyarország). A patkányok colonjának preparálása korábban kidolgozott módszerünk alapján történt [150], kisebb változtatásokkal. Az állatokat intraperitoneálisan (i.p.) alkalmazott thiopental (100 mg/kg) injekcióval termináltuk, majd dekapitáltuk és a vastagbelet kipreparáltuk. A colonszövetet apró darabokra vágtuk és hideg homogenizáló pufferben homogenizáltuk Braun Teflon-üveg homogenizálóval a legmagasabb fokozaton 30 másodpercig. A homogenizáló puffer a következő összetevőket tartalmazta: 10 mM

NaH₂PO₄ pH 7,4, 0,32 M szacharóz, 1 mM MgSO₄, 10 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepsztatin A, 5 µg/ml szójabab tripszin inhibitor, 0,5 mM etilén-glikol-tetraecetsav (EGTA), 1 mM szerin proteáz inhibitor (AEBSF). A homogenizátumot 17.000 g-n centrifugáltuk 10 percig 4°C-on, majd a felülúszót centrifugáltuk tovább 100.000 g-n 60 percig 4°C-on. A keletkező pelletet használtuk tovább, amelyet 10-szeres homogenizáló pufferben reszuszpendáltunk, üveghomogenizálóval homogenizáltunk, majd aliquotokban tároltuk -80°C-on a biokémiai mérésekig. Az egyes homogenizátumok fehérjetartalmát Bradford módszerrel mértük és a módszernek megfelelő koncentrációra hígítottuk.

5.2.2. Radioligandum kötődési vizsgálat

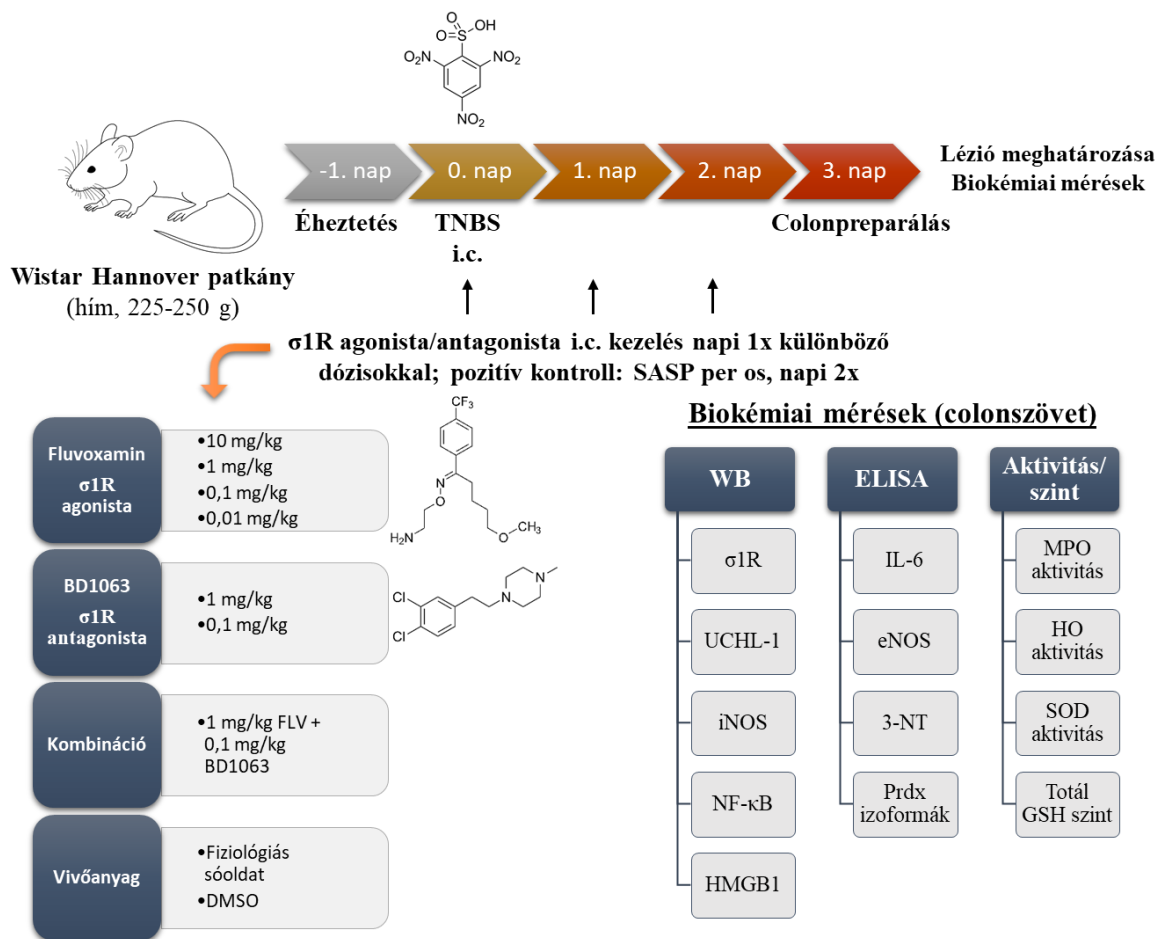
A σ₁R radioligandum kötődési tesztet 50 mM Tris-HCl (pH 8) pufferben végeztük műanyag csövekben 0,6 mg/ml membrán proteint tartalmazó 1 ml végtérfogatban 37°C-on 120 percig. A kompetíciós receptorkötődési vizsgálatokhoz a patkány colon membrán preparátumot 37°C-on 120 percig inkubáltuk 2,3 nM [³H](+)-pentazocinnal (K_d=6,4 nM) növekvő koncentrációiban alkalmazott (10⁻¹¹-10⁻⁵ M) hideg (+)-pentazocin jelenlétében. A nem-specifikus kötést 10 µM haloperidol hozzáadásával határoztuk meg. Az egyensúlyi disszociációs állandó (K_d) és a maximális receptorsűrűség (B_{max}) meghatározása céljából patkány colon membrán homogenizátumon növekvő radioligandum koncentráció ([³H](+)-pentazocin 0,26-20,4 nM) jelenlétében 37°C-on, 120 perces inkubálást alkalmazva radioligandum telítési kísérletet, szaturációs kötési vizsgálatokat végeztünk, 10 µM haloperidol jelenlétében (totál kötés) vagy nélküle (nem-specifikus kötés). A mintákat vízfürdőben inkubáltuk és a reakciót jéghideg 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) mosópuffer hozzáadásával állítottuk le, majd gyorsan szűrtük 24-well-es Brandel Cell Harvesterrel, 0,1% PEI oldattal impregnált GF/B üvegszálás szűrőpapírra (Whatman Ltd., Maidstone, Egyesült Királyság). A szűrőpapírokat levegőn szárítottuk és Ultima Gold MV szcintillációs koktélnak merítettük, majd a radioaktivitást TRI-CARB 2100TR folyadékszintillációs analizátorral mértük (Packard, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

5.3. Kísérleti elrendezés és a TNBS-indukálta colitis modell

Kísérleteinket 225-250 g-os hím Wistar Han patkányokon végeztük. Az állatok a Toxicop Kft.-től (Dunakeszi) származtak. A kísérleti állatokat akklimatizált helyen 12 órás

nappal és sötét cikluson tartottuk. A táphoz és ivóvízhez hozzáfértek *ad libitum*. Az állatokat 3 csoportra osztottuk: abszolút kontroll (nem kaptak kezelést, n=12), 50% EtOH (etanol i.c.), n=12), és TNBS (10 mg 50% EtOH-ban oldva i.c., n=85). A colitis modellt Morris és mtsai. által leírt módszerrel indukáltuk [104]. A módszer során az állatokat 16 órán keresztül éhezettük, majd a TNBS beöntést i.c. végeztük egy 8 cm-es polietilén kanüllel a rektumon keresztül enyhe anesztéziában (i.p. 40 mg/kg thiopental). A TNBS kezelést kapott állatokat tovább osztottuk 10 csoportra (n=6-14/csoport) és a következő anyagokkal kezeltük: fluvoxamin (FLV, σ 1R agonista) i.c. különböző dózissal (10 mg/kg, 1 mg/kg, 0,1 mg/kg és 0,01 mg/kg 3% DMSO-ban oldva); BD1063 (σ 1R antagonist) 1 mg/kg és 0,1 mg/kg (0,9%-os fiziológiás sóoldatban oldva); FLV + BD1063 (kombinált kezelés a két ligand hatásos dózissal: FLV 1 mg/kg + BD1063 0,1 mg/kg); fiziológiás sóoldat (BD1063 és SASP vivőanyaga); DMSO (3%, FLV vivőanyaga); szulfaszalazin (SASP, pozitív kontroll, per os 2 x 25 mg/kg). A kezeléseket napi egyszer végeztük 3 napig ugyanabban az időpontban. Az állatokat az i.c. kezelések előtt 5 órán keresztül éhezettük.

A TNBS kezelés után 72 órával az állatokat feláldoztuk (i.p. 100 mg/kg thiopental), a rektumtól számított 8 cm-es vastagbél szakaszokat kireparáltuk, hosszában felvágtuk és fiziológiás sóoldatban mostuk, majd kifeszítettük és fotót készítettünk a bél lumen felőli oldaláról további makroszkópos analízisre. A szövetet ezután folyékony nitrogénben fagyasztottuk és dörzsmozsárban porítottuk. A porított mintákat a biokémiai mérésekig -80°C -on tároltuk. Kísérleti elrendezésünket a 9. ábra szemlélteti.



9. ábra. Kísérleti elrendezésünk és a mért paraméterek összefoglalása

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, σ1R: sigma-1 receptor, UCHL-1: ubiquitin C-termiális hidroláz L1, iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz, NF-κB: nukleáris faktor kappa B, HMGB1: high mobility group box 1, IL-6: interleukin-6, eNOS: endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz, 3-NT: 3-nitrotirozin, Prdx: peroxidoxin, MPO: mieloperoxidáz, HO: hemoxygenáz, SOD: szuperoxid-dizmutáz, GSH: glutation, SASP: szulfaszalazin

5.4. Lézió meghatározása

A kialakult lézió makroszkópos analizését az elkészült fotók alapján vizsgáltuk, a laborunk által fejlesztett, a planimetria elvén alapuló programmal (Stat_2_1_1, Szeged). A kialakult léziók nagysága a teljes kipreparált 8 cm-es bélszakasz területének és a gyulladt terület méretének hányadosa.

5.5. A pro-inflammatorikus MPO enzim aktivitásának mérése

A pro-inflammatorikus mieloperoxidáz (MPO) enzim a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatok markerének tekinthető, aktivitása korrelál a gyulladás mértékével, valamint a neutrofil granulocita akkumulációval. Az MPO enzim aktivitásának mérése során 30 mg szövetet homogenizáltunk Benchmark Scientific D100 kézi homogenizátorral (Benchmark Scientific, New Jersey, USA) 2x10 másodpercig hideg 0,5% hexadeciltrimetilammónium-bromidot (HETAB, Sigma-Aldrich Kft.) tartalmazó foszfátpufferben (50 mM, pH 6). A sejtmembrán hatékonyabb feltárása érdekében ezután fagyasztás-olvasztás ciklusnak tettük ki ötször a homogenizátumot folyékony nitrogénben és 37°C-os vízfürdőben. A centrifugálás 10.000 g-n történt 15 percig 4°C-on, majd a felülúszót használtuk tovább. A méréshez a mintákból 12 µl aliquotot használtunk fel, amelyhez 280 µl 0,167 mg/ml *O*-adenozin-dihidrokloridot (Sigma-Aldrich Kft.) tartalmazó foszfátpuffert (50 mM, pH 6) adtunk, majd 96-lyukú platebe pipettáztuk. A reakciót 10 µl 0,03%-os H₂O₂ hozzáadásával indítottuk el. 90 másodperces rázatást követően, az optikai denzitást (OD) ELISA readerben mértük 490 nm-en (Benchmark Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories). Az MPO aktivitást µU/mg fehérjében fejeztük ki.

5.6. A σ 1R, az UCHL-1, az iNOS, az NF κ -B p65, valamint a HMGB1 expressziójának vizsgálata Western blottal

A fehérje expresszió vizsgálata érdekében 30 mg porított colon szövetet mértünk ki, amelyet 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) homogenizáltunk kiegészítve fenilmetilszulfonil-fluoriddal (PMSF) (a végtérfogat 1/10-e). A homogenizálást 3x10 másodpercig végeztük Ultrasonic Homogenizer UP-100H ultrasonikálólal jégen. A centrifugálás 12.000 g-n történt 10 percig 4°C-on. A továbbiaknak a felülúszót használtuk, amelyben Bradford módszerrel (szarvasmarha szérum albumin (BSA) kontroll) fehérje koncentrációt mértünk. A mintákból egységesen 50 µg-ot vittünk fel 10%-os nátrium-dodecilszulfát (SDS) poliakrilamid gélre (iNOS esetében 8%) és 2 órán keresztül futtattuk 90V-on. Ezután nitrocellulóz membránra transzferáltuk a mintákat 2,5 órán keresztül 35V-on (kivéve: iNOS, egy éjszakán keresztül, 4°C, 25V). A membránokat ezután Ponceau festékkel festettük és 3x10 perc TBS-T-ben (pH 7,4) történő mosást követően egy éjszakán át blokkoltuk 5%-os tejben vagy 5%-os BSA-ban. A blokkolást követően 3x10 perc mosás következett TBS-T-ben, majd

szobahőmérsékleten inkubáltuk a membránokat 2 órán keresztül elsődleges antitesttel: anti-Sigma-1 receptor (sc-137075, 1:250, Santa-Cruz Biotechnology, Dallas, USA), anti-UCHL-1 (ab108986, 1:500, Abcam, Cambridge, UK), anti-iNOS (ab3523, 1:500, Abcam, Cambridge, UK), anti-NF- κ B p65 (ab16502, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK) és anti-HMGB1 (ab79823, 1:1000, Abcam, Cambridge, UK). A membránokat 2 órán keresztül inkubáltuk az elsődleges antitesttel szobahőmérsékleten, kivéve az iNOS esetében (overnight, 4°C). TBS-T-ben történő 3x10 perc mosás után a membránokat inkubáltuk specifikus, nyúlban (anti-rabbit, DAKO) vagy egérben (anti-mouse, DAKO) termeltetett másodlagos antitestekkel. Az inkubáció tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitesttel történt szobahőmérsékleten (1 óra, 1:5000 hígítás). Az előhívást Enhanced Chemiluminescence rendszerrel végeztük (ECL Plus, Amersham Pharmacia Biotech, Egyesült Királyság) és a keletkező kemilumineszcenciát detektáltuk (UVItec Ltd., Egyesült Királyság). A kapott eredményt Quantity One szoftverrel analizáltuk. A membránokat sztrippeltük és belső kontrollként, β -aktinra specifikus elsődleges antitesttel inkubáltuk (anti- β -aktin: 1:10.000, Abcam; anti-egér: 1:5000, DAKO). Az eredményeket relatív expresszióként ábrázoltuk β -aktinra normalizálva.

5.7. IL-6, eNOS, 3-NT és a Prdx1, -2, -4, -6 szintjének meghatározása ELISA módszerrel

A szöveti IL-6, eNOS, 3-NT és a Prdx1, -2, -4, és -6 szintjének meghatározását szendvics ELISA módszerrel végeztük. Az ELISA kitek beszerzése az alábbi gyártóktól történt: IL-6 (GenAsia, Shanghai, Kína), eNOS (MyBioSource, San Diego, USA), 3-NT (BioAssay Technology Laboratory, Shanghai, Kína) és a Prdx1, -2, -4, -6 (GenAsia, Shanghai, Kína). A mintákat pH 7,4-es foszfát pufferben (PBS) homogenizáltuk kézi homogenizátorral 2x10 másodpercig (Benchmark Scientific Handheld homogenizer D1000 (Benchmark Scientific, New Jersey, USA)). A mérést a kithoz a gyártó által csatolt protokoll alapján végeztük 96-lyukú plateben. Az OD-t 450 nm-en mértük. Az eredmények ábrázolása a következőképpen történt: ng/L (IL-6), ng/ml (eNOS), nmol/L (3-NT), pg/g fehérje (Prdx1, -2, -4, -6).

5.8. A SOD aktivitás meghatározása colonban

A SOD aktivitás mérése kit segítségével történt (Abcam, Egyesült Királyság). A mérést a gyártó által a kithoz csatolt protokollt követve végeztük. A mintákat hideg homogenizáló

pufferben (0,1 M Tris/HCl, 0,5% Triton X-100, 5 mM β -merkaptoetanol (β -ME), 0,1 mg/mL PMSF, pH 7,4) homogenizáltuk. A centrifugálást 14.000 g-n végeztük 5 percig 4°C-on. A továbbiakban a felülúszót használtuk. Az OD-t 450 nm-en mértük. A SOD enzim aktivitását a mért OD alapján az alábbi egyenlettel számoltuk ki és gátlási rátában (%) fejeztük ki. A= abszorbancia, Blank1 = 20 μ l dH₂O + Enzim working solution, Blank2 = 20 μ l minta, Blank3 = 20 μ l dH₂O, Minta well = 20 μ l minta.

$$\text{SOD aktivitás (gátlási ráta \%)} = \frac{(\text{Ablank1} - \text{Ablank3}) - (\text{Aminta} - \text{Ablank2}) \times 100}{(\text{Ablank1} - \text{Ablank3})}$$

5.9. A HO enzim aktivitásának meghatározása TNBS colitisben

A HO enzim aktivitásának meghatározását Tenhunen és mtsai. [151] által leírt módszer alapján végeztük, amelyet kisebb módosításokkal egészítettünk ki [152]. Az aktivitásmérés a reakció során képződő bilirubin szintjének meghatározásán alapszik. A módszer során 30 mg colonszövetet mértünk ki és homogenizáltunk kézi homogenizátorral (Benchmark Scientific Handheld homogenizer D1000 (Benchmark Scientific, New Jersey, MA, USA)); 2 x 10 másodpercig jégen, a következő anyagokat tartalmazó, pH 7,4-es pufferben: 10 mM N-[2-hidroxietyl] piperazin-N'-[2-etánszulfonsav] (HEPES), 32 mM szukróz, 1 mM ditiotreitól (DTT), 0,1 mM EDTA, 10 μ g/ml tripszin inhibitor, 10 μ g/ml leupeptin és 2 μ g/ml aprotinin. A homogenizátumokat centrifugáltuk 20.000 g-n 30 percig 4°C-on, majd további méréseinkhez a felülúszót használtuk. Ezután 150 μ l felülúszót 1,5 ml végtérfogatú, a következő anyagokat tartalmazó pufferben inkubáltuk 60 percig 37°C-on: 2 mM glükóz-6-foszfát, 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát dehidrogenáz, 15 μ M hemin, 150 μ M β -NADPH, biliverdin reduktáz (forrás: 120 μ g/ml patkány májsejt citoszól), 2 mM MgCl₂, 100 mM KH₂PO₄. A felsorolt reagensek a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) származtak. A reakciót a minták jégre helyezésével termináltuk. A képződő bilirubin szintjét a 460 és 530 nm-en mért OD-k különbségéből számoltuk ki. Egy egység HO enzim aktivitást a keletkező bilirubin mennyiségével definiáltuk (nmol/óra/mg fehérje).

