

**Kísérletes gyulladássos bélbetegség modell
hatásmechanizmusának vizsgálata**

Ph. D. disszertáció

Horváth Krisztina

Témavezetők:

Dr. Varga Csaba
egyetemi docens

ifj. Dr. László Ferenc
egyetemi tanár

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

2008

TARTALOMJEGYZÉK

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
II. TUDOMÁNYOS HÁTTÉR	7
<i>A gyulladáshoz vezető betegségekről és típusaikról általában</i>	7
<i>A gyulladáshoz vezető betegségek kialakulását befolyásoló tényezők</i>	10
<i>Az oxidatív stressz szerepe a gyulladáshoz vezető betegségekben</i>	11
<i>Az antioxidáns hem-oxigenáz enzimrendszer feltételezett szerepéről</i>	12
<i>A gyulladási folyamatokban szerepet játszó citokinekről</i>	18
<i>Alkalmazott gyógyszeres kezelések</i>	20
1. Szalicilsav-származékok	20
2. Kortikoszteroidok	21
3. Immun-szuppresszorok	22
4. Antibiotikumok	23
5. Biológiai hatóanyagok	23
<i>A TNBS vastagbél gyulladáshoz vezető modell</i>	24
III. CÉLKITŰZÉS	25
IV. MÓDSZEREK	26
Kísérletek menete, kezelések	26
Nyálkahártyagyulladás paramétereinek vizsgálata	27
<i>Lézió meghatározás planimetriás analízissel</i>	27
<i>Mieloperoxidáz aktivitásmérés</i>	27
<i>TNF-alfa szint meghatározás Eliza módszerrel</i>	28
HO-1 enzim expressziós vizsgálat	29
HO enzim aktivitásmérés	30
Fehérjetartalom mérés	31
Statisztikai analízis	31
Alkalmazott vegyszerek	31
V. EREDMÉNYEK	32
<i>A TNBS okozta makrószkópos elváltozás patkány vastagbélben</i>	32
<i>Etanol illetve TNBS hatása a HO-1 expressziójára és a HO aktivitásra</i>	32
<i>Hem hatása a HO-1 expressziójára</i>	36
<i>A HO aktivitás indukciója kadmium-kloriddal</i>	37

<i>Hem és ZnPP hatása a HO aktivitásra</i>	<i>37</i>
<i>Hem és ZnPP hatása a gyulladás kiterjedésére</i>	<i>38</i>
<i>Hem és ZnPP hatása a MPO aktivitásra.....</i>	<i>39</i>
<i>Az 5-ASA kezelés hatása a nyálkahártyaléziók kiterjedésére.....</i>	<i>40</i>
<i>Az 5-ASA kezelés hatása a TNBS indukálta lézió kiterjedésére.....</i>	<i>41</i>
<i>Az 5-ASA kezelés hatása a TNBS indukálta gyulladási paraméterekre</i>	<i>42</i>
<i>Az 5-ASA kezelések hatása a TNF-alfa szintre</i>	<i>44</i>
<i>Az 5-ASA kezelés hatása a TNBS indukálta HO aktivitásra</i>	<i>45</i>
<i>Az 5-ASA (75 mg/kg) és a TNBS kezelés hatása a HO-1 expressziójára</i>	<i>46</i>
<i>Az 5-ASA (75 mg/kg) kezelés és a ZnPP hatása a lézió kiterjedésére.....</i>	<i>47</i>
<i>Az 5-ASA (75 mg/kg) kezelés és a ZnPP hatása az MPO aktivitásra.....</i>	<i>48</i>
<i>Az 5-ASA (75 mg/kg) kezelés és a ZnPP hatása a HO aktivitásra</i>	<i>49</i>
VI. MEGBESZÉLÉS	50
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	61
VIII. SUMMARY	64
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	67
IX. IRODALOMJEGYZÉK.....	69

I. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

IBD: inflammatory bowel diseases - gyulladássos bélbetegségek

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzén-szulfonsav

EtOH: etanol

5-ASA: 5-amino-szalicilsav

CMC: carboxymethyl cellulose – karboximetil-cellulóz

MPO: mieloperoxidáz enzim

TNF- α : tumor nekrozis faktor alfa

HO: hem-oxigenáz

HO-1: hem-oxigenáz-1

HSP32: hősokk protein 32

HO-2: hem-oxigenáz-2

HO-3: hem-oxigenáz-3

ZnPP: cink-protoporfirin

SnPP: ón-protoporfirin

CdCl₂: kadmium-klorid

PBS: foszfát-puffer

HEPES: N-(2-hidroxietyl)-piperazin-N-(etánszulfonsav)

EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

DTT: 1,4-dithiothreitol

SDS: szódium-dodecil-szulfonát

PMSF: fenilmetil-szulfonil-fluorid

NADPH: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

BSA: bovine serum albumin - marha szérum fehérje

RONS: reaktív oxigén és nitrogén eredetű szabad gyökök

ROS: reactive oxygen species- reaktív oxigén gyökök

GSH: glutation redukált forma

GSSG: glutation oxidált forma

CO: szén-monoxid

O₂: oxigén

Fe³⁺: három vegyértékű ferri vas

NO: nitrogén-monoxid

iNOS: indukálható nitrogén-monoxid szintetáz
NF-κB: nukleáris faktor-kappa B
IL-1: interleukin 1
IL-1β: interleukin-1β
IL-1ra: interleukin 1 receptor antagonist
IFN-γ: interferon-γ
IL-6: interleukin 6
IL-10: interleukin 10
AP-1: aktivátor protein 1
PDTC: pirrolidin dithiokarbamát
HTAB: hexadeciltrimetilammónium-bromid
BVR: biliverdin reduktáz
SER: sima felszínű endoplazmatikus retikulum
RER: durva felszínű endoplazmatikus retikulum
MAPK: mitogén aktivált protein kináz
JNK: Jun N-terminális kináz
cGMP: ciklikus guanozin monofoszfát
ERK: extracelluláris szignál által regulált kinázok
ERK1/2: extracelluláris szignál által regulált kináz 1/2
HsF1: hősokk transzkripció faktor 1
HSP70: hősokk protein 70
MIP1α: macrophage inflammatory protein 1α– makrofág gyulladásszerű fehérje 1α
NrF2: NF-E2 nukleáris kapcsolt faktor-2
Keap1: Kelch ECH asszociációs protein 1
Hif-1: hipoxia indukált faktor 1
Bach-1: HO-1 transzkripció represszor
NAC: N-acetil-cisztein
DFO: desferrioxamin
LPS: lipopoliszacharid
C5a: anafilatoxin
TLR: toll-like receptor
MD2, CD14: sejtfelszíni fehérjék
MyD88: mieloid differenciációs faktor 88
IRAK: interleukin 1 receptorhoz kapcsolt kináz

TRAF6: TNF receptorhoz kapcsolt faktor 6

IKK α/β : IkappaB kináz α/β

TLR2: toll-like receptor 2

SIRS: systemic inflammatory response syndrome – szisztémás gyulladásoos válasz szindróma

Nod: nukleotid-kötő oligomerizációs domén

sTNFR: szolubilis TNF receptor

PGN: peptidoglükán

GM-CSF: granulocita kolónia stimuláló faktor

BG +/-: Gram +/- baktériumok

OmP: outer (külső) membrán protein

DNA: DNS – dezoxiribonukleinsav

LBP: lipopoliszacharid binding protein

sCD14: szolubilis CD14

PGRP: peptidoglükán felismerő fehérje

p65/p50: NF- κ B aktív forma

PKR: protein kináz R

MKK3/6: p38 MAPK aktivátor

CREB: cAMP-reszponzív elem kötő fehérje

CRE: cAMP reszponzív elem

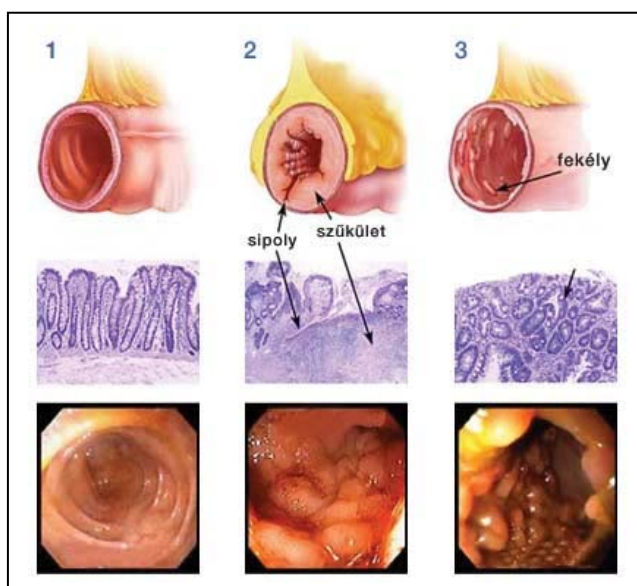
Sp1: stimuláló fehérje 1, transzkripcióo faktor

PPAR γ : peroxiszóma proliferator aktivált receptor γ

II. TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

A gyulladásos bélbetegségekről és típusaikról általában

Napjaink gyakori betegségei közé tartoznak a különböző gyulladásos eredetű bélbetegségek. Szinte a világ valamennyi országában találkozhatunk ilyen típusú megbetegedésekkel. Érdekes, hogy Európában az ilyen típusú betegségek előfordulása északon gyakoribb, mint délen. Ezekre a betegségekre jellemző, hogy sokkal gyakrabban alakulnak ki 15-25, illetve 55-65 év között, mint más életkorban. A gyulladásos bélbetegségeknek két alapvető formája ismeretes. Az egyik a colitis ulcerosa, amely csak a vastagbelet támadja meg, és a gyulladásos reakció csak a nyálkahártyára lokalizálódik, a másik pedig a Crohn betegség. Burrill Crohn amerikai belgyógyász 1932-ben írta le ezt a gyulladásos bélbetegséget, melynek névadója lett (Crohn, 1932). A két betegség elkülönítése és a pontos diagnózis klinikai, endoszkópos és szövettani jellegzetességeik alapján lehetséges (1. ábra).



1. ábra

Az egészséges (1), illetve a Crohn betegség (2) és a colitis ulcerosa (3) által érintett bél keresztmetszeti rajza és szövettani képe.

Az alsó sorban az endoszkópos vizsgálatok során készült kép látható.

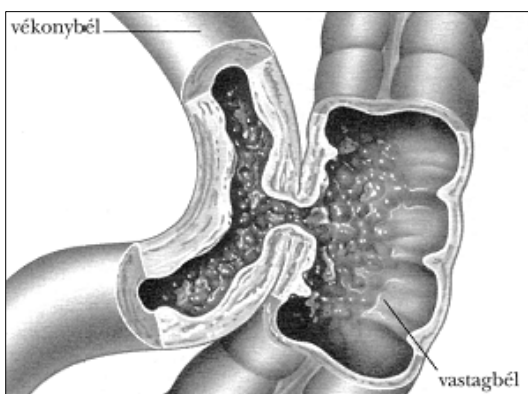
(forrás: http://crohn-colitis.hu/html/p1c_crohncolitis.php)

Colitis ulcerosában a gyulladáshoz vezető jelenségek csak a bél nyálkahártyájára és a submucosára korlátozódnak, míg Crohn betegség esetén a bélfal minden rétege érintett a mucosától a serosáig (transzmurális). A colitis ulcerosa csak a vastagbélben fordul elő, így ha szükségessé válik a vastagbél eltávolítása, végleges gyógyulás következik be. Ezzel szemben a Crohn betegség az emésztőrendszer egészét érintheti a szájtól a végbélig, ezért a gyulladt szakasz eltávolítása nem hoz gyógyulást, a betegség bárhol visszatérhet. Míg a colitis összefüggő gyulladást hoz létre, a Crohn betegségben gyulladt és ép bélszakaszok váltakoznak egymással. Mindezen különbségek ellenére bizonyos betegeknek (kb. az esetek 10 százalékában) nem lehetséges megkülönböztetni a két betegséget; őket a nem meghatározható colitis-csoportba sorolják.

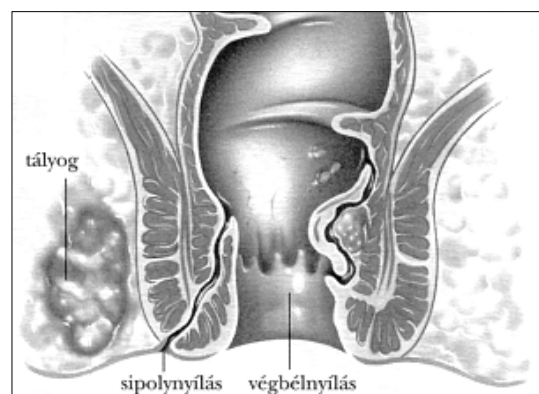
A Crohn betegség a gasztrointesztinális traktus bármely szakaszán előfordulhat, de leggyakrabban az ileum disztális részén, valamint a colonban jelentkezik. Előfordulási valószínűsége a béltraktus különböző szakaszai között a következő eloszlást mutatja: disztális ileum 35%, jobb colon 35%, colon 20%, vékonybél 5% illetve az egyéb bélszakaszokon szintén 5% (Hanauer, 1996). Leggyakoribb a vékony- és vastagbél együttes megbetegedése. A gyulladás szakaszosan alakul ki, ép és kóros területek váltakoznak. A betegség az esetek többségében 20 éves kor alatt kezdődik, de 10 éves kor alatt ritkán. Típusos tünet a fogyás, a hasi fájdalom, a hasmenés és a visszatérő lázas állapot (Selby, 2000). Krónikus betegség, lefolyása hullámzó, jó és rossz periódusok váltakoznak. A jó periódust (remisszió) relatív panaszmentesség, jó közérzet jellemzi. A visszaesés (relapszus) oka nem mindig ismert, bél- vagy egyéb fertőzés, bizonyos gyógyszerek (például reuma ellenes szerek), testi vagy lelki túlterhelés okozhatja. A betegség tünetei összefüggenek azzal, hogy a tápcsatorna mely része érintett.

A vékonybél bizonyos szakaszainak a betegsége fogyást és hasmenést, fontos tápanyagok felszívódási zavarát okozhatja (vas, B12-vitamin, fehérje, stb.). A vastagbél érintettsége esetén dominál a véres hasmenés. A fájdalmat a gyulladt bél rendellenes összehúzódása, görcse okozza. Ritkábban előfordul a nyelőcső vagy a gyomor gyulladása is. A lázat a bélfal mélyebb rétegeibe behatoló baktériumok okozzák. A vékonybelek gyulladása felszívódási zavart, tápanyaghiányt (fogyás, vérszegénység, fehérje-, só-, vitamin- és ásványianyag hiány), a gyermekek növekedésében és fejlődésében elmaradást okozhat. A betegségnek különböző szövődményei is lehetnek. Ezek lehetnek bél eredetűek és bélen kívüliek. Bél eredetű szövődményeknél a bélfal savós hártóját elérő gyulladás más szervekre (például húgyhólyag, méh), sőt ép bélszakaszokra is ráterjedhet. A savós hártók összetapadása következtében gyulladással járó gomolyag keletkezik, mely a hasfalon át tapintható. Később az összetapadt üreges szervek között járat keletkezhet, melyet sipolynak (fistula) nevezünk. Ilyen rendellenes közlekedés kialakulhat a bél és a húgyhólyag, két bélszakasz (2. ábra) vagy a bél ürege és a bőrfelület között (leggyakrabban a végbélnyílás körül) (3. ábra).

2. ábra Sipoly a vastag és vékonybél között



3. ábra Tályog és sipoly a végbél körül



Forrás: <http://www.ujdieta.hu/index.php?content=64>

A bélbaktériumok hatására tályog alakulhat ki a végbél körül vagy a szabad hasüregben. A gyulladás továbbá a bélüreg szűkületét (strictura) is okozhatja. A szűkület előtti bélszakasz egy idő múlva kifárad, kitágul, átérésztővé válik, és a bélfalon átjutó baktériumok hatására sipoly, tályog alakulhat ki (Hanauer, 1996).

A gyulladós bélbetegségek kialakulását befolyásoló tényezők

Ezeknek a típusú betegségeknek a pontos etiológiája a mai napig ismeretlen. Számos tényező hatását feltételezik a betegségek kialakulásában. Az egyre nagyobb számban rendelkezésünkre álló adatok azt mutatják, hogy több egymással kölcsönható tényező befolyásolhatja a kialakulásukat. Az egyik tényezőnek a genetikai hajlamot tekintik. A genetikai hajlamot számos környezeti tényező és genetikai faktor befolyásolhatja. A legfőbb környezeti befolyást a táplálkozás és a dohányzás jelenti (Koutroubakis et al., 1996; Somerville et al., 1984). A különböző környezeti hatásokon túl számos kísérleti eredmény és klinikai adat is bizonyítja azt a tényt, hogy a bélflóra jelentős szereppel bír a nyálkahártyagyulladás fenntartásában (Aranda et al., 1997; Kuhn et al., 1993). A nyálkahártyagyulladás kialakulásában és fenntartásában az említett tényezőkön túl lényeges szerepet tulajdonítanak a különböző immunfolyamatoknak is (Fiocchi, 1998), ezen belül is a különböző gyulladáskeltő citokinek és kemokinek nagymennyiségű felszabadulása, valamint az immunválaszban bekövetkező zavarok szintén befolyásolhatják a gyulladásos folyamatokat és ezáltal a betegségek kialakulását (Gaya et al., 2006; Hanauer, 2006; Papadakis, 2004; Rutgeerts et al., 2006). Feltehető, hogy veleszületett vagy az élet során szerzett

hajlamhoz társul valamilyen kiváltó tényező, például fertőzés, mely a lappangó hajlamot felszínre hozza.

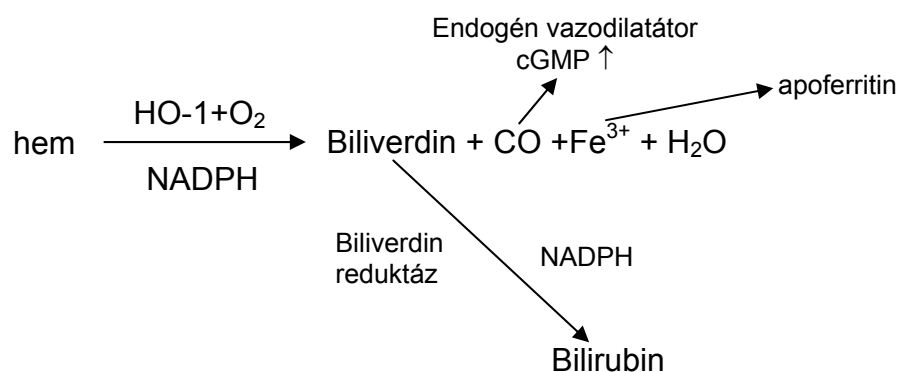
Az oxidatív stressz szerepe a gyulladásos bélbetegségekben

Az eddig említett befolyásoló tényezők mellett, meg kell említenünk egy másik fontos tényezőt, amelyet napjainkban is egyre inkább lényeges faktornak tekintenek. Kimutatták, hogy a bélepithelium károsodás kialakulásában az oxidatív stressz kulcsfontosságú faktor (Grisham, 1994). IBD-ben szenvedő betegekben és kísérletes állatmodellekben, ugyanis fokozott oxidatív stresszre utaló jeleket találtak a gyulladt nyálkahártyában és a keringő fagocita sejtekben. (Seo et al., 1995; Zingarelli et al., 1999) Az oxidatív stresszre jellemző, hogy a szervezetben reaktív oxigén- és nitrogén eredetű szabad gyökök képződnek nagy mennyiségben (reactive oxygen and nitrogen species [RONS]). A RONS termelődését fokozzák a gyulladást keltő faktorok, amelyekről kimutatták, hogy önmagukban és interakciójuk következményeképpen is súlyosbítják az IBD lefolyását és szerepet játszanak epitheliális és vaszkuláris sérülések kialakulásában a vastagbélben (Dryden et al., 2005; Grisham et al., 1990; McKenzie et al., 1996; Pavlick et al., 2002; Simmonds and Rampton, 1993). Ilyen gyulladáskeltő átvivő anyagoknak tekinthetjük a gyulladást keltő citokinineket, mint pl. a TNF- α , IL-6 (Sakaguchi et al., 1996) és az indukálható nitrogén-monoxid szintetáz (inducible nitric oxide synthase [iNOS]) enzim által képzett nitrogén-monoxidot (NO) (Chamulitrat et al., 1996; Singer et al., 1996). Ismeretes, hogy az NO és a szuperoxid szabadgyök kölcsönhatásából származó peroxinitrit erősen mérgező hatású, amely az IBD kialakulása során egyértelmű patológiás szerepet

játszik (Rachmilewitz et al., 1995). Meg kell említenünk, hogy a bélcsatorna sejtei önmaguk is termelnek RONS-t (Cavicchi et al., 1999; Hata et al., 1997; Salzman et al., 1996; Watson et al., 1994). Az oxidatív stressz az epitheliális sejtmembránok lipid rétegét oxidálva is kifejti károsító hatását. A tapasztalatok szerint a RONS képes aktiválni olyan transzkripciós faktorokat, mint a nukleáris faktor- κ B (NF- κ B) (Rogler and Andus, 1998), melyről kimutatták, hogy kulcsfontosságú szerepet játszik számos gyulladást keltő, de – érdekes módon, a körülményektől függően - csökkentő gén transzkripciójában is (Neurath et al., 1998).

