

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK  
KÍSÉRLETES VASTAGBÉLGYULLADÁSOS  
PATKÁNYMODELLBEN

**MAGYARINÉ BERKÓ ANIKÓ**

TÉMAVEZETŐK:

DR. VARGA CSABA

SÓTINÉ DR. BAGYÁNSZKI MÁRIA

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK



SZEGED

2019

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	8
1.1 A gyulladásos bélbetegségek jellemzése.....	8
1.1.1 Epidemiológia.....	8
1.1.2 Környezeti tényezők.....	9
1.1.3 A gyulladásos bélbetegség kialakulásában szerepet játszó faktorok, strukturális elemek, és molekuláris mechanizmusok.....	9
1.1.3.1 Genetikai tényezők.....	9
1.1.3.2 Mikrobiális faktorok.....	10
1.1.3.3 A bél szövettani felépítése.....	10
1.2 A gyulladásos bélbetegségek klinikai megjelenési formái.....	16
1.2.1 Diagnosztikai módszerek.....	16
1.3 A betegség kezelésében jelenleg alkalmazott gyógyszercsoportok.....	18
1.3.1 Szalicilsav származékok.....	18
1.3.2 Glükokortikoszteroidok.....	18
1.3.3 Immunszuppresszív, immunmodulációs szerek.....	19
1.3.4 Antibiotikumok, probiotikumok.....	19
1.3.5 Biológiai hatóanyagok a gyulladásos bélbetegségekben, anti-TNF- $\alpha$ kezelés.....	19
1.3.6 Lehetséges természetes antioxidánsok és egyéb gyulladást csökkentő anyagok.....	21
1.3.7 Sebészeti kezelés.....	22
1.4 A Crohn-betegség modellezése.....	22
2. Célkitűzések.....	24
3. Anyagok és módszerek.....	25
3.1 Krónikus 2,4,6–trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS)-modell.....	25
3.1.1 Makroszkópos analízis.....	25
3.1.2 Szövettani vizsgálatok.....	25
3.1.3 Fehérje meghatározás.....	26
3.1.4 MMP-9 és TIMP-1 fehérje expresszió vizsgálata.....	27
3.1.5 Statisztikai analízis.....	28
3.2 Akut 2,4,6 –trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS)-modell.....	28
3.2.1 A nyálkahártya makroszkópos analízise.....	29

3.2.2	A nyálkahártya gyulladás mértékének súlyossága .....	29
3.2.3	Colon súlymérés .....	29
3.2.4	Mieloperoxidáz aktivitás mérése.....	30
3.2.5	IL-6, TNF- $\alpha$ szint meghatározása.....	30
3.2.6	Szöveti LTB <sub>4</sub> szint meghatározása.....	30
3.2.7	Szöveti vizsgálatok.....	30
3.2.8	Felhasznált anyagok és vegyszerek.....	32
3.2.9	Statisztikai analízis .....	32
4.	Krónikus kísérleti eredmények .....	33
4.1	Makroszkópos gyulladás paraméterek vizsgálata krónikus TNBS kezelés után .....	33
4.2	A testsúly változásának nyomon követése krónikus TNBS kezelés után .....	34
4.3	Krónikus TNBS kezelés utáni szövettani eredmények.....	35
4.4	MMP-9 és TIMP-1 expressziója krónikus TNBS kezelés után .....	36
4.5	MMP-9 aktivitása krónikus TNBS kezelés után .....	37
5.	Akut kísérleti eredmények .....	39
5.1	A hisztamin H4 receptor antagonisták és az LTA <sub>4</sub> H inhibitor kezelés hatása az állatok gyulladás paramétereire akut TNBS kezelés után.....	39
5.1.1	A hisztamin H4 receptor antagonisták és az LTA <sub>4</sub> H inhibitor kezelés hatása a léziók nagyságára akut TNBS kezelés után.....	43
5.1.2	A hisztamin H4 receptor antagonisták és az LTA <sub>4</sub> H inhibitor kezelés hatása az állatok testsúlyára akut TNBS kezelés után.....	44
5.1.3	A hisztamin H4 receptor antagonisták és az LTA <sub>4</sub> H inhibitor kezelés hatása az állatok colonsúlyára akut TNBS kezelés után .....	45
5.1.4	A hisztamin H4 receptor antagonisták és az LTA <sub>4</sub> H inhibitor kezelés hatása a mieloperoxidáz aktivitásra akut TNBS kezelés után.....	46
5.1.5	A hisztamin H4 receptor antagonisták és az LTA <sub>4</sub> H inhibitor kezelés hatása a TNF- $\alpha$ szintre akut TNBS kezelés után.....	47
5.1.6	Az LTA <sub>4</sub> H inhibitor kezelés hatása a colon IL-6 és LTB <sub>4</sub> szintjére .....	48
5.1.7	A hisztamin H4 receptor blokkoló kezelés hatásának szövettani értékelése .....	49
6.	Eredmények megbeszélése .....	53
6.1	Krónikus vizsgálatok eredményeinek megbeszélése .....	53
6.1.1	MMP-9 és TIMP-1 fehérje expresszió.....	53
6.1.2	MMP-9 aktivitás.....	54
6.2	Akut vizsgálatok eredményeinek megbeszélése .....	54
6.2.1	A hisztamin H4 receptor antagonisták kezelés hatása a gyulladás kialakulására .....	55

---

6.2.2	Az LTA <sub>4</sub> H inhibitor kezelés hatása a gyulladásra.....	56
7.	Következtetések.....	57
8.	Köszönetnyilvánítás .....	58
9.	Irodalomjegyzék .....	59
10.	Tartalmi összefoglaló.....	76
11.	Summary.....	79
12.	Tudományos közlemények listája .....	82
12.1	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája .....	82
12.2	Folyóiratban megjelent egyéb közlemények listája .....	82

# Rövidítések jegyzéke

<b>5-ASA</b>	5-amino-szalicilsav
<b>5-HpETE</b>	5-hidroperoxieikosa-7,9,11,14-tetraénsav
<b>5-LO</b>	5-lipoxigenáz
<b>6-MP</b>	6-mercaptopurin
<b>ANCA</b>	anti-neutrofil citoplazmatikus antitestek
<b>ANOVA</b>	analysis of variance-szóráslelemzés
<b>AOM</b>	azoxymetán
<b>ASCA</b>	anti- <i>Saccharomyces</i> antitestek
<b>ATG16L</b>	autophagy related gene 16 like 1 gén
<b>AZA</b>	azathioprin
<b>BSA</b>	marhaszérum albumin
<b>BLT1</b>	leukotrién B <sub>4</sub> receptor
<b>CARD15</b>	kaspáz aktivációs domén 15
<b>CD</b>	Crohn-betegség
<b>CD4<sup>+</sup></b>	Helper T-sejt
<b>CD8<sup>+</sup></b>	Szupresszor T-sejt
<b>CRP</b>	C reaktív fehérje
<b>CT</b>	komputertomográf
<b>CU</b>	colitis ulcerosa
<b>DNS</b>	deoxiribonukleinsav
<b>DSS</b>	dextrán nátrium szulfát
<b>ECM</b>	extracelluláris mátrix
<b>ELISA</b>	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálatok
<b>FLAP</b>	5-lipoxigenáz aktivátor fehérje
<b>GWAS</b>	teljes genom asszociált vizsgálatok
<b>H1R</b>	hisztamin H1 receptor
<b>H2R</b>	hisztamin H2 receptor
<b>H3R</b>	hisztamin H3 receptor
<b>H4R</b>	hisztamin H4 receptor
<b>HA</b>	hialuronán
<b>HO</b>	hem-oxigenáz
<b>HPCD</b>	(2-hidroxypropil)- $\beta$ -ciclodextrin
<b>hsCRP</b>	ultraszenzitív C reaktív fehérje
<b>IBD</b>	gyulladásos bélbetegség
<b>IBDU</b>	nem kategorizált gyulladásos bélbetegségek
<b>IC</b>	intra colonális
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferon- $\gamma$
<b>IgG1</b>	immunglobulin-G 1
<b>IL-1</b>	interleukin-1
<b>IL-10</b>	interleukin-10

---

<b>IL-12</b>	interleukin-12
<b>IL-17</b>	interleukin-17
<b>IL-2</b>	interleukin-2
<b>IL-23</b>	interleukin-23
<b>IL-6</b>	interleukin-6
<b>IL23R</b>	interleukin 23 receptor gén
<b>JNJ 10191584</b>	H4 receptor antagonista, (5-chlorobenzimidazolyl N-methylpiperazine carboxamide)
<b>JNJ 26993135</b>	LTA <sub>4</sub> H inhibitor (1-[4-(benzothiazol-2-yloxy)-benzyl]-piperidine-4-carboxil acid)
<b>LTA<sub>4</sub></b>	leukotrién A <sub>4</sub>
<b>LTA<sub>4</sub>H</b>	leukotrién A <sub>4</sub> hidroláz
<b>LTB<sub>4</sub></b>	leukotrién B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b>	leukotrién C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b>	leukotrién D <sub>4</sub>
<b>MES</b>	mesalamine
<b>MMP-1</b>	mátrix metalloproteináz 1
<b>MMP-2</b>	mátrix metalloproteináz 2
<b>MMP-3</b>	mátrix metalloproteináz 3
<b>MMP-7</b>	mátrix metalloproteináz 7
<b>MMP-8</b>	mátrix metalloproteináz 8
<b>MMP-9</b>	mátrix metalloproteináz 9
<b>MMP-10</b>	mátrix metalloproteináz 10
<b>MMP-13</b>	mátrix metalloproteináz 13
<b>MMP-20</b>	mátrix metalloproteináz 20
<b>MMX</b>	multimátrix
<b>MP</b>	myenterikus plexus
<b>MPO</b>	mieloperoxidáz aktivitás
<b>MRI</b>	mágneses rezonancia vizsgálat
<b>MTX</b>	metotrexát
<b>NAC</b>	N-acetilcisztein
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	nukleáris faktor-kappa B
<b>NOD</b>	nukleotid kötő oligomerizációs domén
<b>NOD2</b>	nukleotid oligomerizációs domain 2
<b>NSAIDs</b>	nem szteroid gyulladáscsökkentők
<b>PAF</b>	platelet aktiváló faktor
<b>PAMP</b>	patogén asszociált molekuláris mintázat
<b>PBS</b>	foszfát puffer
<b>PML</b>	progresszív multifokális leukoencephalopathia
<b>PMSF</b>	fenilmetilszulfonil fluorid
<b>QT szakasz</b>	a kamraizomzat depolarizációjának és repolarizációjának együttes időtartama
<b>ROS</b>	reaktív oxigén gyökök
<b>SUC</b>	szukralfát