5.10. A GSH szintjének meghatározása TNBS-indukálta patkány colitisben

A totál glutation szint méréséhez a mintákat 0,25 M szukróz, 20 nM Tris és 1 mM DTT oldatban homogenizáltuk kézi homogenizátorral (Benchmark Scientific Handheld homogenizer D1000 (Benchmark Scientific, New Jersey, MA, USA)). A homogenizátumokat 15.000 g-n centrifugáltuk 30 percig 4°C-on. A továbbiakban a felülúszót használtuk, amelyet 0,1 M CaCl₂, 0,25 M szukróz, 20 mM Tris és 1 mM DTT-t tartalmazó oldattal inkubáltuk jégen 30 percig. Inkubáció után a mintákat 21.450 g-n centrifugáltuk 60 percig 4°C-on, majd méréseinkhez a citoszólikus frakciót használtuk tovább. 125 mM Na₃PO₄-t és 6 mM EDTA-t tartalmazó oldatot alkalmaztunk a glutation törzsoldat, a glutation reduktáz, az 5,5-ditio-bisz-2-nitrobenzoesav (DTNB) és a β-NADPH hígítására. Ezután 96-lyukú plate-be mértük a következőket: 40 µl blank, standard vagy colon minta; 20 µl DTNB, valamint 140 µl β-NADPH, majd inkubáltuk a plate-t 5 percig 25°C-on. Az inkubációs idő után 10 µl glutation reduktáz enzim hozzáadásával indítottuk el a reakciót. Az iniciációt követő 10. percben spektrofotometriás módszerrel mértük az OD-t 405 nm-en. A minta teljes GSH tartalmának mérése érdekében a reakcióhoz DTNB-t adtunk, amely oxidálja a GSH-t, valamint redukálódik glutation reduktáz és NADPH jelenlétében. A GSH-t nmol/mg fehérjében fejeztük ki.

5.11. Fehérjemeghatározás

Az összfehérje mennyiségi meghatározását Bradford módszerrel végeztük. A mérés során 2-lépcsős hígítással 1250-2000x-esre hígítottuk a mintát előzetes tapasztalatok alapján. Ezt követően 200 µl Bradford reagenst adtunk minden mintához és vortexeltük. A mintákat 96-lyukú plate-be pipettáztuk és spektrofotométerrel mértük 595 nm-en. A kapott eredményt BSA-ból készült standardhoz hasonlítottuk. Az összfehérje tartalmat µg/ml-ben fejeztük ki.

5.12. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag ± standard error of mean (SEM)-ben ábrázoltuk. A statisztikai analízist a leszorítási (K_i) és a szaturáció (B_{max}) eredményei esetében analysis of variance (ANOVA)-val végeztük, amelyet Bonferonni post hoc teszt követett. A western blot eredményeket β-aktinra normalizáltuk és relatív expresszióval fejeztük ki. A biokémiai mérések eredményeinek értékelését ANOVA módszerrel, majd Holm-Sidak post hoc teszttel végeztük SigmaPlot 12

szoftverrel (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Az eredményeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0,05$.

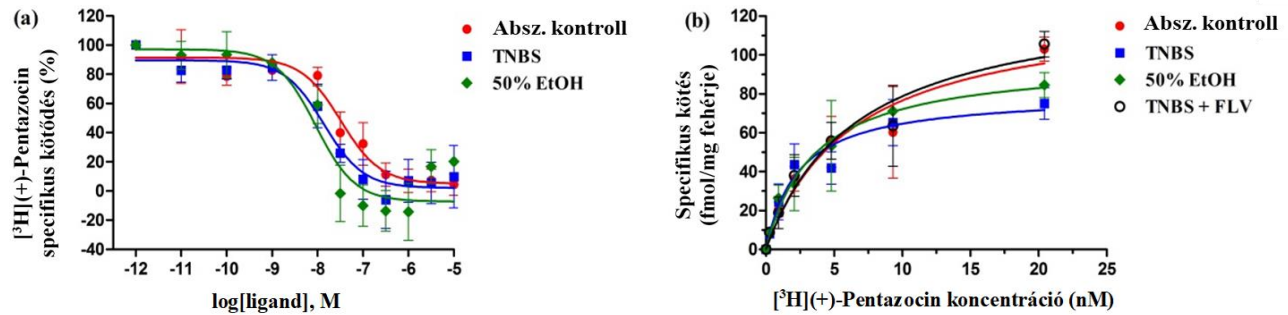
6. Eredmények

6.1. *In vitro* σ 1R radioligandum kötődési tesztek a colonszövetben

A σ 1R receptorsűrűséget (receptor denzitás, B_{\max}) növekvő koncentrációjú [^3H](+)-pentazocinnal telítési kísérletekben, a (+)-pentazocin σ 1R-hoz való affinitását (K_i , K_d) pedig homológ kompetíciós receptorkötődési vizsgálatokkal határoztuk meg patkány colon membrán homogenizátumon.

A [^3H](+)-pentazocin specifikus kötődése nagy affinitású telítést mutatott a colon szövetben. Az abszolút kontroll állatok esetében, amelyek nem kaptak semmilyen kezelést, közepes receptor denzitást (sűrűséget) tapasztaltunk ($B_{\max} = 126 \pm 17$). TNBS kezelés hatására azonban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a σ 1R denzitásában ($B_{\max} = 79 \pm 6,5$). Továbbá megállapítottuk, hogy az 1 mg/kg-os FLV kezelés szignifikánsan növelte a σ 1R maximális kötési kapacitását ($B_{\max} = 134 \pm 14$) a TNBS csoporthoz viszonyítva ($B_{\max} = 79 \pm 6,5$). A σ 1R denzitása FLV kezelés hatására magasabb volt, mint azt az abszolút kontroll csoport esetében tapasztaltuk (10. b. ábra, 1. táblázat).

A kompetíciós receptorkötődési vizsgálatokhoz 37°C-on 90 percig 2 nM [^3H](+)-pentazocinnal, majd különböző növekvő koncentrációiban alkalmazott (10^{-12} - 10^{-5} M) versengő ligandummal inkubáltuk a colon membrán preparátumot. Homológ leszorításos kísérletekben a hideg (+)-pentozocin ligandum alacsony inhibíciós állandó értéket mutatott patkány colon membrán preparátumon. Az inhibíciós állandó értékek között szignifikáns különbséget tapasztaltunk a kontroll és a kezelt csoportok között. A (+)-pentazocin magasabb affinitást mutatott a σ 1R-ra TNBS-indukálta colitises patkány colonszövetben ($K_i = 7,1 \pm 1,5$), valamint 50% EtOH kezelés hatására ($K_i = 5,5 \pm 0,9$) a kontroll csoporthoz képest ($K_i = 24 \pm 5,1$) (10. a. ábra, 1. táblázat).



10. ábra. (a) Homológ leszorítási görbék növekvő koncentrációjú (+)-pentazocin hatására 2,3 nM $[^3\text{H}](+)\text{-pentazocin}$ jelenlétében. (b) Telítési görbék meghatározása növekvő koncentrációjú 0,26 – 20,4 nM $[^3\text{H}](+)\text{-pentazocin}$ jelenlétében

A görbék a specifikus kötés százalékos arányában \pm SEM-ben ábrázoltuk legalább 3 független mérés átlagaként. A nem specifikus kötéseket 10 μM haloperidol jelenlétében detektáltuk.
50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin

Kezelés	$[^3\text{H}](+)\text{-Pentazocin}$ ligand kompetíció		$[^3\text{H}](+)\text{-Pentazocin}$ szaturáció	
	$K_i \pm \text{SEM}$ (nM)	$K_d \pm \text{SEM}$ (nM)	$B_{\text{max}} \pm \text{SEM}$ (fmol/mg)	
Absz. kontroll	$24 \pm 5,1$	$6,4 \pm 2,2$	126 ± 15	
TNBS	$7,1 \pm 1,5 \#$	$2,4 \pm 0,8$	$79 \pm 6,5 \#$	
50% EtOH	$5,5 \pm 0,9 \text{ a}$	$3,5 \pm 0,6$	$96 \pm 5,2$	
TNBS + FLV	n.m.	$6,7 \pm 2,1$	$134 \pm 14 \text{ *}$	

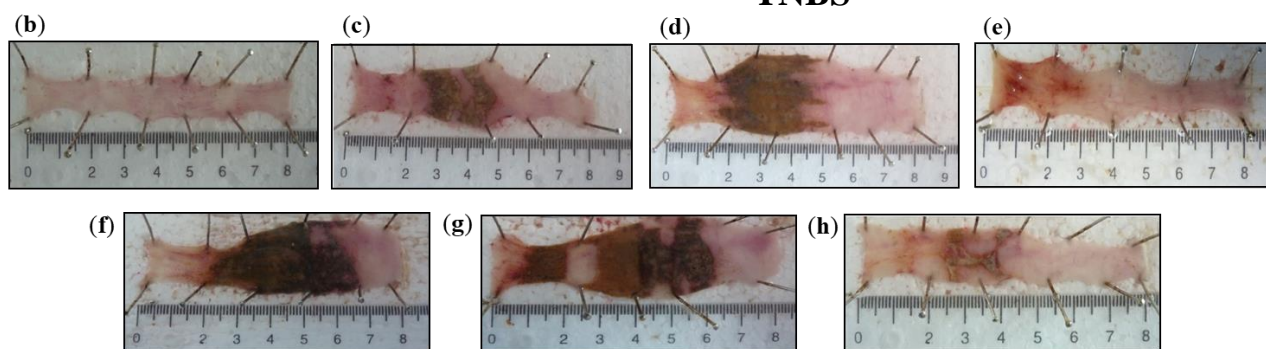
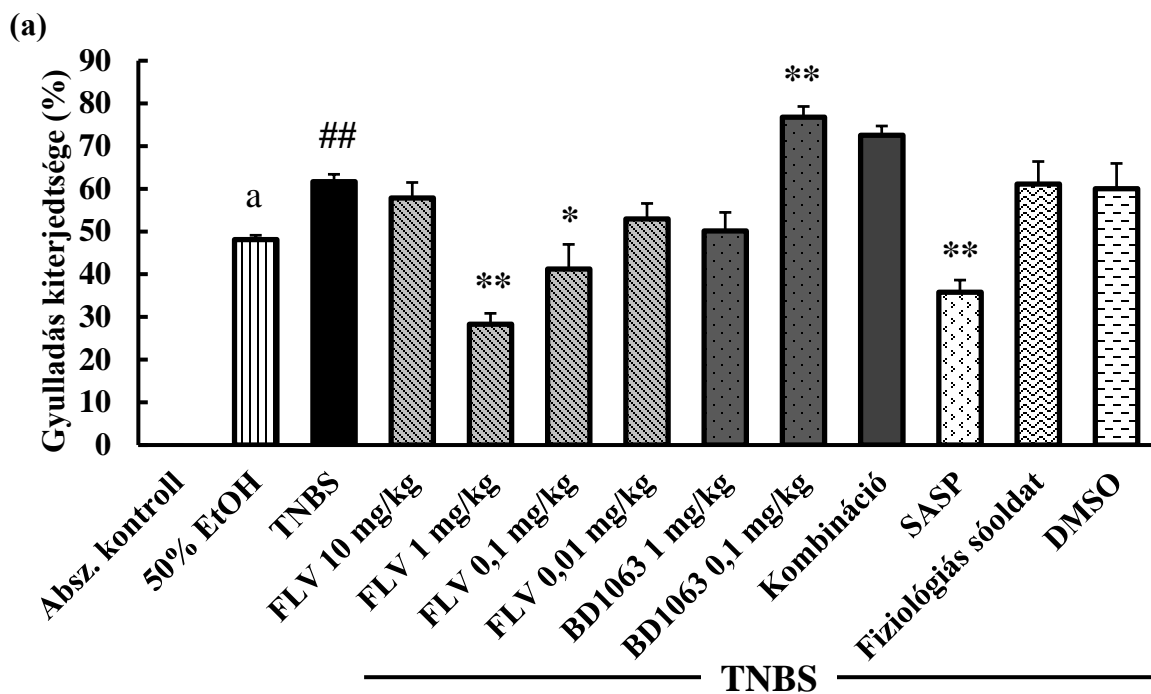
1. táblázat. A $[^3\text{H}](+)\text{-pentazocin}$ ligand sigma-1 receptor ($\sigma 1\text{R}$) kötődési tulajdonságai abszolút kontroll, TNBS-indukálta colitis modell, valamint a $\sigma 1\text{R}$ agonista FLV kezelés esetében

Az adatokat átlag \pm SEM-ben ábrázoltuk minimum három független mérés eredményeként. a $p < 0,05$ abszolút kontroll vs. 50% EtOH; # $p < 0,05$ abszolút kontroll vs. TNBS; * $p < 0,05$ TNBS vs. TNBS + FLV
n.m.: nem meghatározott, 50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin

6.2. $\sigma 1\text{R}$ moduláció hatása a gyulladás kiterjedtségére TNBS modellben

A $\sigma 1\text{R}$ gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata érdekében i.c. alkalmazott TNBS-el colitist indukáltunk az állatok vastagbelében. A TNBS-t 50%-os EtOH-ban oldottuk, amely önmagában alkalmazva felületi sérülést, fekélyesedést okozott a colon mucosában, azonban a TNBS sokkal súlyosabb gyulladást idézett elő. A TNBS kezelést követően, az állatokat i.c. kezeltük napi egyszer ugyanabban az időpontban, különböző dózisu (10 mg/kg, 1 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,01 mg/kg) $\sigma 1\text{R}$ agonista FLV-vel. Az eredmények alapján megállapítható, hogy az 1 mg/kg és a 0,1 mg/kg FLV dózis szignifikánsan csökkentette a gyulladás mértékét a TNBS csoporthoz képest ($28,29 \pm 2,53$ és $41,23 \pm 5,76$ vs. $61,68 \pm 1,7\%$), azonban a protektivitás

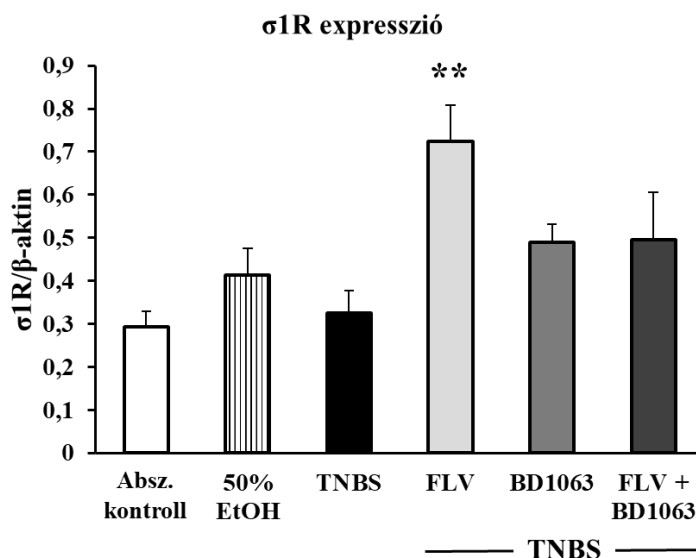
mértéke kifejezettebb volt az 1 mg/kg dózis esetében. Pozitív kontrollként SASP-ot alkalmaztunk per os. A SASP szignifikánsan csökkentette a TNBS-indukálta gyulladást a TNBS csoporthoz képest ($35,78 \pm 2,83$ vs. $61,68 \pm 1,7\%$), hasonló mértékben, mint a hatásos FLV dózis. A csökkent $\sigma 1R$ aktivitás modellezése érdekében, $\sigma 1R$ antagonistaként, BD1063-t alkalmaztunk i.c. napi egyszer (1 mg/kg, 0,1 mg/kg). Méréseink alapján megállapítható, hogy a 0,1 mg/kg BD1063 dózis szignifikánsan növelte a gyulladás mértékét a TNBS csoporthoz képest ($76,77 \pm 2,52$ vs. $61,68 \pm 1,7\%$). A fent említett eredmények alapján, hatásos dózissnak tekintettük FLV esetében az 1 mg/kg, BD1063 esetében pedig a 0,1 mg/kg dózisokat. A két hatásos dózissal szimultán kezeltük az állatokat i.c. napi egyszer (kombinációs kezelés). A kombinációs kezelés során azt tapasztaltuk, hogy a BD1063 antagonistája jelenléte megszüntette az FLV-indukálta protekciót. Az agonista és antagonisták kezelése során használt vivőanyagok hatásait önmagukban is teszteltük (FLV: 3% DMSO; BD1063 és SASP: 0,9% fiziológiás sóoldat). Kísérleteink alapján megállapítható, hogy a vivőanyagok nem befolyásolták a gyulladás mértékét a TNBS csoporthoz képest (11. a. ábra). A 11. b-h. ábrákon reprezentatív képek láthatók a különböző kezelések hatásairól.