Az antioxidáns hem-oxigenáz enzimrendszer feltételezett szerepéről

Az oxidatív stresszel összefüggésben elmondhatjuk, hogy különböző antioxidáns rendszerek, fontos szerepet játszhatnak a gyulladásokkal szembeni védelemben. Az egyik ilyen ismert rendszer a hem-oxigenáz enzimrendszer. A hem-oxigenáz enzimről ismeretes, hogy katabolizálja a hem átalakulását biliverdinné, amely a biliverdin reduktáz (BVR) hatására tovább alakul bilirubinná (Maines, 1997, 2005; Ryter et al., 2006) (4. ábra).



4. ábra
A hem-oxigenáz-1 hatásmechanizmusa

A hem-oxigenáz (HO) enzimcsaládnak három tagja van, az oxidatív stresszre indukálódó HO-1 (HSP32 a másik elnevezésének rövidítése, mivel a hősokk fehérjékhez tartozik), és a konstitutív izoenzimek a HO-2 és HO-3. (Maines et al., 1986). A HO enzimek különböző gének termékei. Elsődleges szerkezetükben, szabályozásukban és a szöveti eloszlásukban igen kevés a hasonlóság. Mindháromról kimutatták azonban, hogy katalizálják a hem-csoport oxidációját, amelynek során biológiailag aktív vegyületek szabadulnak fel: a vas (génregulációban vehet részt), a biliverdin (antioxidáns hatású) és a szén-monoxid (CO, a hem-csoport ligandja).

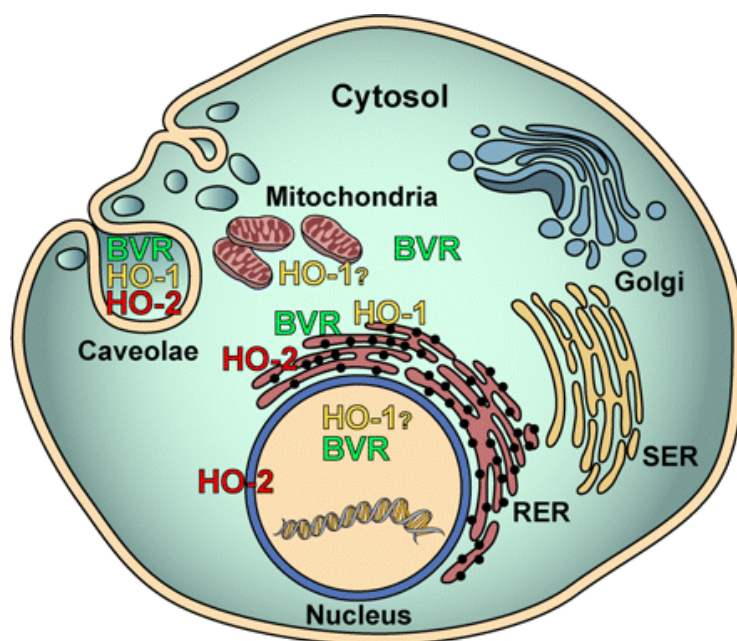
A reakció során keletkező szén-monoxid és bilirubin antioxidáns tulajdonságú, továbbá a CO csökkenti a gyulladáskeltő citokininek szintjét (Otterbein et al., 2000). A NO és a CO termelő rendszerek működése között sok hasonlóság figyelhető meg, és a szabályozásuk is szorosan kapcsolódik (Maines, 1997).

Az induktív HO-1 a szervezet nagy részében expresszáldik oxidatív stresszt kiváltó ingerek hatására. A konstitutív HO-2 idegi elemekben, illetve az érendotélium sejtjeiben található meg, és az általa termelt CO jelenlétét kimutatták az erekben. Az érendotéliumból felszabaduló CO az érfal simaizomrétegébe diffundálva, a NO hatásától függetlenül, a cGMP képződés serkentése révén relaxációt vált ki, és ezáltal szabályozza a rezisztenciaerek átmérőjét (Kozma et al., 1999; Tschugguel et al., 2001). *In vitro* vizsgálatokban azt is kimutatták, hogy a HO-1 működése során termelődött bilirubin javítja a postischemiás miokardiális diszfunkciót (Clark et al., 2000), és javítja a szívfunckiót ischemia-reperfúziót követően, amely feltehetően antioxidáns tulajdonságának köszönhető (Csonka et al., 1999).

A HO-2 enzim expresszióját intrakardiális neuronokban is kimutatták (Hassall and Hoyle, 1997). Megfigyelték, hogy a HO-2 révén felszabaduló bilirubin védi a neuronokat az oxidatív stressztől (Dore et al., 1999). Úgy tűnik, hogy az endotéliumban, illetve a neuronokban található HO-2 aktivitása szerepet játszik az erek érendotélium-függő fiziológiás relaxációjában (Zakhary et al., 1996).

A HO-3 szintén konstitutív izoforma, melyet számos szövetben leírtak már – máj, szív, vese, agy, here (McCoubrey et al., 1997; Naito et al., 2004), de a pontos biológiai funkciója ismeretlen (Wu and Wang, 2005). Amellett, hogy a HO-3 90%-os homológiát mutat a HO-2 enzimmel, a katalitikus aktivitása alacsonyabb (Wunder and Potter, 2003).

A HO-1 enzimet számos sejtfeleség termelheti (Maines, 1997). A HO enzimek sejten belüli elhelyezkedését mutatja az 5. ábra (Ryter et al., 2006).



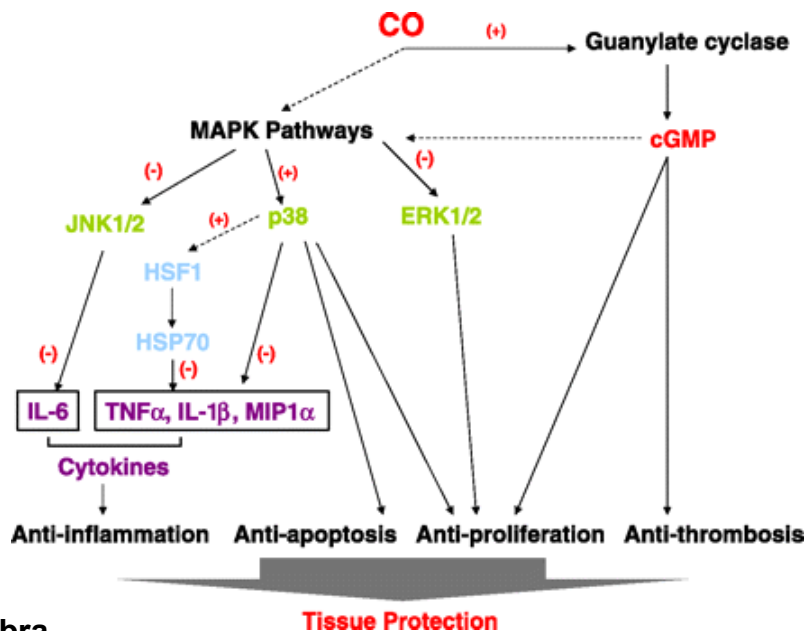
5. ábra

A hem-oxigenáz enzimek szubcelluláris elhelyezkedése. (Ryter et al., 2006)

BVR: biliverdin reduktáz, RER: durva felszínű endoplazmatikus retikulum,
SER: sima felszínű endoplazmatikus retikulum.

A HO-1 enzim különböző stimulusok hatására képes expresszálni. Ilyen hatások például a hem, vagy annak oxidációs terméke a vas, illetve a hemin, a nitrogén-monoxid, a reaktív oxigén gyökök valamint a nehézfémek (Maines, 2005; Ryter et al., 2006; Tsiftoglou et al., 2006).

A HO-1 tulajdonképpen egy antioxidáns enzim (Applegate et al., 1991), mivel csökkenti a kifejezetten prooxidáns hatású hem képződését úgy, hogy ezáltal emeli a biliverdin és bilirubin szintet. Ezen hatása miatt képes csökkenteni a lipidperoxidáció mértékét (Maines, 1997; Nath, 2006; Stocker et al., 1987; Takahashi et al., 2004). A HO-1 képes a hemet átalakítani biliverdinné, szén-monoxiddá (CO), és szabad vas ionná. Kimutatták, hogy a szén-monoxid szintén rendelkezik gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal, a gyulladáskeltő citokinek expressziójának gátlása révén (Gibbons and Farrugia, 2004; Kirkby and Adin, 2006; Otterbein et al., 2003; Ryter et al., 2006; Wu and Wang, 2005) (6. ábra).



6. ábra

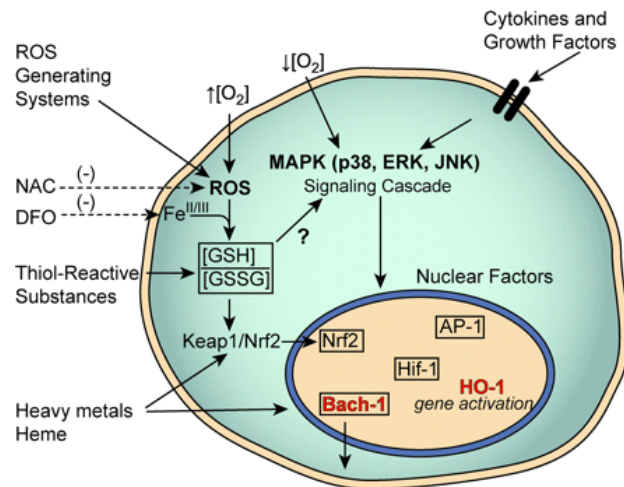
A CO feltételezett szerepe a szöveti károsodás elleni védelemben. (Ryter et al., 2006)

A protektív hatást eddig két fő vonalon feltételezik. Az egyik során a cGMP serkentése révén szabályozza a NO hatásait, a másik révén pedig a MAPK szignálon keresztül csökkenti a gyulladáskeltő citokinek hatását.

cGMP: ciklikus guanozin monofoszfát, MAPK: mitogén aktivált protein kinázok (p38, JNK1/2, ERK1/2), JNK: Jun N-terminális kináz, ERK: extracelluláris szignál által regulált kinázok, HSF1: hő sokk transzkripció faktor 1, HSP70: hő sokk protein 70, IL-6: interleukin 6, TNF α : tumor nekrozis faktor alfa, IL-1 β : interleukin 1 β , MIP1 α : makrofág gyulladáshoz köthető fehérje 1 α .

A korábbi munkák során bizonyítást nyert az a tény, hogy a gyulladási folyamatok során termelődő HO-1 gyulladáscsökkentő folyamatokat képes indukálni. A HO-1 indukció gátlásával a gyulladási folyamat súlyosbodását tapasztalták (Willis et al., 1996; Willis et al., 2000). Hasonló eredményeket kaptak kísérletes colitis modellben is, ahol a HO-1 gátlószere, az ón-protoporfirin (SnPP) csökkentette a HO aktivitást, és fokozta a gyulladás mértékét 6-72 órás időintervallumban, a trinitrobenzén-szulfonsav (TNBS) beadását követően (Wang et al., 2001). Ezek az eredmények számos HO-1 indukcióját kiváltó anyag alkalmazásával megerősítésre kerültek más colitis modellekben is (Berberat et al., 2005; Hegazi et al., 2005; Paul et al., 2005).

Sokfajta stimulus növelheti a HO-1 enzim aktivitását, mint például a gyulladást keltő citokinek (Chamulitrat et al., 1996), a hem (Cable et al., 1993), egyes nehézfémek (Maines and Kappas, 1977), de a NO donorok (Durante et al., 1997), a reaktív oxigén donorok (Kim et al., 1995; Vesely et al., 1998) és a peroxinitrit is hasonló tulajdonságú (Foresti et al., 1999). A transzkripcionális kontroll valószínűleg magába foglal olyan fémérzékeny peptideket, mint a NF- κ B és az aktivátor fehérje-1 (activator protein-1 [AP-1]) (Alam, 1994; Alam and Den, 1992; Lavrovsky et al., 1994; Mitani et al., 1993). Ezen kívül a glutation (GSH) szabályozni képes az AP-1 és az NF- κ B indukcióját (Piette et al., 1997; Pinkus et al., 1996) (7. ábra).



7. ábra
HO-1 feltételezett aktivációja (Ryter et al., 2006)

Az ábra azokat a feltételezett kapcsolatokat mutatja, melyek a HO-1 transzkripciójához vezetnek. A ROS valószínűleg a GSH/GSSG arány változtatása révén hat a HO-1-re. A stressz és a citokinek pedig valószínűleg a MAPK kinázon keresztül fejtik ki hatásukat.

ROS: reaktív oxigén gyökök, GSH: redukált glutation, GSSG: oxidált glutation, MAPK: mitogen aktivált protein kináz, ERK: extracelluláris szignál által regulált kinázok, JNK: Jun N-terminális kináz, Nrf2: NF-E2 nukleáris kapcsolt faktor-2, Hif-1: hipoxia indukált faktor, AP-1: aktivátor proten-1, Bach-1: HO-1 transzkripció represszor, NAC: N-acetil-cisztein, DFO: desferrioxamin, Fe: vas, O₂: oxigén

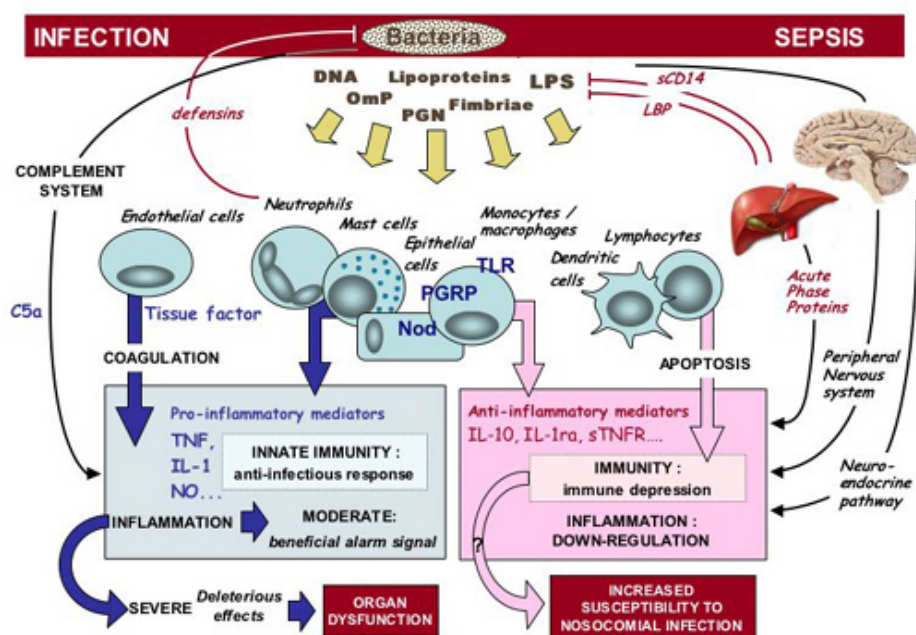
Érdekes módon az antioxidáns tulajdonságú, NF-κB gátló, pirrolidin dithiokarbamát (PDTC) maga is képes indukálni a HO-1 enzimet (Hartsfield et al., 1998). A kurkumin pedig antioxidáns hatását az NF-κB aktivitásának gátlásán, és a HO-1 enzim mennyiségének fokozásán keresztül fejt ki (Jobin et al., 1999; Motterlini et al., 2000). Az előzetes vizsgálatok igazolták a HO-1 enzim expresszióját IBD-ben (Barton et al., 1999). Nehézfém vagy NO donorok adása után a HO-1 indukciója humán epitheliális sejt kultúrában is kimutatható volt (Cavicchi et al., 1999). Figyelemre méltónak tartható az a megfigyelés, hogy az oxidatív stressz szintje önmagában is szabályozza a HO-1 enzim expresszióját. A HO-1 enzim indukciója pro-oxidánsokkal (NO donorok, hem) fokozható, antioxidánsokkal (GSH, E vitamin) pedig csökkenthető (Ito et al., 1997).

A gyulladási folyamatokban szerepet játszó citokinekről

A gyulladási folyamatokat kiválthatják közvetlenül a fertőzéseket okozó baktériumok (Gram negatív vagy pozitív), vagy a molekuláris termékeik, mint pl. az *Escherichia coli* endotoxinja (lipopoliszacharid-LPS). Az utóbbi folyamatokat hívják systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-nek.

A gyulladási folyamatok során a neutrofil sejtek és az endothél sejtek jelentős mennyiségű gyulladást keltő citokineket (IL-1, IL-6, TNF-alfa) kezdenek termelni.

A szervezet védekezése során számos gyulladáscsökkentő citokin is képződik a monocitákban, makrofágokban és a limfocitákban. Ilyen pl. az interleukin 10 (IL-10) (Adib-Conquy et al., 2001) (8. ábra).



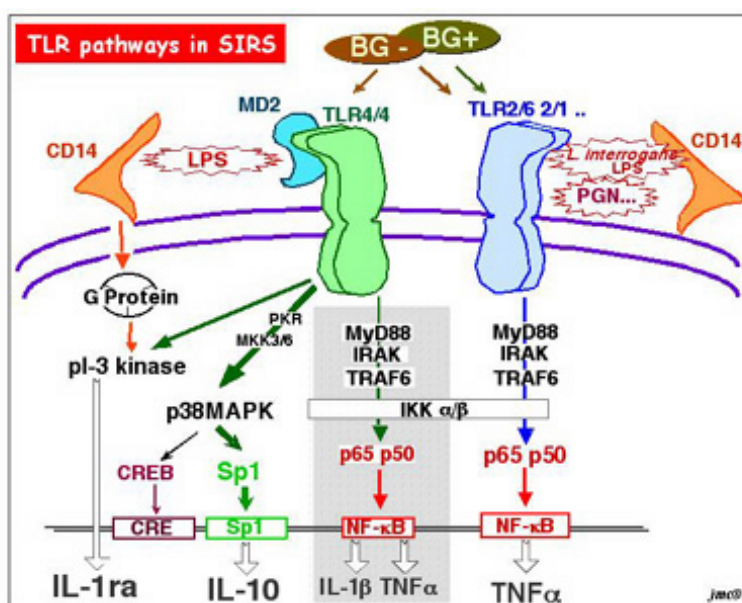
8. ábra

A fertőző ágensek hatása a citokin termelésre (Annane et al., 2005).

Lipoproteinek; OmP: outer (külső) membrán protein; PGN: peptidoglükán; LPS: lipopoliszacharid; LBP: lipopoliszacharid binding protein; sCD14: szolubilis CD14; C5a: anafilatoxin; TLR: toll-like receptor; PGRP: peptidoglükán felismerő fehérje; Nod: nukleotid-kötő oligomerizációs domén; TNF: tumor nekrozis faktor; IL-1: interleukin 1; NO: nitrogén-monoxid; IL-10: interleukin 10; IL-1ra: IL-1 receptor antagonist; sTNFR: szolubilis TNF receptor

Gyulladásos folyamatok alatt megnő a NF- κ B aktív p65/p50 izoformájának a mennyisége. A felborult izoforma arány pedig gyulladáskeltő citokinek termelését indukálja. A szervezetben a gamma interferon (IFN- γ) valamint a granulocita kolónia stimuláló faktor (GM-CSF) hatására csökken a szervezet endotoxinnal szembeni érzékenysége (9. ábra).

A szervezet számos védekező rendszere, pedig beindítja a gyulladáscsökkentő citokinek (pl.: IL-10) termelését is. A HO-1-ről kimutatták, hogy gátolja a TNF- α termelését számos modellben, valamint serkenti a monociták IL-10 termelését is. (Petit-Bertron et al., 2003; Petit-Bertron et al., 2005) (9. ábra).



9. ábra

Endotoxinok hatása a citokinin termelésre (Adib-Conguy and Cavillon, 2002)

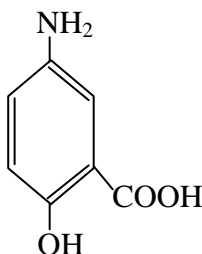
TLR: toll-like receptor; SIRS: systemic inflammatory response syndrome; BG-: Gram negatív baktérium; BG+: Gram pozitív baktérium; LPS: lipopoliszacharid; MD2, CD14: sejtfelszíni fehérjék; MyD88: mieloid differenciációs faktor 88; IRAK: interleukin 1 receptorhoz kapcsolt kináz; TRAF6: TNF receptorhoz kapcsolt faktor 6; IKK α/β : IkkappaB kináz α/β ; p65/p50: NF- κ B aktív forma; NF- κ B: nukleáris faktor kappa B; IL-1 β : interleukin 1 β ; TNF α : tumor nekrosis faktor alfa; PKR: protein kináz R; MKK3/6: p38MAPK aktivátor; p38MAPK: mitogén aktivált protein kináz; CREB: cAMP-reszponzív elem kötő fehérje; CRE: cAMP reszponzív elem; Sp1: stimuláló fehérje 1, transzkripció faktor; IL-10: interleukin 10; IL-1ra: interleukin-1 receptor antagonist

Alkalmazott gyógyszeres kezelések

A gyulladássos bélbetegségeknél alkalmazott gyógyszeres kezelések elsődleges célja a betegség tüneteinek enyhítése, a gyulladássos folyamat leállítása, az esetleges szövödmény (tályog, sipoly) meggyógyítása, és a gyógyult állapot (remisszió) fenntartása. A gyógyszeres kezelések módja a betegség súlyossága és megjelenésének helye szerint eltérő lehet. Az IBD kezelésében használatos gyógyszereknek öt fő csoportját különíthetjük el.