---

<b>TBC</b>	tuberkulózis
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	növekedési faktor $\beta$
<b>Th1</b>	T helper sejt 1
<b>Th2</b>	T helper sejt 2
<b>Th17</b>	T helper sejt 17
<b>TIMP-1</b>	szöveti MMP inhibitor 1
<b>TIMP-2</b>	szöveti MMP inhibitor 2
<b>TIMP-3</b>	szöveti MMP inhibitor 3
<b>TIMP-4</b>	szöveti MMP inhibitor 4
<b>TJ</b>	szoros sejtkapcsolat
<b>TLR</b>	Toll like receptor
<b>TNBS</b>	2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	tumor nekrosis faktor-alfa
<b>Treg</b>	regulátor T sejt

### **Kulcsszavak**

Crohn-betegség, TNBS-modell, H4 hisztamin receptor antagonist, leukotrién B4 inhibitor, MMP-9, TIMP-1

# 1. Bevezetés

## 1.1 A gyulladásoos bélbetegségek jellemzése

A gyulladásoos bélbetegségek (inflammatory bowel diseases, IBD) heterogén betegségek, krónikus visszaeső zavarokat okoznak az emésztőszervrendszer területén, az arra genetikailag hajlamos egyéneknél. A betegségre jellemző a ciklikusság, aktív és nyugalmi állapotok váltakozása. A gyulladás során legkorábban jelentkező makroszkópikus elváltozás a nyálkahártya ödémás kifelélyesedése, valamint a gyulladásoos és hegesedési folyamatok miatt kialakult striktúrák (szűkült bélszakaszok). Az előforduló tünetek, mint a hasmenés, hasi fájdalom, görcsök, csökkent étvágy, fogyás, rektális vérvesztés, láz és fáradtság jelentősen befolyásolják a betegek életminőségét, a betegség végkimenetelét<sup>[1]</sup>.

Crohn és munkatársai által először 1932-ben publikált ismeretlen etiológiájú, krónikus gyulladásoos bélbetegség elnevezése sokféleképpen szerepelhet, pl. „*ileitis terminalis*”, „*enteritis regionalis*”, „*ileitis regionalis*”, „*ileitis segmentalis*”, „*ileocolitis granulomatosa*” néven. Az enteritis regionalis 1932-ben került először leírásra a JAMA-ban Crohn, Ginsburg és Oppenheimer által, és nevét a patológus Crohn-ról kapta<sup>[2]</sup>.

Osztályozásuk:

### **Crohn-betegség (CD)**

A gyomor-bélcsatorna bármely szakaszán előforduló, minden szövettani réteget érintő krónikus gyulladás, mely az ileum disztális részén és a colonban jelentkezik leggyakrabban. A gyulladásoos folyamat a bélrendszeren kívül más területeken is megjelenik, CD-ben ilyen az ízületi gyulladás, májbetegség, bőr tünetek, illetve a szem gyulladásoos betegsége<sup>[3, 4]</sup>. A sorozatos fel-lángolások eredményeként fisztulák, fibrotikus szűkületek alakulhatnak ki.

### **Colitis ulcerosa (CU)**

A krónikus gyulladás összefüggő, a mucosa, felületesen a submucosa területét érinti, és a colonra lokalizálódik<sup>[5]</sup>.

### **Nem kategorizált colitis (IBDU)**

Nem rendelkezik differenciál diagnózissal, ezért nem lehet egyértelműen meghatározni melyik alcsoportba tartozik. Tüneteiben és lefolyásában a CD és UC közé tehető<sup>[6]</sup>, és kétszer olyan gyakran fordul elő gyerekekben, mint felnőttekben<sup>[7]</sup>.

#### 1.1.1 Epidemiológia

Az IBD leggyakoribb földrajzi előfordulási helyei Észak-Amerika és Európa északi országai<sup>[8, 9]</sup>, de Dél- és Kelet-Európában, Ázsiában is egyre gyorsabban növekszik a betegek száma<sup>[10]</sup>. Mindkét nemben közel azonos arányban fordul elő, a legtöbb megbetegedés 30 éves kor alatt kezdődik, a leggyakoribb időszak a 15 és 30 év között fordul elő<sup>[11, 12]</sup>.



## 1.1.2 Környezeti tényezők

A **dohányzás** rontja a betegek állapotát CD esetén, növelve a fellángolások arányát<sup>[13]</sup>, szükségessé téve az immunszuppresszív és szteroidos kezelést. A dohányzás abbahagyása jótékony hatású a betegség lefolyására, csökken a kockázata a posztoperatív kiújulásnak<sup>[14]</sup>, azonban UC esetén a dohányzásról való leszokás növeli a fellángolásokat, és a kezelés szükségességét<sup>[15]</sup>.

A mikroszkópikus nagyságú idegentestek és emészthetetlen anyagok kóroki szerepe is felmerült a betegség kialakulásában, azonban az, hogy miként hat az **étrend** a gyulladásra, nem tisztázott. A nyugati étrend, a "hús-édes" diéta, a vörös húsok magasabb bevitel, a finomított gabonafélék, és a magas cukor tartalmú italok megnövelik az IBD kockázatát<sup>[16, 17]</sup>. Az alacsony rost tartalmú étrend magas cukorfogyasztással az UC kockázatát is emeli<sup>[18]</sup>. Ezzel szemben, a hosszan tartó, magas rost tartalmú étrend esetén, ahol a rost gyümölcs-, zöldség eredetű, csökken a CD kialakulásának kockázata<sup>[19]</sup>.

A **D-vitamin hiány** vagy alacsony D-vitamin szint gyakran fokozza a betegség **aktivitását**. Néhány tanulmány szerint a D-vitamin fokozott bevitel, a fogyás, a fizikai aktivitás növelése képes csökkenteni a betegség kiújulásának lehetőségét<sup>[20, 21]</sup>.

Az antibiotikumok<sup>[22]</sup>, a nem szteroid gyulladáscsökkentő **gyógyszerek** (NSAIDs), a fogamzásgátlók és a menopauza utáni hormonpótlás megnövelik az IBD kialakulásának kockázatát<sup>[19, 23]</sup>.

További kofaktorként szerepel a **stressz**, a depresszió, a szorongás, melyek a már kialakult tünetek súlyosbodását idézhetik elő<sup>[24]</sup>.

## 1.1.3 A gyulladósos bélbetegség kialakulásában szerepet játszó faktorok, strukturális elemek, és molekuláris mechanizmusok

Annak ellenére, hogy számos tanulmány született a gyulladáshoz vezető immunmechanizmusokkal kapcsolatban, a tényezők pontos szerepe továbbra sem tisztázott. A fő megállapítás az, hogy a betegség kialakulásában részt vesz a **kontrollálatlan immunrendszer**, a kommenzalista **baktériumok** és **egyéb luminális anyagok** átjutása a **sérült epitheliumon**<sup>[25, 26]</sup>.

### 1.1.3.1 Genetikai tényezők

Elsőfokú rokoni kapcsolatban 12x-15x nagyobb a kockázata a betegség kialakulásának, mint a hasonló korú lakosság esetén<sup>[27]</sup>. Egy ikertanulmány szerint fokozott nukleáris faktor-kappa B-(NF- $\kappa$ B) és neutrofil aktivitást, magasabb mieloperoxidáz szintet figyeltek meg mind az egyetétjű, mind a kétetétjű ikerpár eltérő, egészséges tagjaiban<sup>[28]</sup>.

A betegségre való hajlam örökletes, genetikai variációk meghatározzák a betegség altípusát, lefolyását, az adott terápiára történő válaszreakciókat. A teljes genom asszociációs (genome wide association scan-GWAS) vizsgálatok során számos összefüggést találtak a homeosztázis fenntartásáért felelős folyamatok (epiteliális barrier, autofágia, limfocita differenciálódás) és az IBD kialakulása között<sup>[29]</sup>. A CD kialakulásáért feltételezhetően a NOD2/CARD15 gén 3 féle mutációja is felelős, amely genetikai rizikófaktornak tekinthető<sup>[30, 31]</sup>. Hajlamosító tényező az IL-23 receptor gén(IL-23R) és az autofágiáért felelős gén ATG16L1 polimorfizmusa is<sup>[32, 33]</sup>.

### 1.1.3.2 Mikrobiális faktorok

A **mikroorganizmusoknak** alapvető szerepük van a kóros folyamatok kialakulásában, klinikai- illetve szövettani megnyilvánulás alapján feltételezik szerepüket. Számos baktérium, mint a vékonybél-tuberkulózist okozó *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis*, a *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, valamint az Epstein Bar vírus fertőzés gyakrabban fordul elő krónikus bélgyulladásos betegekben, amely hozzá járulhat a folyamatos gyulladáshoz, csökkentve ezáltal a különböző kezelések hatékonyságát<sup>[34-36]</sup>

### 1.1.3.3 A bél szövettani felépítése

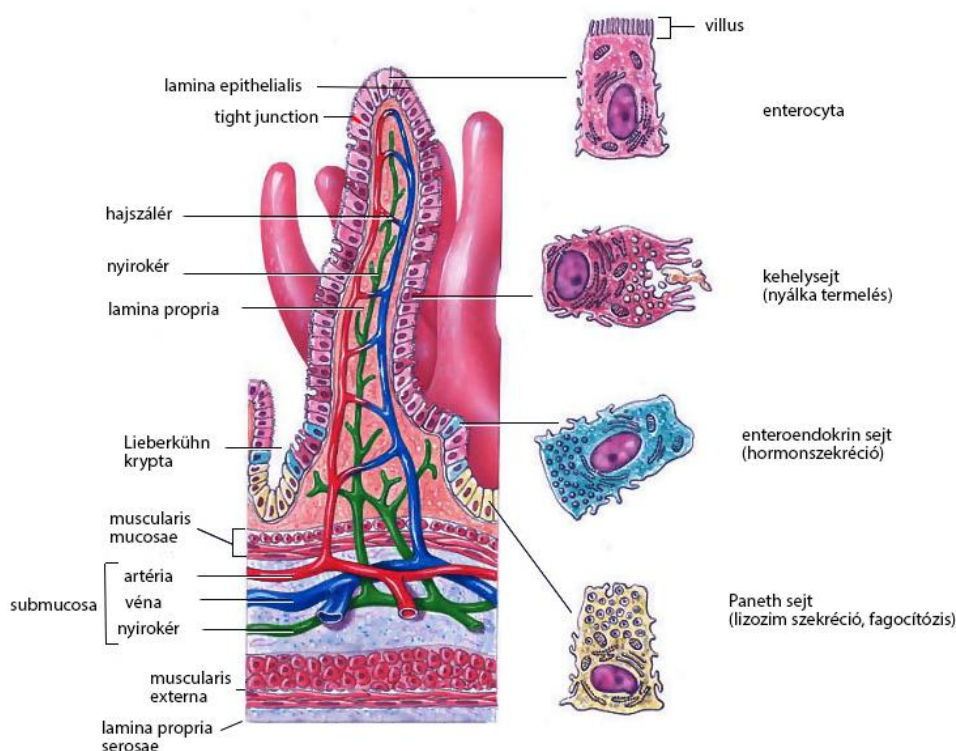
A bél epitélium szelektív gátként elhatárolja a lumen tartalmát a környező szövetektől, így tartva fenn a homeosztatis egyensúlyt<sup>[37]</sup>. A gyulladással járó folyamatokban ez az egyensúly felborul a szerkezeti elemek, és azok funkciójának károsodásával<sup>[38]</sup>.