11. ábra. (a) A sigma-1 receptor ($\sigma 1R$) moduláció hatásának vizsgálata a gyulladás kiterjedtségére TNBS-indukálta colitisben. A $\sigma 1R$ agonista fluvoxamin (FLV) (1 mg/kg dózis) szignifikánsan csökkentette a gyulladást, míg a BD1063 antagonist (0,1 mg/kg dózis) a hatásos FLV dózissal kombinációban adva megszüntette az FLV-indukálta protektív hatást. A különböző hatóanyagok vivőanyagai: 50% etanol (EtOH), fiziológias sóoldat, 3% dimetil szulfoxid (DMSO). **Reprezentatív képek a kialakult gyulladásról:** (b) abszolút kontroll, (c) 50% EtOH, (d) 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS), (e) TNBS + FLV 1 mg/kg, (f) TNBS + BD1063 0,1 mg/kg, (g) TNBS + hatásos dózisok kombinációja (FLV 1 mg/kg + BD1063 0,1 mg/kg), (h) TNBS + SASP (pozitív kontroll). Az eredményeket átlag \pm SEM-ben ábrázoltuk; $n = 4-14$ /csoport; * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ TNBS vs. TNBS + kezelés; ## $p < 0,01$ abszolút kontroll vs. TNBS; $a p < 0,05$ abszolút kontroll vs. 50% EtOH.

6.3. Az FLV kezelés hatásának vizsgálata a $\sigma 1R$ expressziójára TNBS-indukálta colitisben

A 12. ábrán látható, hogy az 1 mg/kg-os hatásos FLV dózis szignifikánsan növelte a $\sigma 1R$ expresszióját a colonban a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,72 \pm 0,083$ vs. $0,326 \pm 0,05$ relatív expresszió). Az alkalmazott BD1063 antagonistá esetünkben nem befolyásolta a $\sigma 1R$ expresszióját a TNBS csoporthoz képest. Az eredmények további vizsgálata érdekében az agonista és antagonistá hatásos dózisokat kombinációban alkalmazva megállapítottuk, hogy a BD1063 jelenléte megszüntette az FLV $\sigma 1R$ expresszió indukáló hatását.



12. ábra. A sigma-1 receptor ($\sigma 1R$) expressziójának változása $\sigma 1R$ agonista és antagonistá kezelés hatására TNBS-indukálta gyulladásban

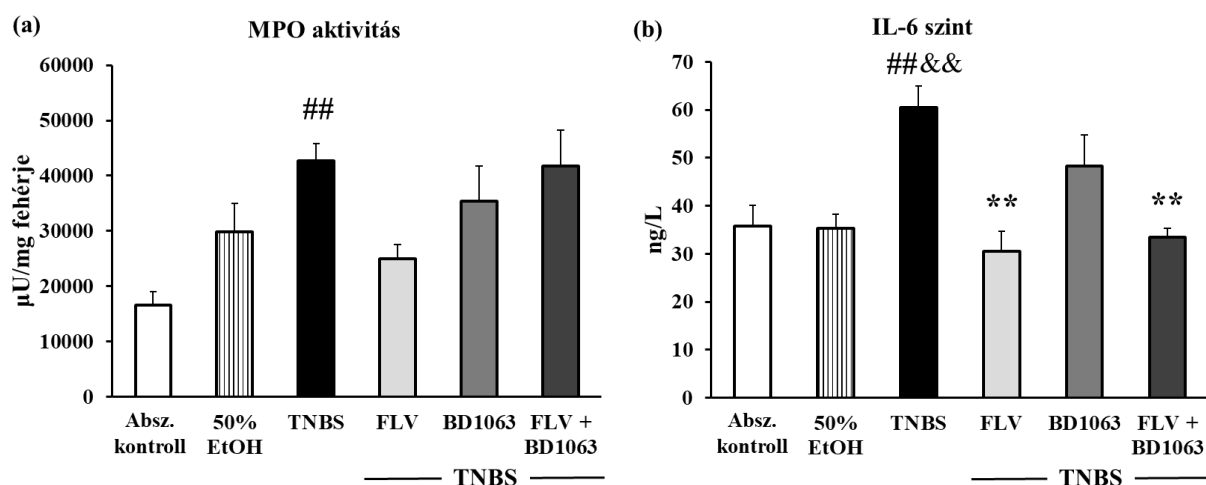
Átlag \pm SEM; n= 6-9/csoport; ** $p < 0,01$ TNBS vs. TNBS + kezelés

50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin

6.4. Az MPO enzim aktivitásának és az IL-6 citokin szintjének változása $\sigma 1R$ moduláció hatására

Az MPO enzim a neutrofil granulocitákban expresszáldó gyulladásos marker. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a TNBS kezelés szignifikánsan növelte az MPO enzim aktivitását az abszolút kontroll csoporthoz képest ($16557,5 \pm 2425,58$ vs. $42653,4 \pm 3220,24$ $\mu\text{U}/\text{mg}$ fehérje). A $\sigma 1R$ agonista FLV markánsan csökkentette az enzim aktivitását a TNBS csoporthoz viszonyítva ($25021,2 \pm 2554,66$ vs. $42653,4 \pm 3220,24$ $\mu\text{U}/\text{mg}$ fehérje), azonban a változás nem volt szignifikáns. Továbbá megállapítható, hogy kombinációs kezelés esetében a BD1063 megszüntette az FLV protektív hatását (13. a. ábra).

Az IL-6 egy gyulladáscsökkentő citokin, amely jelentős szerepet tölt be a gyulladáscsökkentő bélbetegségek patogenezisében. A 13. b. ábrán látható, hogy TNBS hatására az IL-6 szintje szignifikánsan megemelkedett az abszolút kontroll, valamint az 50%-os EtOH csoporthoz képest ($60,48 \pm 4,55$ vs. $35,84 \pm 4,29$ és $35,26 \pm 2,96$ ng/L). FLV kezelés hatására az IL-6 szintje szignifikánsan csökkent a TNBS csoporthoz viszonyítva ($30,53 \pm 4,10$ vs. $60,48 \pm 4,55$ ng/L). A BD1063 hatásos dózisa nem befolyásolta az IL-6 szintjét, azonban kombinációs kezelés hatására az IL-6 szintje szignifikánsan csökkent a TNBS csoporthoz képest ($33,45 \pm 1,82$ vs. $60,48 \pm 4,55$ ng/L).



13. ábra. (a) A mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitásának és (b) az interleukin-6 (IL-6) szintjének változása a sigma-1 receptor (σ 1R) agonista és antagonisták hatására TNBS colitisben

Átlag \pm SEM; n= 4-8/csoport; ## p <0,01 abszolút kontroll vs. TNBS; ** p <0,01 TNBS vs. TNBS + kezelés; && p <0,01 50% EtOH vs. TNBS

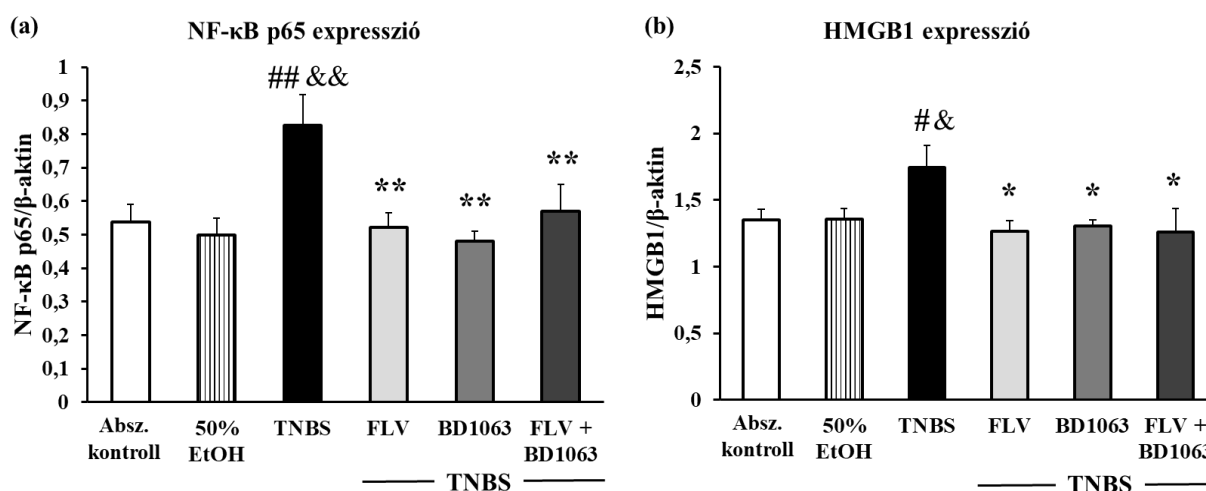
50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin

6.5. σ 1R ligandok hatásának vizsgálata az NF- κ B p65-ös alegységének és a HMGB1 fehérje expressziójára TNBS colitisben

Az NF- κ B p65-ös alegysége gyulladáscsökkentő folyamatokban magasabb expressziót mutat. Eredményeink alapján megállapítható, hogy TNBS kezelés hatására szignifikánsan nőtt az NF- κ B p65-ös alegységének expressziója a kontroll és az 50% EtOH csoporthoz képest ($0,83 \pm 0,09$ vs. $0,54 \pm 0,05$ és $0,5 \pm 0,05$ relatív expresszió). FLV kezelés hatására szignifikánsan csökkent a p65 expressziója a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,52 \pm 0,04$ vs. $0,83 \pm 0,09$ relatív expresszió),

azonban meglepő módon a BD1063 önmagában és FLV-vel kombinációban alkalmazva is a p65-ös alegység szignifikánsan alacsonyabb expressziójához vezetett a TNBS csoporthoz viszonyítva ($0,48 \pm 0,03$ és $0,57 \pm 0,08$ vs. $0,83 \pm 0,09$ relatív expresszió) (14. a. ábra).

A HMGB1 gyulladási faktor expresszióját Western blot technikával vizsgáltuk. TNBS kezelés hatására a HMGB1 expressziója szignifikánsan megemelkedett, mind az abszolút kontroll ($1,75 \pm 0,165$ vs. $1,35 \pm 0,08$ relatív expresszió), mind az 50% EtOH csoporthoz képest ($1,75 \pm 0,165$ vs. $1,36 \pm 0,07$ relatív expresszió). Az FLV hatásos dózisa (1 mg/kg) szignifikánsan csökkentette a HMGB1 expresszióját a TNBS csoporthoz viszonyítva ($1,264 \pm 0,07$ vs. $1,75 \pm 0,165$ relatív expresszió). Érdekes módon a BD1063, valamint a kombinációs kezelés is szignifikánsan csökkentette a HMGB1 expressziót a TNBS csoporthoz képest ($1,305 \pm 0,044$ és $1,258 \pm 0,17$ vs. $1,75 \pm 0,165$ relatív expresszió) (14. b. ábra).



14. ábra. (a) A sigma-1 receptor ($\sigma 1R$) szerepének vizsgálata a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) p65-ös alegységének és a (b) high mobility group box 1 (HMGB1) fehérje kifejeződésére TNBS-indukálta colitisben

Átlag \pm SEM; n= 5-9/csoport; * $p < 0,05$ és ** $p < 0,01$ TNBS vs. TNBS + kezelés; # $p < 0,05$ és ## $p < 0,01$ abszolút kontroll vs. TNBS; & $p < 0,05$ és && $p < 0,01$ 50% EtOH vs. TNBS

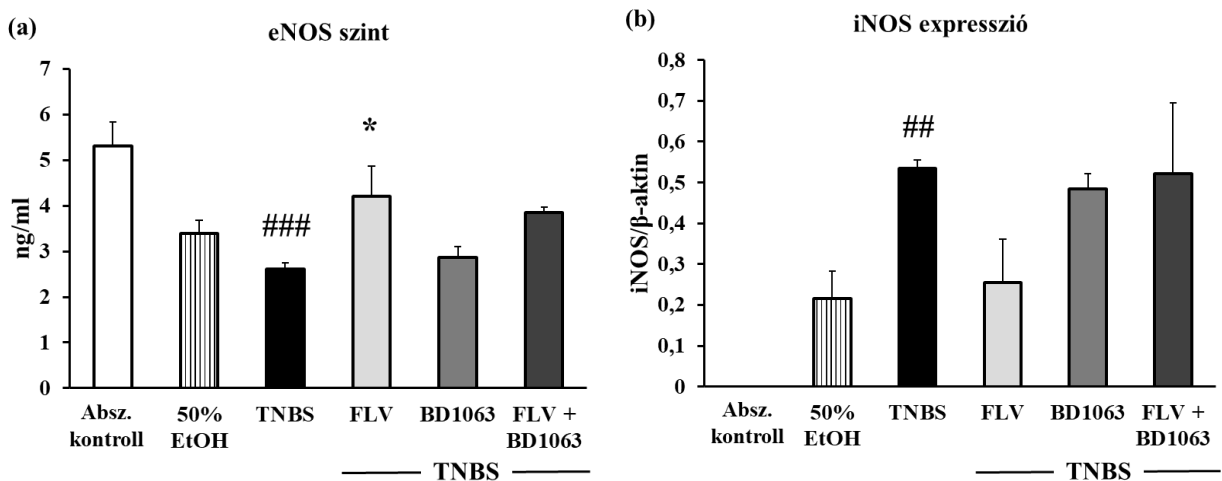
50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin

6.6. A $\sigma 1R$ -hoz köthető kezelések hatásának vizsgálata a NOS enzimrendszerre TNBS-indukálta gyulladásban

Kísérleteink során meghatároztuk a NOS enzim 2 izoformájának (eNOS, iNOS) kifejeződését. Tapasztalataink alapján megállapítható, hogy az eNOS enzim szintje

szignifikánsan csökkent TNBS kezelést követően a kontroll csoporthoz képest ($2,62 \pm 0,126$ vs. $5,31 \pm 0,52$ ng/ml). A σ 1R agonista FLV 1 mg/kg-os dózisa szignifikánsan növelte az eNOS szintjét a TNBS csoporthoz képest ($4,21 \pm 0,66$ vs. $2,62 \pm 0,126$ ng/ml). A BD1063 σ 1R antagonistája esetében azonban nem tapasztaltunk változást a TNBS csoporthoz viszonyítva, a kombinációs kezelés esetében pedig a BD1063 jelenléte megszüntette az FLV protektív hatását (15. a. ábra).

A gyulladásos marker iNOS enzim expressziójának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a TNBS kezelés szignifikánsan megemelte az iNOS enzim expresszióját a kontroll csoporthoz képest ($0,53 \pm 0,021$ vs. 0 relatív expresszió). Továbbá a σ 1R agonista FLV markánsan csökkentette az iNOS enzim expresszióját a TNBS csoporthoz viszonyítva, azonban a különbség nem volt szignifikáns ($0,255 \pm 0,11$ vs. $0,53 \pm 0,02$ relatív expresszió). A BD1063 σ 1R antagonistája adása nem befolyásolta az iNOS enzim expresszióját a TNBS csoporthoz képest, valamint a két ligand együttes alkalmazása sem befolyásolta az iNOS kifejeződését a TNBS csoporthoz viszonyítva (15. b. ábra).



15. ábra. A sigma-1 receptor (σ 1R) agonista és antagonistája kezelés hatásának vizsgálata az (a) eNOS és a (b) iNOS enzim szintjére TNBS-indukálta colitisben

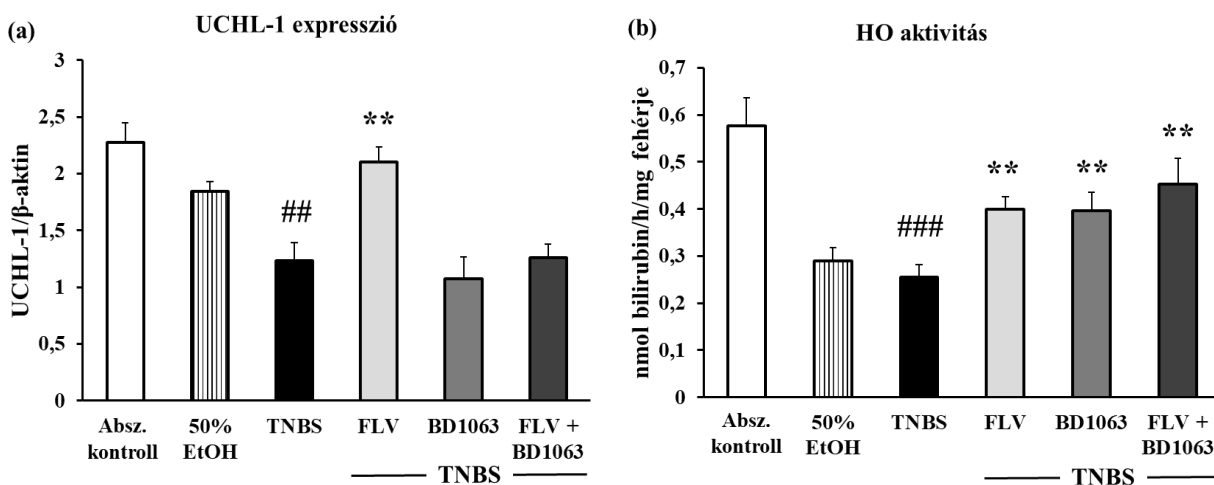
Átlag \pm SEM; n= 5-8/csoport; * $p < 0,05$ TNBS vs. TNBS + kezelés; ## $p < 0,01$ és ### $p < 0,001$ abszolút kontroll vs. TNBS

50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin, eNOS: endoteliális nitrogén-monoxid-szintáz, iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz

6.7. A σ 1R agonista és antagonisták kezelése az UCHL-1 expressziójára és a HO enzim aktivitására TNBS colitisben

Az UCHL-1 enzim expressziójának változását Western blottal vizsgáltuk. Eredményeink alapján megállapítható, hogy az UCHL-1 expressziója szignifikánsan csökkent a TNBS kezelés hatására az abszolút kontroll csoporthoz képest ($1,23 \pm 0,16$ vs. $2,27 \pm 0,17$ relatív expresszió). A σ 1R agonista FLV azonban szignifikánsan növelte az UCHL-1 enzim expresszióját a TNBS csoporthoz viszonyítva ($2,104 \pm 0,13$ vs. $1,23 \pm 0,16$ relatív expresszió), melynek mértéke az abszolút kontroll csoportéhoz konvergált. A BD1063 antagonisták esetében az UCHL-1 expressziója nem változott a TNBS csoporthoz képest, valamint a kombinációs kezelés esetében a BD1063 megszüntette az FLV protektív hatását (16. a. ábra).