1. Szalicilsav-származékok

Az enyhe és közepsúlyos Crohn-betegség és colitis ulcerosa első vonalbeli gyógyszerei a különböző szalicilsav-származékok. Hatóanyaguk az 5-amino-szalicilsav (5-ASA) (10. ábra), amely egy aszpirinhez hasonló gyulladásgátló. Az 5-ASA-nak fontos szerepe van a gyulladássos bélbetegségek gyógyításában (Klotz, 1985). A bél nyálkahártyájával közvetlenül érintkezve fejt ki gyulladáscsökkentő hatását. Az aminoszalicilátok többféle gyógyszerben is megtalálhatóak. Ilyenek például a Salazopyrin, Dipentium, Pentasa és a Salofalk. Attól függően kerülnek alkalmazásra az adott gyógyszerek, hogy melyik bélszakaszon lépett fel a gyulladás.



10. ábra
Az 5-amino-szalicilsav képlete

Az amino-szalicilátok az enyhébb kórképekben mérséklik a tüneteket, és a tartós kezelés a gyógyulási szakaszban csökkenti a visszaesések számát. Az eredetileg (1939-ben) a rheumatoid arthritis kezelésére kifejlesztett sulfasalazin egy szulfonamid és egy 5-amino-szalicilsav alegységből áll, amelyek azo-kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. A molekula a vastagbélben a baktériumok hatására az aktív részt képviselő 5-amino-szalicilsavra és szulfapiridinre hasad (Peppercorn and Goldman, 1973). Ez utóbbi felszívódva a szulfonamidokra jellemző nemkívánatos mellékhatásokat okozhat (pl. hányinger, bőrkiütés, vérképzési zavarok, fejfájás, valamint a férfiak esetében reverzibilis infertilitás). Az 5-ASA a vastagbélben marad, ahol kifejti terápiás hatását. Egy újabb, kevésbé toxikus gyógyszer az 5-amino-szalicilátot tartalmazó enterosolvens mesalazin, valamint az olsalazin (azo-diszalicilát), amely azo-kötéssel kapcsolt két 5-amino-szalicilsav molekulából áll, és a baktériumok hatására az azokötés a vastagbélben felhasad (Banai, 2000; Kovacs, 1991). Az 5-amino-szalicilsav pontos hatásmechanizmusa egyelőre ismeretlen.

Irodalmi adatokat tanulmányozva az 5-ASA származékokról ugyanakkor elképzelhető, hogy vannak antioxidáns tulajdonságaik is (Ahnfelt-Ronne et al., 1990; McKenzie et al., 1999), amely szerintünk - legalábbis részlegesen - szerepet játszhat a HO-1 enzim indukciójában.

2. Kortikoszteroidok

A súlyosabb esetek kezelésének alapja a kortikoszteroidok alkalmazása. A kortikoszteroidok a legerősebb gyulladáscsökkentők. Az aminoszalicilsavakkal ellentétben, ezek az anyagok az egész szervezetben feloldódva fejtik ki hatásukat.

Az akut roham kezelésében a legfontosabb gyógyszerek. A leggyakoribb kortikoszteroidok közé tartozik a Prednisolon, a Metypred és a Medrol. Kisebb adagokban alkalmazva jobban tolerálhatók, de hosszabb távon súlyos mellékhatások (pl. idegesség, álmatlanság, felgyorsult csontvesztés, hypertonia, diabetes) alakulhatnak ki, amelyek korlátozzák a tartós kezelést (Malchow et al., 1984). Új, kevesebb mellékhatással bíró, lokálisan ható, a szisztémás keringésbe csak 10-20%-ban kerülő gyógyszerek hatóanyaga a budenozid (Budenofalk, Entocort). Az orális budenozid és a prednisolon egyformán hatásos, azonban a májon keresztül történő jelentős first-pass metabolizmusa és a vékonybél glükokortikoid-receptoraihoz való nagy affinitása miatt a budenosidnak kevesebb kedvezőtlen mellékhatása van (Lofberg et al., 1996).

3. Immun-szupresszorok

Az immun-szupresszorok azáltal mérséklék a fellépő gyulladást, hogy csökkentik az immunsejtek számát. Az IBD kezelésében használt leggyakoribb immun-szupresszorok az Imuran, a Methotrexat és súlyos esetben a Sandimmun. Ezeket, a gyógyszereket akkor alkalmazzák, ha a szteroidok nem bizonyulnak hatásosnak illetve, ha azok mellékhatásai jelentkeznek. Az immun-szupresszorok hátránya, hogy lassan fejtik ki hatásukat. A teljes hatás kifejtéséhez legalább három, de olykor hat hónapra van szükség. A fertőzésekkel szemben kevésbé ellenállóvá tett immunrendszer pedig számos fertőző betegség veszélyének van jobban kitéve.

4. Antibiotikumok

A gyulladások kialakulásában szerepet játszhatnak különböző baktériumok is. Az antibiotikumok az emésztőrendszerben elszaporodó baktériumok ellen hatásosnak bizonyultak, bár pontos hatásmechanizmusuk még nem ismert. A gyulladással járó bélbetegségek kezelésében a Klion, és a Ciprobay általában huzamosabb ideig alkalmazható, és infúzió formájában főként sipoly- és tályogképződés esetén kerül alkalmazásra.

5. Biológiai hatóanyagok

Az egyik legismertebb ilyen új hatóanyag az infliximab (Remicade), amelyet kifejezetten a Crohn betegség kezelésére fejlesztettek ki. Ez a szer egy TNF-alfa ellenes antitest, amely a szolubilis és a membránhoz kötött TNF-hez kapcsolódva blokkolja az immunsejtek fehérjetermelését, és ezáltal csökkenti a gyulladást. Ez a gyógyszer olyan esetekben alkalmazható, amikor a Crohn betegséget a fentebb említett gyógyszerek egyikével sem sikerült hatékonyan kezelni (Ardizzone and Bianchi Porro, 2005). Mivel ez a gyógyszer még új, nem tudható, hogy alkalmazása hosszú távon milyen mellékhatásokkal járhat.

A TNBS vastagbél gyulladási modell

A TNBS (2,4,6-trinitrobenzén-szulfonsav) modell jól reprodukálja számos, a Crohn betegekre jellemző makroszkópos, szöveti és immunológiai elváltozásokat, (Boughton-Smith et al., 1988a; Boughton-Smith et al., 1988b; Morris et al., 1989), így ez a modell széleskörűen használt és elfogadott az IBD tanulmányozásában (Morris et al., 1989; Sartor, 1997). Egyes eredmények arra is rámutattak, hogy a TNBS feltételezhetően különböző oxidatív lebontás során keletkező reaktív oxigénradikálokkal képes előidézni a gyulladást (Grisham et al., 1991). A HO rendszert már többen is vizsgálták gyulladási modellekben, de ebben a TNBS modellben még nem teljesen tisztázott a szerepe. (Rivera et al., 2006; Sun et al., 2001; te Velde et al., 2006; Torres et al., 1999; Wang et al., 2001; Whittle et al., 2003).

III. CÉLKITŰZÉS

Kísérleteink első részében arra kerestük a választ, hogy a jól ismert TNBS vastagbélgyulladásos modell alkalmazása során patkányokban

- hogyan változik a HO enzimek aktivitása és a HO-1 expressziója, az idő függvényében.
- a különböző HO indukcióját (hem, kadmium-klorid) és gátlását (ZnPP) kiváltó anyagok hatására ezen eredmények, illetve a gyulladásos paraméterek (lézió, MPO) hogyan módosulnak.

Munkánk következő szakaszában az IBD kezelésére használt klasszikus készítménynek, az 5-amino-szalicilsavnak (5-ASA) a hatásmechanizmusát tanulmányoztuk.

- Vizsgáltuk az 5-ASA hatását a TNBS okozta gyulladásos paraméterekre (léziók kiterjedése, colonsúly, MPO aktivitás, TNF- α szint).
- A következő lépésben az 5-ASA HO-1 enzim expressziójára és a hemoxigenáz enzim (HO) aktivitásra kifejtett hatását tanulmányoztuk.
- Végül megvizsgáltuk, hogy az 5-ASA hatását hogyan befolyásolja egy HO aktivitás gátló anyag (ZnPP). Itt is mértük a gyulladásos paramétereket (léziók kiterjedése, MPO aktivitás), valamint a HO aktivitást.

Munkánk során egy széles körben alkalmazott colitis modell hatásmechanizmusának vizsgálatával azt tűztük ki célul, hogy jobban megismerjük a gyulladásos folyamatokban résztvevő védelmi rendszer, a HO rendszer szerepét, és ezáltal pontosabb képet kapjunk a betegség enyhítésében potenciálisan szerepet játszó folyamatokról.

IV. MÓDSZEREK

Kísérletek menete, kezelések

Kísérleteinket két szakaszra osztottuk. Mindkét kísérletsorozat során 200-250 gramm közötti hím Wistar patkányokkal dolgoztunk. Az állatoknál a Crohn betegség gyulladós tüneteit jól reprodukáló TNBS modellt alkalmaztuk. Ennek során a gyulladást egy erős savval, a 2,4,6-trinitrobenzén-szulfonsavval (TNBS) (30 mg illetve 10 mg/ 250 µl 50 %-os etanol/állat) idéztük elő az állatoknál intracolónálisan (i.c.) egy 8 cm hosszú, polietilén kanül segítségével (Boughton-Smith et al., 1988a; Boughton-Smith et al., 1988b; Kiss et al., 1997; Morris et al., 1989; Whittle et al., 2003). Az állatok a TNBS kezelést megelőzően 12 órával éheztetve voltak.

A kísérletek első sorozatánál az állatok hem (30 µmol/kg), cink-protoporfirin (ZnPP; 50 µmol/kg), vagy kadmium-klorid (CdCl₂; 2 mg/kg) kezelést kaptak subcutan (s.c.) injekcióval 18 órával a TNBS (30 mg) kezelést megelőzően, a TNBS beadása előtt közvetlenül, valamint azt követően minden nap egyszer az 1-10 napos kezeléseknél. A hemet, a ZnPP-t először nátrium- hidroxidban (0,1 N) majd nátrium-kloridban (0,9 %) oldottuk fel és a pH-jukat 7.4-es értékre állítottuk be, úgy, hogy a törzsoldat koncentrációja 0,5 mg/ml legyen. A kadmium- kloridot desztillált vízben oldottuk fel.

Kísérleteink második részében 48 órás TNBS (10mg) modellt alkalmaztunk.

Az 5-ASA különböző dózisaival (8,3, 25, 75 mg/kg; 250 µl 1% carboxy methyl-cellulose (CMC)/nap; i.c.) a TNBS kezelést megelőzően 24 órával, 3 órával

és a TNBS kezelést követően 24 órával kezeltük az állatokat. A ZnPP (50 $\mu\text{mol/kg}$) a TNBS kezelést megelőzően 18 órával, közvetlenül a TNBS kezelést megelőzően és az azt követő napon végeztük el subcutan injekcióval.

Nyálkahártyagyulladás paramétereinek vizsgálata

Lézió meghatározás planimetriás analízissel

Minden csoportnál cervikális diszlokációt követően az állatok hasfalát felnyitva a végbéltől számított 8 cm-es szakaszt kivágtuk az állatokból, hosszanti irányban felvágtuk és hideg foszfát pufferben (pH 7.4) átmosva kifeszítettük. Minden ilyen bélszakaszról fényképet készítettünk digitális fényképezőgép (Samsung, Digimax 340) segítségével. Ezt követően a bélszakaszokat hosszanti irányban elvágtuk, lemértük a súlyukat és folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd a további vizsgálatokig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A bélszakaszokról készített képeken egy számítógépes program (Scion Image B 4.0.2) segítségével lemértük a keletkezett gyulladások százalékos kiterjedését, a 8 cm-es bélszakaszhoz viszonyítva.

Mieloperoxidáz aktivitásmérés

Különböző gyulladásos folyamatok jellemzésére használják a mieloperoxidáz (MPO) aktivitásmérést (Bradley et al., 1982). Ennek az enzimnek a mennyisége a neutrofil granulociták infiltrációjakor megemelkedik, és mennyisége jól jellemzi a gyulladások mértékét. A minták homogenizálását 0,5 % hexadeciltrimetilammónium–bromidot (HTAB), tartalmazó foszfát pufferben (50

mM, pH 6.0) végeztük. Ennek során a feldarabolt vastagbelet súlyarányosan (250 mg colon/1 ml puffer) hideg pufferban, Ultra Thurrax homogenizáló segítségével (2x30 másodpercig; 13000 rpm) homogenizáltuk. A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd 37 °C-os vízfürdőben felolvasztottuk. A fenti folyamatot háromszor megismételtük. Ezt követően a mintáinkat 15000 g-vel 15 percig 4 °C-on lecentrifugáltuk, és a felülúszót használtuk a mérésekhez. Az MPO méréseinkhez peroxidázt használtunk standardként (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; U/ml). A mérés során mikroplate-be tettünk 280 µl O-dianisidin-diHCl-t (0,167 mg/1 ml foszfát puffer). Ehhez adtunk a felülúszónkból vagy a standardunkból 12 µl-t, és a reakciót 10 µl 0,03 %-os hidrogén-peroxiddal indítottuk. 90 másodperces rázatás után 450 nm-n Eliza reader (Benchmark, BIO-RAD) segítségével mértük a kialakult színváltozásokat. Eredményeinket mU/g nedves szövet vagy mU/mg fehérjére vonatkoztattuk.

TNF-alfa szint meghatározás Eliza módszerrel

A TNF- α mennyisége gyulladások egyik legjellemzőbb paramétere, így alkalmas a gyulladások mértékének leírására (Ten Hove et al., 2001). Kísérleteinkben a Hycult biotechnology b.v. (Hbt) patkány TNF-alfa HK102-es számú Eliza kítet használtuk. A homogenizáláshoz Greenburger puffert (NaCl 300 mmol/l; TRIS 15 mmol/l; MgCl 2 mmol/l; Pepstatin-A 100 ng/ml; Leupeptin 100 ng/ml; Aprotonin 100 ng/m; pH 7.4) alkalmaztunk. A homogenizálást (Ultra Thurrax, 13000 rpm, 2x30 másodperc) ötszörös volumenű hideg pufferben végeztük. Ezt követően 30 percig 10000 g-vel 4 °C-on lecentrifugáltuk mintáinkat. A méréshez a felülúszót használtuk. A mérésnél a fenti kithoz küldött protokoll

alapján elkészítettük a szükséges oldatokat. A reakció első lépéseként a kapott plate-ekre felvittük a TNF-alfa standardjeinkből és az ötszörösen hígított mintáinkból 100-100 µl-t. 2 órás 37 °C-os inkubálás után a plate-ek aljára rögzített elsődleges antitest megkötötte a mintáinkban jelen levő TNF-alfát, majd a felesleges oldatot háromszori mosással eltávolítottuk. A második lépésben a biotinilált TNF-alfa elleni antitesttel (100 µl) 1 órán keresztül szobahőn végeztünk inkubációt. Háromszori mosás után streptavidin-peroxidáz konjugátum (100 µl; 1 óra szobahőn) alkalmazása, majd újabb háromszori mosás után tetramethylbenzidine (TMB) szubsztrát (100 µl, 25 perc 25 °C, sötétben) felvitele következett. A reakciót citromsav (100 µl) oldattal leállítva, 450 nm-en végeztük el a mérést. Eredményeinket pg/mg fehérjére vonatkoztattuk.

HO-1 enzim expressziós vizsgálat

A hem-oxigenáz enzim expressziójának mérését Western blot segítségével végeztük (Chomczynski and Sacchi, 1987; Essig et al., 1997). Mintáinkat Tris-mannitol pufferrel (2 mM Tris 7-9; 50 mM Mannitol; 100 µM Fenil-metil-szulfonil-fluorid; 2,0 µM Leupeptin; 0,5 mU/ml Aprotinin; 0,5 % TritonX100) homogenizáltuk (Ultra Thurrax, 13000 rpm, 2x30 másodperc) jégen. Ezt követően a mintákat 20 percig, 12000 g-vel 4 °C-on centrifugáltuk. A felülúszót használtuk a méréseinkhez. A mintáinkat 1:1 arányban hígítottuk (20 mM Tris 7-9; 3 mM EDTA; 2 % SDS; 10 % β-merkaptotanol; 20 % glicerol), majd denaturáltunk (100 °C-os vízfürdő, 3 perc). A 25 µg fehérjét tartalmazó mintákat ezt követően 10 %-os SDS-poliakrilamid gélen megfutattuk (100 V, 50 mA/gél), és nitrocellulóz membránra (Hybond ECL Nitrocellulose membrán, Amersham, Pharmacia Biotech.,

Buckinghamshire, UK) transzferáltuk át (100 V, 100 mA/gél, 2 óra). A 2 órás blokkolást (PBS pH 7.4; 0,25%-os Tween 20, 5%-os sovány tejpor) követően a HO-1 monoklonális antitestet (1/10000; 2 óra, 25 °C) (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada) alkalmaztuk. Az inkubáció után PBS-tween 20-as oldattal mostuk a membránt (3x15 perc). Ezt követően torna-peroxidázzal kapcsolt egér antitesttel (1/2000; 1 óra; 25 °C Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Ca, USA) végeztünk inkubációt. Ismételt mosás után a membránokat egy kemilumineszcens rendszer (ECL+Plus, Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK) segítségével láthatóvá tettük és Hyperfilmre (Biomax light-1, Eastman Kodak Comp. Rochester, New York) exponáltuk. A denzitásokat egy számítógépes program (ImageQuant Software; Amersham Pharmacia Biotech., Buckinghamshire, UK) segítségével analizáltuk, miután a GelAnalyst 3.01 Software (Iconix, Toronto, Canada) használatával beszkeneltük. Eredményeinket százalékos változásokban is kifejeztük.

HO enzim aktivitásmérés

A hem-oxigenáz aktivitásmérésnél Tenhunen módszerén változtatva (Tenhunen et al., 1968) a hem átalakulása során keletkező bilirubin szintet mértük spektrofotometriás módszerrel. A minták homogenizálását (Ultra Thurrax, 2x30 sec, 13000 rpm) négyszeres volumenű pufferben (10 mM HEPES; 32 mM szacharóz; 0,1 mM EDTA; 10 µg tripszin inhibitor; 10 µg Leupeptin; 10 µg Aprotonin; 1 mM DTT; pH 7.4) végeztük 4 °C-on. Ezt követően a mintákat lecentrifugáltuk 15 percig 15000 g-vel 4 °C-on, majd a felülúszóval dolgoztunk. A reakció során 1,25 ml inkubáló oldatot (100 mM KH_2PO_4 ; 2 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1

mM PMSF; 10 µg tripszin inhibitor; 10 µg Leupeptin; 10 µg Aprotinin; 0,1 mM DTT; 2 mM glükóz-6-foszfát; 0.14 U/ml glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz; 120 µg/ml biliverdin-reduktáz; 15 µM hemin, pH 7.4) használtunk. A mérésnél 150 µl minta felülúszót alkalmaztunk. A reakciót 100 µl NADPH (150 µM)-val indítottuk, és 1 órán keresztül 37 °C-os vízfürdőben végeztük. Ezután a mintákat jégre helyezve állítottuk le a reakciót. A méréshez bilirubin oldatot használtunk standardként (58,47 µg/ml; 10 µM). A vak csoportot (NADPH mentes reakció elegy) azonnal lemértük. A mérések 464 és 530 nm-en történtek. A mérések eredményeinél a NADPH-s csoport értékeiből levontuk a vak csoport adatait. Eredményeinket nM Bilirubin/mg fehérjére vonatkoztattuk.

Fehérjetartalom mérés

A fehérjemérésnél Bradford módszerét alkalmaztuk. (Bradford, 1976)

Itt a standard sorunkhoz (0-12 µg/ml) BSA-t (bovine serum albumin) használtunk. Mintáinkból a szükséges hígítás (25x vagy 50x) után 20 µl-t tettünk 980 µl desztillált vízhez, ezután mind a standard sorhoz, mind pedig a mintáinkhoz 200-200 µl Bradford reagenst adtunk. A reakció 5 perc után stabilizálódik és 1 órán keresztül felhasználható mérésre. 200-200 µl-t tettünk a plate-be és 595 nm-en fotometráltunk. Eredményeinket mg/ml fehérjekoncentrációban adtuk meg.