A bél lumenét 3 rétegből álló nyálkahártya borítja (1. ábra). A **lamina epitheliális**ban az egyrétegű hengerhámsejtek (enterocyták) szorosan illeszkednek egymáshoz, fizikailag megakadályozzák a Gram-pozitív és -negatív baktériumok, valamint más antigének fokozott bejutását a véráramba. A szoros kapcsolatért a tight junctionok (TJ) felelősek. A kehelysejtek védő funkciójú mucint termelnek, amely fizikailag gátolja az antigének bejutását.

Az enteroendokrin sejtek a bélműködés szabályozásáért felelős hormonokat termelnek. A Paneth sejtek, a kripták alapját képezik, szekréciós granulumaik növekedési faktorokat, antimikrobiális fehérjéket ( $\alpha$  defenzin) szekretálnak.

A **lamina propriában** vér- és nyirokerek, nyiroktüszők, idegvégződések valamint immunsejtek találhatóak. A **lamina muscularis mucosae** a nyálkahártya felszíni rajzolatáért, redőzöttségéért felel. A submucosa közepesen tömött kötőszövetes elemeket, kiterjedt ér- és nyirokrendszert, valamint idegrostokat, ganglionokat tartalmaz.

A **tunica muscularis externa** egy külső, hosszanti és egy belső körkörös simaizomrétegből áll, ezen izomrétegek kontrakciója és relaxációja elősegíti a béltartalom továbbítását. A **tunica serosa**-t a lamina propria serosae és az egyrétegű mesothelium alkotja<sup>[39]</sup>.



1. ábra A bélfal struktúráis elemei

a kép forrása : <http://www.biotrick.com/digestive-system/aipmt-biology-notes-modifications-in-layers-of-digestive-tract/>

**Az immunválasz két alapvető összetevőből, a veleszületett és adaptív immunválaszból áll.**

A veleszületett immunitás a nem-specifikus, kezdeti immunválaszért felelős, a kórokozó elpusztítására irányul. Tagjai a monociták, makrofágok, dendritikus sejtek, hízósejtek, neutrofil granulociták és antigén prezentáló sejtek. A neutrofil granulociták kezdeti, gyors reagálást biztosítanak a bejutott kórokozókkal szemben.

A makrofágok fagocita tulajdonságokkal rendelkeznek a neutrofilekhez hasonlóan. Granulomát képeznek, ezáltal elzárják a patogén anyagokat, és immunválaszt erősítő citokineket szekretálnak.

A hízósejtek a bélfal felületi rétegeiben találhatóak, számos szabályozó funkcióban vesznek részt, mint például a véráramlás, a koaguláció ellenőrzése, a simaizom összehúzódása, perisztaltika, és az epitheliális sejtek szekréciója. Felismerik a mikrobákat, és ez a folyamat proteázok, hisztamin kiszabadulást eredményezi a szekréciós granulumokból. Ezután citokinek, gyulladáshoz vezető mediátorok szabadulnak fel, megkezdve a veleszületett védelmi mechanizmusokat. Ilyen mediátor például a tumor nekrosis faktor (TNF- $\alpha$ ) és a leukotrién B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). A hízósejt fontos feladatot tölt be továbbá a bél-barrier funkciójának szabályozásában, részt vesz a kórokozók elleni védekező mechanizmusokban, allergiás, majd gyulladáshoz vezető folyamatokat idéz elő<sup>[40]</sup>.

A folyamat során felszabadult **hisztamin** (2- [4-imidazolil] -etilamin) egy endogén amin, amely a hisztidin-dekarboxiláz enzim által szintetizálódik<sup>[41]</sup>. Számos immun- illetve nem immun eredetű folyamat a hisztamin-termelő sejtek aktiválásához illetve degranulációjához vezet. A hisztamint főleg hízósejtek és bazofilek termelik, koncentrációja magasabb a bőrben, hörgőben, bélnyálkahártyában. A receptoroknak jelenleg 4 altípusát különböztetjük meg: H1R, H2R, H3R, H4R<sup>[42]</sup>.

A **hisztamin H4 receptort** (H4R) eozinophil és bazofil granulocitákban, dendritikus sejtekben, T sejtekben<sup>[43]</sup>, valamint a lamina propria mononukleáris sejtjeiben, bélhámsejtekben is kimutatták<sup>[44]</sup>.

A receptor modulációja a hisztamin függő interleukin-16 (IL-16) és LTB<sub>4</sub> felszabadulását fokozza.

A LTB<sub>4</sub> fontos szerepet játszik az IBD kialakulásában, mint helyi lipid-mediátor, részt vesz a neutrofilek, eozinophilek és dendritikus sejtek aktiválásában<sup>[45-47]</sup>, kemotaktikus hatást gyakorol direkt és indirekt módon az LTB<sub>4</sub> (BLT1) receptorral rendelkező sejtekre (neutrofil granulocita, hízósejt, monocita, makrofág)<sup>[48]</sup>, a helper-CD4<sup>+</sup> és szupresszor-CD8<sup>+</sup> effektor T-sejtekre<sup>[49]</sup>.

Az LTB<sub>4</sub> bioszintézise során az 5-lipoxigenáz enzimrendszer katalizálja az arachidonsav átalakulását 5-hidroperoxieikozoa-7,9,11,14-tetraénsavvá (5-HpETE), majd vízvesztéssel egy instabil epoxid leukotrién A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) keletkezik. Az LTA<sub>4</sub> egyrésztől LTA<sub>4</sub> hidroláz enzim hatására LTB<sub>4</sub>-gyé alakul<sup>[50, 51]</sup>, másrészt LTB<sub>4</sub> szintetáz katalizáló hatására LTC<sub>4</sub> képződik. Az LTC<sub>4</sub>-ből glutaminsav vesztéssel LTD<sub>4</sub> keletkezik, majd ebből cisztein lehasadással leukotrién 4 jön létre.

A gyógyszeres fejlesztések célja az, hogy szabályozzák az LTB<sub>4</sub>, illetve más, biológiailag aktív leukotrién termelését.

A dendritikus sejtek képesek a **veleszületett és adaptív immunrendszer összekapcsolására**. A kórokozókkal való találkozás során peptid-antigének segítségével kiváltják az adaptív immunválaszt.

Az adaptív immunitás során a T- és B-limfocyták klonális expanzió révén felszaporodnak, differenciálódnak, az antigén felismerést követően aktiválódnak.

Idővel az akut gyulladásból krónikus bélgyulladás alakul ki, amely szabályozatlan, kontrollálatlan nyálkahártya immunrendszert eredményez. Különösen a makrofágok, T-sejtek, és a limfoid sejtek határozzák meg az immunválasz jellegét azokkal az antigénekkal szemben, amelyek elősegítik a krónikus gyulladást a gyomor-bél traktus területén<sup>[52]</sup>.

A tolerancia kialakításában és a gyulladós reakció elindításában szerepük van az intesztinális dendritikus sejteknek. A Toll-like (TLR) sejt felszíni receptorok felismerik a patogén molekuláris mintázatát (pathogen-associated molecular patterns – PAMP)<sup>[53, 54]</sup>, majd a nukleotid kötő oligomerizációs (NOD) domének az immunválaszt beindítják<sup>[55]</sup>.

A TLR-ok tartós aktiválása a gyulladós szövetkárosodás területén történik, amely gyakran NF- $\kappa$ B aktiválódáshoz és más redoxérzékeny transzkripció hiperaktivációjához vezet<sup>[56]</sup>.

CD-ben az adaptív immunrendszer nem képes a gyulladást közvetlenül kiváltani, csak a közvetítésben, illetve a gyulladás fenntartásban van szerepe<sup>[25]</sup>. A naív CD4<sup>+</sup> T-sejtekből különböző fenotípusú T-limfocita klónok (Th1, Th2, Th17 vagy regulátor Treg) keletkeznek<sup>[57]</sup>, s a fokozott reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) miatt, meghatározzák az immunválasz jellegét. A gyulladás során H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, és hidroxil gyök keletkezik mieloperoxidáz (MPO) hatására. A fagociták aktiválják a gyulladást keltő leukotrién B<sub>4</sub>-et (LTB<sub>4</sub>), a vérlemezke aktiváló faktort (PAF), melynek következtében nagy mennyiségű ROS kerül az extracelluláris térbe<sup>[58-60]</sup>.

A ROS képes aktiválni az NF- $\kappa$ B-t, amely védő- és káros funkciót is elláthat a bélben<sup>[61]</sup>.