A HO anti-inflammatorikus enzim aktivitásának mértékére mérésünk során a reakcióban képződő bilirubin mennyiségéből következtettünk. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a TNBS kezelés szignifikánsan csökkentette a HO aktivitást a kontroll csoporthoz viszonyítva ($0,26 \pm 0,03$ vs. $0,58 \pm 0,06$ nmol bilirubin/h/mg fehérje). Meglepő módon mind az FLV ($0,40 \pm 0,03$ vs. $0,26 \pm 0,03$ nmol bilirubin/h/mg fehérje), mind a BD1063 ($0,40 \pm 0,04$ vs. $0,26 \pm 0,03$ nmol bilirubin/h/mg fehérje), valamint a két szer szimultán alkalmazása is szignifikánsan növelte a HO aktivitást a TNBS csoporthoz képest ($0,45 \pm 0,06$ vs. $0,26 \pm 0,03$ nmol bilirubin/h/mg fehérje) (16. b. ábra).

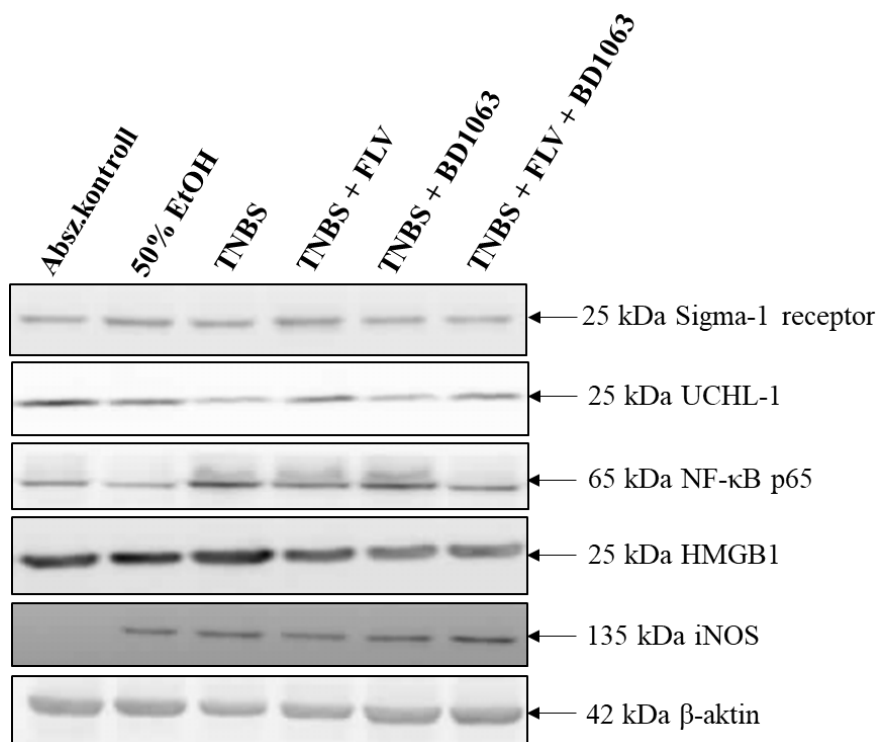


16. ábra. (a) Az ubiquitin C-terminális hidroláz L1 (UCHL-1) expressziójának és a (b) hemoxigenáz (HO) enzim aktivitásának változása sigma-1 receptor (σ 1R) ligand kezelésekre colitisben

Átlag \pm SEM; n = 5-7/csoport; ### p <0,01 és ### p <0,001 abszolút kontroll vs. TNBS; ** p <0,01 TNBS vs.

TNBS + kezelés

50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin

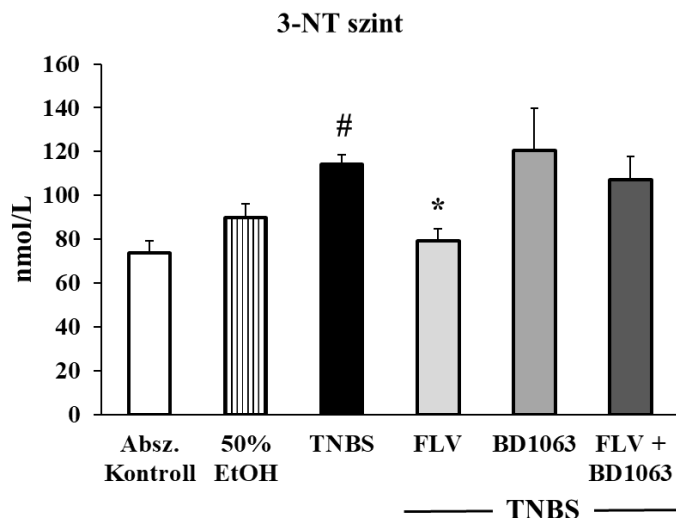


17. ábra. Reprezentatív ábra a Western blot mérések eredményeiből

50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin, UCHL-1: ubuquitin C-terminális hidroláz L1, NF-κB p65: nukleáris faktor κ B, HMGB1: high mobility group box 1, iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz

6.8. σ 1R ligandkezelés hatása az oxidatív stressz marker 3-NT szintjére TNBS modellben

A 18. ábrán látható, hogy az oxidatív stressz marker 3-NT szintje szignifikánsan növekedett TNBS hatására a kontroll csoporthoz képest ($114,24 \pm 4,29$ vs. $73,93 \pm 5,38$ nmol/l). A σ 1R agonista FLV kezelés szignifikánsan csökkentette a 3-NT szintjét a TNBS csoporthoz viszonyítva ($79,17 \pm 5,5$ vs. $114,24 \pm 4,29$ nmol/l), továbbá sem a BD1063 önmagában, sem a két ligandum kombinációja nem befolyásolta a 3-NT szintjét a TNBS csoporthoz képest.



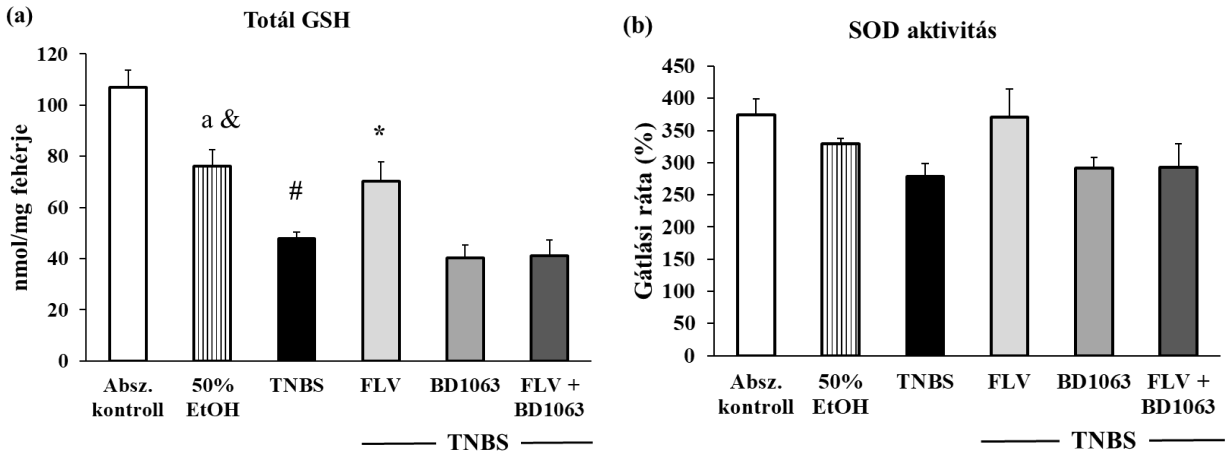
18. ábra. A sigma-1 receptor (σ 1R) hatásának vizsgálata a 3-nitrotirozin (3-NT) oxidatív stressz marker szintjére

Átlag \pm SEM; n= 5-9/csoport; * p <0,05 TNBS vs. TNBS + kezelés; # p <0,05 abszolút kontroll vs. TNBS
50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin

6.9. A GSH szintjének változása, valamint a SOD enzim aktivitásának vizsgálata σ 1R aktiváció hatására patkány colitisben

Az antioxidáns tulajdonságú GSH szintje szignifikáns csökkenést mutatott 50%-os EtOH kezelés hatására az abszolút kontroll csoporthoz képest ($76,24 \pm 6,35$ vs. $106,85 \pm 6,94$ nmol/mg fehérje). TNBS kezelés hatására szignifikáns csökkenést tapasztaltunk mind az 50% EtOH ($47,74 \pm 2,68$ vs. $76,24 \pm 6,35$ nmol/mg fehérje), mind az abszolút kontroll csoportokhoz viszonyítva ($47,74 \pm 2,68$ vs. $106,85 \pm 6,94$ nmol/mg fehérje). Az FLV hatásos dózisa szignifikánsan növelte a GSH szintjét a TNBS csoporthoz képest ($70,19 \pm 7,62$ vs. $47,74 \pm 2,68$ nmol/mg fehérje), tovább a GSH szintje BD1063 és kombinációs kezelés hatására sem változott a TNBS csoporthoz viszonyítva (19. a. ábra).

Az antioxidáns SOD enzim aktivitását ELISA kit segítségével határoztuk meg. TNBS-indukálta colitisben a SOD aktivitása csökkent az abszolút kontroll csoporthoz képest, azonban a különbség nem volt szignifikáns. Az FLV kezelés enyhén növelte a SOD aktivitást, a BD1063, valamint a kombinációban adott két ligand pedig nem befolyásolta az enzim aktivitását a TNBS csoporthoz képest (19. b. ábra).

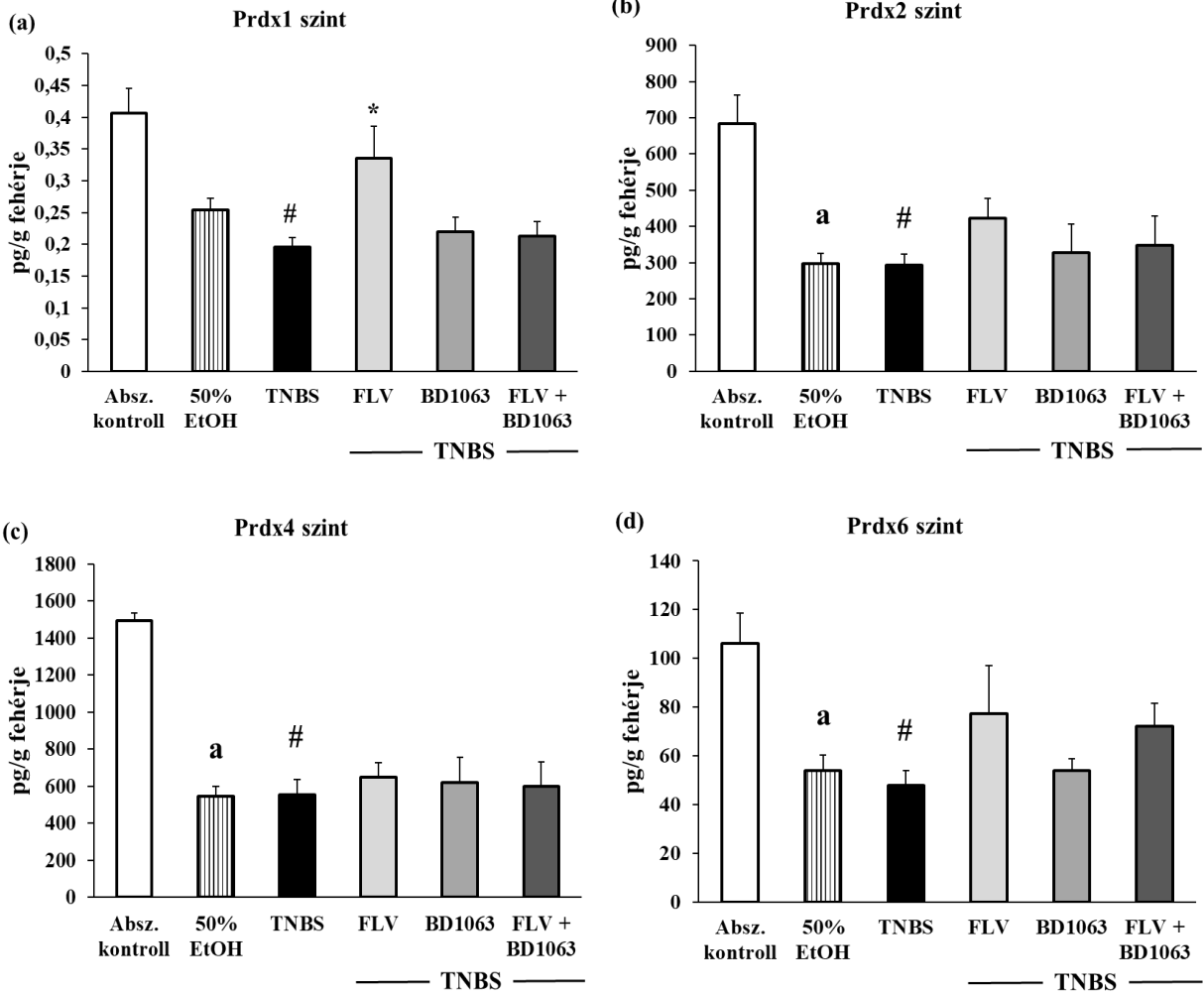


19. ábra. A sigma-1 receptor (σ 1R) aktiválásának hatása a glutation (GSH) szintre és a szuperoxid-dizmutáz (SOD) enzim aktivitására TNBS colitisben

Átlag \pm SEM; n= 5-11/csoport; * p <0,05 TNBS vs. TNBS + kezelés; # p <0,05 abszolút kontroll vs. TNBS; & p <0,05 50% EtOH vs. TNBS; a p <0,05 abszolút kontroll vs. 50% EtOH
 50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin

6.10. A σ 1R agonista és antagonisták hatásának vizsgálata a Prdx izoformákra TNBS modellben

Vizsgáltuk a σ 1R-asszociált kezelések hatását az antioxidáns Prdx enzimsalád 4 izoformájára (Prdx1, -2, -4, -6). 50% EtOH kezelés hatására szignifikánsan csökkent a Prdx2, -4 és -6-os izoforma szintje az abszolút kontroll csoporthoz képest ($297,15 \pm 27,62$ vs. $638,69 \pm 79,75$; $545,66 \pm 53,03$ vs. $1494,18 \pm 39,69$; $53,88 \pm 6,33$ vs. $106,12 \pm 12,61$ pg/g fehérje). TNBS kezelés hatására mind a 4 izoforma szintje szignifikáns csökkenést mutatott az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva ($0,19 \pm 0,01$ vs. $0,4 \pm 0,03$; $292,08 \pm 31,7$ vs. $638,69 \pm 79,75$; $554,57 \pm 79,86$ vs. $1494,18 \pm 39,69$; $48,02 \pm 5,79$ vs. $106,12 \pm 12,61$ pg/g fehérje). FLV kezelés hatására azonban csak a Prdx1 izoforma szintje emelkedett meg szignifikánsan a TNBS csoporthoz képest ($0,33 \pm 0,05$ vs. $0,19 \pm 0,01$ pg/g fehérje). Továbbá az FLV kezelés enyhén növelte a Prdx2 és Prdx6 izoformák szintjét, azonban nem befolyásolta a Prdx4 enzim kifejeződését a TNBS csoporthoz képest. Továbbá a BD1063, valamint a kombinációs kezelés sem befolyásolta a Prdx izoformák szintjét a TNBS csoporthoz viszonyítva (20. ábra).



20. ábra. (a) A sigma-1 receptor (σ 1R) aktivációjának és gátlásának hatása a peroxidáz 1 (Prdx1), (b) a Prdx2, (c) a Prdx4, valamint (d) a Prdx6 enzimek szintjére colonszövetben

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

a p <0,05 abszolút kontroll vs. 50% EtOH

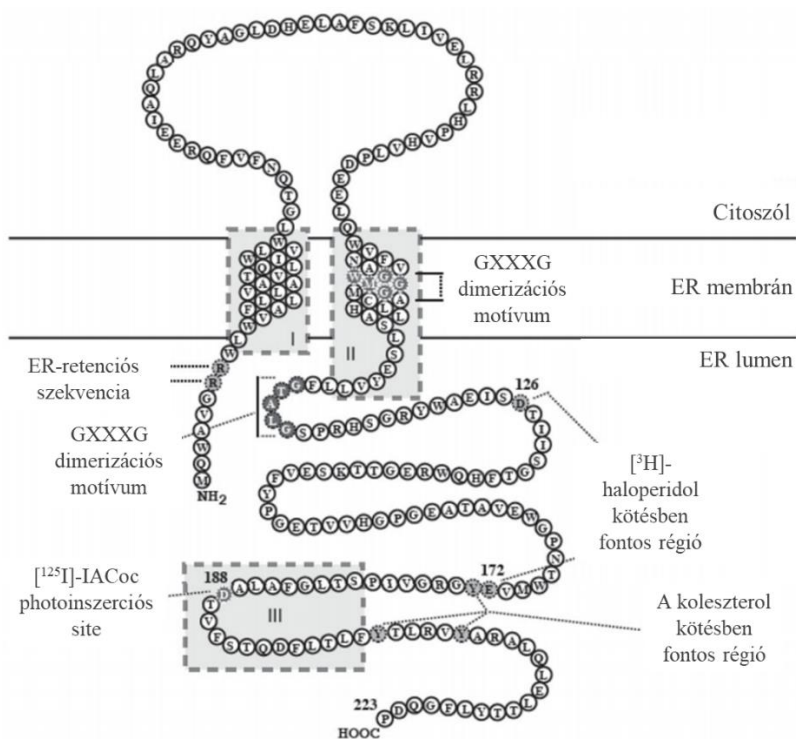
50% EtOH: 50% etanol, TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav, FLV: fluvoxamin

7. Diskusszió

Az IBD autoimmun megbetegedés, amely genetikailag fogékony egyénekben manifesztálódik különböző környezeti tényezők indukáló hatására. A folyamatot kiválthatja a szervezet normál mikrobiomja vagy akár a GI rendszer saját sejtei és molekulái is [33]. Az IBD terápiás lehetőségei jelenleg főleg tüneti kezelést jelentenek, amely során a cél a gyulladáscsökkentő folyamatok mérséklése és az anti-inflammatorikus mechanizmusok indukciója. Az IBD modellezése érdekében TNBS kezelést, majd a σ 1R feltételezett gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata érdekében σ 1R agonista (FLV) és σ 1R antagonistá (BD1063) szereket alkalmaztunk i.c. Kísérletünk során az FLV-indukálta σ 1R aktiváció gyulladáscsökkentő hatású volt, feltételezhetően többek között az IL-6 csökkentésén és az UCHL-1 enzim növelésén keresztül, valamint antioxidáns hatásának bizonyult, a 3-NT csökkentése, a GSH növelése és a Prdx1 enzim indukálása révén. Eredményeink alapján feltételezhető a σ 1R aktiváció protektív, gyulladáscsökkentő, valamint antioxidáns hatása és ezzel terápiás lehetősége is IBD-ben.