Statisztikai analízis

Eredményeink értékelése során a kétmintás student „t” tesztet és a Bonferoni teszteket alkalmaztuk.

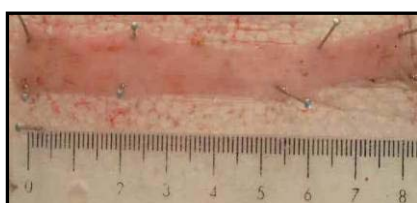
Alkalmazott vegyszerek

A további vegyszereket a Sigma-Aldrich cégtől rendeltük.

V. EREDMÉNYEK

A TNBS okozta makroszkópos elváltozás patkány vastagbélben

A patkányok vastagbelében a vizsgált 8 centiméteres szakaszon súlyos, és nagy mértékű fekélyes gyulladás alakult ki TNBS kezelés hatására, amely makroszkóposan is jól látható a kontroll állapothoz képest. A gyulladások transzmurálisan, általában a rectális végtől (0 cm) a bél első 5-6 cm-ig terjedtek. (11. ábra).



kontroll



TNBS kezelt

11. ábra

TNBS hatása a colon nyálkahártyájára

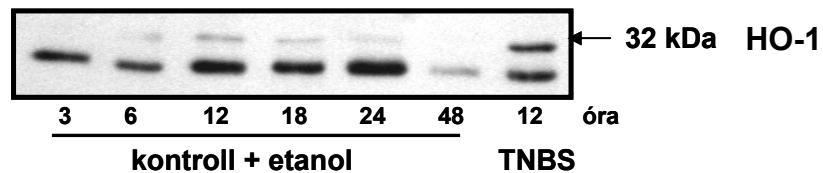
A TNBS kezelés hatására nagy kiterjedésű, fekélyes gyulladás alakult ki a vizsgált bélszakaszon.

Etanol illetve TNBS hatása a HO-1 expressziójára és a HO aktivitásra

Kísérleteink első szakaszában megnéztük, hogy a TNBS oldószere az etanol, valamint maga a TNBS hogyan befolyásolja a HO-1 expresszióját és a HO aktivitást. Itt szeretném előljáróban felhívni a figyelmet arra, hogy a HO-1 expressziós képe minden esetben egy kettős jel formájában detektálható, ahol az egyiket 32 kDa-nál, míg a másikat 27 kDa-nál láthatjuk. Feltételezhetően a 27 kDa

egy degradációs termék lehet, amit az irodalmi eredmények is igazolnak (Carraway et al., 1998).

A méréseink során azt tapasztaltuk, hogy az etanol önmagában is növekedést idézett elő mind a HO-1 expressziójában, mind a HO aktivitásban. Etanol kezelés után a kontroll állatokban az expresszió 12 óránál érte el maximális értékét, de 48 óra után már nem volt detektálható a HO-1 fehérje. (12 ábra).

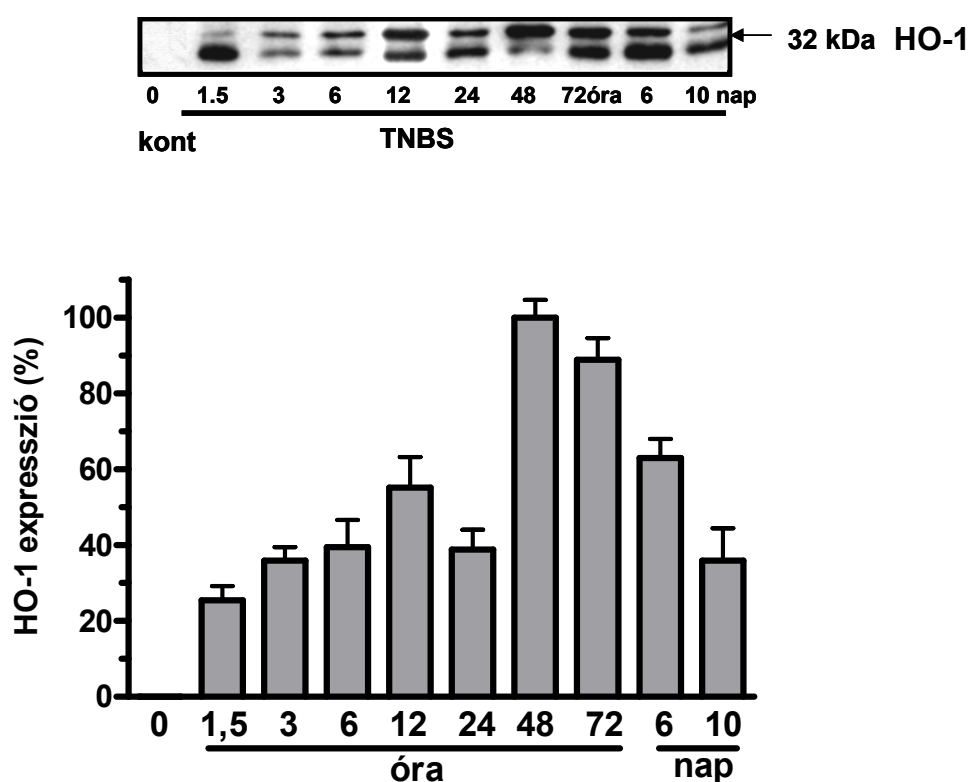


12. ábra

Etanol illetve TNBS hatása a HO-1 fehérje expressziójára

Etanol kezelés hatására 12 óránál tapasztaltuk a maximális hatást, mely 48 óránál már nem volt kimutatható.

A TNBS adását követően már 1,5 órával detektáltuk a HO-1 expresszióját, ami 12 óránál érte el első maximumát, majd átmeneti csökkenés (24 óra) után 48 óránál adott egy csúcsot, és ezt követően a 10. napig folyamatos csökkenést mutatott (13. ábra).



13. ábra

TNBS hatása a HO-1 expresszióra

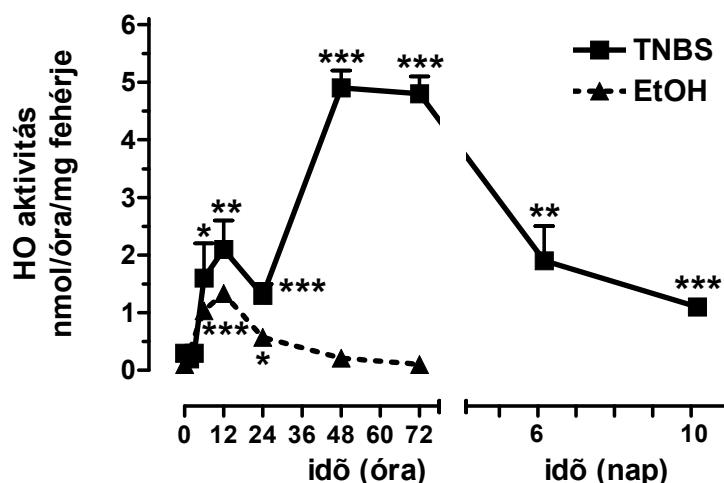
Az ábra felső részén egy reprezentatív Western blot kép látható.

Az ábra alsó részén %-os értékben jelenítettünk meg 5 denzitometriás analízis alapján az értékeket. A 100%-nak a maximális expresszió értéket vettük (48 óra).

A TNBS kezelés után egy átmeneti csúcsot követően (12 óra), a HO expresszió 48 óránál érte el a maximumát.

A 1,5 óra és 10 nap közötti eredmények szignifikánsak ($P < 0.001$) a 0 perces időponthoz képest.

Az etanol kezelés hatására megemelkedett a HO aktivitás is, amely 12 óránál szintén elért egy maximum értéket. A HO aktivitás 12 óra után fokozatos csökkenést mutatott etanol kezelés hatására, és 72 óránál már az alapértékre csökkent. TNBS kezelés után egy gyors emelkedést tapasztaltunk, mely első maximumát szintén 12 óránál érte el. Egy rövid csökkenés után 48 óránál tapasztaltuk a maximális hatást, ami 72 óráig nem változott. A HO aktivitás jelentősen lecsökkent a 10. napra (14. ábra).



14. ábra

Etanol illetve TNBS hatása a HO-aktivitásra

Etanol kezelés után csak egy rövid ideig tartó aktivitás emelkedést tapasztaltunk, mely 12 óránál érte el maximumát. TNBS kezelés után a maximális hatást 48 és 72 óra között figyeltük meg.

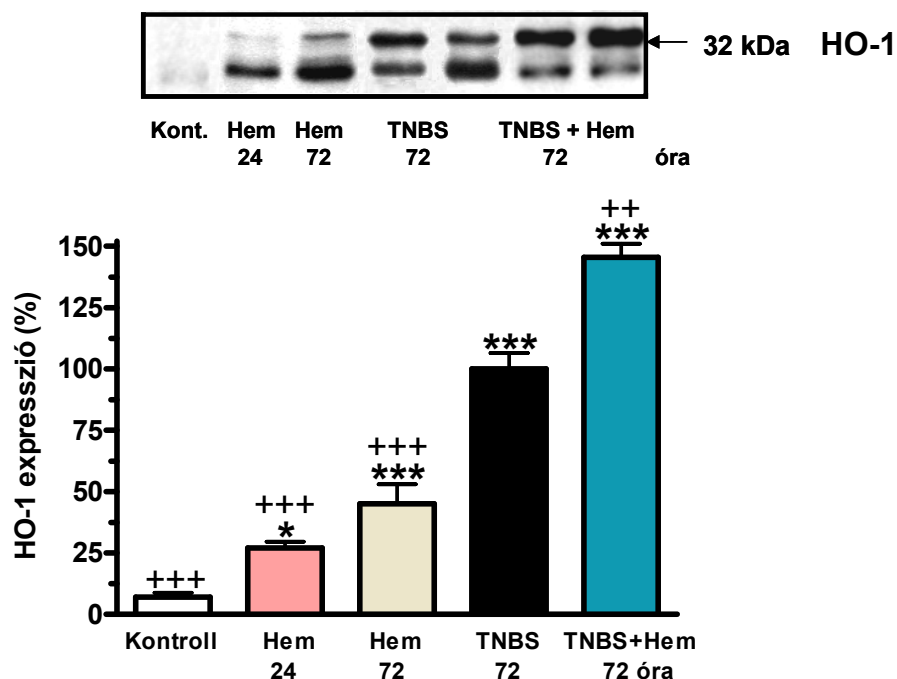
Szórás \pm S.E.M.; n=5; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 az abszolút kontroll állatokhoz viszonyítva.

A HO aktivitásban bekövetkező változások hasonló képet mutattak az expressziós eredményekkel. Kontroll állatok esetében 0,3 nmol/óra/mg értéket mértünk, ami a TNBS beadását követően 6 óránál már szignifikáns emelkedést mutatott, és a 2. napnál elérte a $4,9 \pm 0,3$ nmol/óra/mg fehérje maximum értéket. Ahogy az expressziós eredményeknél, itt is egy kétlépcsős emelkedést figyelhattunk meg.

A TNBS kezelést követően 12 óránál az aktivitás értéke $2,1 \pm 0,5$ nmol/óra/mg volt, ami ezt követően 24 óránál lecsökkent $1,3 \pm 0,5$ nmol/óra/mg értékre, és 48 óránál ismét megemelkedett. 72 óra elteltével ez a magas érték megmaradt, és fokozatosan $1,1 \pm 0,1$ nmol/óra/mg értékre csökkent a 10. napra (14. ábra).

Hem hatása a HO-1 expressziójára

Abszolút kontroll állatokhoz képest, hem kezelést követően 24 óra elteltével szignifikánsan megemelkedett a HO-1 expressziója a vastagbélben. Ez az emelkedés 3 nap elteltével tovább fokozódott. TNBS kezelés hatására 3 nap után jelentős mértékű HO-1 expressziót figyeltünk meg. Hem előkezelés hatására a TNBS csoporthoz képest szignifikáns HO-1 expresszió emelkedést tapasztaltunk. (15. ábra).



15. ábra

Hem és TNBS hatása a HO-1 expressziójára

Az ábra felső része a Western blot eredményekből egy reprezentatív képet mutat. Az ábra alsó része 5 kísérlet denzitometriás értékeit mutatja. A 100%-ot a TNBS által kiváltott maximális expresszió adja.

Hem kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a HO-1 expresszió. A TNBS kezelés után megnőtt expresszió szintet a hem előkezelés szignifikánsan tovább fokozta.

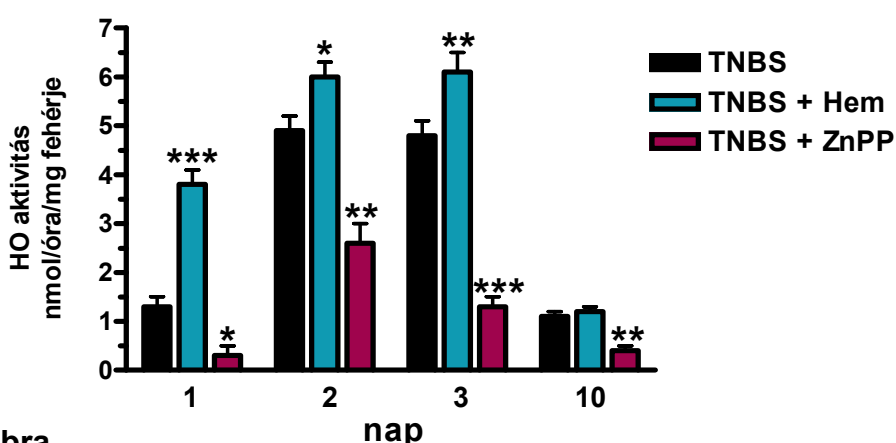
Szórás \pm S.E.M.; n=5; *P<0.05, ***P<0.001 a kontroll csoporthoz viszonyítva; **P<0.01, ***P<0.001 a TNBS kezelt állatokhoz viszonyítva.

A HO aktivitás indukciója kadmium-kloriddal

A kadmium-klorid kezelést (18 órával, és egy alkalommal közvetlen a TNBS kezelést megelőzően) követően szignifikánsan csökkent a gyulladások kiterjedése ($69 \pm 7\%$ gátlás, $n=8$; $P<0,05$) és az MPO aktivitás ($52 \pm 9\%$ gátlás, $n=8$; $P<0,05$) a TNBS kezelt állatokhoz képest.

Hem és ZnPP hatása a HO aktivitásra

A HO aktivitás TNBS kezelés hatására jelentősen megemelkedett az első napon, majd maximumát a 2.-3. napon érte el. A 10. napra a hatás lecsökkent az első napi értékre. Hem kezelésre szignifikánsan magasabb HO aktivitás értékeket mértünk az első 3 napon. A 10. napon viszont már nem volt jelentős különbség a TNBS kezeléshez képest. A ZnPP szignifikánsan lecsökkentette a HO aktivitást a teljes kísérleti periódus alatt (16. ábra).



16. ábra

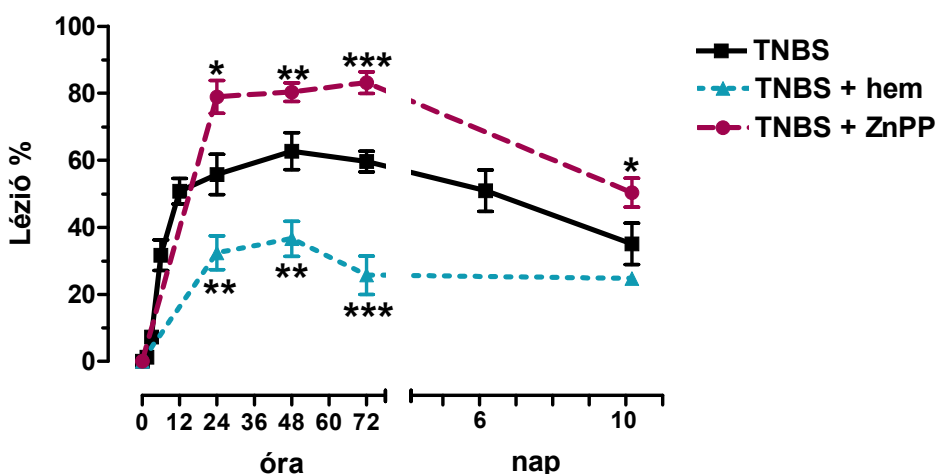
Hem és ZnPP kezelés hatása a HO aktivitásra TNBS kezelt állatokban

A TNBS kezelés okozta HO aktivitás emelkedést a hem előkezelés az első 3 napon tovább fokozta. A ZnPP a teljes kísérleti időtartam alatt szignifikánsan blokkolta a HO aktivitást.

Szórás \pm S.E.M.; $n=5$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ a TNBS kezelt állatokhoz viszonyítva.

Hem és ZnPP hatása a gyulladás kiterjedésére

TNBS kezelés hatására a gyulladások kiterjedése az idő előrehaladtával szignifikánsan emelkedett. A TNBS beadása után 24 órával már jelentékeny gyulladást tapasztaltunk, de a legnagyobb mértékű gyulladást 48 óra elteltével detektáltuk. A 10. napnál a gyulladások mértéke csökkent, de még jelentős kiterjedésű volt. A HO-t serkentő hem kezelés hatására a gyulladások kiterjedése szignifikánsan csökkent. Hemmel történő kezeléskor a TNBS-hez hasonló lefutású görbét kaptunk. Itt is 48 óránál tapasztaltuk a legmagasabb értéket. Hem kezelés után az első 3 napon szignifikáns különbséget tapasztaltunk a TNBS csoporthoz képest. A HO aktivitás gátló ZnPP kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a léziók kiterjedése. A ZnPP kezelésre 72 óránál mértük a legnagyobb mértékű gyulladást, de már 24 illetve 48 óránál is szignifikánsan magasabb értékeket tapasztaltunk a TNBS kezelt csoporthoz képest. 72 óra után a gyulladások mértéke folyamatosan csökkent, de még a 10. napon is szignifikánsan nagyobb volt a TNBS csoporthoz képest (17. ábra).



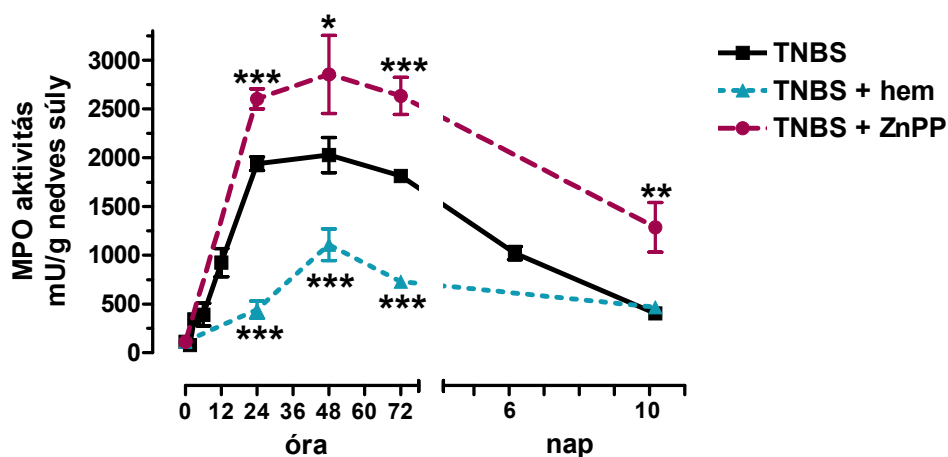
17. ábra

Hem és ZnPP kezelés hatása a gyulladások kiterjedésére TNBS kezelt állatokban

A TNBS kezelés hatására jelentős gyulladást tapasztaltunk, mely a 2. napon érte el a maximumát. A HO indukáló hem kezelés szignifikánsan csökkentette, míg a HO aktivitás blokkoló ZnPP kezelés szignifikánsan növelte a gyulladások kiterjedését. Szórás \pm S.E.M.; n=8; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 a TNBS kezelt állatokhoz viszonyítva.

Hem és ZnPP hatása a MPO aktivitásra

TNBS kezelés hatására megemelkedett az MPO szint. A legmagasabb értéket 48 óránál mértük, majd az idő előrehaladtával az MPO aktivitás folyamatosan csökkent. Hemmel történő kezelés hatására az MPO aktivitás már 24 óránál szignifikánsan lecsökkent a TNBS kezelt csoporthoz képest. Ez a szignifikáns különbség az első 3 napon megmaradt. Ennél a kezelésnél is 48 óránál mértük a legmagasabb értéket. 48 órát követően az MPO aktivitás fokozatosan csökkent, majd a 10. napon a TNBS kezelésnek megfelelő értéken maradt. A ZnPP-vel történő kezelés hatására az MPO aktivitás már 24 óránál szignifikánsan megemelkedett a TNBS kezelt csoporthoz képest. A legnagyobb értéket ennél a kezelésnél is 48 óránál mértük, majd az MPO aktivitás az idő előrehaladtával lecsökkent, de az egész kísérleti periodus alatt szignifikánsan magasabb volt a TNBS csoporthoz képest (18. ábra).