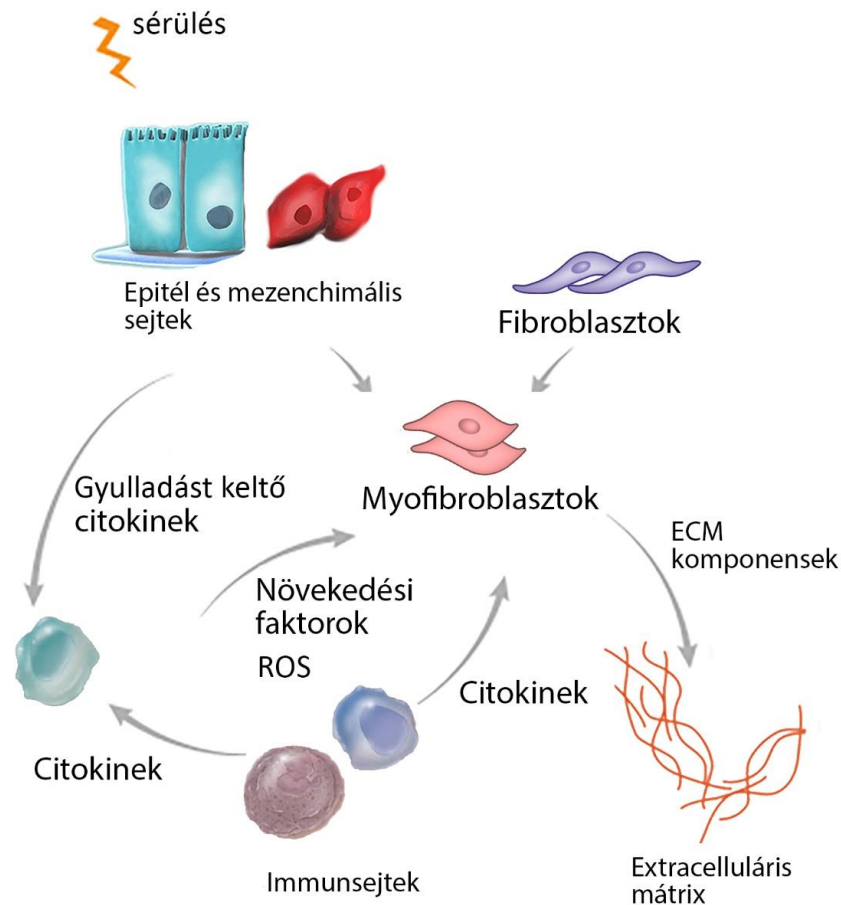
A CD-ben fokozottabb a Th1 és Th17 válasz, nagyfokú a gyulladást keltő IL-2, IL-17, az interferon (IFN) - $\gamma$ , IL-23 és a TNF- $\alpha$  szekréciója<sup>[62]</sup>. Öngerjesztő gyulladós körforgás alakul ki, és

ez a folyamat serkenti az antigénprezentáló sejteket, makrofágokat, fibroblasztokat, és endoteliális sejteket a TNF- $\alpha$ , és a gyulladást keltő IL-ok termelésére<sup>[63-65]</sup>. A szöveti károsodás kivédésében a hemoxigenáz (HO) enzim rendszernek kulcsfontosságú szerepe van<sup>[66]</sup>. A fokozott HO-1 aktiváció jelentősen enyhíti a Th17 választ, gátolja a gyulladást keltő citokinek termelődését, növeli a Treg számot, és az IL-10 mennyiségét. A Th17/Treg egyensúlyt fenntartva részt vesz a gyógyulási folyamatokban, colitisben<sup>[67, 68]</sup>.

Az immunfolyamatokat kísérő **szöveti elváltozások** során megfigyelhető a bélfal megvastagodása, amely részben a submucosa megvastagodásából, részben az izomréteg hipertrofiájából ered. A mucosa duzzadt, vérbő, a mesenterium ödémát, gyulladós beszűrődést mutat. Előrehaladottabb esetekben a mesenterium körbefoghatja a beleket, azokkal összenő, azt leszoríthatja, a hasüreg szervei között tályogok is kialakulhatnak.

A nyálkahártya pusztulás ráterjed a submucosára és a belső muscularis rétegre, minden réteg megvastagodik az extracelluláris mátrix (ECM) elemek (kollagén, fibronectin) felhalmozódása miatt.

Az ECM és a különböző sejtadhéziós molekulák expressziójának megváltozásával megtörténik a leukociták infiltrációja olyan területekre, ahol gyulladós sejtek szükségesek. Az ECM komponensei, mint például a fibronectin, kollagének, laminin és az általuk létrehozott kapcsolatok szabályozzák mind a keringő leukociták felvételét, mind az endoteliális permeabilitást szabályozó intracelluláris jelátviteli útvonalakat. A gyulladós ingerekre adott válaszként nagy mértékű leukocita mozgás történik a gyulladt szövetek területén<sup>[69]</sup> (2. ábra).



2. ábra A fibroneogenezis lépései

Az epitheliális gát sérülése során kemokinek és citokinek felszabadulása történik. Ezt gyulladásos sejtek (immun és nem immun eredetű) toborzása követi, majd reaktív oxigéngyökök (ROS), profibrogenikus citokinek és növekedési faktorok termelődnek. Az extracelluláris mátrix (ECM) termelődésben szerepet játszó sejtek aktiválódnak, majd felszaporodnak az ECM fehérjék. A kép forrása : <https://www.discoverx.com/>

A hialuronán (HA), mint ECM komponens is szerepet játszik a leukociták felvételében, a gyulladásos ingerekre adott válaszként. Nemcsak felszaporodik, hanem térhálós szerkezetet alakít ki<sup>[70]</sup>. Továbbá különböző vastagbélgyulladásos modellekben, a gyulladás korai stádiumában a submucosa területén a HA lerakódás előzi meg a leukocita infiltrációt<sup>[71]</sup>. Elősegíti a sebgyógyulást fokozott fibroblaszt proliferáció és mioblaszt differenciálódás révén is, amely hozzájárulhat a fibrotikus folyamatokhoz az IBD-ben<sup>[72]</sup>.

Korábbi vizsgálatok szerint, a növekedési faktor-béta (TGF- $\beta$ ), a mátrix metalloproteinázok (MMP) kulcsfontosságú szerepet játszanak a fibrotikus folyamatokban<sup>[73-75]</sup>. A TGF- $\beta$  és izoformáinak expressziója nagyban függ az adott szövet tulajdonságától. A fibrotikus szövetben a TGF- $\beta$ 3 csökkent míg a TGF- $\beta$ 2 fokozott expressziót mutat<sup>[76, 77]</sup>.

Az MMP-ok cink- és kalciumfüggő proteolitikus enzimek, melyek részt vesznek az ECM átalakításában és lebontásában, valamint ezen funkción túlmutatva számos szerepet töltenek be a bélgyulladásban<sup>[78, 79]</sup> (1. táblázat).

típus		szerep
kollagenáz	MMP-1	A fibrózis megelőzése
zselatináz	MMP-2	Antiangiogén faktorok generálása, az epiteliális barrier fenntartása és a fibrosis megelőzése
stromalizin	MMP-3	Endosztatin generálása
matrilizin	MMP-7	$\alpha$ -defenzin aktiváció, kemokin expresszió, sebgyógyulás és endosztatin képződés
kollagenáz	MMP-8	Neutrofil infiltráció
zselatináz	MMP-9	Kemokin expresszió, neutrofil infiltráció, anti-angiogén faktorok generálása, VEGF-A feldolgozás, csökkent a serlegsejtek differenciálódása és a fibrosis megelőzése
stromalizin	MMP-10	Sebgyógyulás
kollagenáz	MMP-13	A TNF- $\alpha$ aktiválása és endosztatin képződése
nincs hozzárendelve egyetlen csoporthoz sem	MMP-20	Endosztatin generálása

1. táblázat Az MMP típusok, és azok szerepe a bélgyulladásban<sup>[78, 79]</sup>.

Az MMP-k közül elsősorban a kollagenázok és zselatinázok szabályozzák a leukocita felhalmozódást és a citokin termelést a gyulladt szövetekben<sup>[80]</sup>. Az MMP-k működéséért két fő endogén inhibitor felelős: az  $\alpha$ 2-makroglobulin és a szöveti MMP-inhibitor, (TIMP). A TIMP-ek 1:1 arányban komplexet képeznek az MMP-k erősen konzervált cinkkötőhelyével. A kapott MMP-inhibitor komplex inaktív és nem képes szubsztrátot kötni. 4 féle szöveti inhibitor ismert: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 és TIMP-4<sup>[81, 82]</sup>. Fiziológiásan azonban az MMP-k szintje alacsony. A gyulladásos betegség kialakulása során az aktív MMP-eket a TIMP-ek nem szabályozzák, és ez az ECM lebontásához, szövetkárosodáshoz vezethet.

A striktúrák kialakulásában szerepet játszik a TGF- $\beta$ , az MMP-k és a TIMP-ek arányának kiegyensúlyozatlansága, amely a gyulladás krónikus fázisában alakul ki<sup>[83]</sup>.

Az MMP-9 a CD betegek vastagbéliszövetében expresszáldott leggyakoribb MMP, és ezért a IBD súlyosságának, aktivitásának meghatározásában biomarkernek tekinthető<sup>[84]</sup>.

Ismeretes, hogy az MMP-9 fokozza a colitises bél permeabilitását<sup>[85]</sup>, a konstitutív bél epiteliális MMP-9 növeli a hámsejtek epiteliális apoptózisát a gyulladásos citokin felszabadulás mellett<sup>[86]</sup>. Egyes kutatások a szelektív MMP-9 gátlás hatását vizsgálták a fibrozisra állatkísérletes modellekben<sup>[87]</sup>.

A bélfal megvastagodását a mezenchimális- és epitel sejtekből keletkező myofibroblasztok okozák<sup>[88]</sup>. A lamina propriában található mezenchimális sejtek érzékelik a mikrokoznyezetüket, felismerik a mikrobiális jeleket, aktiválódnak a gyulladásos környezetben, valamint részt vesznek a szövetregenerálódási folyamatokban is<sup>[89]</sup>.