A σ 1R-al kapcsolatos kutatás kezdetben elsősorban a központi idegrendszerre korlátozódott, azonban egyre inkább tisztázott, hogy a receptor a periférián is nagy jelentőséggel bírhat. Jelen munkánk radioligand kompetíciós és szaturációs kötődési kísérletei alapján megállapítható, hogy a colon szövetben is kifejeződik a [3 H](+)-pentazocin kötőhely közepes mértékű denzitással. Hara és mtsai. [153] kísérletei alapján megállapítható, hogy a σ 1R főleg a mucosában és a plexus submucosusban lokalizálódik és a σ 1R ligandok alkalikus anyagok szekrécióját indukálják a GI traktusban.

A σ 1R a MAM-ban lokalizált 2 TM doménnel rendelkező receptor. A fehérje C- és N-terminálisa az ER-lumenben található [111]. A receptor 3 hidrofób régiója közül az egyik a σ 1R C-8 szterol izomerázzal való nagyfokú homológiája miatt szterol-kötő domént, valamint két szteroid-kötő domént tartalmaz [154]. A receptor szerkezetét a 21. ábra szemlélteti. A σ 1R különlegességét specifikus ligandkötése is indikálja, mivel a σ 1R esetében nem a klasszikus értelemben vett agonizmus és antagonizmus valósul meg [155]. Feltételezések szerint, a σ 1R ligandkötődése a receptoron történő speciális nyitódási folyamattal megy végbe [125], amelynek pontos mechanizmusa még nem tisztázott. Továbbá a jelenlegi eredmények alapján a ligandok csoportosítása a következőképpen alakul: agonisták a σ 1R aktivációját indukálják, az antagonisták jelenléte pedig a receptor csökkent működéséhez vezethetnek [156].



21. ábra. A sigma-1 receptor (σ 1R) topológiai modellje

(Forrás: Ruoho és mtsai., 2012 [154])

Érdekes módon számos diverz szerkezetű farmakon mutat magas kötődési affinitást a σ 1R-hoz [125]. Ezek alapján a σ 1R szerepének vizsgálata kihívást jelent a kutatás során, mert a különböző ligandok alkalmazása sokféle egyéb mellékhatással is járhat. A nagyfokú diverzitás miatt a σ 1R ligandok agonista vagy antagonistá tulajdonságait tekintve általában nehezen elkülöníthetők és hatásuk sokszor vitatott. A σ 1R ligandok feltételezhetően kétféleképpen fejtik ki hatásukat a receptorra: a BiP- σ 1R komplex szabályozásával, valamint a σ 1R oligomerizációs állapotának befolyásolásával. Tapasztalataink alapján az i.c. alkalmazott hatásos FLV dózis (1 mg/kg) szignifikánsan növelte a σ 1R denzitását a colonszövetben a TNBS-indukálta colitis csoporthoz viszonyítva. Továbbá FLV hatására magasabb σ 1R expressziós szintet figyeltünk meg, míg a BD1063 antagonistá nem befolyásolta, a két ligandó együttes alkalmazása során pedig a BD1063 megszüntette az FLV σ 1R indukáló hatását. A kapott eredményeink megfelelnek az Omi és mtsai. által tapasztalt megfigyeléseknek [157]. Munkájukban a σ 1R magasabb expressziót mutatott *in vitro* alkalmazott FLV kezelés hatására Neuro2a sejtekben. Érdekes módon Zhao és mtsai. [158] (+)-pentazocint alkalmazva nem tapasztaltak szignifikáns változást a σ 1R expressziójában LPS-indukálta gyulladásban. Az említett eredményeink alapján megállapítottuk,

hogy a σ_{1R} detektálható a colonszövetben és feltételeztük, hogy az FLV feltehetőleg a σ_{1R} aktiválásán keresztül fejt ki protektív hatását TNBS-indukálta gyulladásban.

Az IBD egyik elsődleges tünete a fekélyes elváltozások kialakulása a GI rendszer különböző szakaszain, amely CD esetében az egész GI traktust érinheti, CU esetében pedig elsősorban a colon utolsó harmada érintett [159]. Kísérleteink során az IBD modellezésére a TNBS-módszert alkalmaztuk, amely során a TNBS egyszeri i.c. alkalmazásával akut gyulladás idézhető elő patkányban. TNBS kezelés hatására a kialakuló gyulladás a CD-hez hasonlítható, tehát jellegét tekintve transzmurális, a bélfal minden rétege érintett, azonban a lokalizációját tekintve inkább a colitisre hasonlít, amely csak a vastagbelet érinti. Kísérleteink során a TNBS-el kezelt csoportban megfigyelhető volt az állatok súlyvesztése, valamint súlyos fekélyes elváltozások megjelenése a vastagbélben, amelyet jellegzetes szövetmegvastagodás, nekrotikus léziók és vérömleny jellemzett. σ_{1R} aktiváció hatására, amelyet az FLV agonista hatásos dózisének alkalmazásával indukáltunk, szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a fekélyes elváltozások kiterjedésében és súlyosságában. Ezzel szemben, a σ_{1R} antagonistá BD1063 súlyosbította a TNBS okozta károsodást, a kombinációban alkalmazott két σ_{1R} ligand esetében pedig az FLV-indukálta protekció megszűnését tapasztaltuk. Az FLV 1 mg/kg-os dózisének gyulladáscsökkentő hatékonysága a klinikumban alkalmazott SASP-hoz volt hasonlítható.

Számos SSRI antidepresszáns szerről kiderült, hogy gyulladáscsökkentő hatással, valamint magas kötődési affinitással rendelkezik a σ_{1R} -hoz. Az affinitás mértékének sorrendje SSRI-k esetében a következő: FLV > szertralin > fluoxetin > escitalopram > citalopram >> paroxetin [160]. Az SSRI antidepresszánsok a szerotonin visszavételét gátolva fejtik ki hatásukat, mellyel a szerotonin tovább marad a szinaptikus térben és tovább fejt ki protektív hatását.

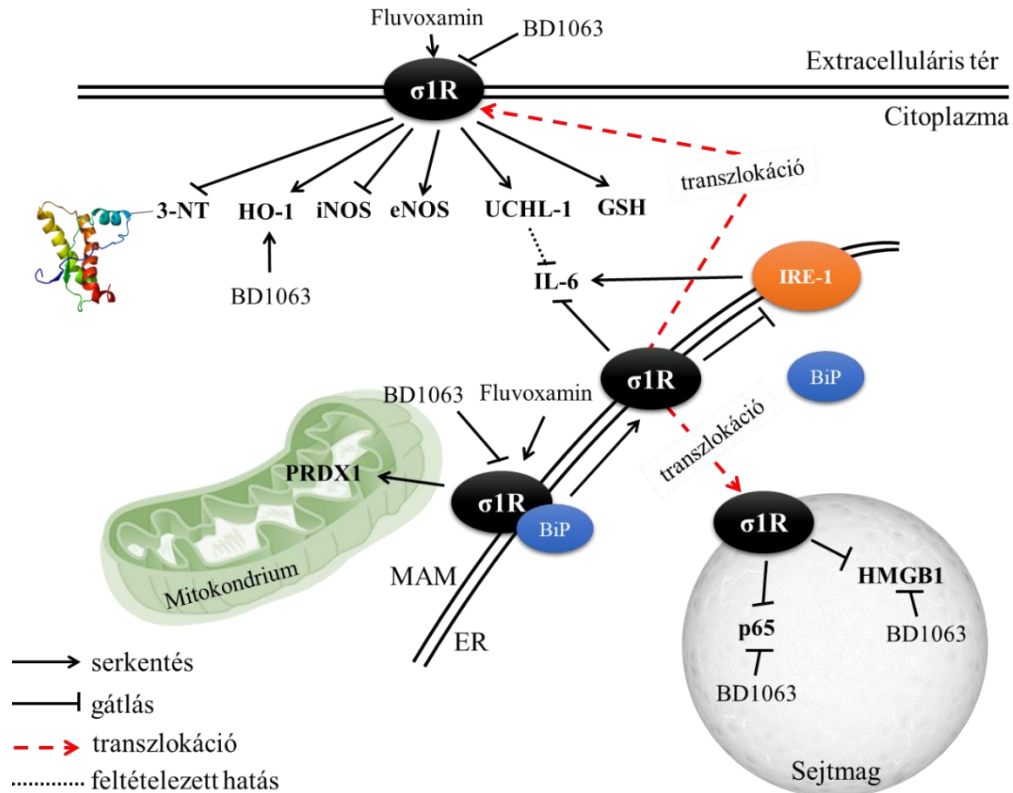
A szerotonin fontos szerepet játszik a bélmotilitásban és a normál, fiziológias funkciók fenntartásában [161]. IBD-ben, valamint az IBD állatmodelljeiben megnövekedett 5-HT szint tapasztalható. A magasabb 5-HT szint pro-inflammatórikus szignálnak tekinthető, és ez feltételezések szerint hozzájárulhat a kísérletes IBD modellekben a gyulladás kialakulásához [162]. Ghia és mtsai. [163] által végzett kutatás alapján megállapítható, hogy a bélrendszerben lokálisan, paraklorofenilalaninnal gátolt 5-HT szintézis protektívnek bizonyult DSS-indukálta colitisben. Mivel az FLV SSRI hatásmechanizmusú antidepresszáns, ezért feltehető, hogy a lokális FLV kezelés kísérleti elrendezésünkben is növelte az 5-HT szintjét az FLV szerotonin transzporter (SERT) receptorokhoz való kötődése révén. Linden és mtsai. [164] munkájuk során

azonban azt tapasztalták, hogy a fluoxetin kezelés TNBS colitisben a csökkent SERT expresszió miatt nem befolyásolta az 5-HT szintjét. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy az SSRI-k fiziológiás körülmények között növelhetik az 5-HT szintjét a bélrendszerben a SERT-en keresztül, azonban, mivel a gyulladás csökkent SERT expresszióval karakterizált, így a SERT szerepe kevésbé jelentős gyulladásos közegben. Azonban, mivel az 5-HT IBD-ben betöltött szerepe vitatott, ezért nem kizárható, hogy a kapott eredményünkhöz, a gyulladás csökkentéséhez, az FLV-által modulált 5-HT metabolizmus változása is hozzájárulhatott. Annak vizsgálata érdekében, hogy esetünkben a gyulladáscsökkentő hatás valóban a σ 1R aktiválásán keresztül valósult-e meg, teszteltük az FLV hatását a σ 1R antagonistá BD1063 jelenlétében. Az eredmények alátámasztották hipotézisünket, mivel az antagonistá jelenléte megszüntette az FLV-indukálta protekciót. Eredményeink megegyeznek Elsaed és mtsai. [165] által végzett kutatással, amely során a per os alkalmazott FLV szignifikánsan csökkentette a gyulladás mértékét stressz-indukálta gyomorfekély modellben. Továbbá Rosen és mtsai. [121] eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az FLV gyulladáscsökkentő hatása a σ 1R-on keresztül valósul meg és feltételezték az inozitol-függő enzim-1 (IRE1), egy ER-lokalizált pro-inflammatórikus faktor szerepét a folyamatban.

Kísérletes gyulladásos modellek esetében a károsító stimulus ideje alatt vagy a kezelés során fenntartott normál véráramlás is fontos szerepet játszhat a protekció kialakulásában [166]. Megfigyelték, hogy mindaddig, amíg a normál véráramlás fenntartott, még károsító stimulus hatására sem vagy alig alakul ki fekélyes elváltozás. Megemlíthető egy kutatás, amelyben bizonyították, hogy a ghrelin gyulladáscsökkentő hatását feltehetőleg a normál véráramlás fenntartásával váltja ki DSS-indukálta patkány colitisben, ezzel indikálva a normál véráramlás fontosságát a fekélyes elváltozások gyógyulásában [167]. Továbbá ez a jelenség szintén alátámasztást nyert obesztatin (a ghrelin gén egy másik produktuma) kezelés hatására, mind TNBS-indukálta gyulladásban [168], mind ecetsav-indukálta fekélyes elváltozásban [169]. Egy másik tanulmányban kiderült, hogy az FLV-indukálta σ 1R aktiváció védő hatású renális ischemia-reperfúziós sérülésben, azáltal, hogy javítja a vese vérellátását [170]. Továbbá a fluoxetinről kiderült, hogy növeli a véráramlást patkány stroke modellben, érdekes módon szerotonin-independens útvonalon [171]. Jelen dolgozat írásakor, mivel az FLV ezen hatása még nem tisztázott a GI traktusban, elképzelhetőnek tartjuk, hogy az FLV gyulladáscsökkentő hatását

a $\sigma 1R$ -on keresztül részben a mucosális véráramlás növelésével is kifejthette, amely hozzájárulhatott a gyulladáscsökkentő hatáshoz TNBS colitisben.

Munkánk során, a $\sigma 1R$ -indukálta gyulladáscsökkentő folyamat molekuláris hátterének feltérképezése érdekében mért paramétereket és a kapott eredményeinket a 22. ábra foglalja össze.



22. ábra. A sigma-1 receptor ($\sigma 1R$) feltételezett protektív mechanizmusa eredményeink alapján

$\sigma 1R$: sigma-1 receptor, 3-NT: 3-nitrotirozin, HO-1: hemoxigenáz-1, iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz, eNOS: endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz, UCHL-1: ubiquitin C-terminális hidroláz L1, GSH: glutation, IL-6: interleukin-6, IRE-1: inozitol válaszelem-1, BiP: binding immunoglobulin protein, MAM: mitokondrium-asszociált endoplazmatikus retikulum (ER) membrán, Prdx1: peroxiredoxin-1, NF- κ B p65: nukleáris faktor κ B p65-ös alegység, HMGB1: high mobility group box 1

(Forrás: Almási és mtsai, 2020, módosítva [172])

Az UCHL-1 egy deubiquitináló enzim, amelynek immunszuppresszív szerepe is egyre inkább tisztázott. Gu és mtsai. [173] multipotens mezenchimális sztróma sejtekben az UCHL-1 anti-inflammatórikus, valamint a pro-inflammatórikus citokinek UCHL-1 expresszió aktiváló hatásáról számoltak be. Jelen tanulmányunk szerint az FLV kezelés szignifikánsan növelte az

UCL-1 expresszióját, amely hatást a BD1063 σ 1R antagonistája jelenléte megszüntetett. A kombinációs kezelés során kapott eredmény alapján feltételezzük, hogy kapcsolat állhat fenn a σ 1R liganddal történő kezelés és az UCL-1 expressziójának változása között. Továbbá vizsgáltuk a kezelések hatását az IL-6 pro-inflammatorikus citokinre, amely fontos szerepet játszik az IBD patogenezisében [174]. Azt tapasztaltuk, hogy az FLV kezelés csökkentette az IL-6 szintjét a colonszövetben. BD1063 kezelés hatására nem tapasztaltunk változást az IL-6 szintjében a TNBS csoporthoz képest, azonban kombinációs kezelés hatására érdekes módon az IL-6 szintje az FLV kezeléshez hasonlóan alakult. Ez esetben magyarázatként feltételezzük, hogy az FLV-indukálta IL-6 szint csökkenése σ 1R dependens, azonban mivel az alkalmazott ligandok effektív dózisa nem egyforma tartományba esnek, így elképzelhető, hogy az FLV már alacsonyabb dózisban is szignifikánsan csökkentette az IL-6 citokin szintjét még az antagonistája jelenlétében is. Rosen és mtsai. [121] σ 1R KO egerekben magasabb IL-6 szintet tapasztaltak, amelyet az FLV kezelés szignifikánsan lecsökkentett σ 1R-IRE1-dependens útvonalon. Jelen kutatási eredményeink alapján feltételezzük, hogy az FLV-indukálta gyulladáscsökkentő hatás a σ 1R-on keresztül, az UCL-1 megnövekedett expresszióján, valamint az IL-6 citokin csökkenésén keresztül valósult meg.

A pro-inflammatorikus MPO enzim aktivitása a gyulladós folyamatok korai indikátoraként elfogadott marker, amelynek szintje korrelál a gyulladás kiterjedtségével, súlyosságával és a neutrofil granulocita akkumulációval [175]. BD1063 kezelés hatására az MPO enzim aktivitásában nem tapasztaltunk változást, azonban az enzim aktivitása markáns csökkenést mutatott az FLV kezelés következményeként. A HO enzim anti-inflammatorikus hatása és ezzel terápiás lehetősége is felmerült IBD-ben. Kutatócsoportunk korábbi eredményei alapján a HO enzim aktiválása protektívnek bizonyult TNBS colitisben [176]. Mindezekkel összhangban, jelen munkánk során FLV kezelés hatására a HO enzim aktivitásának szignifikáns növekedését figyeltük meg. Mendez-David és mtsai. [177] a fluoxetin HO-1 expresszió indukáló hatásáról számoltak be, amely folyamatot egy HO-1 promotáló transzkripciós faktor, a nukleáris faktor eritroid 2-vel összefüggő faktor 2 (Nrf2) indukciójának tulajdonították. Érdekes módon, jelen munkánk során, az FLV és a BD1063 kezelés hatására is HO enzimaktivitás növekedést tapasztaltunk, azonban mivel az alkalmazott két σ 1R ligand pontos szignalizációs mechanizmusa még nem ismert, ezért feltételezzük, hogy a BD1063 is indukciós szignál lehet a HO enzim esetében. Lehetséges magyarázatként Pal és mtsai. [140] által végzett kutatás említhető meg,

amelyben σ 1R KO egerekben, valamint BD1063-al történő kezelés hatására is megnövekedett ROS szintet tapasztaltak. Mivel a ROS-okat a HO enzim egyik fő indukciós jeleiként tartjuk számon [178], így elképzelhetőnek tartjuk, hogy esetünkben a BD1063 általi HO indukció a BD1063 ROS generáló hatásán alapult.