18. ábra

Hem és ZnPP kezelés hatása az MPO aktivitásra TNBS kezelt állatokban

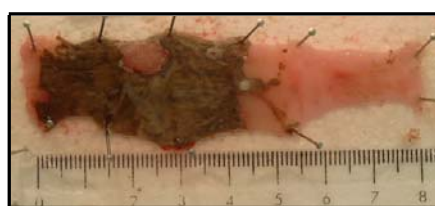
TNBS kezelés után az MPO aktivitás lefutási görbéje megegyezik a léziónél tapasztaltakkal. A jelentős MPO aktivitást a HO serkentő hem kezelés szignifikánsan lecsökkentette, míg a HO aktivitás gátló ZnPP szignifikánsan megnövelte. Szórás \pm S.E.M.; n=8; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 a TNBS kezelt állatokhoz viszonyítva.

Az 5-ASA kezelés hatása a nyálkahártyaléziók kiterjedésére

A TNBS által kiváltott gyulladás kiterjedését már a legalacsonyabb dózisú 5-ASA is csökkentette. Az alábbi képek jól reprezentálják az 5-ASA egyre emelkedő dózisainak pozitív hatását, a gyulladások kiterjedésének fokozatos csökkentésével (19 ábra).



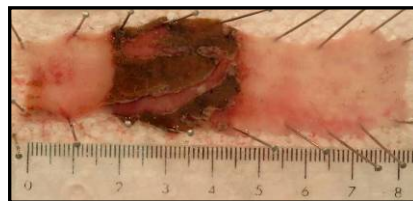
TNBS kezelés



5-ASA 8,3 mg/kg



5-ASA 25 mg/kg



5-ASA 75 mg/kg

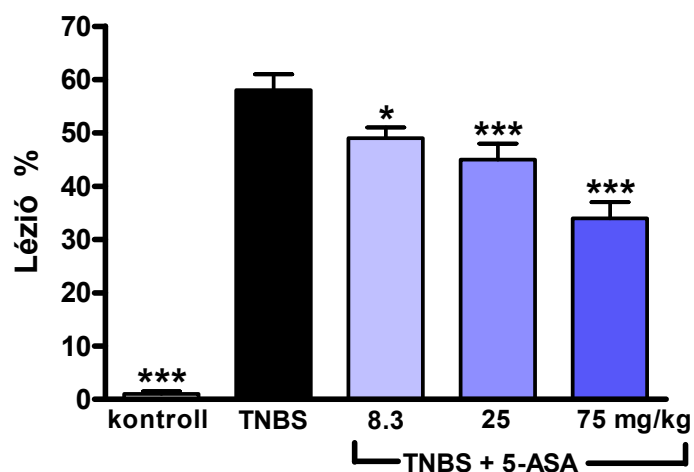
19. ábra

5-ASA kezelések hatása a TNBS okozta gyulladásra

A TNBS kezelés által kiváltott gyulladás kiterjedését az egyre emelkedő dózisú 5-ASA kezelések (8,3-25-75 mg/kg) fokozatosan csökkentették.

Az 5-ASA kezelés hatása a TNBS indukálta lézió kiterjedésére

A TNBS kezelés hatására a vizsgált bélszakasz teljes területének 58%-ára kiterjedt a gyulladás. Az 5-ASA kezelések dóziszfüggően csökkentették a léziók kiterjedését (20. ábra).



20. ábra

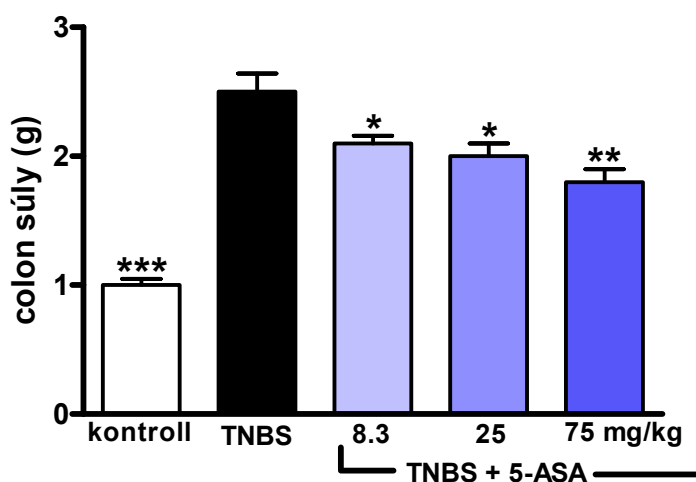
5-ASA kezelések hatása a léziók kiterjedésére TNBS kezelt állatokban

Az 5-ASA kezelés dóziszfüggően lecsökkentette a léziók kiterjedését a TNBS kezeléshez képest.

Szórás \pm S.E.M.; n=6; *P<0.05, ***P<0.001 a TNBS csoporthoz viszonyítva

Az 5-ASA kezelés hatása a TNBS indukálta gyulladási paraméterekre

Kontroll állatokban a vizsgált bélszakaszok súlya viszonylag alacsony értéket mutatott. A TNBS hatására kialakult jelentős mértékű gyulladás szignifikánsan megemelte a vizsgált bélszakaszok súlyát a kontroll egészséges bélszakaszok súlyához képest. Már az alkalmazott legkisebb dózisú 5-ASA kezelés hatására is szignifikánsan csökkent a vizsgált bélszakaszok súlya. A legnagyobb alkalmazott dózis hatására további csökkenést tapasztaltunk a bélszakaszok súlyában (21. ábra).



21. ábra

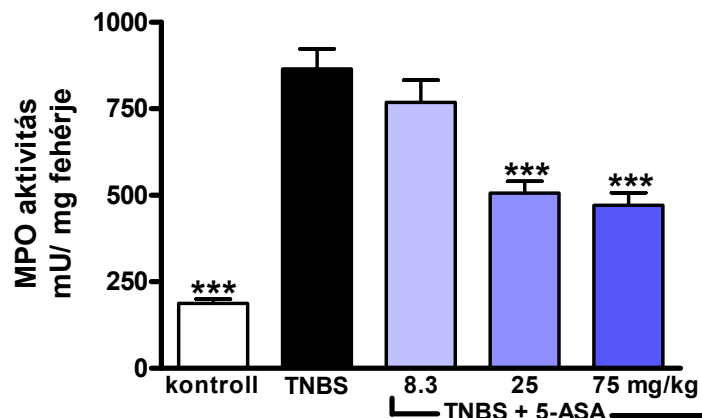
5-ASA kezelések hatása a colon súly változására TNBS kezelt állatokban

TNBS kezelés hatására jelentősen megemelkedett a vizsgált bélszakasz súlya.

Az 5-ASA alkalmazott dózisa szignifikánsan csökkentették a colonsúlyt.

Szórás \pm S.E.M.; n=6; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 a TNBS csoporthoz viszonyítva

A TNBS adás után egy másik fontos gyulladási paraméter, az MPO aktivitás is szignifikánsan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest. Ez a fokozott MPO aktivitás már a legkisebb dózisu 5-ASA kezelés hatására is csökkent, és szignifikáns további csökkenést mutatott a két nagyobb dózis alkalmazása esetén (22. ábra).



22. ábra

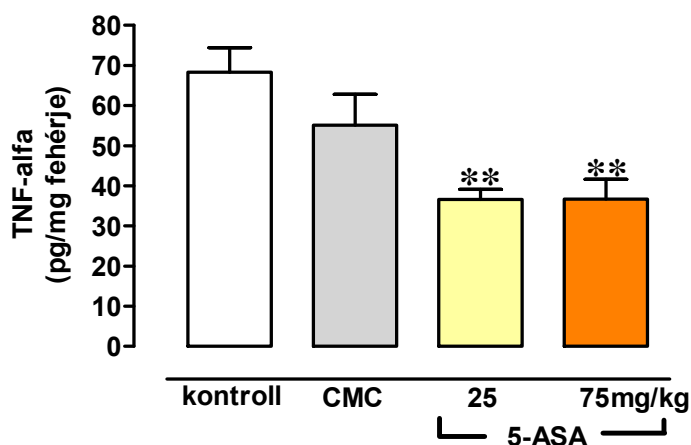
5-ASA kezelések hatása az MPO aktivitásra TNBS kezelt állatokban

TNBS kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett az MPO szint a kontroll állatokhoz képest. Az 5-ASA két legnagyobb alkalmazott dózisa szignifikánsan lecsökkentette az MPO aktivitást.

Szórás \pm S.E.M.; n=6; ***P<0.001 a TNBS csoporthoz viszonyítva

Az 5-ASA kezelések hatása a TNF-alfa szintre

A kontroll állatokban mért TNF-alfa szintet az 5-ASA oldószere a CMC nem befolyásolta. A két legnagyobb dózisú 5-ASA kezelés hatására a TNF-alfa szint szignifikánsan lecsökkent (23. ábra).



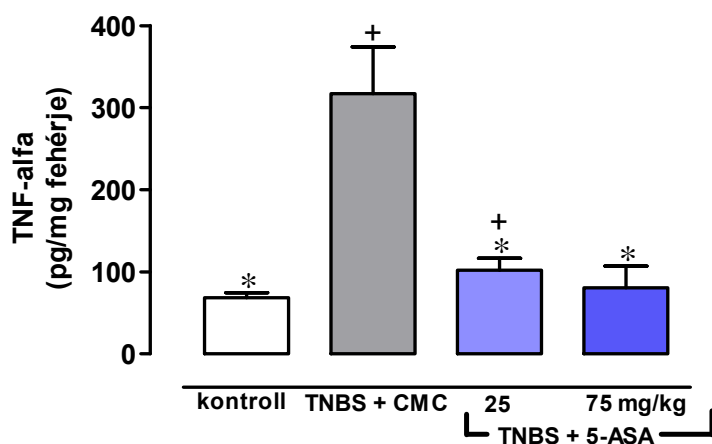
23. ábra

5-ASA kezelések hatása a TNF-alfa szintre kontroll állatokban

Az 5-ASA kezelések egyre emelkedő dózisa szignifikánsan csökkentették a TNF-alfa szintet abszolút kontroll állatokban.

Szórás \pm S.E.M.; n=5; **P<0.01 a CMC csoporthoz viszonyítva

TNBS kezelést követően szignifikánsan megemelkedett a TNF-alfa szint az abszolút kontroll állatokhoz képest. Az egyre növekvő 5-ASA kezelés hatására a TNF-alfa szint szignifikánsan lecsökkent, és a kontroll érték körüli értékre esett vissza (24. ábra).



24. ábra

5-ASA kezelések hatása a TNF-alfa szintre TNBS kezelt állatokban

A TNBS által kiváltott TNF-alfa szint emelkedést az 5-ASA két legmagasabb alkalmazott dózisa szignifikánsan, a kontroll értékhez közeli értékre csökkentette.

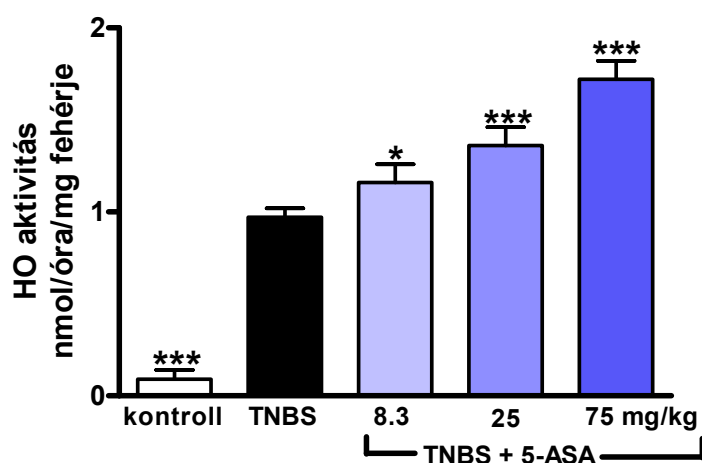
Szórás \pm S.E.M.; n=5;

*P<0.01 a kontrollhoz viszonyítva

*P<0.001 a TNBS+CMC csoporthoz viszonyítva

Az 5-ASA kezelés hatása a TNBS indukálta HO aktivitásra

A TNBS kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a HO-aktivitás a kontroll értékhez képest. Már a legkisebb dózisú 5-ASA kezelés hatására szignifikánsan megnőtt a HO aktivitás a TNBS kezeléshez viszonyítva. Az 5-ASA nagyobb dózisaire tovább emelkedett a HO aktivitás szintje (25. ábra).



25. ábra

5-ASA kezelések hatása a HO aktivitásra TNBS kezelt állatokban

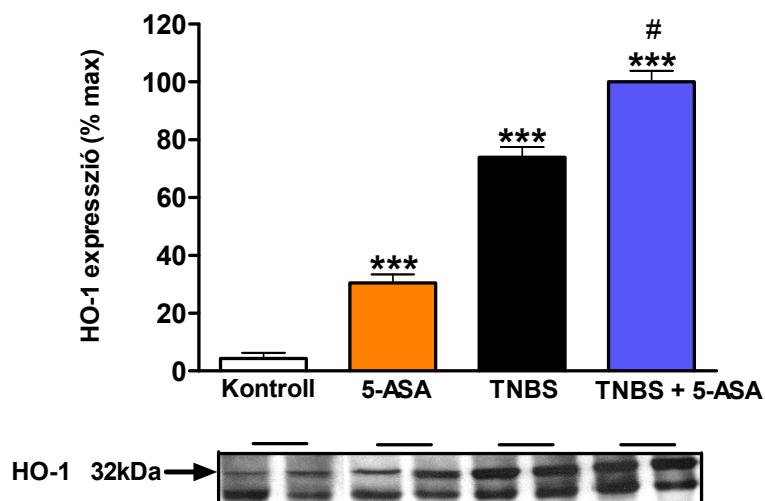
A TNBS kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a HO aktivitás a kontroll csoporthoz képest. Az 5-ASA kezelés növekvő dózisaival egyre nagyobb mértékű HO aktivitás emelkedést eredményeztek.

Szórás \pm S.E.M.; n=6;

*P<0.05, ***P<0.001 a TNBS csoporthoz viszonyítva

Az 5-ASA (75 mg/kg) és a TNBS kezelés hatása a HO-1 expressziójára

Kontroll állatokban is detektálni tudtuk a HO-1 fehérjét. Az alkalmazott 5-ASA kezelés (75 mg/kg) hatására szignifikánsan megemelkedett a HO-1 enzim expressziója. A TNBS kezelés önmagában szignifikáns mértékű emelkedést váltott ki a HO-1 expressziójában a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezt a hatást az 5-ASA előkezelés szignifikánsan tovább fokozta (26. ábra).



26. ábra

A TNBS és 5-ASA kezelések hatása a HO-1 expresszióra

Az ábra alsó részén egy reprezentatív Western blot képet láthatunk. A felső ábrán pedig 4 kísérlet denzitometriás eredményét tüntettük fel. 100 %-nak a TNBS+5-ASA értékét vettük.

Az alkalmazott legnagyobb dózisú 5-ASA (75 mg/kg) önmagában is szignifikánsan megemelte a HO-1 expressziót. A TNBS kezelés hatására további szignifikáns emelkedés következett be a HO-1 expressziójában. A TNBS és 5-ASA együttes adásával, a TNBS csoporthoz viszonyítva szignifikáns HO-1 expresszió növekedést tapasztaltunk.

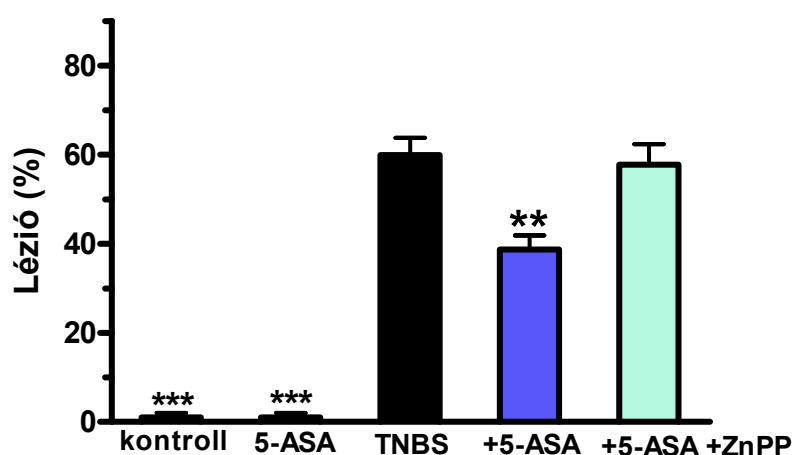
Szórás \pm S.E.M.; n=4;

***P<0.001 a kontroll csoporthoz viszonyítva;

#P<0.05 a TNBS csoporthoz viszonyítva

Az 5-ASA (75 mg/kg) kezelés és a ZnPP hatása a lézió kiterjedésére

Kontroll állatokban az intracolónális 5-ASA kezelés nem okozott semmilyen léziót. A TNBS kezelés hatására jelentős kiterjedésű gyulladás alakult ki a vizsgált vastagbélszakaszon. Az alkalmazott 5-ASA kezelésre (75 mg/kg) szignifikánsan lecsökkent a kialakult gyulladás kiterjedése. Az 5-ASA kezelés mellett alkalmazott HO aktivitás gátló ZnPP kezelés megszüntette az 5-ASA védő hatását, s a TNBS csoportnak megfelelő gyulladást tapasztaltunk (27. ábra).



27. ábra

Az 5-ASA(75 mg/kg) kezelés és a ZnPP hatása a léziókra

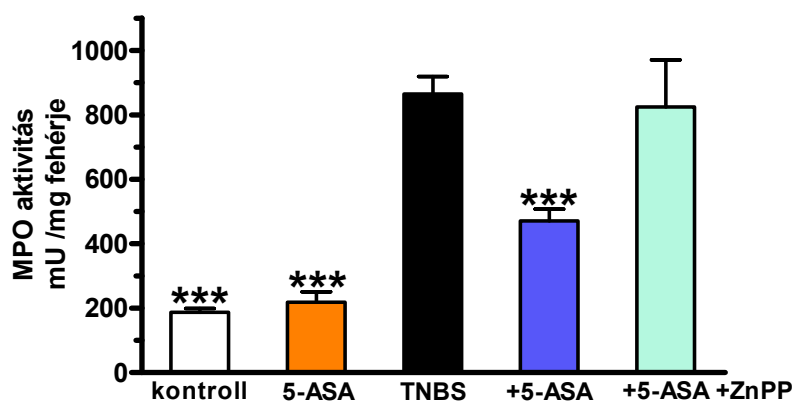
TNBS kezelés hatására jelentősen megemelkedett a gyulladások kiterjedése. A legmagasabb dózisu 5-ASA kezelés szignifikánsan lecsökkentette a lézió kiterjedését. 5-ASA kezelés mellett alkalmazott HO aktivitás gátló ZnPP kezelés megszüntette az 5-ASA által kialakított léziócsökkenést.

Szórás \pm S.E.M.; n=6;

P<0.01, *P<0.001 a TNBS csoporthoz viszonyítva

Az 5-ASA (75 mg/kg) kezelés és a ZnPP hatása az MPO aktivitásra

Az 5-ASA kezelés hatására a kontroll csoportnak megfelelő MPO aktivitás értékeket kaptunk. TNBS kezelés után szignifikánsan megemelkedett az MPO aktivitás a kontroll csoporthoz képest. Az 5-ASA kezelés a TNBS által kiváltott nagymértékű MPO aktivitást szignifikánsan lecsökkentette. Az 5-ASA kezelés mellett alkalmazott HO aktivitás gátló ZnPP kezelés következtében az MPO aktivitás érték szignifikánsan megemelkedett, és a TNBS által kiváltott értékhez közeli eredményt mutatott (28. ábra).



28. ábra

Az 5-ASA(75 mg/kg) kezelés és a ZnPP hatása a léziókra

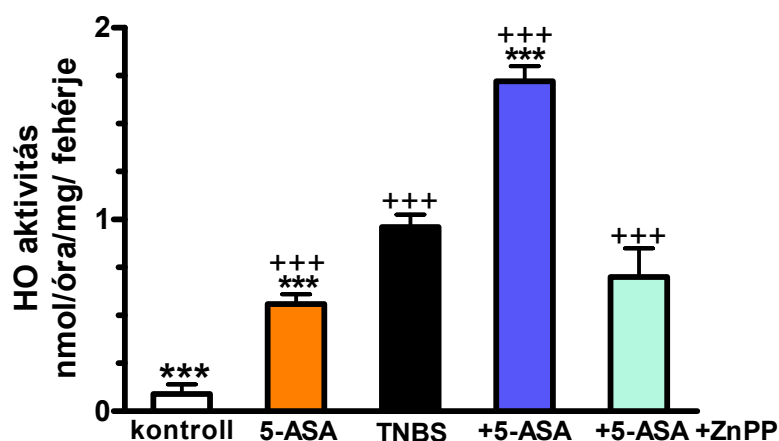
5-ASA kezelés hatására nem emelkedett az MPO aktivitás a kontroll csoporthoz képest. TNBS kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett az MPO szint a kontroll csoporthoz képest. Az 5-ASA kezelés szignifikánsan lecsökkentette a TNBS által kiváltott MPO aktivitást. Az 5-ASA kezelés mellett alkalmazott HO aktivitás gátló ZnPP kezelés megszüntette az 5-ASA protektív hatását.