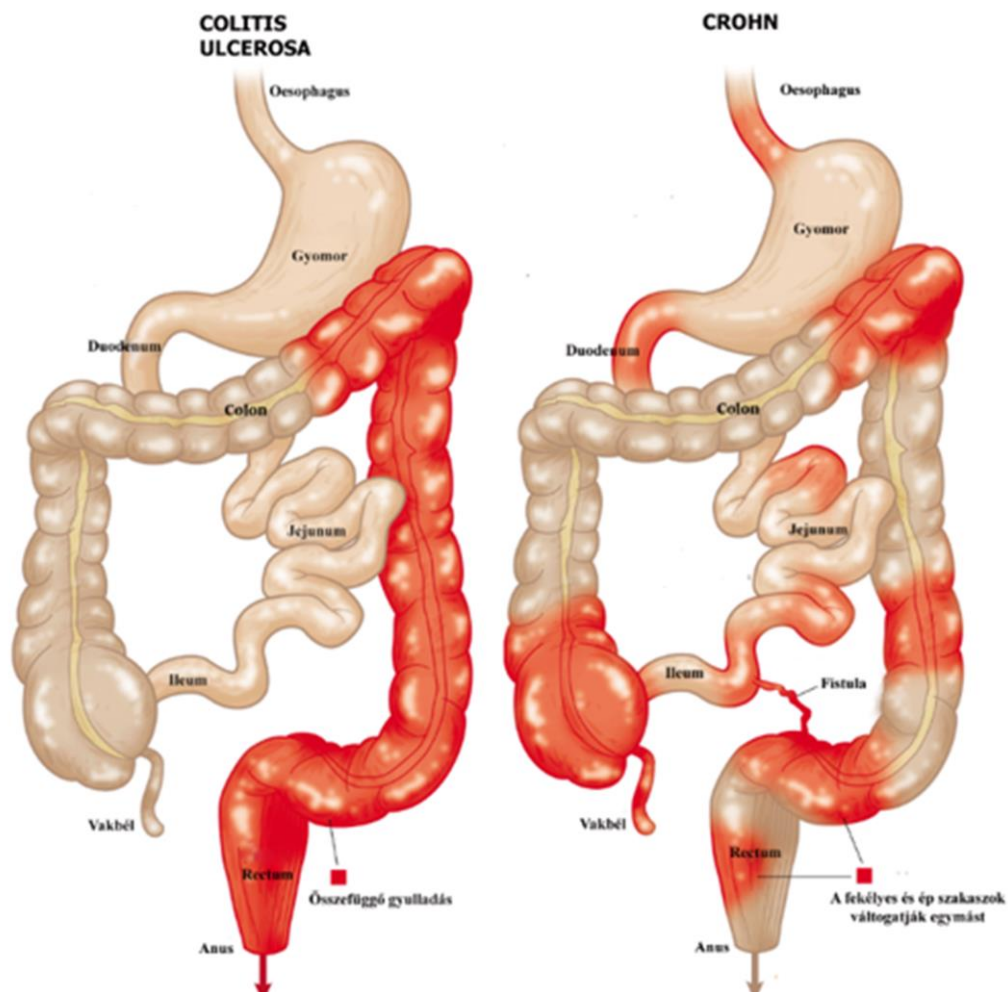
## 1.2 A gyulladássos bélbetegségek klinikai megjelenési formái

A CD megjelenési helyei<sup>[90]</sup>: distális ileum 35%; vékonybél 5%; vastagbél 20%; jobb colon 35%; egyéb bélszakasz 5%. A változó lokalizációjú és különböző súlyosságú gyulladás miatt, változatos panaszokkal és tünetekkel jelentkezhet. A leggyakoribb tünetek közé tartozik a hasi fájdalom, az étvágytalanság, a rossz közérzet, a fogyás és a láz. Gyermekkorban gyakran az észlelhető tünet a letargia, étvágytalanság vagy növekedésbeli elmaradás és a pubertás késése<sup>[91, 92]</sup>.

### 1.2.1 Diagnosztikai módszerek

Az **endoszkópos** módszerek előnyt élveznek a radiológiai módszerekkel szemben, segítségével a nyálkahártya felszínén levő finom elváltozások is észrevehetőek, és szövettani mintavételre is lehetőséget adnak. A vizsgálat a CD és a CU elkülönítésében is hasznos lehet CD-re jellemzők a megvastagodott redők, a gyomor falának rigiditása, az aftózus fekélye. A fekélyesedés annyira súlyos lehet, hogy a bél lumenét szinte csak fekélyek bélelik, melyet helyenként egy-egy ép nyálkahártyahíd szakít meg. CD esetén a felső gasztrointesztinális traktus vizsgálata is szükséges a betegség lokalizációjából adódóan. CU-ban a rectum általában mindig érintett, és az elváltozások szinte folyamatosan észlelhetőek<sup>[93]</sup>, míg CD-ben a rectum mintegy 50%-ban megkímélt, és a fekélyes vastagbélszakaszok szabályos nyálkahártyával fedett szakaszokkal váltakoznak<sup>[94]</sup> (3. ábra).





3. ábra A., Colitis ulcerosa és Crohn-betegség előfordulása az emésztőrendszerben  
 A kép forrása: <https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/enfermedades/enfermedad-crohn>, <https://es.slideshare.net/Xideral/curso-histologia-22-histopatologia-digestiva>

**Röntgen** diagnosztikai vizsgálatot akkor alkalmaznak, ha valamilyen akadály van az endoszkópos vizsgálat elvégzésének (pl. szűkület miatt). Elsősorban akut szövődmények, mint az ileus felismerésében játszik szerepet. **Ultrahang**, ill. **doppler** vizsgálat segítségével meghatározható a bélfal vastagsága, a nyirokcsomók, mesenterium, szűkületek, fisztulák állapota. A **CT**, **MRI** alkalmas nem csak a bélfal, hanem az azon kívüli eltérések diagnosztizálására, a szövődmények kutatására is alkalmas. **Laboratóriumi vizsgálatok** során a betegség különböző formáiban kimutatható antigének, vagy antitestek szerepe még nem teljesen tisztázott. A meghatározandó ellenanyagok száma egyre bővül, diagnosztikus szerepe van az anti-neutrofil citoplazmatikus antitesteknek (ANCA), CD-ben az egyes mikrobiális antigének ellen termelődő antitesteknek, mint az ASCA (anti-*Saccharomyces* antitestek), valamint az anti-flagellin antitesteknek<sup>[95]</sup>. Rutin diagnosztikában alkalmazott módszerek a hsCRP (ultraszenzitív C reaktív fehérje), a vérsüllyedés, a leukocita-, trombocitaszám, a székletből történő lactoferrin, calprotectin meghatározás<sup>[96]</sup>.

Összefoglalva tehát, nem létezik olyan egyetlen, specifikus biomarker, amely választ adna a betegség aktivitására, vagy a kezelés hatékonyságára. Emiatt a klinikumban kombinálva alkalmazzák az endoszkópos vizsgálatot, a szövettani kiértékelést, valamint a betegségre leginkább jellemző biomarkerek monitorozását.

## 1.3 A betegség kezelésében jelenleg alkalmazott gyógyszer-csoportok

A jelenleg rendelkezésre álló gyógyszer-csoportok továbbra sem kezelik hatékonyan a bélfal strukturális károsodását, szükség van a betegség patofiziológiájának tanulmányozására, új terápiás célpontok-, új kezelési lehetőségek alkalmazására.

A IBD kezelése során elsődleges szempont a tüneti kezelés, a gyulladós folyamatok gátlása, a szövődmények (sipoly, tályog) gyógyítása, és a remisszió. Az alkalmazott gyógyszer-csoportokat aszerint kell kiválasztani, hogy milyen súlyos az állapot, ill. hol fordul elő a gyulladás. A CD kezelésében alkalmazott gyógyszer-csoportok: gyulladásgátlók (5-aminoszalicilsav (5-ASA) készítmények, glükokortikoszteroidok), immunmodulánsok, antibakteriális szerek, biológiai hatóanyagok, tüneti szerek. Hatástani szempontból az az ideális, ha az alkalmazott gyógyszer maximális hatását a bélben, a nyálkahártya szintjén fejti ki a bélcsatorna meghatározható szakaszán, és csekély szisztémás hatással rendelkezik.

Lokális hatású szereknel nagyon fontos, hogy a gyógyszer célzottan jusson el a kívánt helyre. Újabb készítmények esetén Multimatrix (MMX) technológiát alkalmaznak, amely során a hidrofil és lipofil segédanyagokkal ellátott hatóanyagot egy gyomornedv-ellenálló, pH-függő bevonattal látják el. Ez a bevonat a terminális ileum területén kezd el feloldódni<sup>[97, 98]</sup>.

### 1.3.1 Szalicilsav származékok

A szalicilsav származékok az IBD kezelésében legrégebben használt gyógyszer-csoport, melyet enyhe- és közepes súlyos bélgyulladásban alkalmaznak. Az alapgyógyszer az 1940 óta alkalmazott Salazopyrin (sulfasalazin). Hatóanyaga az 5-ASA<sup>[99]</sup>, amely azo-kötéssel kapcsolódik a szulfapiridin (szulfonamid - antibakteriális szer) karriermolekulához<sup>[100]</sup>. Csökkenti a ROS és gyulladást keltő citokinek mennyiségét<sup>[101]</sup>. Az 5-ASA hatékonyan gátolja a peroxinitrit által közvetített DNS-szál törést, ezáltal gyulladásgátló és rákellenes hatású<sup>[102]</sup>.

További tanulmányokban vizsgálták a lokális hatású mesalamine-t (MES) és a szukralfátot (SUC), mint fix dózisú kombinációs terméket. A szukralfát a gastroduodenalis mucosához tapad, helyi semlegesítő hatást fejt ki, ezáltal lokálisan védi a fekélyes területet<sup>[103]</sup>.

### 1.3.2 Glükokortikoszteroidok

A IBD kezelésében az 1950-es évek óta alkalmazott glükokortikoszteroidok a legerősebb és leggyorsabb gyulladásgátló hatású szerek. Akut, súlyos esetekben nélkülözhetetlen alkalmazásuk. Széleskörű, részben irreverzibilis mellékhatásaik (osteoporosis, hypertonia, diabetes) miatt azonban hosszan tartó kezelésre nem alkalmazzák. A kortikoszteroid kezelés (Prednisolon, Metypred, Medrol) során a terápiás hatású dózist elérve a szteroid mennyiségét fokozatosan

csökkenteni kell, majd a gyógyszer teljes elhagyása javasolt<sup>[104]</sup>. A lokális szteroidoknak (Budenofalk, Entocort) mintegy 10-20%-a kerül be a keringésbe, de még így is hasonlóan hatékony, mint 5-ASA kezelés CD-ben. Ez a kezelés azon betegek számára jelent alternatívát, ahol a szteroid mellékhatások nem elhanyagolhatóak<sup>[105]</sup>.

### 1.3.3 Immunszuppresszív, immunmodulációs szerek

Az alkalmazott szerek CD4<sup>+</sup> hatás gátlásán alapulnak, a betegség középsúlyos és súlyos eseteiben alkalmazzák, valamint ha a beteg szteroid dependenssé vagy rezisztenssé válik. A kezelés hátránya, hogy az immunrendszer kevésbé lesz ellenálló a különböző fertőzésekkel szemben.