A NOS enzimeket a gyulladási folyamat fontos modulátoraiként írták le IBD-ben. A 3 NOS izoforma közül az iNOS nagy mennyiségben termel NO-t, amely hozzájárul a gyulladás kialakulásához, míg az eNOS kisebb mennyiségben, de folyamatosan termeli a NO-t, amely nélkülözhetetlen a megfelelő colon homeosztázis biztosításához [179]. Jelen kísérletünkben FLV kezelés hatására csökkent iNOS expressziót és megnövekedett eNOS szintet tapasztaltunk, míg az antagonistá BD1063 alkalmazása megszüntette az FLV protektív hatását mindkét izoforma esetében. Vagnerova és mtsai. [180] a σ 1R agonista (+)-pentazocinnal való kezelés hatására C57/B16 egerek agyszövetében csökkent iNOS szintet tapasztaltak. Továbbá Bhuiyan és mtsai. [181] ovariektomizált patkánymodellben azt tapasztalták, hogy a σ 1R agonista tulajdonságú dehidroepiandrosteron kezelés visszaállította a csökkent eNOS szintet hipertenzió-indukálta vese hipertrofia modellben.

A sejtmagi gyulladást indukáló mediátorok, mint az NF- κ B és a HMGB1, IBD patogenezisében betöltött szerepét már számos tanulmányban bizonyították. Kutatásunk során azt tapasztaltuk, hogy TNBS-indukálta colitisben megemelkedett az említett két pro-inflammatorikus paraméter expressziója. FLV kezelés hatására mind az NF- κ B p65-ös alegysége, mind a HMGB1 kifejeződése csökkenést mutatott, azonban érdekes módon BD1063 és kombinációs kezelés hatására is csökkenést tapasztaltunk mindkét paraméter esetében. Meunier és mtsai. [182] kínai hörcsög petefészek sejtvonalon végzett kutatása során, σ 1R knockdown körülmények között az NF- κ B indukcióját tapasztalta. Továbbá Hyrskyluoto és mtsai. [183] megnövekedett NF- κ B p65-ös alegység expressziót tapasztaltak neuronális PC6.3 sejtekben a σ 1R agonista PRE084 kezelés következményeként. Zhang és mtsai. [184] munkájuk során, a σ 1R által közvetített drog, a metamfetamin, alkalmazásának hatására a HMGB1 expressziójának és a p65-ös alegység sejtmagba történő transzlokációjának növekedését figyelték meg. Továbbá tapasztalataink alapján a σ 1R antagonistá BD1047-el való előkezelés csökkentette a p65-ös alegység sejtmagba történő transzlokálódását. Ez az ellentmondás az általunk tapasztaltakkal, feltételezhetően a különböző, *in vitro* és *in vivo* modellek alkalmazásának tulajdonítható. Mindemellett, mivel a BD1063 antagonistá hatásának szignalizációs útvonala még nem teljesen ismert, ezért elképzelhető, hogy

a BD1063 csökkentette a HMGB1 és az NF- κ B p65 alegység expresszióját egy egyelőre ismeretlen útvonalon.

A gyulladáscsökkentő folyamatok mellett egyre inkább tisztázott, hogy az oxidatív stressz is fontos szerepet játszik az IBD patogenezisében [66]. Továbbá a σ 1R-ról kiderült, hogy aktivációja patológiás körülmények között csökkenti az ER stresszt, valamint az oxidatív stresszt [148]. A 3-NT oxidatív stressz marker TNBS kezelés hatására esetünkben növekedést mutatott. Pal és mtsai. [140] σ 1R KO egerek tüdejében, valamint májában tapasztalta az oxidatív stressz marker növekedését és fokozott ROS termelődést. Továbbá megfigyelték COS7 sejtvonalon, hogy BD1063 kezelés hatására szignifikánsan emelkedett a ROS-ok szintje, míg (+)-pentazocin kezelés hatására ROS csökkenést tapasztaltak. Jelen munkánk során kapott eredmények összhangban állnak a fent említett eredményekkel, mivel a σ 1R agonista FLV hatására a 3-NT csökkenését, BD1063 kezelés esetén viszont a 3-NT szint növekedését tapasztaltuk.

A GSH a szervezet egyik legfontosabb antioxidáns tulajdonságú thiol tartalmú molekulája. Pal és mtsai. [140] σ 1R KO egerek májában az oxidált GSSG forma magasabb expresszióját mérték, ezzel rávilágítva, hogy a σ 1R szintje feltehetőleg ellentétes összefüggést mutat az oxidatív stressz mértékével. Ezt a megfigyelést eredményeink is alátámasztják, mivel FLV kezelés hatására GSH szint növekedést, BD1063 kezelés hatására pedig GSH depléciót tapasztaltunk. Továbbá Dursun és mtsai. [185] indomethacin-indukálta gyomorfekély modellben azt tapasztalták, hogy a különböző dózisú orálisan alkalmazott FLV, dózis-függő módon gyulladáscsökkentő hatásúnak bizonyult az antioxidáns útvonalak serkentése révén. Érdekes módon Weng és mtsai. [186] σ 1R KO egerek agyában megfigyelték, hogy a σ 1R hiánya kompenzatórikus útvonalak indukációjához vezetett, amelynek köszönhetően aktiválódtak az antioxidáns válaszelemek (ARE) és így az oxidatív stresszt csökkentő útvonalak. Eredményeink alapján azonban feltételezzük, hogy a σ 1R a központi idegrendszerben tapasztaltakkal ellentétben, a periférián aktiválhatja az ARE-t. Ezt alátámasztva, Pal és mtsai. [140] σ 1R KO COS-7 sejtekben magasabb ARE aktivációt és SOD1 expressziót tapasztaltak σ 1R transzfekció hatására. További növekedést tapasztaltak az ARE aktivációban és a SOD1 expresszióban (+)-pentazocin kezelés hatására, valamint csökkenés volt megfigyelhető a haloperidol σ 1R antagonistá alkalmazásának következményeként. Esetünkben a SOD enzim aktivitása FLV-kezelés hatására markáns emelkedést mutatott, amely Elsaed és mtsai. által tapasztalt eredményeknek megfelelő. Elsaed és mtsai. [165] stressz-indukálta gyomorfekély modellben

figyelték meg az orálisan alkalmazott FLV kezelés SOD indukáló hatását, valamint a gyomorfekély kiterjedésének csökkenését.

Az antioxidáns rendszer további fontos résztvevői a Prdx családba sorolható peroxidáz enzimek. Emlősökben 6 izoformát különböztetünk meg (Prdx1-6), amelyek terápiás potenciálja felmerült az IBD kezelésében [78]. Zhang és mtsai. [187] patkány dorzális gyökér idegdúcban azt tapasztalták, hogy TNBS kezelés hatására csökkent a Prdx1 enzim szintje, amely a kapott eredményeinkkel megegyező. Továbbá Hsieh és mtsai. [188] súlyos fekélyes vastagbélgyulladásban szenvedő betegekben a Prdx1 és Prdx2 enzimek downregulációját mérték. Horie és mtsai. [78] javasolták a Prdx1 szint vizsgálatát az aktív CU állapot indikátoraként, valamint az CU-asszociált karcinogenezis lehetséges markereként. Prdx4 KO egerekben végzett vizsgálatok alapján Pfeuffer és mtsai. [80] súlyosabb gyulladás kialakulásáról számoltak be DSS expozíció hatására, míg Melhem és mtsai. [81] Prdx6 KO egerekben kisebb fokú gyulladást és csökkent fekélyképződést tapasztaltak DSS kezelés hatására. Jelen tanulmányunkban, a TNBS mind a 4 vizsgált Prdx izoformát csökkentette, azonban csak a Prdx1, -2 és -6-os izoformára volt láthatóan hatással a σ 1R-hoz köthető agonista és antagonisták kezelése. FLV kezelés hatására a Prdx1 enzim szintje szignifikánsan nőtt a TNBS csoporthoz képest, illetve a Prdx2 és -6-os izoformák is markáns növekedést mutattak. Az FLV-indukálta protekciót a kombinációs kezelés során alkalmazott BD1063 megszüntette. A dolgozat írásakor a σ 1R és a Prdx enzimek közötti kapcsolattal eddig egy publikáció foglalkozik [140], melyben σ 1R KO egerekben megemelkedett Prdx6 szintet tapasztaltak. Ez az eredmény ellentétes az általunk tapasztalttal, mivel BD1063 kezelés hatására csökkent Prdx6 szintet, FLV hatására pedig enyhe emelkedést láttunk. Ez az eltérés feltehetőleg a különböző állatmodellek alkalmazásával magyarázható.

Összességében eredményeink alapján feltételezhető az FLV általi σ 1R indukció gyulladás és oxidatív stressz csökkentő hatása a periférián. Mivel azonban a σ 1R-hoz kötődő ligandok nagyfokú diverzitást mutatnak, így a többi agonista ligand hatásának és az FLV-indukálta protekció pontos mechanizmusának feltérképezése érdekében további kutatás szükséges. Eredményeink segíthetnek az IBD új terápiás lehetőségeinek kifejlesztésében, valamint hozzájárulhatnak a σ 1R szerepének pontosabb megismeréséhez.

9. Tartalmi összefoglaló

A gyulladással járó bélbetegségek (IBD) autoimmun lefolyású idült gyulladással járó gasztrointesztinális megbetegedések. Két fő típusa a Crohn betegség (CD) és a colitis ulcerosa (CU), amelyek elkülönítése klinikai vizsgálatok, radiológiai eltérések és endoszkópos vizsgálat alapján lehetséges. Annak ellenére, hogy az IBD a kutatás intenzív részét képezi, pontos patogenezise még nem teljesen ismert. Azonban egyre inkább tisztázott, hogy a betegség kialakulásában genetikai faktorok, környezeti tényezők, különböző immunológiai folyamatok, immundiszreguláció, valamint a szervezet mikrobiomja játszik közre. Jelenleg az IBD terápiás lehetőségei közül alkalmazhatók szalicilsav-származékok, kortikoszteroidok, immunszuppresszánsok, biológiai terápia, valamint különböző műtéti beavatkozások. Mivel az IBD jelenleg nem gyógyítható betegség, ezért az új terápiás célpontok és a kevesebb mellékhatással járó kezelések kifejlesztése nélkülözhetetlen.

A sigma-1 receptor ($\sigma 1R$) egy a mitokondrium-asszociált endoplazmatikus retikulum-membránban (MAM) lokalizálódó chaperon fehérje. A $\sigma 1R$ evolúciósan konzervált, azonban szekvencia homológiát érdekes módon emlős fehérjékkel nem, csak az élesztő szterol C-8 izomerázzal mutat. Számos tanulmány igazolja, hogy különböző stressz faktorok vagy a $\sigma 1R$ agonistákkal történő kezelés $\sigma 1R$ aktivációt indukál, amely gyulladáscsökkentő és antioxidáns útvonalak aktivációjához vezet. A $\sigma 1R$ -hoz diverz farmakológiájú ligandok kötődnek, mint a benzomorfán-származékok, antihisztamin, antifungális szerek és szerotonin visszavétel gátlók (SSRI). Az antidepresszáns tulajdonságú SSRI fluvoxaminról (FLV) kiderült, hogy magas affinitással kötődik a $\sigma 1R$ -hoz, valamint kísérletes gyulladással járó modellekben anti-inflammatórikusnak bizonyult.

Doktori munkám során célul tűztük ki a $\sigma 1R$ szerepének vizsgálatát 2,4,6-trinitrobenzolszulfonsav (TNBS)-indukálta patkány colitis modellben. Kísérleteink első felében célunk volt a colonszövet $\sigma 1R$ denzitásának vizsgálata. Majd célul tűztük ki *in vivo* végzett kísérleteink során a $\sigma 1R$ aktiváció vizsgálatát specifikus agonista (FLV) alkalmazásával, csökkent aktivitását pedig antagonistával (BD1063). Továbbá célunk volt a $\sigma 1R$ ligandok (FLV, BD1063) hatásos dózisének beállítása a TNBS-indukálta gyulladással járó modellben, valamint a hatásos FLV dózis alkalmazásával a protektív hatás molekuláris hátterének feltérképezése. Kutatásunk során BD1063 antagonistával csökkentett aktivitását modelleztük, a kombinációs kezelés során pedig az agonista és antagonistával szimultán alkalmazásakor feltételeztük, hogy a biokémiai

paraméterekben tapasztalt változás σ 1R-regulált folyamat, ha az antagonistá megszüntette az agonista-indukálta protekciót. Az FLV-indukálta protekció molekuláris hátterének feltérképezése érdekében gyulladási markereket, valamint oxidatív stresszhez köthető faktorokat mértünk.

Vizsgálatainkat hím Wistar Hannover patkányokon végeztük TNBS-indukálta colitis modellben, amely hatékony és relatíve könnyen reprodukálható módszer a betegség tanulmányozására. Az állatok enyhe altatásban kaptak intracolónálisan (i.c.) 10 mg 50%-os etanolban oldott TNBS-t. A hapténáló ágenseket tartalmazó TNBS transzmurális gyulladási körülmény vizsgálatát teszi lehetővé specifikus T-sejt aktivációval és citokinválással. A σ 1R szerepének vizsgálatát i.c. alkalmazott FLV és BD1063, valamint kombinációs kezeléssel vizsgáltuk. A colon σ 1R denzitásának változását a TNBS és az FLV kezelés hatására σ 1R szaturációs méréssel határoztuk meg. Az FLV hatásos dózisát *in vivo* határoztuk meg különböző dózisok TNBS-indukálta gyulladási lézióra gyakorolt hatásának vizsgálatával. A hatásos dózis kiválasztása után a σ 1R-indukálta protekció hátterében lévő mechanizmusok feltérképezése érdekében gyulladási faktorokat és oxidatív stressz markereket mértünk. Gyulladási faktorok közül vizsgáltuk a mieloperoxidáz (MPO), az interleukin-6 (IL-6), a nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) p65-ös alegység, a high mobility group box 1 (HMGB1), az endotheliális nitrogén-monoxid-szintáz (eNOS) és az indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS), valamint az ubiquitin C-terminális hidroláz L1 (UCHL-1) kifejeződését. Az oxidatív stresszhez köthető molekulák közül a 3-nitrotirozin (3-NT), a hemoxigenáz (HO) aktivitás, a glutation (GSH), a szuperoxid-dizmutáz (SOD) aktivitás, valamint a peroxiredoxin (Prdx) rendszer 4 izoformájának szintjét határoztuk meg.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a σ 1R közepes denzitást mutatott a colonszövetben. TNBS kezelés hatására a σ 1R szignifikánsan lecsökkent, amelyet az FLV beadása az abszolút kontroll csoport értékeihez hozott vissza. A TNBS-indukálta gyulladt fekélyes elváltozásokat az FLV hatásos dózisa szignifikánsan csökkentette, a BD1063 σ 1R antagonistá azonban szignifikánsan súlyosbította, valamint a két ligand hatásos dózisának szimultán alkalmazása (kombinációs kezelés) megszüntette az FLV-indukálta protekciót. Továbbá megfigyeltük, hogy az FLV kezelés szignifikánsan növelte a σ 1R expresszióját, azonban kombinációs kezelés hatására nem tapasztaltunk változást a σ 1R expressziójában a TNBS csoporthoz képest. Az FLV-indukálta protekció molekuláris hátterében eredményeink alapján a gyulladási faktorok közül az IL-6 szint csökkenését, az UCHL-1 enzim megnövekedett expresszióját, a HO aktivitás

növekedését és az NF- κ B p65-ös alegységének, valamint a HMGB1 nukleráris mediátor kifejeződésének csökkenését, illetve a NOS izoformák esetében az FLV iNOS csökkentő és eNOS serkentő hatásának szerepét feltételezzük a protekció kialakulásában. Az oxidatív stresszhez köthető faktorok esetében a 3-NT csökkenésének, a GSH növekedésének és a Prdx1 enzim szint emelkedésének tulajdonítunk jelentős szerepet.

Összességében megállapítható, hogy a σ 1R aktiválása FLV agonista adásával protektívnek bizonyult a gyulladási folyamatok és az oxidatív stressz csökkentésén keresztül patkány colonban. Mivel a σ 1R-hoz kötődő ligandok nagyfokú diverzitást mutatnak, így a többi agonista ligand hatásának és az FLV-indukálta protekció pontos mechanizmusának feltérképezése érdekében a jövőben további kutatás szükséges. Eredményeink hozzájárulhatnak a σ 1R szerepének pontosabb megértéséhez, valamint segíthetnek az IBD új terápiás lehetőségeinek kifejlesztésében.

10. Summary

Inflammatory Bowel diseases (IBDs) are chronic disorders of the gastrointestinal tract. The 2 main forms of the disease are Crohn's Disease (CD) and colitis ulcerosa (CU) which can be distinguished by clinical features, radiological alterations and endoscopic examination. Besides its extensive research, the pathogenesis of IBD is still not precisely known. However, it is increasingly clear that genetic predisposition, environmental factors, immunological processes and the microbiome seem to play a role in the pathomechanism of IBD. Current therapeutic options against this disease are 5-aminosalicylic acid derivatives, corticosteroids, immunosuppressants, biological therapy and surgical interventions. Since IBD is a non cureable disease currently, new therapeutic targets and the development of novel therapeutic options with less side effects are urgently needed.

Sigma-1 receptor (σ 1R) is a chaperon located in the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM). σ 1R is evolutionary conserved, however, it shows no sequence homology with any other mammalian protein. Interestingly, σ 1R shows homology with the yeast C-8 sterol isomerase but the receptor lacks isomerase activity. Several research showed that the activation of σ 1R by various stress stimuli or the presence of its agonist induce anti-inflammatory and antioxidant pathways. Highly diverse ligands show high affinity to σ 1R, such as benzomorphans, antihistamins, antifungal agents and serotonin reuptake inhibitors (SSRI). The antidepressant SSRI fluvoxamine (FLV) shows high affinity to σ 1R and furthermore, it showed anti-inflammatory effects in several experimental models.