Szórás \pm S.E.M.; n=6;

***P<0.001 a TNBS csoporthoz viszonyítva

Az 5-ASA (75 mg/kg) kezelés és a ZnPP hatása a HO aktivitásra

Az 5-ASA kezelés hatására szignifikánsan megemelkedett a HO aktivitás a kontroll csoporthoz képest. A TNBS kezelés hatására a kontrollhoz viszonyítva szintén szignifikáns emelkedés következett be a HO aktivitásban. A TNBS és az 5-ASA együttes adásával a HO aktivitás tovább emelkedett szignifikánsan a TNBS csoporthoz képest. Az 5-ASA kezelés mellett alkalmazott HO aktivitás gátló ZnPP hatására a HO aktivitás szignifikánsan lecsökkent (29. ábra).



29. ábra

Az 5-ASA(75 mg/kg) kezelés és a ZnPP hatása a HO aktivitásra

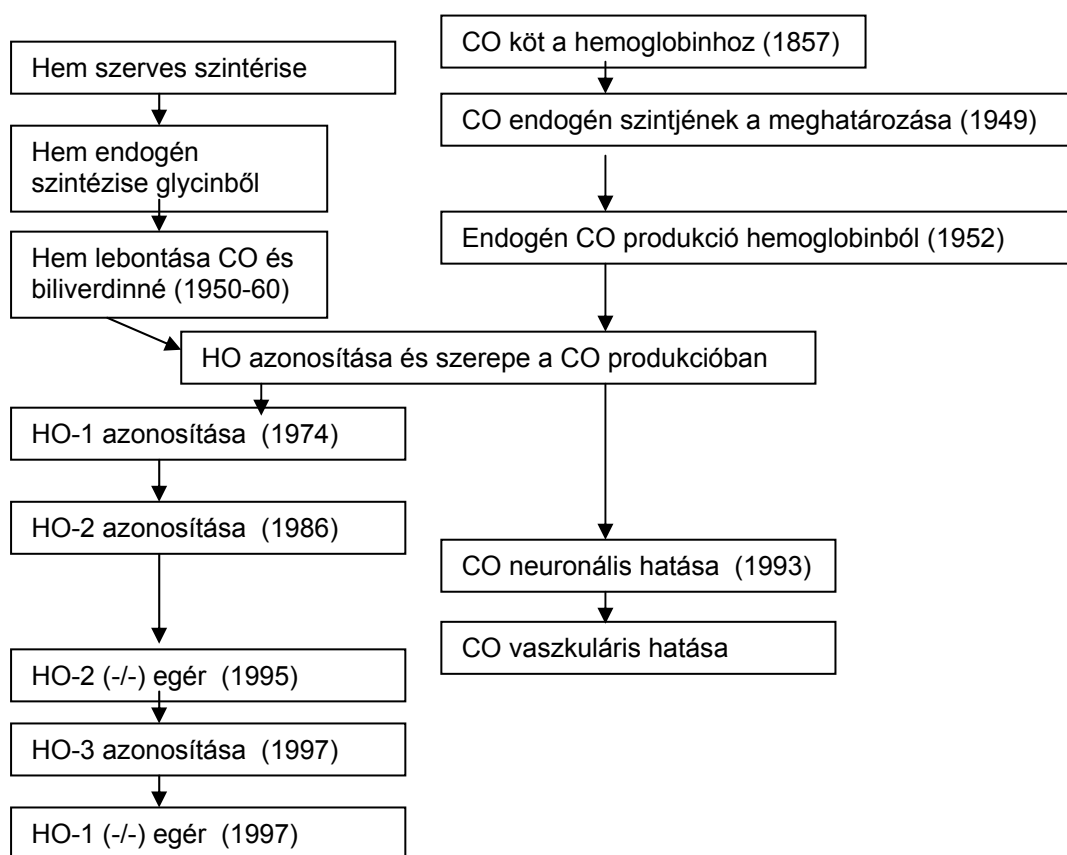
Az 5-ASA kezelés után fokozott HO aktivitást figyeltünk meg. TNBS kezelés hatására tovább emelkedett a HO aktivitás. A TNBS és 5-ASA együttes adásával szignifikánsan tovább fokozódott a HO aktivitás. A HO aktivitás gátló ZnPP szignifikánsan lecsökkentette a HO aktivitást.

Szórás \pm S.E.M.; n=6;

***P<0.001 a TNBS csoporthoz viszonyítva; +++P<0.001 a kontroll csoporthoz képest.

VI. MEGBESZÉLÉS

A gyulladási folyamatok tanulmányozása nagyon távoli múltba tekint vissza. A vizsgálatoknál új fejezetet nyitottak azok a kísérletek, melyek a szervezet saját védekező rendszereinek megismerése révén, azok aktiválásával igyekeznek a káros folyamatokat megállítani. Szervezetünk egyik ilyen antioxidáns rendszere, a HO rendszer, melynek tanulmányozása közel 150 éve folyik (Wu and Wang, 2005) (30. ábra).



30. ábra
A CO és HO rendszer felfedezésének kronológiája (Wu and Wang, 2005)

Vizsgálataink során egy jól ismert kísérletes gyulladási modell és a HO rendszer kapcsolatát vizsgáltuk.

Munkánkkal megerősítést nyertek azon korábbi eredmények, miszerint a HO-1 fehérje nagy mennyiségben expresszálódik TNBS indukálta vastagbélgyulladásos modellben, patkányokban (Wang et al., 2001). A HO aktivitás emelkedését is tapasztaltunk, az expresszió növekedésével párhuzamosan. A jelenlegi eredmények azt mutatják, hogy a HO-1 nagyon gyorsan, a TNBS kezelést követően már másfél órával indukálódik *in vivo*. Ez a gyors expresszió jellemző a hősokk fehérjékre (Soti et al., 2005). A HO-1 expresszió és a HO aktivitás platója 48-72 óránál volt megfigyelhető, és még 10 nap elteltével is kimutatható volt az aktív fehérje.

Kísérleteink során HO-1 expresszió és HO aktivitás növekedése már a TNBS oldószereként használt 50 %-os etanol adásakor is megfigyelhető volt. Ez az etanol által kiváltott hatás feltehetően segít magyarázatot adni a TNBS kezelésre bekövetkező korai kétszakaszos HO aktivitásváltozásra. Eredményeink arra is utalhatnak, hogy a HO-1 indukciója egy általános stresszre adott válasz, amit különböző anyagokkal ki lehet váltani, bár ennek a feltételezésnek az igazolása még további vizsgálatokat igényel.

A HO-1 indukcióját elősegítő mechanizmus ebben a colitis modellben egyelőre ismeretlen. Korábbi eredmények bizonyították a reaktív oxigén gyökök képződését TNBS modellben (Grisham et al., 1991), feltételezve, hogy ezek az anyagok HO-1 indukáló szereppel rendelkeznek (Maines, 2005). Az oxidatív stresszről az a vélemény, hogy szerepet játszik a Crohn betegség és a colitis ulcerosa kialakulásában (Lih-Brody et al., 1996; McKenzie et al., 1996). Reaktív oxigén gyökök képződését mutatták ki gyulladt humán vastagbélben (Grisham et al., 1990; Holmes et al., 1998), amelyek közreműködnek a HO-1 expressziójában.

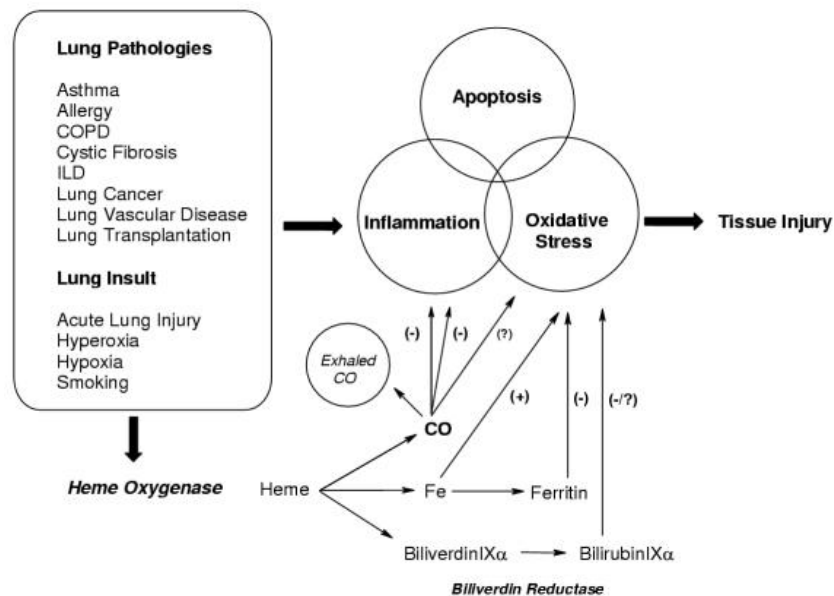
A RONS aktivációját korábban már megfigyelték colitisben szenvedő betegeknél (Barton et al., 2003; Paul et al., 2005). A reaktív oxigén gyökök fokozott termelése a gyulladás helyén valószínűleg endogén antioxidáns rendszereket indukál (Lih-Brody et al., 1996; Ramakrishna et al., 1997). A HO-1 indukció, mint egy korai sejtes védelmi válasz, segíthet az eredeti egyensúly visszaállításában az oxidatív stressz és a szöveti károsodás csökkentése révén.

A HO-1 expresszió történhet egyrészt neutrofil granulocitákban, makrofágokban, de számos más sejttypusban is expresszálódhat. Korábbi kísérletek során bizonyították, hogy a tüdőben például a lipopoliszacharid hatására HO-1 indukció történik, úgy a mucosa rétegbe infiltrálódó fehérvérsejtekben, mint az epithél sejtekben (Carraway et al., 1998). A HO-1 expresszióját mutatták ki humán intesztinális epithél sejtvonalakban is hem, és nehézfémek hozzáadását követően. Továbbá colitisben szenvedő betegek szövetmintáiban a HO-1 expressziója mind a felső sejtrétegben, mind a crypta sejtek rétegében megfigyelhető volt, csak úgy, mint a lamina propria gyulladt sejtjeiben (Barton et al., 2003; Paul et al., 2005). Munkánk során nem vizsgáltuk, hogy a vastagbél pontosan milyen típusú sejtjeiben történt a HO-1 indukciója. Mindezek ellenére, a HO-1 korai már 90 percen belül és 10 nap elteltével is megfigyelhető expressziója jól korrelált az MPO változásokkal. Ezek az adatok arra utalhatnak, hogy a neutrofil granulociták a fő forrásai a termelődő HO-1-nek, TNBS modellben.

Kísérleteink során a HO endogén szubsztátjának, a hemnek (ami ismert HO indukáló szer) napi adagolásával HO-1 indukciót és HO enzimaktivitás fokozódást tapasztaltunk. Ezek a változások a lézió kiterjedésének szignifikáns csökkenésében is megnyilvánultak, és az MPO aktivitás is csökkent. Egy nehézfém, a kadmium-klorid adását követően a HO-1 hasonló védelmi szerepét

tapasztaltuk TNBS modellben (Varga et al., 2007). Más szerzők nehézfém komplexekkel és kobalt-protoporfirinnel a dextrán-szulfát indukálta colitis modellben is azt találták, hogy a gyulladás csökken (Berberat et al., 2005; Paul et al., 2005). Egy IL-10 gén deléciós modellben pedig, a hem adása hatékonynak bizonyult (Hegazi et al., 2005). A hem megfigyelt hatásai egy pathofiziológiai mechanizmusra utalhatnak, amelyben ezek az endogén faktorok szerepet játszhatnak többek között a reaktív oxigén gyökökön keresztül, növelve a HO aktivitást, és így csökkentve a gyulladásos folyamatokat. Ezek a folyamatok azonban még nem teljesen ismertek.

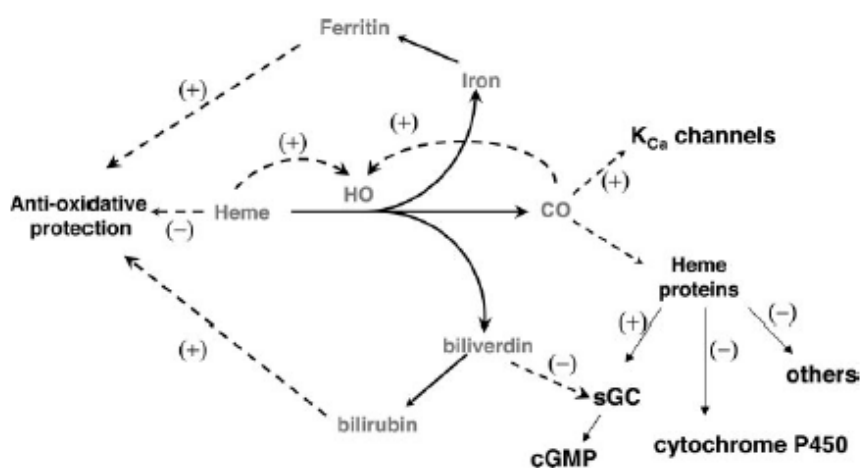
A mechanizmusok, amelyeken keresztül a HO-1 feltételezhetően kifejti pozitív hatását egyrészt az antioxidáns biliverdinen, másrészt a szén-monoxidon (CO) keresztül történhet. A fenti elméletet már tüdőben igazolták. (Slebos et al., 2003) (31. ábra).



31. ábra
A HO és CO szerepe a tüdő fertőzéseiben

Azt már szintén kimutatták, hogy a HO-1 növeli az extracelluláris szuperoxid dizmutáz aktivitást is, amely a HO-1 produktumok antioxidáns szerepére utal (Turkseven et al., 2005).

Biliverdin kezelést követően a gyulladások enyhülését tapasztalták dextrans indukálta colitis modellben, amely hatásban a HO-1 szerepet játszott (Berberat et al., 2005). Ugyan a CO önmagában nem csökkentette a gyulladás súlyosságát, de a korábbi eredmények azt mutatták, hogy a CO napi adásával csökken a gyulladás mértéke IL-10 gén deléciós colitis modellben (Hegazi et al., 2005). Ezekben a hatásokban szerepet játszhatnak a CO helyi vazóaktív tulajdonságai, valamint az, hogy a CO képes az adhéziós molekulák modulálására (Otterbein et al., 2000). Ilyen típusú hatásokat figyeltek meg transzplantációs kutatásokban, vékonybélben, ami szintén arra utalhat, hogy ezek a tulajdonságok együttműködhetnek a biliverdinnel (Nakao et al., 2004). Feltételezhető, hogy ezek az eltérő bomlástermékek önálló, de egymással kölcsönható védelmi folyamatok szabályozásában vesznek részt, elősegítve ezzel a gyulladások súlyosságának csökkentését colitis modellben (32. ábra).



32. ábra
A HO és a CO rendszer feltételezett kölcsönhatása (Wu and Wang, 2005)

A HO-1 indukció hatásával ellentétben, egy nem fiziológias metalloprotein, a cink-protoporfirin adásával, és így a HO aktivitás csökkentésével jelentős súlyosbodást tapasztaltunk a gyulladások kiterjedésében, mivel a gyulladás kiterjedése 80 % feletti értéket mutatott a vizsgált területen. Ez a kezelés egyben MPO aktivitásbeli növekedést is eredményezett. A HO aktivitás gátlása a ZnPP hatására az egész 10 napos kezelés ideje alatt megfigyelhető volt. Hasonló hatást tapasztaltak Wang és munkatársai (Wang et al., 2001) a gyulladás kiterjedésére és a növekvő MPO aktivitásra vonatkozóan egy másik HO gátló anyag, az ón-protoporfirin adását követően. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a HO-1 pathofiziológiai indukciója colitis modellben valóban moduláló szereppel bír a gyulladás súlyosságának mértékében mind akut, mind krónikus periódusokban.

Munkánk során sikerült megerősítenünk azon eredményeket melyek szerint az endogén antioxidáns és gyulladáscsökkentő HO-1 enzim indukálódik TNBS modellben, patkányokban. A HO-1 expresszió már nagyon korai időpontban megfigyelhető, és még a TNBS adást követően 10 nappal is detektálható. A HO-1 expressziója hem adásával tovább fokozódott, amely csökkentette a gyulladások súlyosságát és kiterjedését. Továbbá egy másik HO-1 indukáló anyag, a kadmium-klorid szintén pozitívan befolyásolta a gyulladás kiterjedésének mértékét ebben a modellben. Ezzel ellentétben egy ismert HO aktivitás gátló (ZnPP) adását követően a gyulladás mértékének fokozódását figyeltük meg. Ez a változás a 10 napos észlelési periódus alatt végig megfigyelhető volt. Eredményeink arra utalhatnak, hogy olyan új anyagok kifejlesztése, amelyek a HO-1 enzimet indukálják, olyan endogén promóteren keresztül, mint például a hem, vagy direkt módon egy nem toxikus folyamaton keresztül további lehetőséget jelenthetnének a gyulladásos bélbetegségek kezelésében.

Az oxidatív stresszről már régóta feltételezik, hogy szövetkárosodást okoz gyulladáshoz vezető bélbetegségekben. Korábbi kísérleti eredmények alapján feltételezhető, hogy a mucosa antioxidáns védelmében bekövetkező károsodás potenciális etiológiai faktornak tekinthető (Dryden et al., 2005; Grisham et al., 1990; McKenzie et al., 1996; Pavlick et al., 2002). Így a reaktív oxigén gyökök képződése és az endogén antioxidáns védelmi mechanizmusok közötti egyensúly felbomlása a vastagbélben szerepet játszhatnak a gyulladási folyamatok kialakulásában és súlyosbodásában. Egy aminoszalicilát, az 5-ASA, antioxidáns szereppel bír *in vitro* körülmények között. Klinikai kutatások során, a mezalazin metabolitjaként *in vivo* körülmények között is antioxidáns hatást mutatott, gyulladáshoz vezető bélbetegségben szenvedő betegeknél történt terápiás alkalmazása során (Ahnfelt-Ronne et al., 1990). A jelenlegi 5-ASA-val patkányokon végzett kísérleti eredmények arra utalhatnak, hogy *in vivo* antioxidáns és gyulladáscsökkentő szerepe endogén antioxidáns rendszerek szabályozásán keresztül valósulhat meg.

A korábbi kísérletekben, az 5-ASA elő- és utókezelések esetén, kísérletes TNBS kiváltotta colitis modellben, terápiás hatást mutattak. A kísérleti eredmények között némi ellentmondás fedezhető fel, ami az eltérő dózisokra és módszerekre vezethető vissza (Galvez et al., 2000; Song et al., 2006; Tozaki et al., 2002). Munkánk során az 5-ASA 8,3 és 75 mg/kg közötti dózisait alkalmaztuk intracolónálisan. 24 órás előkezelés után a TNBS kezelést követően naponta adagoltuk az 5-ASA-t. A léziók kiterjedésének szignifikáns csökkenését, és a colon súly csökkenését tapasztaltunk minden alkalmazott dózis esetében. Mindezek mellett a neutrofil granulociták infiltrációjára utaló MPO szint szignifikánsan csökkent a két magasabb dózis alkalmazásánál.

Megvizsgáltunk egy másik fontos gyulladási paramétert, a TNF- α szintet is. Ismeretes, hogy a gyulladási folyamatok során jelentős szereppel bírnak az immunrendszer különböző faktorai. Ilyen faktor a TNF- α is, amely számos gyulladási és autoimmun folyamatban vesz részt. (Pfeffer et al., 1993; Vandenabeele et al., 1995) Néhány újfajta gyulladáscsökkentő gyógyszer is a TNF- α szint csökkentésén keresztül fejti ki hatását (anti-TNF- α antitest; Infliximab, Remicade) (Woodruff et al., 2003). Kísérleteink során vizsgáltuk az 5-ASA hatását a TNF- α szintek változásaira, mind kontroll, mind TNBS kezelt állatokban. Azt tapasztaltuk, hogy az 5-ASA kezelés csökkentette a TNF- α szinteket, már kontroll esetben is. A TNBS kezelt állatoknál jól látszik, hogy az 5-ASA kezelés hatására milyen nagy mértékű csökkenés következett be a TNF- α szintekben.