A klinikumban legtöbbet alkalmazott szer az azathioprin (AZA) és aktív metabolitja a 6-merkaptopurin (6-MP). Széles körben alkalmazzák autoimmun betegségekben (CD, reumatoid arthritis), transzplantált betegeknél<sup>[106]</sup>. Súlyos mellékhatásai a csontvelő károsodás, hepatotoxicitás és a hasnyálmirigy-gyulladás<sup>[107]</sup>.

A Metotrexát (MTX) egy folsav inhibitor, amely gátolja a sejt-növekedést, immunszuppresszív szer az autoimmun betegségekben, kemoterápia esetén. Elsősorban fenntartó terápiában alkalmazzák CD-ben, amikor a betegek nem reagálnak, vagy intoleránsak az azathioprin kezelésre<sup>[108]</sup>, mellékhatásai miatt nyomon követése elengedhetetlen.

### 1.3.4 Antibiotikumok, probiotikumok

CD esetében felmerül az a kérdés, hogy az antibiotikum használat hajlamosít-e CD-re, ill. hatékony kezelést jelent-e a betegség fennállása esetén. Metronidazol kezelés, melyet az elmúlt 10-15 évben alkalmaztak, hatékony lehet a vastagbelet, ill. végbélnyílás körüli területet érintő gyulladás esetén, valamint csökkenti annak a valószínűségét, hogy a betegség újból kialakuljon a műtéti eltávolítás után. Az azitromicin és metronidazol kombinált terápiában, a CRP és a calprotectin szintjét szignifikánsan csökkentette, az enyhe és közepes CD betegségben, gyermekeknél, azonban idősebb betegeknél mellékhatásként QT szakasz megnyúlást okozhat<sup>[109]</sup>. Az utóbbi időben a ciprofloksantin eredményességét is igazolták<sup>[110]</sup>.

Probiotikumok esetében kimutatták, hogy kevésbé hatékonyak, egy tanulmány szerint betegség kontrolláló hatása van a tejsavó és a szója fehérjéknek, különösen, ha a beteget kezeltek anti TNF- $\alpha$  antitestekkel és azathioprinnal<sup>[111]</sup>.

### 1.3.5 Biológiai hatóanyagok a gyulladásos bélbetegségekben, anti-TNF- $\alpha$ kezelés

A proinflammatorikus citokinek gátlása (például IL-1 receptor antagonist, anti-TNF- $\alpha$  antitest) során TNF- $\alpha$  hiányos egerekben nem alakul ki a gyulladás<sup>[112]</sup>, és az anti-TNF- $\alpha$  antitest (Infliximab, Remicade) adásával biztató eredményeket sikerült elérni CD-ben<sup>[113]</sup>. A kezelés során a magasabb Treg sejtszám fokozza a gyulladásgátló hatást<sup>[114]</sup>. Az infliximab esetében kimutatták, hogy dózis függően fokozza a TIMP-1 szabályozó fehérje termelését, ezáltal csökkenti az MMP aktivitást, valamint csökkenti a miofibroblasztok kollagén termelését<sup>[115]</sup>. A Remsima olyan ki-

méra monoklonális IgG1 antitest, amelyet ugyanazon technológiával állítottak elő, mint az infliximabot, és az infliximabéval megegyező aminosav-szekvenciával rendelkeznek, viszont olcsóbb annál. Hosszú távú alkalmazása hatékony, ígéretes kezelési lehetőség lehet az IBD-s betegek számára<sup>[116, 117]</sup>.

Az anti-TNF- $\alpha$  terápia (Adalimumab, Certolizumab pegol, Golimumab, Infliximab) közel 50%-al csökkentette a fekélyes területek nagyságát<sup>[118-120]</sup>, ezért napjainkban fő vonala a bélgyulladásos betegségek biológiai terápiájának. Az anti-TNF- $\alpha$  kezelés monoterápiában vagy kombinációs szerként alkalmazva viszonylag biztonságos, de gyakori mellékhatások közé tartoznak a súlyos fertőzések (TBC, Candida, Herpes), bőrrák és limfoma<sup>[121]</sup>.

#### **Terápiás jelentőségű a T-sejt aktiváció gátlása**

Az úgynevezett másodgenerációs anti-adhéziós molekulák hatásmechanizmusuk révén blokkolják a leukocytá migrációt, megakadályozzák a gyulladásos kaskád beindulását, ezáltal minimalizálják a bél károsodását<sup>[122]</sup>. Az integrin ellenes monoklonális IgG4 antitest (Natalizumab) súlyos mellékhatásaként felmerül a progresszív multifokális leukoencephalopathia (PML), mivel nem csak a gasztrointesztinális területeken, hanem az agyban is kivált bizonyos válaszreakciókat. A Vedolizumab, egy másik szelektív integrin inhibitor ezzel szemben csak a bélrendszerben indukál biológiai választ, az agyban nem, ezért csökken a kockázata a PML-nek<sup>[123]</sup>. Az Ustekinumab az IL-12 és az IL-23 p40 alegységének monoklonális antitestje, amelyet pszoriázis-, pszoriázisos ízületi gyulladás- és CD kezelésére engedélyeztek. Hosszú távú alkalmazása fenntartotta a klinikai remissziót<sup>[124]</sup>. A Rizankizumab, a Brazikumab, a Mirikizumab és a Guselkumab a tesztek különböző szakaszaiban vannak. Az IL-23 p19 alegység célzásával akadályozzák meg a gyulladásos kaskád folyamatokat<sup>[117]</sup>.

A **bispecifikus antitestek** olyan egyedi antitest-formátumok, amelyek tipikusan két különböző célfehérje antigénjét ismerik fel. Például a TNF- $\alpha$ -át és IL-23-at célzó bispecifikus molekulák az IBD és más autoimmun / gyulladásos betegségek kezelésében preklinikai fázisban vannak<sup>[125]</sup>. A bispecifikus antitestek a terápiás antitestek következő generációját képviselik, és lehetővé teszik a bonyolult kezelési stratégiát. (1) a célcitokinek vagy útvonalak fokozott vagy egyidejű blokkolása; (2) specifikus sejttípusok szelektív célzása; (3) új jelátvitel a receptor-kolokalizáció vagy a hiper-térhálósítás; vagy (4) a patogén sejttípusok T-sejtes megsemmisítése révén<sup>[126]</sup>.

**Őssejt terápia:** A Darvadstrocel olyan zsírszöveti stem sejteket tartalmaz, amelyek gyulladáscsökkentő hatást fejtenek ki, a fisztula sávokba fecskendezve képes a fisztula gyógyulását előidézni. Hatásmechanizmusára jellemző, hogy a gyulladás folyamán felszabadult citokinek aktiválják a zsírszöveti stem sejteket, és ez az aktiváció csökkenti a gyulladást a fisztula környékén<sup>[127, 128]</sup>.

Mindezen terápiás lehetőségek mellett szükség van a további lehetséges gyulladásgátló anyagok kutatására, mivel a különböző biológiai hatóanyagok, antitestek rendkívül drágák.

### 1.3.6 Lehetséges természetes antioxidánsok és egyéb gyulladást csökkentő anyagok

Az **N-acetilcisztein (NAC)** erős antioxidáns, gyulladásgátló hatása van a bélgyulladásban, valamint csökkenti az MMP-2 szintjét, ezáltal biztosítja az epitheliális barrier helyes működését<sup>[129, 130]</sup>. Kimutatták azt is, hogy a liponsav, mint egy másik természetes antioxidáns, csökkenti a gyulladás mértékét patkány colitisben<sup>[131]</sup>.

Hasonlóképpen a **curcumin** és a **gyömbér** is képes csökkenti a szabadgyökök mennyiségét, gátolja a citokinek által közvetített NF- $\kappa$ B aktivációt<sup>[132, 133]</sup>. Egy összefoglaló tanulmány vizsgálta az Európában és az ázsiai országok területén a hagyományos kínai orvoslás részeként alkalmazott, legalább ötven különböző gyógynövény és növényi termékek hatását a kísérletes gyulladásos állatmodellekben. A gyógynövénykészítmények biológiai tulajdonságaik miatt alkalmasak lehetnek az IBD kezelésére, azonban mivel gyógynövénykeverékekről van szó, nem feltétlenül ismert, hogy melyik összetevő felelős a gyulladáscsökkentő hatásért. További számos vizsgálat szükséges, hogy kiderítsük milyen gyógynövénykomponensek hatékonyak, és azokat milyen koncentrációban kell alkalmazni<sup>[134]</sup>.

#### **Szelektív hisztamin H4 receptor antagonisták**

A Johnson & Johnson Gyógyszergyár elsőként közölt egy szelektív hisztamin H4 receptor antagonistát, melynek fontos szerepe van az autoimmun betegségek kezelésében. A JNJ 777120 gátolja a hisztamin indukció alatt a kemotaxist és a Ca<sup>2+</sup> beáramlást egércsontvelő hízósejtjeiben<sup>[135]</sup>. Szignifikánsan blokkolja a neutrofil infiltrációt egérben, fertőzés indukálta hashártyagyulladásos modellben. Bizonyított továbbá, hogy a hisztamin H4 receptor szerepet játszik tüdőgyulladásos folyamataiban. A szelektív hisztamin H4 receptor antagonisták hasznos szerepet tölthetnek be a gyulladásos folyamatok kezelésében<sup>[136]</sup>, a receptor farmakológiai vagy genetikai blokkolása gátolja a gyulladást keltő citokin választ<sup>[137]</sup>.

#### **LTA<sub>4</sub>H szelektív inhibitor**

Az elsődleges cél az LTB<sub>4</sub>, illetve más, biológiailag aktív leukotriének, például leukotrién C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), leukotrién D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) termelés szabályozása. Egyes kísérletekben az 5-lipoxigenáz (5-LO) hatásának a gátlását vizsgálták<sup>[138, 139]</sup>, valamint azt is, hogy hogyan hat a LTA<sub>4</sub>H gátlás az LTB<sub>4</sub> termelésre<sup>[51]</sup>. A JNJ 26993135, mint LTA<sub>4</sub>H inhibitor, hatásos arachidonsav által kiváltott fülgyulladásos egérmodellben<sup>[140]</sup>.