In my doctoral thesis, our aim was to examine the effects of the σ 1R in 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-model of colitis. Firstly, our aim was to determine the density of σ 1R in the rat colonic tissue. Then we administered a specific σ 1R agonist, FLV, which cause the activation of the receptor, and BD1063 antagonist was used as a model of a reduced σ 1R activity. To determine the effective doses of the two σ 1R ligands we observed their effects on colonic ulcers. The effective doses of the agonist and antagonist was also administered simultaneously as a combined treatment. In that case we presumed that the alterations in the biochemical parameters were σ 1R-mediated when the antagonist abolished the protective effect induced by the agonist. To clarify the FLV-induced protection inflammatory mediators and oxidative stress markers were measured.

Our experiments were done using the TNBS-induced model of colitis in Wistar Hannover rats. TNBS colitis is an effective and well reproducible model to study IBD. Under mild anesthesia, animals were injected intracolonicly (i.c.) with 10 mg/kg dose of TNBS dissolved in 50% ethanol. TNBS causes transmural inflammation with CD-like specific T cell activation and cytokine profile. The role of the σ 1R were examined with i.c. administered FLV, BD1063 and the combination of the effective doses of the two ligands. σ 1R density of the colon was measured by saturation binding experiments with [³H](+)-pentazocine. The effective dose of FLV was selected *in vivo* through measuring its effect in TNBS-induced colonic lesions. The FLV-mediated protection then were examined through the measuring of inflammatory and oxidative stress markers. According to inflammatory markers myeloperoxidase (MPO), interleukin-6 (IL-6), p65 subunit of nuclear factor- κ B (NF- κ B), high mobility group box 1 (HMGB1), endothelial nitric oxid synthase (eNOS), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and ubiquitin C-terminal hidrolase L1 (UCHL1) were measured. Among oxidative stress markers, we determined 3-nitrotyrosine (3-NT), heme oxygenase (HO), glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and 4 isoforms of the peroxiredoxin (Prdx) enzyme family.

Based on our results, σ 1R showed moderate density in the colonic tissue. After TNBS enema, σ 1R density significantly decreased which effect was reversed by the treatment with FLV. In Wistar Hannover rats FLV administration resulted in a significantly reduced ulceration compared to TNBS, while BD1063 significantly elevated the severity of ulcers in the colon. In our combined treatment we found that the presence of the antagonist abolished the protective effect of FLV. Furthermore, we measured a significant increase in the expression of σ 1R itself after FLV treatment, while in the combined treatment this effect was abolished by the presence of the antagonist. Based on our biochemical measurements, the following alterations seemed to play a role in FLV-induced protection: the reduced level of IL-6 cytokine, the elevated expression of UCHL-1, the increased activity of HO enzyme, the reduced expression of NF- κ B p65 and HMGB1 and according to NOS isoforms, the FLV-induced decrease in iNOS expression and the increase in eNOS levels. In addition, among oxidative stress markers, the decreased levels of 3-NT and the elevated levels of GSH and Prdx1 seem to contributed to the σ 1R-associated protective mechanism in TNBS-induced rat colitis model.

In summary, our current study shows evidence for the protective anti-inflammatory and antioxidant mechanism of FLV-induced σ 1R activation in TNBS colitis. Besides the high

diversity of σ 1R ligands, further investigations are needed whether other ligands show this protective effect in TNBS colitis. Furthermore, additional examinations are also needed to clarify the exact mechanism of the FLV-induced protection in TNBS-induced colitis. Our current results may shed light to the better understanding of the role of σ 1R and may contribute to develop new therapeutic options against IBD.

11. Köszönetnyilvánítás

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

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Kupai Krisztinának témavezetői munkájáért, tanácsaiért, építő kritikáiért. Külön szeretném megköszönni Török Szilviának a mérésekben nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Továbbá köszönettel tartozom laborunk egykori és jelenlegi munkatársainak: Dr. Amin Al-awarnak, Börzsei Denisenek, Dr. Hegyköziné Dr. Veszelka Médeának, Dr. Pósa Anikónak, Dr. Szűcs Gergőnek, Dr. Szabó Renátának, Magyarai Ferencnek, Magyariné Dr. Berkó Anikónak, Nagyné Hoffmann Alexandrának a sok segítségért, Niksic-Juhász Katalinnak és Veketyné Váradi Margitnak az adminisztrációs segítségért és az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi dolgozójának.

Köszönöm továbbá Dr. Dvorácskó Szabolcsnak és Dr. Tömböly Csabának a ligandkötődési és szaturációs méréseket.

Végül, de nem utolsó sorban nagyon hálás vagyok a párom, a szüleim, a testvérem, a nagyszüleim, valamint a családom és barátaim odaadó támogatásáért.

12. Irodalomjegyzék

1. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
2. Roh, J.S. and D.H. Sohn, *Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases*. Immune Netw, 2018. **18**(4): p. e27.
3. Chen, L., et al., *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*. Oncotarget, 2018. **9**(6): p. 7204-7218.
4. Francois, A., et al., *Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 123241.
5. Leick, M., et al., *Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies*. Cell Tissue Res, 2014. **355**(3): p. 647-56.
6. Turner, M.D., et al., *Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(11): p. 2563-2582.
7. Zhang, J.M. and J. An, *Cytokines, inflammation, and pain*. Int Anesthesiol Clin, 2007. **45**(2): p. 27-37.
8. Li, Y., et al., *The regulatory roles of neutrophils in adaptive immunity*. Cell Commun Signal, 2019. **17**(1): p. 147.
9. Romagnani, S., *T cell subpopulations*. Chem Immunol Allergy, 2014. **100**: p. 155-64.
10. Collier, J.L., et al., *Not-so-opposite ends of the spectrum: CD8(+) T cell dysfunction across chronic infection, cancer and autoimmunity*. Nat Immunol, 2021. **22**(7): p. 809-819.
11. Borst, J., et al., *CD4(+) T cell help in cancer immunology and immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(10): p. 635-647.
12. Libby, P., *Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease*. Nutr Rev, 2007. **65**(12 Pt 2): p. S140-6.
13. Cheng, L.K., et al., *Gastrointestinal system*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2010. **2**(1): p. 65-79.
14. Rao, M. and M.D. Gershon, *Enteric nervous system development: what could possibly go wrong?* Nat Rev Neurosci, 2018. **19**(9): p. 552-565.
15. Okumura, R. and K. Takeda, *Roles of intestinal epithelial cells in the maintenance of gut homeostasis*. Exp Mol Med, 2017. **49**(5): p. e338.
16. Fleming, M.A., 2nd, et al., *The Enteric Nervous System and Its Emerging Role as a Therapeutic Target*. Gastroenterol Res Pract, 2020. **2020**: p. 8024171.
17. Reed, K.K. and R. Wickham, *Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro*. Semin Oncol Nurs, 2009. **25**(1): p. 3-14.
18. Cieza, R.J., et al., *Immunomodulation for gastrointestinal infections*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012. **10**(3): p. 391-400.
19. Fiocchi, C., *Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions*. Am J Physiol, 1997. **273**(4): p. G769-75.
20. Furman, D., et al., *Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span*. Nat Med, 2019. **25**(12): p. 1822-1832.
21. Murdoch, J.R. and C.M. Lloyd, *Chronic inflammation and asthma*. Mutat Res, 2010. **690**(1-2): p. 24-39.
22. Reich, K., *The concept of psoriasis as a systemic inflammation: implications for disease management*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012. **26 Suppl 2**: p. 3-11.
23. Basu, S., et al., *Type 1 diabetes is associated with increased cyclooxygenase- and cytokine-mediated inflammation*. Diabetes Care, 2005. **28**(6): p. 1371-5.

24. Rubin, D.C., A. Shaker, and M.S. Levin, *Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 107.
25. Seyedian, S.S., F. Nokhostin, and M.D. Malamir, *A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease*. J Med Life, 2019. **12**(2): p. 113-122.
26. Roushan, N., et al., *Differentiation of Crohn's disease and ulcerative colitis using intestinal wall thickness of the colon: A Diagnostic accuracy study of endoscopic ultrasonography*. Med J Islam Repub Iran, 2019. **33**: p. 57.
27. Liverani, E., et al., *How to predict clinical relapse in inflammatory bowel disease patients*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 1017-33.
28. Marzo, M., et al., *Management of perianal fistulas in Crohn's disease: an up-to-date review*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(5): p. 1394-403.
29. Lakatos, L. and P.L. Lakatos, *[Changes in the epidemiology of inflammatory bowel diseases]*. Orv Hetil, 2007. **148**(5): p. 223-8.
30. Loftus, E.V., Jr., *Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences*. Gastroenterology, 2004. **126**(6): p. 1504-17.
31. Duricova, D., et al., *Age-related differences in presentation and course of inflammatory bowel disease: an update on the population-based literature*. J Crohns Colitis, 2014. **8**(11): p. 1351-61.
32. Taleban, S., et al., *Inflammatory bowel disease and the elderly: a review*. J Crohns Colitis, 2015. **9**(6): p. 507-15.
33. Zhang, Y.Z. and Y.Y. Li, *Inflammatory bowel disease: pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(1): p. 91-9.
34. Sartor, R.B., *Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006. **3**(7): p. 390-407.
35. Satsangi, J., et al., *Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(1): p. 3-18.
36. Cooney, R. and D. Jewell, *The genetic basis of inflammatory bowel disease*. Dig Dis, 2009. **27**(4): p. 428-42.
37. Ek, W.E., M. D'Amato, and J. Halfvarson, *The history of genetics in inflammatory bowel disease*. Ann Gastroenterol, 2014. **27**(4): p. 294-303.
38. Hugot, J.P., et al., *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease*. Nature, 2001. **411**(6837): p. 599-603.
39. Stoll, M., et al., *Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease*. Nat Genet, 2004. **36**(5): p. 476-80.
40. Annese, V., et al., *Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(23): p. 3636-44.
41. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis*. Gastroenterology, 1998. **115**(1): p. 182-205.
42. Molodecky, N.A. and G.G. Kaplan, *Environmental risk factors for inflammatory bowel disease*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2010. **6**(5): p. 339-46.
43. Scanu, A.M., et al., *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection in cases of irritable bowel syndrome and comparison with Crohn's disease and Johne's disease: common neural and immune pathogenicities*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(12): p. 3883-90.
44. Miranda-Bautista, J., et al., *Listeria monocytogenes infection in inflammatory bowel disease patients: case series and review of the literature*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014. **26**(11): p. 1247-52.
45. Martinez-Medina, M. and L.J. Garcia-Gil, *Escherichia coli in chronic inflammatory bowel diseases: An update on adherent invasive Escherichia coli pathogenicity*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2014. **5**(3): p. 213-27.

46. Kostic, A.D., R.J. Xavier, and D. Gevers, *The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(6): p. 1489-99.
47. Campieri, M. and P. Gionchetti, *Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative?* *Gastroenterology*, 1999. **116**(5): p. 1246-9.
48. Xu, L., et al., *Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017. **46**(9): p. 780-789.
49. Koloski, N.A., L. Bret, and G. Radford-Smith, *Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature*. *World J Gastroenterol*, 2008. **14**(2): p. 165-73.
50. de Souza, H.S. and C. Fiocchi, *Immunopathogenesis of IBD: current state of the art*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. **13**(1): p. 13-27.
51. Liu, T., et al., *NF-kappaB signaling in inflammation*. *Signal Transduct Target Ther*, 2017. **2**.
52. Giridharan, S. and M. Srinivasan, *Mechanisms of NF-kappaB p65 and strategies for therapeutic manipulation*. *J Inflamm Res*, 2018. **11**: p. 407-419.
53. Murano, M., et al., *Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis*. *Clin Exp Immunol*, 2000. **120**(1): p. 51-8.
54. Wullaert, A., M.C. Bonnet, and M. Pasparakis, *NF-kappaB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation*. *Cell Res*, 2011. **21**(1): p. 146-58.
55. Parronchi, P., et al., *Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease*. *Am J Pathol*, 1997. **150**(3): p. 823-32.
56. Heller, F., et al., *Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution*. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 550-64.
57. Ramos, G.P. and K.A. Papadakis, *Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases*. *Mayo Clin Proc*, 2019. **94**(1): p. 155-165.
58. Yang, H., H. Wang, and U. Andersson, *Targeting Inflammation Driven by HMGB1*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 484.
59. Palone, F., et al., *Fecal HMGB1 Reveals Microscopic Inflammation in Adult and Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease in Clinical and Endoscopic Remission*. *Inflamm Bowel Dis*, 2016. **22**(12): p. 2886-2893.
60. Guihot, G., et al., *Inducible nitric oxide synthase activity in colon biopsies from inflammatory areas: correlation with inflammation intensity in patients with ulcerative colitis but not with Crohn's disease*. *Amino Acids*, 2000. **18**(3): p. 229-37.
61. Geller, D.A. and T.R. Billiar, *Molecular biology of nitric oxide synthases*. *Cancer Metastasis Rev*, 1998. **17**(1): p. 7-23.
62. Kolios, G., V. Valatas, and S.G. Ward, *Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle*. *Immunology*, 2004. **113**(4): p. 427-37.
63. Graham, S.H., *Modification of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 by reactive lipid species: role in neural regeneration and diseases of aging*. *Neural Regen Res*, 2016. **11**(6): p. 908-9.
64. Bishop, P., D. Rocca, and J.M. Henley, *Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1): structure, distribution and roles in brain function and dysfunction*. *Biochem J*, 2016. **473**(16): p. 2453-62.
65. Takami, Y., 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): p. 2184-90.
66. Tian, T., Z. Wang, and J. Zhang, *Pathomechanisms of Oxidative Stress in Inflammatory Bowel Disease and Potential Antioxidant Therapies*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. **2017**: p. 4535194.
67. Mittal, M., et al., *Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **20**(7): p. 1126-67.

68. Rezaie, A., R.D. Parker, and M. Abdollahi, *Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause?* Dig Dis Sci, 2007. **52**(9): p. 2015-21.
69. Dedon, P.C. and S.R. Tannenbaum, *Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation.* Arch Biochem Biophys, 2004. **423**(1): p. 12-22.
70. Wiseman, H. and B. Halliwell, *Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer.* Biochem J, 1996. **313** (Pt 1): p. 17-29.
71. Ahsan, H., *3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions.* Hum Immunol, 2013. **74**(10): p. 1392-9.
72. Roessner, A., et al., *Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis.* Pathol Res Pract, 2008. **204**(7): p. 511-24.
73. Saini, R., *Coenzyme Q10: The essential nutrient.* J Pharm Bioallied Sci, 2011. **3**(3): p. 466-7.
74. Dziabowska-Grabias, K., et al., *Antioxidant Therapy in Inflammatory Bowel Diseases.* Antioxidants (Basel), 2021. **10**(3).
75. Hamada, N., et al., *Emerging issues in radiogenic cataracts and cardiovascular disease.* J Radiat Res, 2014. **55**(5): p. 831-46.
76. Rhee, S.G., *Overview on Peroxiredoxin.* Mol Cells, 2016. **39**(1): p. 1-5.
77. Hampton, M.B. and K.M. O'Connor, *Peroxiredoxins and the Regulation of Cell Death.* Mol Cells, 2016. **39**(1): p. 72-6.
78. Horie, K., et al., *Peroxiredoxin 1 expression in active ulcerative colitis mucosa identified by proteome analysis and involvement of thioredoxin based on immunohistochemistry.* Oncol Lett, 2018. **15**(2): p. 2364-2372.
79. Senhaji, N., et al., *Peroxiredoxin-2 up-regulation in inflammatory bowel disease: Friend or foe?* J Gastroenterol Hepatol, 2017. **32**(6): p. 1212-1220.
80. Pfeuffer, S., et al., *PWE-110 A Role For Peroxiredoxin-4 In A Murine Colitis Model Of Intestinal Inflammation.* Gut, 2014. **63**(Suppl 1): p. A172-A173.
81. Melhem, H., et al., *Prdx6 Deficiency Ameliorates DSS Colitis: Relevance of Compensatory Antioxidant Mechanisms.* J Crohns Colitis, 2017. **11**(7): p. 871-884.
82. Vijayan, V., et al., *Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract.* World J Gastroenterol, 2010. **16**(25): p. 3112-9.
83. Waza, A.A., et al., *A review on heme oxygenase-1 induction: is it a necessary evil.* Inflamm Res, 2018. **67**(7): p. 579-588.
84. Chiang, S.K., S.E. Chen, and L.C. Chang, *A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells.* Int J Mol Sci, 2018. **20**(1).
85. Sheikh, S.Z., et al., *An anti-inflammatory role for carbon monoxide and heme oxygenase-1 in chronic Th2-mediated murine colitis.* J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5506-13.
86. Erbil, Y., et al., *Effect of heme oxygenase-1 induction by octreotide on TNBS-induced colitis.* J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(11): p. 1852-8.
87. Tsui, J.J. and H.Q. Huynh, *Is top-down therapy a more effective alternative to conventional step-up therapy for Crohn's disease?* Ann Gastroenterol, 2018. **31**(4): p. 413-424.
88. Gisbert, J.P., et al., *Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: a systematic review.* Dig Dis Sci, 2002. **47**(3): p. 471-88.
89. Iacucci, M., S. de Silva, and S. Ghosh, *Mesalazine in inflammatory bowel disease: a trendy topic once again?* Can J Gastroenterol, 2010. **24**(2): p. 127-33.
90. Ye, B. and D.R. van Langenberg, *Mesalazine preparations for the treatment of ulcerative colitis: Are all created equal?* World J Gastrointest Pharmacol Ther, 2015. **6**(4): p. 137-44.
91. Xu, C.T., S.Y. Meng, and B.R. Pan, *Drug therapy for ulcerative colitis.* World J Gastroenterol, 2004. **10**(16): p. 2311-7.