A TNBS hatása a HO-1 expressziójára és a HO aktivitásra – korábbi eredmények illetve saját megfigyeléseink tanúsága szerint – igazolást nyert. Ezek alapján a HO-1 enzim produktumok szerepe a gyulladás kialakításában feltételezhetően infiltráción, és a reaktív oxigén gyökök mennyiségének csökkentésén keresztül történik (Varga et al., 2007). Mindezek, egy korai génexpresszióra utalhatnak, amely stressz-mediálta védelmi mechanizmusokon keresztül védelmet nyújthat a gyulladással szemben. Ennek a koncepciónak megfelelően, korábbi eredményeink rámutattak, hogy a HO aktivitást fokozó hem napi subcutan adására a gyulladás kiterjedése csökken ebben a modellben (Varga et al., 2007). Jelenlegi munkánkban az 5-ASA dózisainak intracolónális adásával a HO aktivitás dózisfüggően emelkedett a gyulladt vastagbélben. A legmagasabb alkalmazott dózisban az 5-ASA megközelítőleg kétszeres növekedést eredményezett a HO aktivitás változásában. Ez a dózis a HO-1 expressziójában is szignifikáns emelkedést okozott TNBS kezelt állatokban, utalva arra a tényre,

hogy a megemelkedett HO aktivitás sokkal inkább a fokozott enzim expresszió következménye, mintsem egyszerűen egy helyi kofaktor hatás, vagy az 5-ASA facilitált reakciója az adott enzimre.

Mindezekon túl meg kell említenünk, hogy a kizárólag 5-ASA kezelt állatoknál, önmagában is képes volt az 5-ASA szignifikánsan megemelni a HO-1 fehérje expresszióját és a HO enzim aktivitást. Az 5-ASA ezen direkt hatásai a hém, nehézfémeken, a nitrogén-monoxid donorokon és a szabadgyökökön kívül további indukáló anyagok csoportjaira is utalhatnak. Azok a folyamatok, amelyek képesek ennek a hősök fehérjének ilyen indukciójára még kevésbé ismertek. Az 5-ASA egy olyan anyagnak bizonyult, amely csökkentette a szöveti károsodás mértékét. Korábbi kísérletek eredményei arra mutattak rá, hogy az 5-ASA a PPAR- γ receptor agonistája (Rousseaux et al., 2005). A PPAR- γ receptor agonisták, mint például a roziglitazon és a troglitazon modulálni képesek a TNBS okozta gyulladást (Desreumaux et al., 2001; Sanchez-Hidalgo et al., 2005). A PPAR- γ receptor aktiváció lehetséges szerepe azonban a HO-1 expresszió aktiválásában, ebben a rendszerben még ismeretlen. Érdemes lenne megvizsgálni a strukturális és aktívásbeli összefüggéseket a különböző aminoszalicilátok és a szerkezetileg hasonló vegyületek között, hogy milyen hatással rendelkeznek a HO-1 expressziójára és a HO aktivitásra. Meg lehetne vizsgálni mind a vastagbélben, mind más szövetekben is, például az érrendszerben, ahol a HO-1 szintén fontos védelmi szereppel rendelkezik (Abraham and Kappas, 2005; Foresti et al., 2004).

Azokban a mechanizmusokban, amelyeken keresztül a hem-oxigenáz rendszer szerepet játszik a gyulladások csökkentésében (Willis et al., 1996) feltételezhetően az enzimikus reakciók végtermékei is szerepet játszanak. Ilyen

végtermékek például a biliverdin és a bilirubin, amelyek antioxidáns tulajdonságokkal rendelkeznek, mérséklék a lipid peroxidációt (Maines, 2005; Nath, 2006; Ryter et al., 2006), valamint csökkentik a neutrofil granulociták adhézióját és migrációját, akut gyulladás esetén (Freitas et al., 2006). Egy másik fontos termék a CO, amely szintén gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal rendelkezik, azáltal, hogy gátolja a gyulladáskeltő citokinek termelődését és pozitívan befolyásolja a gyulladásos sejtfunkciókat (Freitas et al., 2006; Gibbons and Farrugia, 2004; Kirkby and Adin, 2006; Otterbein et al., 2000; Wu and Wang, 2005). Más colitis modellekben a HO-1 indukciója fém-komplexekkel, kobalt-protoporfirinnel és hémrel szintén csökkentette a gyulladások mértékét. Ilyen modellek például egy Th-1 sejtmediálta modell, ahol az IL-10 gén deléciója okozta a gyulladást (Hegazi et al., 2005), valamint a dextrán-szulfát által indukált colitis modell (Berberat et al., 2005; Paul et al., 2005).

Mindezen eredmények mellett a HO-1 rendszer gátlásával a gyulladások súlyosbodását tapasztalták (Willis et al., 1996; Willis et al., 2000). A hem-oxigenáz nem fiziológiás metalloporfirinekkal (SnPP; ZnPP) történő gátlását követően a TNBS által kiváltott colitis súlyosbodást mutatott patkányokban (Varga et al., 2007; Wang et al., 2001). Munkánk során a ZnPP adását követően a megemelkedett HO-1 aktivitás csökkent azoknál az állatoknál, amelyek a TNBS kezelés mellett 5-ASA kezelést is kaptak. A ZnPP kezelés gátolta az 5-ASA kezelés hatását. Megszüntette az 5-ASA által kiváltott csökkenést a lézió kiterjedésében és az MPO aktivitásban. Habár a ZnPP aspecifikus hatásai a gyulladásra vagy az 5-ASA által kifejtett védelemre nem zárhatóak ki teljesen, a kapott eredmények azt a feltételezést erősítik, hogy az 5-ASA pozitív hatását részben a HO-1 expresszió és HO aktivitás fokozásán keresztül fejtí ki. Természetesen további kísérletek

szükségesek, hogy még jobban megismerjük az 5-ASA hatásmechanizmusa és a HO rendszer közötti kapcsolatot. Ilyen további lehetőségekként még szelektívebb HO-1 gátlók alkalmazásával, HO-1 gén deléciós modellekkel és más molekuláris manipulációk hatásait vizsgálva erre az enzimre, még pontosabb képet fogunk kapni ezekről a folyamatokról.

Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az 5-ASA gyulladáscsökkentő hatását részben a HO-1 expresszió fokozásán keresztül fejt ki a vastagbélben (Horváth et al., 2008). Habár a HO-1 expresszióját kimutatták humán colitis-es szövetmintákban (Barton et al., 2003; Paul et al., 2005), az azonban, hogy az *in vivo* patkány colitis modellben az 5-ASA kezelést követően kapott eredményeinket mennyiben tudjuk tovább vinni a tényleges terápiás alkalmazások területére még további vizsgálatokat igényel. Korábbi *in vitro* eredmények szerint az 5-ASA mikromoláris koncentrációkban történő adagolását követően a HO-1 expresszió indukciója tapasztaltó humán vastagbél epithél sejtekben (Cavicchi et al., 1999). Ezek a tények további vizsgálatokra sarkallnak, hogy olyan folyamatokat ismerjünk meg, amelyek még jobban alátámasztják az 5-ASA indukáló szerepét a HO rendszerre. Ezek az eredmények és a további vizsgálatok új célpontokat jelenthetnek a klasszikus aminoszalicilátok célzott fejlesztésével a gyulladással szembeni hatékonyabb küzdelemben.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyulladássos bélbetegségeknek (colitis ulcerosa, Crohn betegség) a pontos etiológiája a mai napig ismeretlen. Kimutatták, hogy a bélepithelium károsodás kialakulásában az oxidatív stressz során képződött reaktív gyökök is kulcsfontosságú faktorok. Az oxidatív stresszel összefüggésben elmondhatjuk, hogy különböző antioxidáns rendszerek (pl: HO rendszer), fontos szerepet játszhatnak a gyulladásokkal szembeni védelemben. A gyógyszeres kezelések során az egyik gyakran alkalmazott szer, az 5-amino-szalicilsav (5-ASA) pontos hatásmechanizmusa egyelőre ismeretlen. Irodalmi adatokat tanulmányozva az 5-ASA származékokról ugyanakkor elképzelhető, hogy vannak antioxidáns tulajdonságaik is, amely szerintünk - legalábbis részlegesen - szerepet játszhat a HO-1 enzim indukciójában. Munkánk első részében egy ismert kísérletes colitis modell (TNBS modell) hatásmechanizmusának vizsgálatával azt tűztük ki célul, hogy jobban megismerjük a gyulladási folyamatokban résztvevő védelmi rendszer, a HO rendszer szerepét, és ez által pontosabb képet kapjunk a betegség enyhítésében potenciálisan szerepet játszó folyamatokról. Sikerült megerősítenünk azon eredményeket, melyek szerint az endogén antioxidáns és gyulladáscsökkentő HO-1 enzim indukálódik TNBS modellben, patkányokban. A következő lépésben a HO-1 indukciójával (hem) sikerült tovább csökkentenünk a gyulladások súlyosságát és kiterjedését. Egy másik HO-1 indukáló anyag, a kadmium-klorid szintén pozitívan befolyásolta a gyulladás kiterjedésének mértékét ebben a modellben. Ezzel ellentétben egy ismert HO aktivitás gátló (ZnPP) adását követően a gyulladás mértékének fokozódását figyeltük meg. Ezek az

eredmények arra utalnak, hogy a HO-1 pathofiziológiai indukciója ebben a colitis modellben valóban moduláló szereppel bír a gyulladás súlyosságának mértékében mind akut, mind krónikus periódusokban. A kísérletek harmadik részében az 5-ASA-val kapott eredmények arra utalhatnak, hogy *in vivo* antioxidáns és gyulladáscsökkentő szerepe endogén antioxidáns rendszerek szabályozásán keresztül valósulhat meg. Munkánk során az 5-ASA emelkedő dózisait alkalmazva a gyulladás paraméterek (lézió kiterjedése, colon súly, MPO aktivitás, TNF-alfa szint) csökkenését tapasztaltunk. Az 5-ASA alkalmazásával a HO aktivitás dóziszfüggően emelkedett és a legmagasabb alkalmazott dózis a HO-1 expressziójában is szignifikáns emelkedést okozott TNBS kezelt állatokban. A kizárólag 5-ASA kezelt állatoknál, önmagában is képes volt az 5-ASA szignifikánsan megemelni a HO-1 fehérje expresszióját és a HO enzim aktivitást. A HO-1 aktivitás gátló ZnPP kezelés gátolta az 5-ASA kezelés hatását. Megszüntette az 5-ASA által kiváltott csökkenést a lézió kiterjedésében és az MPO aktivitásban. Habár a ZnPP aspecifikus hatásai a gyulladásra vagy az 5-ASA által kifejtett védelemre nem zárhatóak ki teljesen, a kapott eredmények azt a feltételezést erősítik, hogy az 5-ASA gyulladáscsökkentő hatását részben a HO-1 expresszió és HO aktivitás fokozásán keresztül fejt ki a vastagbélben (Horváth et al., 2008). Habár a HO-1 expresszióját kimutatták humán colitis-es szövetmintákban, az azonban, hogy az *in vivo* patkány colitis modellben az 5-ASA kezelést követően kapott eredményeinket mennyiben tudjuk tovább vinni a tényleges terápiás alkalmazások területére még további vizsgálatokat igényel. Korábbi *in vitro* eredmények szerint az 5-ASA mikromoláris koncentrációkban történő adagolását követően a HO-1 expresszió indukciója tapasztaltó humán vastagbél epithél sejtekben. Ezek a tények további vizsgálatokra sarkallnak, hogy

olyan folyamatokat ismerjünk meg, amelyek még jobban alátámasztják az 5-ASA indukáló szerepét a HO rendszerre. Ezek az eredmények új célpontokat jelenthetnek a klasszikus aminoszalicilátok célzott fejlesztésével a gyulladásos bélbetegségek elleni hatékonyabb küzdelemben.

VIII. SUMMARY

The pathogenesis of the inflammatory bowel diseases, ulcerative colitis and Crohn's disease is still incompletely understood. It has long been speculated that the local release of reactive oxygen species may also be involved, creating epithelial and vascular injury in the colon. It is therefore possible that endogenous protective antioxidant systems could be evoked in order to attenuate colonic tissue injury under such conditions. One such system is the microsomal inducible enzyme, heme oxygenase-1 (HO-1). Preparations of aminosalicylates, exemplified by 5-aminosalicylic acid for oral or colonic administration have been used over many decades for the treatment of the inflammatory bowel diseases. Despite its long-term and wide-spread use, the mechanisms underlying the anti-colonic actions of 5-ASA have not been fully identified. An enduring concept is that at least part of the beneficial activity of 5-ASA reflects its actions as an antioxidant and free radical scavenger. The therapeutic activity of 5-ASA in colitis may also reflect additional pharmacological actions to up-regulate endogenous anti-oxidant and anti-inflammatory systems. The first part of the study confirms previous work in the rat that HO-1 protein is induced at high levels in the colon during TNBS provoked colitis in rats. In the next part of the study, the daily administration of the known HO-1 inducer, heme, caused a substantial induction in HO-1 and heme oxygenase enzyme activity. This was accompanied by a significant decrease in the macroscopically apparent mucosal damage in the colon. Similar colonic protective actions to heme in the TNBS model were observed with cadmium chloride in the current work. In contrast to the effects of HO-1 induction, pharmacological

approaches to reduce HO-1 activity by the administration of zinc protoporphyrin have shown a substantial aggravation of the colonic inflammation. These findings would suggest that the pathophysiological induction of HO-1 in colitis does indeed play a role in modulating the severity of the colonic inflammation over both acute and chronic periods. In the last step of my study, intracolonic daily doses of 5-ASA of 8 to 75 mg/kg, commencing 24 h prior to challenge with TNBS were found to be effective. A significant reduction of macroscopic lesion area and its severity in terms of a macroscopic score, as well as a fall in the elevated colon weight as an index of oedema, was observed with all doses of 5-ASA. In addition, a reduction in colonic MPO levels, an index of neutrophilic infiltration, as well as the inflammatory biomarker, TNF- α was achieved at the two higher dose levels of 5-ASA investigated. Intracolonic administration of 5-ASA in anti-colitic doses caused a dose-dependent increase in heme oxygenase activity in the inflamed colon, with the higher dose of 5-ASA causing an approximately two-fold increase in heme oxygenase activity. This dose of 5-ASA likewise caused a significant increase in the colonic expression of HO-1 protein in the TNBS-challenged rats, indicating that the increased heme oxygenase enzyme activity was probably a reflection of the production of new protein rather than simply a local co-factor or facilitatory action of 5-ASA on existing enzyme, although this awaits direct evaluation. Studies on the unchallenged rat colon following daily intracolonic administration of 5-ASA demonstrated a significant increase in HO-1 protein expression as well as in heme oxygenase enzyme activity. The processes by which such induction of this heat shock protein is brought about are not yet known, 5-ASA being an agent not considered to damage the colon or to cause any cellular injury. Administration of ZnPP, in doses that inhibited HO-1 under these conditions, prevented the

therapeutic effect of 5-ASA, as indicated by the abolition of the reduction in damage area and the colonic MPO levels. Although non-specific actions of this heme oxygenase inhibitor on colonic injury or on the action of 5-ASA cannot yet be excluded, these findings support the suggestion that the beneficial property of 5-ASA in this model involves the activity of HO-1. Our results thus suggest that 5-ASA could exert its colonic anti-inflammatory effect, at least in part, through the up-regulation of colonic HO-1 activity. However, whether these present findings the rat colon following treatment with 5-ASA can be translated into an understanding of the therapeutic effects of the various 5-ASA preparations in colitic patients awaits further study. However, earlier preliminary in vitro studies have demonstrated in human colonic epithelial cells that HO-1 mRNA expression is stimulated by micromolar concentrations of 5-ASA. These current findings thus prompt for further investigation into the mechanisms of action underlying the ability of 5-ASA to affect the HO-1 system. Such studies could thus yield additional pharmacological and molecular targets for rational improvement on the classical aminosalicylates for the therapy of colitis.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani

Dr. Varga Csaba egyetemi docensnek témavezetői munkájáért, építő kritikáiért, végtelen türelméért és segítőkészségéért,

lfj. Dr. László Ferenc egyetemi tanárnak témavezetői munkájáért és hasznos tanácsaiért,

Dr. Toldi József tanszékvezető egyetemi tanárnak, amiért helyet biztosított számomra az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszéken kísérleteim elvégzéséhez,

Dr. László Ferenc professzor úrnak hasznos tanácsaiért,

Pósa Anikónak, Berkó Anikónak, és Molnár Andornak a rengeteg technikai tanácsért, valamint az endokrin labor valamennyi munkatársának a vidám hangulatért,

Doktori disszertációm elkészítéséhez nyújtott további segítségükért köszönetemet fejezem ki az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi, eddig fel nem sorolt munkatársának is.

Nagyon hálás vagyok a szüleimnek, akik mindenben támogattak és segítettek, hogy eljuthassak ennek a munkának a befejezéséig. Szeretném még megköszönni mindazoknak a rokonoknak, barátoknak, testvéreknek is, akik nagyon sok támogatással és bátorítással segítették a munkámat.

És végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni annak a személynek a támogatását is, aki mindvégig és minden helyzetben mellettem állt, és megsegített. Ő pedig a Názáreti Jézus Krisztus.

A kísérletek elvégzéséhez a következő szervezetek biztosítottak anyagi és technikai támogatást:

William Harvey Research Institute, London

Bólyai János Kutatási Ösztöndíj

Egészségügyi Minisztérium (ETT)

Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA)

Gazdasági Versenyképesség Operatív Program (GVOP-3.2.1-2004-04-0086/3.0)

Öveges J. pályázat

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- Abraham, N.G. and A. Kappas, 2005, Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system, *Free Radic Biol Med* 39, 1.
- Adib-Conquy, M., K. Asehnoune, P. Moine and J.M. Cavaillon, 2001, Long-term-impaired expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha in peripheral blood mononuclear cells of trauma patients, *J Leukoc Biol* 70, 30.
- Adib-Conquy, M. and J.M. Cavaillon, 2002, Gamma interferon and granulocyte/monocyte colony-stimulating factor prevent endotoxin tolerance in human monocytes by promoting interleukin-1 receptor-associated kinase expression and its association to MyD88 and not by modulating TLR4 expression, *J Biol Chem* 277, 27927.
- Ahnfelt-Ronne, I., O.H. Nielsen, A. Christensen, E. Langholz, V. Binder and P. Riis, 1990, Clinical evidence supporting the radical scavenger mechanism of 5-aminosalicylic acid, *Gastroenterology* 98, 1162.
- Alam, J., 1994, Multiple elements within the 5' distal enhancer of the mouse heme oxygenase-1 gene mediate induction by heavy metals, *J Biol Chem* 269, 25049.
- Alam, J. and Z. Den, 1992, Distal AP-1 binding sites mediate basal level enhancement and TPA induction of the mouse heme oxygenase-1 gene, *J Biol Chem* 267, 21894.
- Annane, D., E. Bellissant and J.M. Cavaillon, 2005, Septic shock, *Lancet* 365, 63.
- Applegate, L.A., P. Luscher and R.M. Tyrrell, 1991, Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells, *Cancer Res* 51, 974.

- Aranda, R., B.C. Sydora, P.L. McAllister, S.W. Binder, H.Y. Yang, S.R. Targan and M. Kronenberg, 1997, Analysis of intestinal lymphocytes in mouse colitis mediated by transfer of CD4+, CD45RBhigh T cells to SCID recipients, *J Immunol* 158, 3464.
- Ardizzone, S. and G. Bianchi Porro, 2005, Biologic therapy for inflammatory bowel disease, *Drugs* 65, 2253.
- Banai, J., 2000, [Pharmacologic therapy of Crohn's disease and ulcerative colitis], *Orv Hetil* 141, 1171.
- Barton, S., R. Feakins, V. Winrow and D. Rampton, 1999, Expression of heat shock protein 32 is increased in ulcerative colitis and Crohn's disease., *AGA*.
- Barton, S.G., D.S. Rampton, V.R. Winrow, P. Domizio and R.M. Feakins, 2003, Expression of heat shock protein 32 (hemoxygenase-1) in the normal and inflamed human stomach and colon: an immunohistochemical study, *Cell Stress Chaperones* 8, 329.
- Berberat, P.O., A.R. Yi, K. Yamashita, M.M. Warny, E. Csizmadia, S.C. Robson and F.H. Bach, 2005, Heme oxygenase-1-generated biliverdin ameliorates experimental murine colitis, *Inflamm Bowel Dis* 11, 350.
- Boughton-Smith, N.K., J.L. Wallace, G.P. Morris and B.J. Whittle, 1988a, The effect of anti-inflammatory drugs on eicosanoid formation in a chronic model of inflammatory bowel disease in the rat, *Br J Pharmacol* 94, 65.
- Boughton-Smith, N.K., J.L. Wallace and B.J. Whittle, 1988b, Relationship between arachidonic acid metabolism, myeloperoxidase activity and leukocyte infiltration in a rat model of inflammatory bowel disease, *Agents Actions* 25, 115.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72, 248.