### 1.3.7 Sebészeti kezelés

Annak ellenére, hogy széles körben alkalmazzák a különböző gyulladáscsökkentő terápiákat, a betegek közel 80%-a sebészeti beavatkozást igényel a diagnózis felállítása utáni első 10 évben<sup>[141]</sup>. Sebészeti beavatkozásra van szükség súlyos szövődmények, fisztula, szűkület, bélelzáródás vagy folyamatos vérzés esetén<sup>[8]</sup>. A rezekció során eltávolítják a beszűkült bélszakaszt, azonban néhány éven belül visszaesés tapasztalható, ami szükségessé teszi az újabb műtéti beavatkozást. Megelőzőként felmerülhet az endoszkópos ballonos tágítás, amellyel késleltethető az adott bélszakasz sebészeti eltávolítása<sup>[142]</sup>.

Az immunmodulátorok, valamint a biológiai terápiák alkalmazása gyulladáscsökkentő hatású azonban nem alkalmas a fibrózis megelőzésére illetve visszafordítására<sup>[143]</sup>.

## 1.4 A Crohn-betegség modellezése

Számos emlős modellt dolgoztak ki az akut és krónikus bélgyulladás, a gyulladás immunpatomechanizmusának, a gyulladást csökkentő kezelések hatásosságának vizsgálatára. Leggyakrabban alkalmazottak az egér és patkány modellek, mivel bélrendszerük hasonlít az emberi bélelhez, valamint sok immunválasz azonos<sup>[144]</sup>. Ezek a bélgyulladásos állatmodellek több csoportba sorolhatók, mint spontán gyulladásos -, génkiütéses-, transzgenikus-, indukált gyulladásos modell<sup>[145]</sup>.

#### *Spontán gyulladásos modell :*

A nyálkahártya gyulladás spontán alakul ki, az állatok a betegségnek megfelelő genetikai háttérrel rendelkeznek<sup>[146]</sup>.

#### *Génkiütéses, transzgenikus modell :*

Olyan modell, amelyben a résztvevő állatok zavart szenvednek a gyulladásgátló mechanizmusokban, valamilyen gén kiütés vagy a transzgén bejuttatásának következményeként<sup>[146]</sup>. Ezeknek a modelleknek az egyik fő előnye, hogy lehetővé teszik bizonyos immunológiai hibáknak a tanulmányozását, melyek nyálkahártya gyulladásához vezetnek. Számos gén-knockout modell áll rendelkezésre, melynek segítségével tanulmányozható a veleszületett és az adaptív immunrendszer<sup>[147]</sup>. Megemlítendő azonban, hogy különböző kémiai gyulladást indukáló szerek hatása, mint a 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS), nagyban függ a genetikai háttértől<sup>[147]</sup>.

#### *Indukált gyulladásos modell :*

A legtöbbet alkalmazott a kémiai kiváltott gyulladás, mert viszonylag könnyen előidézhető, a gyulladás súlyossága nyomon követhető, a kísérlet megismételhető.

#### **DSS- Dextrán nátrium szulfát**

A DSS-kezelés koncentrációjának, és a kezelés időtartamának beállításával tanulmányozhatók az akut és a krónikus gyulladásos mechanizmusok. 2 hónapig tartó, többször ismételt kezeléssel krónikus bélgyulladás érhető el<sup>[148]</sup>. Ezzel szemben 1–5%-os koncentrációban alkalmazott, 1 hetes orális kezelés akut gyulladást indukál<sup>[149]</sup>.

### **Azoxymetán (AOM)**

Főleg a DSS-sel kombinációs kezelésben alkalmazva fokozza a gyulladás súlyosságát, hosszú távú alkalmazása krónikus bélgyulladást okoz, amely gyakran rákos megbetegedéshez vezet<sup>[150]</sup>. Önmagában történő alkalmazásával rák indukálható a disztális vastagbélben<sup>[151]</sup>.

### **Oxazonon**

Az oxazonon kezelés akut gyulladást okozva testúlycsökkenést, nyálkahártyafekélyt, szubmukozális ödémát, az epitheliális sejtek elvesztését és szöveti vérzést okoz egerekben<sup>[152]</sup>.

Az általunk alkalmazott **TNBS**-sel indukált colitis alkalmas a bél homeosztázisát felborító, korai gyulladós folyamatok javító mechanizmusainak vizsgálatára<sup>[153-155]</sup>. A TNBS egy erős sav, etanolban feloldva, a disztális vastagbélbe juttatva intra colonálisan károsítja a vastagbél epitheliális barrier funkcióját, és T-sejt-függő transzmurális gyulladás alakul ki<sup>[155, 156]</sup>. Az alkohol nem csak hordozóként szerepel, hanem kárt okoz a nyálkahártyában, elősegítve a TNBS által kiváltott Th1-függő immunválasz aktiválását és a CD4<sup>+</sup> T sejtek infiltrációját. Azt is kimutatták, hogy a TNBS 40-50% -os etanolban történő intra colonális beadása a vastagbél rövidüléséhez, bélvérzéshez, az epitheliális nekrozisoz vezet<sup>[148, 149, 155]</sup>. Ezért a TNBS jól reprezentálja a Crohn betegség szubklinikai megjelenési formáját.

Egyszeri TNBS kezelés **akut** gyulladós választ generál, amely beindít egy korai antigén-specifikus Th1-sejtválaszt.

Az ismételt beadás késleltetett típusú túlérzékenységi reakciót vált ki, és a T-sejtfunkció *in vivo* tanulmányozására alkalmas<sup>[157]</sup>.

Többszöri TNBS kezelés **krónikus** vastagbélgyulladást vált ki, amely nagy mértékben hasonlít a humán CD-re<sup>[158, 159]</sup>.

A TNBS beadása után 1 héttel a fokozott IL-12 termelődés Th1 immunválaszt generál, melyet IFN- $\gamma$  termelés kísér<sup>[159]</sup>. A gyulladás krónikus fázisában (3. hét) beindul egy Th17 immunválasz, IL-23 megjelenéssel<sup>[159, 160]</sup>. Fitzpatrick és munkatársai<sup>[161]</sup> kimutatták, hogy patkány vastagbél lamina propria-ban és submucosa-ban megnövekedett az IL-17<sup>+</sup> sejtek mennyisége, az akut vagy hosszú távú haptén adagolást követően.

## 2. Célkitűzések

A munkánk során alkalmazott TNBS modell jól reprezentálja az CD-re jellemző tüneteket. A gyulladás kezdeti, aktív szakaszára jellemző a szöveti gyulladás, MPO szint emelkedés, fokozott neutrofil infiltráció. Az aktív és nyugalmi periódusok ismétlődésével a betegség krónikussá válik, melynek során a strukturális elemek megváltozása miatt szűkület alakul ki.

Doktori munkám első részében azt vizsgáltuk, hogy a **krónikus** bélgyulladás esetén bizonyos szabályozó fehérjéknek milyen szerepe van a striktúrák kialakulásában:

- I. Hogyan változik az ECM-et szabályozó MMP-9 és TIMP-1 fehérje expressziója és aktivitása krónikus TNBS patkány modellben?

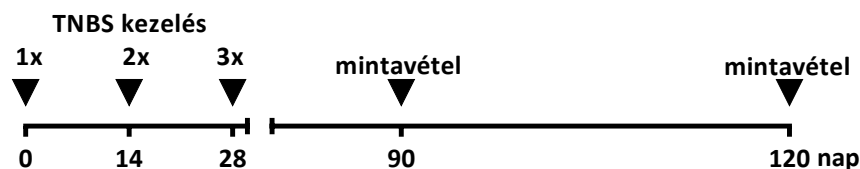
Munkám második felében a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk:

- II. Hogyan változnak a gyulladásos paraméterek hisztamin H4 receptor blokkoló hatására akut TNBS modellben?
- III. Hogyan befolyásolja az LTB<sub>4</sub> gátlása a CD-t akut TNBS modellben?



## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1 Krónikus 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS)-modell



A kísérleteket a Szegedi Tudományegyetem által elfogadott Állatkísérletes Etikai Kódex előírásainak (86/609/EEC9 és a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998 és 243/1998) megfelelően végeztük. Az állatokat standard körülmények (hőmérsékelt, páratartalom, táp, ivóvíz) között tartottuk.

A kísérlet során a vastagbélgyulladást TNBS-sel váltottuk ki, 200-220 g-os, hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. Az állatokat random módon felosztottuk kontroll, 1x-, 2x-, 3x TNBS-sel kezelt csoportokra. A 0. nap 12 órás éheztetés után, pentobarbitális anesztézia alkalmazásával 10 mg TNBS-val (0,25 ml 25% etanolban oldva) kezeltük intra colonálisan (i.c.) az állatokat, egy 8 cm hosszú, polietilén kanül segítségével. A kontroll csoportok fiziológiás sóoldatot kaptak. A beavatkozás után az állatok szabadon ehettek, ihattak<sup>[162]</sup>.

A gyulladós periódusok kialakulását két hetente ismétlődő TNBS kezeléssel idéztük elő (összesen maximum 3x TNBS kezelés). Ebben a kísérletsorozatban hetente mértük az állatok tömegét.

Mintavétel a krónikus kísérleti periódus 90. és 120. napján történt, cervikális diszlokáció után a vastagbelet a végbéltől számítva 8 cm hosszan eltávolítottuk, majd foszfát pufferrel átmostuk.

#### 3.1.1 Makroszkópos analízis

A makroszkópos vizsgálathoz a foszfát pufferrel átmosott, és feltöltött belet lefotóztuk (SONY, 16,1 megapixel). Ezt követően a végbéltől számított 8 cm-es bélszakaszt hosszában felvagtuk, nyálkahártyával felfelé fotóztuk. A gyulladás kiterjedését, a makroszkópos károsodást számítógépes program (Scion Image Beta 4.0.2.) segítségével lemértük, a kapott értéket a 8 cm-es béldarab teljes területének %-ban ábrázoltuk.

#### 3.1.2 Szövetteni vizsgálatok

A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a krónikus fázisban a 90. és 120. napon történt a mintavétel, a hegesedések, és szűkületek területéről. A kontroll állatoknál a colon végbél felőli 8 cm-es szakaszának középső részét vizsgáltuk.

#### Fixálás

Mintáinkat immerziósan fixáltuk (2% paraformaldehid, 2% glutáraldehid 0,1 M PB-ben) egy éjszakán át 4°C-on. Fixálás után ultramikrotómmal 1 µm vastagságú félvékony metszeteket készítettünk. A metszeteket a beágyazó anyag (epoxy típusú műgyanta) kioldása nélkül, toluidinkékkel festettük meg<sup>[163]</sup>.