92. Dubois-Camacho, K., et al., *Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel diseases: From clinical practice to molecular biology*. World J Gastroenterol, 2017. **23**(36): p. 6628-6638.
93. Bruscoli, S., et al., *Glucocorticoid Therapy in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Clinical Practice*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 691480.
94. Reinisch, W., et al., *[Immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: consensus by the Austrian working group on IBD]*. Z Gastroenterol, 2004. **42**(9): p. 1033-45; discussion 1046-7.
95. Peyrin-Biroulet, L., *Anti-TNF therapy in inflammatory bowel diseases: a huge review*. Minerva Gastroenterol Dietol, 2010. **56**(2): p. 233-43.
96. Rencz, F., et al., *Biological therapy in inflammatory bowel diseases: access in Central and Eastern Europe*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(6): p. 1728-37.
97. Harriman, G., L.K. Harper, and T.F. Schaible, *Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment*. Ann Rheum Dis, 1999. **58 Suppl 1**: p. 161-4.
98. Rau, R., *Adalimumab (a fully human anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) in the treatment of active rheumatoid arthritis: the initial results of five trials*. Ann Rheum Dis, 2002. **61 Suppl 2**: p. ii70-3.
99. Papamichael, K., et al., *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): p. 182-97.
100. Lee, M.J., et al., *Systematic review of surgical interventions for Crohn's anal fistula*. BJS Open, 2017. **1**(3): p. 55-66.
101. Randhawa, P.K., et al., *A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents*. Korean J Physiol Pharmacol, 2014. **18**(4): p. 279-88.
102. Barthel, M., et al., *Pretreatment of mice with streptomycin provides a Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host*. Infect Immun, 2003. **71**(5): p. 2839-58.
103. Mizoguchi, A., et al., *Genetically engineered mouse models for studying inflammatory bowel disease*. J Pathol, 2016. **238**(2): p. 205-19.
104. Morris, G.P., et al., *Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon*. Gastroenterology, 1989. **96**(3): p. 795-803.
105. Silva, I., R. Pinto, and V. Mateus, *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).
106. Wirtz, S., et al., *Chemically induced mouse models of intestinal inflammation*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 541-6.
107. Boismenu, R. and Y. Chen, *Insights from mouse models of colitis*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(3): p. 267-78.
108. Antoniou, E., et al., *The TNBS-induced colitis animal model: An overview*. Ann Med Surg (Lond), 2016. **11**: p. 9-15.
109. Weng, T.Y., S.A. Tsai, and T.P. Su, *Roles of sigma-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases*. J Biomed Sci, 2017. **24**(1): p. 74.
110. Martin, W.R., et al., *The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog*. J Pharmacol Exp Ther, 1976. **197**(3): p. 517-32.
111. Rousseaux, C.G. and S.F. Greene, *Sigma receptors [sigmaRs]: biology in normal and diseased states*. J Recept Signal Transduct Res, 2016. **36**(4): p. 327-388.
112. Su, T.P., *Evidence for sigma opioid receptor: binding of [3H]SKF-10047 to etorphine-inaccessible sites in guinea-pig brain*. J Pharmacol Exp Ther, 1982. **223**(2): p. 284-90.
113. Hayashi, T. and T. Su, *The sigma receptor: evolution of the concept in neuropsychopharmacology*. Curr Neuropharmacol, 2005. **3**(4): p. 267-80.

114. Fontanilla, D., et al., *The hallucinogen N,N-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous sigma-1 receptor regulator*. *Science*, 2009. **323**(5916): p. 934-7.
115. Mitsuda, T., et al., *Sigma-1Rs are upregulated via PERK/eIF2alpha/ATF4 pathway and execute protective function in ER stress*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **415**(3): p. 519-25.
116. Hayashi, T. and T.P. Su, *Intracellular dynamics of sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) in NG108-15 cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **306**(2): p. 726-33.
117. Hayashi, T. and T.P. Su, *Sigma-1 receptors (sigma(1) binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003. **306**(2): p. 718-25.
118. Alon, A., et al., *Identification of the gene that codes for the sigma2 receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017. **114**(27): p. 7160-7165.
119. Nguyen, L., et al., *Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases*. *J Pharmacol Sci*, 2015. **127**(1): p. 17-29.
120. van Waarde, A., et al., *Potential applications for sigma receptor ligands in cancer diagnosis and therapy*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1848**(10 Pt B): p. 2703-14.
121. Rosen, D.A., et al., *Modulation of the sigma-1 receptor-IRE1 pathway is beneficial in preclinical models of inflammation and sepsis*. *Sci Transl Med*, 2019. **11**(478).
122. Romero, L. and E. Portillo-Salido, *Trends in Sigma-1 Receptor Research: A 25-Year Bibliometric Analysis*. *Front Pharmacol*, 2019. **10**: p. 564.
123. Prasad, P.D., et al., *Exon-intron structure, analysis of promoter region, and chromosomal localization of the human type 1 sigma receptor gene*. *J Neurochem*, 1998. **70**(2): p. 443-51.
124. Su, T.P., et al., *The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems*. *Trends Pharmacol Sci*, 2016. **37**(4): p. 262-278.
125. Schmidt, H.R., et al., *Structural basis for sigma1 receptor ligand recognition*. *Nat Struct Mol Biol*, 2018. **25**(10): p. 981-987.
126. Hayashi, T., *Sigma-1 receptor: the novel intracellular target of neuropsychotropic drugs*. *J Pharmacol Sci*, 2015. **127**(1): p. 2-5.
127. Hayashi, T., *The Sigma-1 Receptor in Cellular Stress Signaling*. *Front Neurosci*, 2019. **13**: p. 733.
128. Tang, Z., C.C. Roberts, and C.A. Chang, *Understanding ligand-receptor non-covalent binding kinetics using molecular modeling*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2017. **22**: p. 960-981.
129. Salahudeen, M.S. and P.S. Nishtala, *An overview of pharmacodynamic modelling, ligand-binding approach and its application in clinical practice*. *Saudi Pharm J*, 2017. **25**(2): p. 165-175.
130. Kenakin, T., *Overview of receptor interactions of agonists and antagonists*. *Curr Protoc Pharmacol*, 2008. **Chapter 4**: p. Unit 4 1.
131. Mishra, A.K., et al., *The sigma-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands*. *Biochem J*, 2015. **466**(2): p. 263-271.
132. Yano, H., et al., *Pharmacological profiling of sigma 1 receptor ligands by novel receptor homomer assays*. *Neuropharmacology*, 2018. **133**: p. 264-275.
133. Hashimoto, K. and K. Ishiwata, *Sigma receptor ligands: possible application as therapeutic drugs and as radiopharmaceuticals*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(30): p. 3857-76.
134. Garcés-Ramírez, L., et al., *Sigma receptor agonists: receptor binding and effects on mesolimbic dopamine neurotransmission assessed by microdialysis*. *Biol Psychiatry*, 2011. **69**(3): p. 208-17.
135. Hashimoto, K., *Activation of sigma-1 receptor chaperone in the treatment of neuropsychiatric diseases and its clinical implication*. *J Pharmacol Sci*, 2015. **127**(1): p. 6-9.
136. Fishback, J.A., et al., *Sigma receptors: potential targets for a new class of antidepressant drug*. *Pharmacol Ther*, 2010. **127**(3): p. 271-82.

137. Xu, R., et al., *Ether modifications to 1-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-4-(3-phenylpropyl)piperazine (SA4503): effects on binding affinity and selectivity for sigma receptors and monoamine transporters*. *Bioorg Med Chem*, 2015. **23**(1): p. 222-30.
138. Lever, J.R., et al., *Sigma1 and sigma2 receptor binding affinity and selectivity of SA4503 and fluoroethyl SA4503*. *Synapse*, 2006. **59**(6): p. 350-8.
139. Lahti, R.A., et al., *Dopamine D4 versus D2 receptor selectivity of dopamine receptor antagonists: possible therapeutic implications*. *Eur J Pharmacol*, 1993. **236**(3): p. 483-6.
140. Pal, A., et al., *The sigma-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements*. *Eur J Pharmacol*, 2012. **682**(1-3): p. 12-20.
141. Gilmore, D.L., Y. Liu, and R.R. Matsumoto, *Review of the pharmacological and clinical profile of rimcazole*. *CNS Drug Rev*, 2004. **10**(1): p. 1-22.
142. Romero, L., et al., *Pharmacological properties of S1RA, a new sigma-1 receptor antagonist that inhibits neuropathic pain and activity-induced spinal sensitization*. *Br J Pharmacol*, 2012. **166**(8): p. 2289-306.
143. Furuse, T. and K. Hashimoto, *Fluvoxamine for aripiprazole-associated akathisia in patients with schizophrenia: a potential role of sigma-1 receptors*. *Ann Gen Psychiatry*, 2010. **9**: p. 11.
144. Furuse, T. and K. Hashimoto, *Fluvoxamine monotherapy for psychotic depression: the potential role of sigma-1 receptors*. *Ann Gen Psychiatry*, 2009. **8**: p. 26.
145. Marken, P.A. and J.S. Munro, *Selecting a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor: Clinically Important Distinguishing Features*. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*, 2000. **2**(6): p. 205-210.
146. Langa, F., et al., *Generation and phenotypic analysis of sigma receptor type I (sigma 1) knockout mice*. *Eur J Neurosci*, 2003. **18**(8): p. 2188-96.
147. Chevallier, N., E. Keller, and T. Maurice, *Behavioural phenotyping of knockout mice for the sigma-1 (sigma(1)) chaperone protein revealed gender-related anxiety, depressive-like and memory alterations*. *J Psychopharmacol*, 2011. **25**(7): p. 960-75.
148. Goguadze, N., et al., *Sigma-1 Receptor Agonists Induce Oxidative Stress in Mitochondria and Enhance Complex I Activity in Physiological Condition but Protect Against Pathological Oxidative Stress*. *Neurotox Res*, 2019. **35**(1): p. 1-18.
149. Dvoracsko, S., et al., *Preparation of bivalent agonists for targeting the mu opioid and cannabinoid receptors*. *Eur J Med Chem*, 2019. **178**: p. 571-588.
150. Chu, U.B. and A.E. Ruoho, *Sigma Receptor Binding Assays*. *Curr Protoc Pharmacol*, 2015. **71**: p. 1 34 1-1 34 21.
151. Tenhunen, R., H.S. Marver, and R. Schmid, *The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968. **61**(2): p. 748-55.
152. Szalai, 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**: p. 925981.
153. Hara, H., et al., *Sigma receptor-mediated effects of a new antiulcer agent, KB-5492, on experimental gastric mucosal lesions and gastric alkaline secretion in rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. **269**(2): p. 799-805.
154. Ruoho, A.E., et al., *The ligand binding region of the sigma-1 receptor: studies utilizing photoaffinity probes, sphingosine and N-alkylamines*. *Curr Pharm Des*, 2012. **18**(7): p. 920-9.
155. Dvoracsko, S., et al., *Novel High Affinity Sigma-1 Receptor Ligands from Minimal Ensemble Docking-Based Virtual Screening*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(15).
156. Oyer, H.M., C.M. Sanders, and F.J. Kim, *Small-Molecule Modulators of Sigma1 and Sigma2/TMEM97 in the Context of Cancer: Foundational Concepts and Emerging Themes*. *Front Pharmacol*, 2019. **10**: p. 1141.

157. Omi, T., et al., *Fluvoxamine alleviates ER stress via induction of Sigma-1 receptor*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1332.
158. Zhao, J., et al., *Sigma receptor ligand, (+)-pentazocine, suppresses inflammatory responses of retinal microglia*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(6): p. 3375-84.
159. Hendrickson, B.A., R. Gokhale, and J.H. Cho, *Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(1): p. 79-94.
160. Albayrak, Y. and K. Hashimoto, *Sigma-1 Receptor Agonists and Their Clinical Implications in Neuropsychiatric Disorders*. Adv Exp Med Biol, 2017. **964**: p. 153-161.
161. Coates, M.D., et al., *Review article: the many potential roles of intestinal serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) signalling in inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2017. **46**(6): p. 569-580.
162. Margolis, K.G. and C. Pothoulakis, *Serotonin has a critical role in the pathogenesis of experimental colitis*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1562-6.
163. Ghia, J.E., et al., *Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis*. Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1649-60.
164. Linden, D.R., et al., *Serotonin transporter function and expression are reduced in mice with TNBS-induced colitis*. Neurogastroenterol Motil, 2005. **17**(4): p. 565-74.
165. Elsaed, W.M., et al., *Gastroprotective and antioxidant effects of fluvoxamine on stress-induced peptic ulcer in rats*. J Taibah Univ Med Sci, 2018. **13**(5): p. 422-431.
166. Sorbye, H. and K. Svanes, *The role of blood flow in gastric mucosal defence, damage and healing*. Dig Dis, 1994. **12**(5): p. 305-17.
167. Matuszyk, A., et al., *The Influence of Ghrelin on the Development of Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Rats*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 718314.
168. Konarska, K., et al., *Treatment with Obestatin-A Ghrelin Gene-Encoded Peptide-Reduces the Severity of Experimental Colitis Evoked by Trinitrobenzene Sulfonic Acid*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(6).
169. Matuszyk, A., et al., *Obestatin Accelerates the Healing of Acetic Acid-Induced Colitis in Rats*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 2834386.
170. Hosszu, A., et al., *sigma1-Receptor Agonism Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(1): p. 152-165.
171. Ofek, K., et al., *Fluoxetine induces vasodilatation of cerebral arterioles by co-modulating NO/muscarinic signalling*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(11): p. 2736-44.
172. Almasi, N., 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).
173. Gu, Y., et al., *The deubiquitinating enzyme UCHL1 negatively regulates the immunosuppressive capacity and survival of multipotent mesenchymal stromal cells*. Cell Death Dis, 2018. **9**(5): p. 459.
174. Atreya, R. and M.F. Neurath, *Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer*. Clin Rev Allergy Immunol, 2005. **28**(3): p. 187-96.
175. Chami, B., et al., *Myeloperoxidase in the inflamed colon: A novel target for treating inflammatory bowel disease*. Arch Biochem Biophys, 2018. **645**: p. 61-71.
176. Varga, C., et al., *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): p. 164-71.
177. Mendez-David, I., et al., *Nrf2-signaling and BDNF: A new target for the antidepressant-like activity of chronic fluoxetine treatment in a mouse model of anxiety/depression*. Neurosci Lett, 2015. **597**: p. 121-6.
178. Sebastian, V.P., et al., *Heme Oxygenase-1 as a Modulator of Intestinal Inflammation Development and Progression*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1956.

179. Palatka, K., et al., *Changes in the expression and distribution of the inducible and endothelial nitric oxide synthase in mucosal biopsy specimens of inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(6): p. 670-80.
180. Vagnerova, K., et al., *Sigma 1 receptor agonists act as neuroprotective drugs through inhibition of inducible nitric oxide synthase*. Anesth Analg, 2006. **103**(2): p. 430-4, table of contents.
181. Bhuiyan, S. and K. Fukunaga, *Stimulation of Sigma-1 receptor by dehydroepiandrosterone ameliorates hypertension-induced kidney hypertrophy in ovariectomized rats*. Exp Biol Med (Maywood), 2010. **235**(3): p. 356-64.
182. Meunier, J. and T. Hayashi, *Sigma-1 receptors regulate Bcl-2 expression by reactive oxygen species-dependent transcriptional regulation of nuclear factor kappaB*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **332**(2): p. 388-97.
183. Hyrskyluoto, A., et al., *Sigma-1 receptor agonist PRE084 is protective against mutant huntingtin-induced cell degeneration: involvement of calpastatin and the NF-kappaB pathway*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e646.
184. Zhang, Y., et al., *Role of high-mobility group box 1 in methamphetamine-induced activation and migration of astrocytes*. J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 156.
185. Dursun, H., et al., *Antiulcer activity of fluvoxamine in rats and its effect on oxidant and antioxidant parameters in stomach tissue*. BMC Gastroenterol, 2009. **9**: p. 36.
186. Weng, T.Y., et al., *Loss of Sigma-1 Receptor Chaperone Promotes Astrocytosis and Enhances the Nrf2 Antioxidant Defense*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 4582135.
187. Zhang, X.J., et al., *Proteome profiling of spinal cord and dorsal root ganglia in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis*. World J Gastroenterol, 2012. **18**(23): p. 2914-28.
188. Hsieh, S.Y., et al., *Comparative proteomic studies on the pathogenesis of human ulcerative colitis*. Proteomics, 2006. **6**(19): p. 5322-31.

13. Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító: 10060398

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája:

1. **Almási N.**; Török S.; Dvorácskó S.; Tömböly C.; Csonka Á.; Baráth Z.; Murlasits Z.; Valkusz, Z.; Pósa A.; Varga C.; Kupai K. **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, 4046.

IF: 4,556

2. **Almási N.**; Török S.; Valkusz Z.; Tajti M.; Csonka Á.; Murlasits Z.; Pósa A.; Varga C.; Kupai K. **Sigma-1 Receptor Engages an Anti-Inflammatory and Antioxidant Feedback Loop Mediated by Peroxiredoxin in Experimental Colitis.** Antioxidants 2020, 9, 1081.

IF: 5,014

Egyéb közlemények listája:

1. **Almási N.***, Murlasits Z.*, Al-awar A., Csonka Á., Dvorácskó S., Tömböly C., Török S., Bester D., Pósa A., Varga C., & Kupai K. **Effects of aging on proteasomal-ubiquitin system, oxidative stress balance and calcium homeostasis in middle-aged female rat colon,** Physiology International, 2021, 108(1), 27-42.

* megosztott elsőszerező

IF: 1,410

2. Al-awar A., **Almási N.**, Szabó R., Ménesi R., Szűcs G., Török S., Pósa A., Varga C. and Kupai K. **Effect of DPP-4 inhibitor sitagliptin against ischemia-reperfusion (I/R) injury in hyperlipidemic animals,** Acta Biologica Szegediensis, 2019, 62(2), pp. 180-189.

3. Al-awar A.; **Almási N.**; Szabó R.; Takacs I.; Murlasits Z.; Szűcs G.; Török S.; Pósa A.; Varga C.; Kupai K. **Novel Potentials of the DPP-4 Inhibitor Sitagliptin against Ischemia-Reperfusion (I/R) Injury in Rat Ex-Vivo Heart Model.** Int. J. Mol. Sci. 2018, 19, 3226.

IF: 4,556

4. 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, Apr;26(2):479-489. **IF: 3,238**

5. **Almási N***, Pósa A*, Al-Awar A, Török S, Baráth Z, Nemcsók J, Murlasits Z, Nagy I, Puskás G. L, Varga C, Kupai K. **Differentially expressed microRNAs and their relation to gasotransmitters in TNBS-induced colitis in rat colon.** ACADEMIA JOURNAL OF SCIENTIFIC RESEARCH, 2017, 5: 9 pp. 277-289., 13 p.

* megosztott elsőszerező

6. Al-awar A, Kupai K, **Almási N**, Murlasits Z, Török S, Bóta A, Krész M, Berkó A, Pósa A, Varga C. **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: 10 pp. 419-427., 9 p.