- Bradley, P.P., D.A. Priebe, R.D. Christensen and G. Rothstein, 1982, Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J Invest Dermatol* 78, 206.
- Cable, J.W., E.E. Cable and H.L. Bonkovsky, 1993, Induction of heme oxygenase in intestinal epithelial cells: studies in Caco-2 cell cultures, *Mol Cell Biochem* 129, 93.
- Carraway, M.S., A.J. Ghio, J.L. Taylor and C.A. Piantadosi, 1998, Induction of ferritin and heme oxygenase-1 by endotoxin in the lung, *Am J Physiol* 275, L583.
- Cavicchi, M., L. Gibbs and B.J. Whittle, 1999, Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) in human intestinal epithelial cells by nitric oxide donors, *Gastroenterology* 116, A867.
- Chamulitrat, W., N.V. Skrepnik and J.J. Spitzer, 1996, Endotoxin-induced oxidative stress in the rat small intestine: role of nitric oxide, *Shock* 5, 217.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi, 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* 162, 156.
- Clark, J.E., R. Foresti, P. Sarathchandra, H. Kaur, C.J. Green and R. Motterlini, 2000, Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H643.
- Crohn, B., 1932, presented to the library of the New York Academy of Medicine and reproduced with their permission.
- Csonka, C., E. Varga, P. Kovacs, P. Ferdinandy, I.E. Blasig, Z. Szilvassy and A. Tosaki, 1999, Heme oxygenase and cardiac function in ischemic/reperfused rat hearts, *Free Radic Biol Med* 27, 119.
- Desreumaux, P., L. Dubuquoy, S. Nutten, M. Peuchmaur, W. Englard, K. Schoonjans, B. Derijard, B. Desvergne, W. Wahli, P. Chambon, M.D. Leibowitz, J.F. Colombel and J. Auwerx, 2001, Attenuation of colon

inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies, *J Exp Med* 193, 827.

Dore, S., M. Takahashi, C.D. Ferris, R. Zakhary, L.D. Hester, D. Guastella and S.H. Snyder, 1999, Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2445.

Dryden, G.W., Jr., I. Deaciuc, G. Arteel and C.J. McClain, 2005, Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy, *Curr Gastroenterol Rep* 7, 308.

Durante, W., M.H. Kroll, N. Christodoulides, K.J. Peyton and A.I. Schafer, 1997, Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells, *Circ Res* 80, 557.

Essig, D.A., D.R. Borger and D.A. Jackson, 1997, Induction of heme oxygenase-1 (HSP32) mRNA in skeletal muscle following contractions, *Am J Physiol* 272, C59.

Fiocchi, C., 1998, Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis, *Gastroenterology* 115, 182.

Foresti, R., C.J. Green and R. Motterlini, 2004, Generation of bile pigments by haem oxygenase: a refined cellular strategy in response to stressful insults, *Biochem Soc Symp*, 177.

Foresti, R., P. Sarathchandra, J.E. Clark, C.J. Green and R. Motterlini, 1999, Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis, *Biochem J* 339 (Pt 3), 729.

Freitas, A., J.C. Alves-Filho, D.D. Secco, A.F. Neto, S.H. Ferreira, C. Barja-Fidalgo and F.Q. Cunha, 2006, Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation, *Br J Pharmacol* 149, 345.

- Galvez, J., M. Garrido, M. Merlos, M.I. Torres and A. Zarzuelo, 2000, Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat, *Br J Pharmacol* 130, 1949.
- Gaya, D.R., R.K. Russell, E.R. Nimmo and J. Satsangi, 2006, New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* 367, 1271.
- Gibbons, S.J. and G. Farrugia, 2004, The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract, *J Physiol* 556, 325.
- Grisham, M.B., 1994, Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease, *Lancet* 344, 859.
- Grisham, M.B., R.P. MacDermott and E.A. Deitch, 1990, Oxidant defense mechanisms in the human colon, *Inflammation* 14, 669.
- Grisham, M.B., C. Volkmer, P. Tso and T. Yamada, 1991, Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species, *Gastroenterology* 101, 540.
- Hanauer, S.B., 1996, Inflammatory bowel disease, *N Engl J Med* 334, 841.
- Hanauer, S.B., 2006, Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities, *Inflamm Bowel Dis* 12 Suppl 1, S3.
- Hartsfield, C.L., J. Alam and A.M. Choi, 1998, Transcriptional regulation of the heme oxygenase 1 gene by pyrrolidine dithiocarbamate, *Faseb J* 12, 1675.
- Hassall, C.J. and C.H. Hoyle, 1997, Heme oxygenase-2 and nitric oxide synthase in guinea-pig intracardiac neurones, *Neuroreport* 8, 1043.
- Hata, Y., T. Kawabe, H. Hiraishi, S. Ota, A. Terano and K.J. Ivey, 1997, Hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity to cultured colonic epithelial cells, *Life Sci* 60, 2221.

- Hegazi, R.A., K.N. Rao, A. Mayle, A.R. Sepulveda, L.E. Otterbein and S.E. Plevy, 2005, Carbon monoxide ameliorates chronic murine colitis through a heme oxygenase 1-dependent pathway, *J Exp Med* 202, 1703.
- Holmes, E.W., S.L. Yong, D. Eiznhamer and A. Keshavarzian, 1998, Glutathione content of colonic mucosa: evidence for oxidative damage in active ulcerative colitis, *Dig Dis Sci* 43, 1088.
- Horváth, K., C. Varga, A. Berkó, A. Pósa, F. László and B.J.R. Whittle, 2008, The involvement of heme oxygenase-1 activity in the therapeutic actions of 5-aminosalicylic acid in rat colitis, *Eur J Pharmacol*.
- Ito, K., T. Yano, K. Hagiwara, H. Ozasa and S. Horikawa, 1997, Effects of vitamin E deficiency and glutathione depletion on stress protein heme oxygenase 1 mRNA expression in rat liver and kidney, *Biochem Pharmacol* 54, 1081.
- Jobin, C., C.A. Bradham, M.P. Russo, B. Juma, A.S. Narula, D.A. Brenner and R.B. Sartor, 1999, Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity, *J Immunol* 163, 3474.
- Kim, Y.M., H. Bergonia and J.R. Lancaster, Jr., 1995, Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes, *FEBS Lett* 374, 228.
- Kirkby, K.A. and C.A. Adin, 2006, Products of heme oxygenase and their potential therapeutic applications, *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F563.
- Kiss, J., D. Lamarque, J.C. Delchier and B.J. Whittle, 1997, Time-dependent actions of nitric oxide synthase inhibition on colonic inflammation induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats, *Eur J Pharmacol* 336, 219.
- Klotz, U., 1985, Clinical efficacy of oral 5-aminosalicylic acid in the treatment of inflammatory bowel disease, *Am J Gastroenterol* 80, 660.
- Koutroubakis, I., O.N. Manousos, S.G. Meuwissen and A.S. Pena, 1996, Environmental risk factors in inflammatory bowel disease, *Hepatogastroenterology* 43, 381.

- Kovacs, A., 1991, [New salicylic acid derivatives in the treatment of inflammatory intestinal diseases], *Orv Hetil* 132, 1317.
- Kozma, F., R.A. Johnson, F. Zhang, C. Yu, X. Tong and A. Nasjletti, 1999, Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels, *Am J Physiol* 276, R1087.
- Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky and W. Muller, 1993, Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis, *Cell* 75, 263.
- Lavrovsky, Y., M.L. Schwartzman, R.D. Levere, A. Kappas and N.G. Abraham, 1994, Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5987.
- Lih-Brody, L., S.R. Powell, K.P. Collier, G.M. Reddy, R. Cerchia, E. Kahn, G.S. Weissman, S. Katz, R.A. Floyd, M.J. McKinley, S.E. Fisher and G.E. Mullin, 1996, Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease, *Dig Dis Sci* 41, 2078.
- Lofberg, R., A. Danielsson, O. Suhr, A. Nilsson, R. Schioler, A. Nyberg, R. Hultcrantz, B. Kollberg, R. Gillberg, R. Willen, T. Persson and L. Salde, 1996, Oral budesonide versus prednisolone in patients with active extensive and left-sided ulcerative colitis, *Gastroenterology* 110, 1713.
- Maines, M.D., 1997, The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37, 517.
- Maines, M.D., 2005, The heme oxygenase system: update 2005, *Antioxid Redox Signal* 7, 1761.
- Maines, M.D. and A. Kappas, 1977, Metals as regulators of heme metabolism, *Science* 198, 1215.
- Maines, M.D., G.M. Trakshel and R.K. Kutty, 1986, Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible, *J Biol Chem* 261, 411.

- Malchow, H., K. Ewe, J.W. Brandes, H. Goebell, H. Ehms, H. Sommer and H. Jesdinsky, 1984, European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): results of drug treatment, *Gastroenterology* 86, 249.
- McCoubrey, W.K., Jr., T.J. Huang and M.D. Maines, 1997, Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3, *Eur J Biochem* 247, 725.
- McKenzie, S.J., M.S. Baker, G.D. Buffinton and W.F. Doe, 1996, Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease, *J Clin Invest* 98, 136.
- McKenzie, S.M., W.F. Doe and G.D. Buffinton, 1999, 5-aminosalicylic acid prevents oxidant mediated damage of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in colon epithelial cells, *Gut* 44, 180.
- Mitani, K., H. Fujita, Y. Fukuda, A. Kappas and S. Sassa, 1993, The role of inorganic metals and metalloporphyrins in the induction of haem oxygenase and heat-shock protein 70 in human hepatoma cells, *Biochem J* 290 (Pt 3), 819.
- Morris, G.P., P.L. Beck, M.S. Herridge, W.T. Depew, M.R. Szewczuk and J.L. Wallace, 1989, Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon, *Gastroenterology* 96, 795.
- Motterlini, R., R. Foresti, R. Bassi and C.J. Green, 2000, Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress, *Free Radic Biol Med* 28, 1303.
- Naito, Y., T. Takagi and T. Yoshikawa, 2004, Heme oxygenase-1: a new therapeutic target for inflammatory bowel disease, *Aliment Pharmacol Ther* 20 Suppl 1, 177.
- Nakao, A., L.E. Otterbein, M. Overhaus, J.K. Sarady, A. Tsung, K. Kimizuka, M.A. Nalesnik, T. Kaizu, T. Uchiyama, F. Liu, N. Murase, A.J. Bauer and F.H. Bach, 2004, Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel, *Gastroenterology* 127, 595.

- Nath, K.A., 2006, Heme oxygenase-1: a provenance for cytoprotective pathways in the kidney and other tissues, *Kidney Int* 70, 432.
- Neurath, M.F., C. Becker and K. Barbulescu, 1998, Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut, *Gut* 43, 856.
- Otterbein, L.E., F.H. Bach, J. Alam, M. Soares, H. Tao Lu, M. Wysk, R.J. Davis, R.A. Flavell and A.M. Choi, 2000, Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway, *Nat Med* 6, 422.
- Otterbein, L.E., M.P. Soares, K. Yamashita and F.H. Bach, 2003, Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme, *Trends Immunol* 24, 449.
- Papadakis, K.A., 2004, Chemokines in inflammatory bowel disease, *Curr Allergy Asthma Rep* 4, 83.
- Paul, G., F. Bataille, F. Obermeier, J. Bock, F. Klebl, U. Strauch, D. Lochbaum, P. Rummele, S. Farkas, J. Scholmerich, M. Fleck, G. Rogler and H. Herfarth, 2005, Analysis of intestinal haem-oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis, *Clin Exp Immunol* 140, 547.
- Pavlick, K.P., F.S. Laroux, J. Fuseler, R.E. Wolf, L. Gray, J. Hoffman and M.B. Grisham, 2002, Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease, *Free Radic Biol Med* 33, 311.
- Peppercorn, M.A. and P. Goldman, 1973, Distribution studies of salicylazosulfapyridine and its metabolites, *Gastroenterology* 64, 240.
- Petit-Bertron, A.F., C. Fitting, J.M. Cavaillon and M. Adib-Conquy, 2003, Adherence influences monocyte responsiveness to interleukin-10, *J Leukoc Biol* 73, 145.
- Petit-Bertron, A.F., T. Pedron, U. Gross, J.Y. Coppee, P.J. Sansonetti, J.M. Cavaillon and M. Adib-Conquy, 2005, Adherence modifies the regulation of gene expression induced by interleukin-10, *Cytokine* 29, 1.

- Pfeffer, K.D., T.P. Huecksteadt and J.R. Hoidal, 1993, Expression and regulation of tumor necrosis factor in macrophages from cystic fibrosis patients, *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 511.
- Piette, J., B. Piret, G. Bonizzi, S. Schoonbroodt, M.P. Merville, S. Legrand-Poels and V. Bours, 1997, Multiple redox regulation in NF-kappaB transcription factor activation, *Biol Chem* 378, 1237.
- Pinkus, R., L.M. Weiner and V. Daniel, 1996, Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF-kappaB, and glutathione S-transferase gene expression, *J Biol Chem* 271, 13422.
- Rachmilewitz, D., F. Karmeli and E. Okon, 1995, Sulfhydryl blocker-induced rat colonic inflammation is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase, *Gastroenterology* 109, 98.
- Ramakrishna, B.S., R. Varghese, S. Jayakumar, M. Mathan and K.A. Balasubramanian, 1997, Circulating antioxidants in ulcerative colitis and their relationship to disease severity and activity, *J Gastroenterol Hepatol* 12, 490.
- Rivera, E., I. Flores, E. Rivera and C.B. Appleyard, 2006, Molecular profiling of a rat model of colitis: validation of known inflammatory genes and identification of novel disease-associated targets, *Inflamm Bowel Dis* 12, 950.
- Rogler, G. and T. Andus, 1998, Cytokines in inflammatory bowel disease, *World J Surg* 22, 382.
- Rousseaux, C., B. Lefebvre, L. Dubuquoy, P. Lefebvre, O. Romano, J. Auwerx, D. Metzger, W. Wahli, B. Desvergne, G.C. Naccari, P. Chavatte, A. Farce, P. Bulois, A. Cortot, J.F. Colombel and P. Desreumaux, 2005, Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, *J Exp Med* 201, 1205.

- Rutgeerts, P., G. Van Assche and S. Vermeire, 2006, Review article: Infliximab therapy for inflammatory bowel disease--seven years on, *Aliment Pharmacol Ther* 23, 451.
- Ryter, S.W., J. Alam and A.M. Choi, 2006, Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications, *Physiol Rev* 86, 583.
- Sakaguchi, S., S. Furusawa, K. Yokota, K. Sasaki, M. Takayanagi and Y. Takayanagi, 1996, The enhancing effect of tumour necrosis factor-alpha on oxidative stress in endotoxemia, *Pharmacol Toxicol* 79, 259.
- Salzman, A., A.G. Denenberg, I. Ueta, M. O'Connor, S.C. Linn and C. Szabo, 1996, Induction and activity of nitric oxide synthase in cultured human intestinal epithelial monolayers, *Am J Physiol* 270, G565.
- Sanchez-Hidalgo, M., A.R. Martin, I. Villegas and C. Alarcon De La Lastra, 2005, Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, reduces chronic colonic inflammation in rats, *Biochem Pharmacol* 69, 1733.
- Sartor, R.B., 1997, Review article: How relevant to human inflammatory bowel disease are current animal models of intestinal inflammation? *Aliment Pharmacol Ther* 11 Suppl 3, 89.
- Selby, W., 2000, Pathogenesis and therapeutic aspects of Crohn's disease, *Vet Microbiol* 77, 505.
- Seo, H.G., I. Takata, M. Nakamura, H. Tatsumi, K. Suzuki, J. Fujii and N. Taniguchi, 1995, Induction of nitric oxide synthase and concomitant suppression of superoxide dismutases in experimental colitis in rats, *Arch Biochem Biophys* 324, 41.
- Simmonds, N.J. and D.S. Rampton, 1993, Inflammatory bowel disease--a radical view, *Gut* 34, 865.
- Singer, II, D.W. Kawka, S. Scott, J.R. Weidner, R.A. Mumford, T.E. Riehl and W.F. Stenson, 1996, Expression of inducible nitric oxide synthase and

- nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 111, 871.
- Slebos, D.J., S.W. Ryter and A.M. Choi, 2003, Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in pulmonary medicine, *Respir Res* 4, 7.
- Somerville, K.W., R.F. Logan, M. Edmond and M.J. Langman, 1984, Smoking and Crohn's disease, *Br Med J (Clin Res Ed)* 289, 954.
- Song, M., B. Xia and J. Li, 2006, Effects of topical treatment of sodium butyrate and 5-aminosalicylic acid on expression of trefoil factor 3, interleukin 1beta, and nuclear factor kappaB in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats, *Postgrad Med J* 82, 130.
- Soti, C., E. Nagy, Z. Giricz, L. Vigh, P. Csermely and P. Ferdinandy, 2005, Heat shock proteins as emerging therapeutic targets, *Br J Pharmacol* 146, 769.
- Stocker, R., Y. Yamamoto, A.F. McDonagh, A.N. Glazer and B.N. Ames, 1987, Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science* 235, 1043.
- Sun, F.F., P.S. Lai, G. Yue, K. Yin, R.G. Nagele, D.M. Tong, R.F. Krzesicki, J.E. Chin and P.Y. Wong, 2001, Pattern of cytokine and adhesion molecule mRNA in hapten-induced relapsing colon inflammation in the rat, *Inflammation* 25, 33.
- Takahashi, T., K. Morita, R. Akagi and S. Sassa, 2004, Protective role of heme oxygenase-1 in renal ischemia, *Antioxid Redox Signal* 6, 867.
- te Velde, A.A., M.I. Verstege and D.W. Hommes, 2006, Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis, *Inflamm Bowel Dis* 12, 995.
- Ten Hove, T., A. Corbaz, H. Amitai, S. Aloni, I. Belzer, P. Graber, P. Drillenburger, S.J. van Deventer, Y. Chvatchko and A.A. Te Velde, 2001, Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice, *Gastroenterology* 121, 1372.

- Tenhunen, R., H.S. Marver and R. Schmid, 1968, The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 748.
- Torres, M.I., M. Garcia-Martin, M.I. Fernandez, N. Nieto, A. Gil and A. Rios, 1999, Experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid: an ultrastructural and histochemical study, *Dig Dis Sci* 44, 2523.
- Tozaki, H., T. Odoriba, N. Okada, T. Fujita, A. Terabe, T. Suzuki, S. Okabe, S. Muranishi and A. Yamamoto, 2002, Chitosan capsules for colon-specific drug delivery: enhanced localization of 5-aminosalicylic acid in the large intestine accelerates healing of TNBS-induced colitis in rats, *J Control Release* 82, 51.
- Tschugguel, W., F. Stonek, Z. Zhegu, W. Dietrich, C. Schneeberger, T. Stimpfl, T. Waldhoer, W. Vycudilik and J.C. Huber, 2001, Estrogen increases endothelial carbon monoxide, heme oxygenase 2, and carbon monoxide-derived cGMP by a receptor-mediated system, *J Clin Endocrinol Metab* 86, 3833.
- Tsiftoglou, A.S., A.I. Tsamadou and L.C. Papadopoulou, 2006, Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular, and pharmacological aspects, *Pharmacol Ther* 111, 327.
- Turkseven, S., A. Kruger, C.J. Mingone, P. Kaminski, M. Inaba, L.F. Rodella, S. Ikehara, M.S. Wolin and N.G. Abraham, 2005, Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H701.
- Vandenabeele, P., W. Declercq, R. Beyaert and W. Fiers, 1995, Two tumour necrosis factor receptors: structure and function, *Trends Cell Biol* 5, 392.
- Varga, C., F. Laszlo, P. Fritz, M. Cavicchi, D. Lamarque, K. Horvath, A. Posa, A. Berko and B.J. Whittle, 2007, Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat, *Eur J Pharmacol* 561, 164.

- Vesely, M.J., D.J. Exon, J.E. Clark, R. Foresti, C.J. Green and R. Motterlini, 1998, Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro, *Am J Physiol* 275, C1087.
- Wang, W.P., X. Guo, M.W. Koo, B.C. Wong, S.K. Lam, Y.N. Ye and C.H. Cho, 2001, Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G586.
- Watson, A.J., J.N. Askew and G.I. Sandle, 1994, Characterisation of oxidative injury to an intestinal cell line (HT-29) by hydrogen peroxide, *Gut* 35, 1575.
- Whittle, B.J., M. Cavicchi and D. Lamarque, 2003, Assessment of anticolitic drugs in the trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) rat model of inflammatory bowel disease, *Methods Mol Biol* 225, 209.
- Willis, D., A.R. Moore, R. Frederick and D.A. Willoughby, 1996, Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response, *Nat Med* 2, 87.
- Willis, D., A.R. Moore and D.A. Willoughby, 2000, Heme oxygenase isoform expression in cellular and antibody-mediated models of acute inflammation in the rat, *J Pathol* 190, 627.
- Woodruff, T.M., T.V. Arumugam, I.A. Shiels, R.C. Reid, D.P. Fairlie and S.M. Taylor, 2003, A potent human C5a receptor antagonist protects against disease pathology in a rat model of inflammatory bowel disease, *J Immunol* 171, 5514.
- Wu, L. and R. Wang, 2005, Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications, *Pharmacol Rev* 57, 585.
- Wunder, C. and R.F. Potter, 2003, The heme oxygenase system: its role in liver inflammation, *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 3, 199.

Zakhary, R., S.P. Gaine, J.L. Dinerman, M. Ruat, N.A. Flavahan and S.H. Snyder, 1996, Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 795.

Zingarelli, B., C. Szabo and A.L. Salzman, 1999, Blockade of Poly(ADP-ribose) synthetase inhibits neutrophil recruitment, oxidant generation, and mucosal injury in murine colitis, *Gastroenterology* 116, 335.