#### Toluidinkék festés

Az eljárás során 2 percig tartottuk a metszeteket festőoldatban (toluidin 1,75%, ecetsav 0,2 M, Na-acetát 0,2 M), majd 3x2 perces desztillált vizes mosás után 70%-os etilalkohol oldatban 3 perc differenciálás következett<sup>[164, 165]</sup>.

#### Fénymikroszkópia

A képeket 40x,100x nagyítással Olympus (BX51) mikroszkóphoz kapcsolt digitális kamerával (Olympus DP11) készítettük.

#### Morfometriai analízis

A szövettani fotókat (40x, 100x nagyítás) a Scion image számítógépes programmal analizáltuk (B4.02. version, Scion Corp.)<sup>[164, 165]</sup>.

### 3.1.3 Fehérje meghatározás

A fehérjemérésnél Bradford módszerét alkalmaztuk<sup>[166]</sup>. Standard sorunkhoz (0-10 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. 10 perces inkubálás után 200-200 µl-t tettünk egy plate-be és fotometriásan (Benchmark Microplate reader, Bio-Rad Labs) mértük 595 nm-en. Eredményeinket mg/ml fehérjekoncentrációban adtuk meg.

### 3.1.4 MMP-9 és TIMP-1 fehérje expresszió vizsgálata

Fehérje expressziós vizsgálathoz a mintavétel 3.1.2 szerint történt, a méréshez a vastagbél izomrétegei (hosszanti, körkörös) és a myenterikus plexus (MP) használtuk<sup>[167]</sup>. A mucosa és a submucosa eltávolítása után a bélfal simaizomrétegeit, és a köztük elhelyezkedő MP-t tartalmazó mintát folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd -80°C-on tároltuk feldolgozásig.

#### Western blot analízis

A szövetmintákat homogenizáltuk (Ultra-turrax, T25 modell, IKA (Janke&Kunkel), 13500 rev/min fordulatszám, 2x30 másodperc, jégen) tris-mannit pufferben (Tris 7.9 2 mM/l, mannit 50 mM/l, fenilmetilszulfonil fluorid (PMSF) 100 µM/l, leupeptin 100 µg/l, aprotonin 5U/mg 10 µg, 0,5% triton X-100, 100 µl proteáz inhibitor cocktail, pH 7,4), 250 µl/20 mg minta térfogatban. A homogenizátumot centrifugáltuk 12000 rpm-el, 10 percig, 4°C-on. A felülúszót vizsgáltuk tovább, az összfehérje mennyiséget 3.1.3 pont szerint határoztuk meg. Az elektroforézishez a fehérjéket forralással denaturáltuk, β-merkaptóetanolt tartalmazó Laemli-féle mintapufferben 5 percig<sup>[168]</sup>. 10 µg összfehérje mennyiségnek megfelelő, azonos térfogatban (30 µl) felvitt mintát futtattunk TIMP-1 esetén 15% -, MMP-9-nél 10% poliakrilamid gélen, 90 V feszültséggel (Complete system for Mini Vertical Electrophoresis & Blotting, Cleaver Scientific). A blottolás nitrocellulóz membránra (Amersham), félszáraz blottolóval (Semi Dry Blotter Mini, 10 x 10cm System, Cleaver Scientific) történt. A transzferálás eredményességét 5% Red-ponceau festéssel ellenőriztük. Az aspecifikus antitest kötődést 5% tejes TBS Tween-nel (TBS pH 7,6, 300 µl/l Tween 20, 50 g/l zsírmentes, sovány tejpor) blokkoltuk. Ezután a membránokat MMP-9 egér monoklonális antitesttel (ABCAM PLC, 1: 1000-es hígításban), illetve TIMP-1 (H150) nyúl poliklonális antitesttel (Santa Cruz Biotechnology Inc., 1: 1000-es hígítással) inkubáltuk 2 órán keresztül. TBS-Tween-es mosás után inkubáltuk HRP-konjugált anti-egér illetve anti-nyúl másodlagos antitesttel (Santa Cruz Biotechnology Inc., 1: 2000) 1 órán át, szobahőmérsékleten. Immobilon Western HRP Szubsztráttal (Millipore Corporation) tettük láthatóvá a jeleket. A membránokat LICOR C™ blot Scannerrel (Li-Cor Corporate) olvastuk be<sup>[167]</sup>. Az expresszió meghatározásához Bio-Rad Quantity One 4.4.0 programmal elemeztük a felvételeket.

#### MMP-9 meghatározása zselatin zimográfiával

A mintákat homogenizáltuk (pH 7,4: 50 mM tris 7-9, 0,5% triton-X, 100 µl proteáz inhibitor cocktail, 100 µg leupeptin, 10 µg 5U/mg aprotonin) homogenizáló pufferben 13500 rev/min 2x30 másodpercig, jégen. Ezután centrifugáltuk a homogenizátumokat 5000 rpm-mel 10 percig 4°C-on. Az összfehérje mennyiséget 3.1.3 pont szerint határoztuk meg. A mintákat zimogram mintapufferrel (Bio-Rad) hígítottuk, és 5 µg/ml összfehérje mennyiséget azonos térfogatban (30 µl) megfuttattunk zselatint (20 mg/ml) tartalmazó 8% SDS-PAGE gélen 90 V feszültséggel. Ezután a géleket leöblítettük desztillált vízzel, és renaturációs pufferbe (Bio-Rad) helyeztük 40 percre. Majd development pufferben (Bio-Rad) 20 percig ráztuk a géleket, ezután friss pufferbe helyezve 37°C-on 20 óráig inkubáltuk. Másnap 40 percig festettük a géleket Coomassie Blue festékkel (Bio-Rad), a felesleges festéket eltávolítottuk festékmentesítő oldattal, ismételt mosásokkal mindaddig, amíg az MMP aktivitás helyén az elemésztett csíkok átlátszóan jelentek meg<sup>[169]</sup>. A

gélt LICOR C™ blot Scannerrel (Li-Cor Corporate) olvastuk be. Az MMP-9 aktivitás meghatározásához Bio-Rad Quantity One 4.4.0 programmal elemeztük a felvételeket.

### 3.1.5 Statisztikai analízis

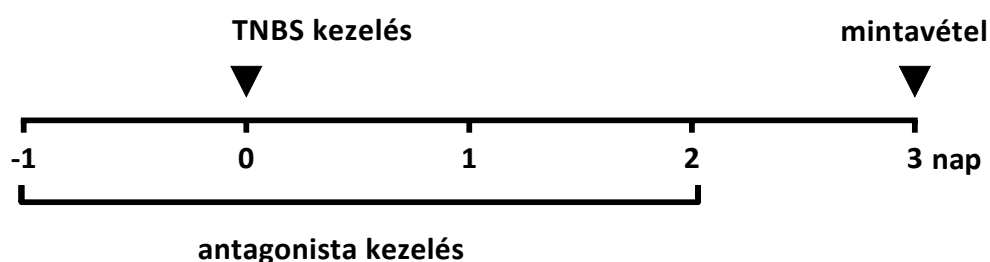
Munkám adatainak értékelése során egyfaktoros variancia analízist (Analysis of variance, ANOVA) és Newman-Keuls tesztet végeztünk (GraphPad Prism 6.0). A kapott eredményeket oszlopdiagramokon ábráztuk, az értékeket átlag±SEM (standard error of mean) formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  valószínűségi értékben határoztuk meg.

## 3.2 Akut 2,4,6 –trinitrobenzol-szulfonsav (TNBS)-modell

Az epithélium-sérülés előidézése kémiaiag történik, amely lehetővé teszi, hogy a baktériumok és immunogén molekulák gyulladást indukáljanak.

A kísérleteket a Szegedi Tudományegyetem által elfogadott Állatkísérletes Etikai Kódex előírásainak megfelelően (86/609/EEC) és a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998 és 243/1998) megfelelően. Az állatokat standard körülmények (hőmérsékelt, páratartalom, táp, ivóvíz) között tartottuk.

Az akut kísérlethez 200-240 g-os hím Wistar patkányokat használtunk.



A kísérlet 5 napig tartott, ezalatt az állatok testsúlyát naponta mértük. A TNBS kezelés előtt legalább 12 órás éheztetést alkalmaztunk, ivóvíz biztosítása mellett. Az állatokat a 0. napon dietil-éter anesztézia alkalmazásával 10 mg TNBS-val (0,25 ml 50 % etanolban oldva) kezeltük intra colonálisan, egy 8 cm hosszú, polietilén kanül segítségével. A kontroll csoportok fiziológiás sóoldatot kaptak. A beavatkozás után az állatok szabadon ehettek, ihattak<sup>[155, 170]</sup>

Két, a Johnson & Johnson Gyógyszergyár által szintetizált farmakon hatását teszteltük, kísérletes vastagbélgyulladásos modellben:

#### II. Hisztamin H4 receptor antagonisták kezelése csoportjai:

1. abszolút kontroll
2. TNBS+ 20% 2-hidroxi-propil-β-ciclodextrin (HPCD) vivőanyag
3. TNBS + JNJ 10191584 10 mg/kg p.o./20% HPCD 2ml/kg
4. TNBS + JNJ 10191584 30 mg/kg p.o./20% HPCD 2ml/kg
5. TNBS + JNJ 10191584 100 mg/kg p.o./20% HPCD 2ml/kg

A hisztamin H4 receptor blokkoló kezelést 4 napig, a TNBS kezelést megelőző -1. naptól, naponta kétszer (JNJ 10191584 10, 30, 100 mg/kg) alkalmaztuk orálisan. A 0. napon a hisztamin H4 receptor antagonisták kezelése 3 órával a TNBS beadása előtt történt<sup>[165]</sup>.

### III. LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés csoportjai:

1. abszolút kontroll
2. TNBS + 20% HPCD
3. TNBS + JNJ 26993135 5 mg/kg p.o./20% HPCD 2ml/kg
4. TNBS + JNJ 26993135 15 mg/kg p.o./20% HPCD 2ml/kg
5. TNBS + JNJ 26993135 30 mg/kg p.o./20% HPCD 2ml/kg

Az orális LTA<sub>4</sub>H inhibitor (JNJ 26993135 5, 15, 30 mg/kg) kezelést a hisztamin H<sub>4</sub> receptor blokkoló kezeléshez hasonlóan végeztük, naponta kétszer<sup>[171]</sup>.

A TNBS kezelést követően, 72 óra elteltével, a cervikális diszlokáció után a vastagbelet a végbéltől számítva kb. 8 cm hosszán eltávolítottuk. A belet hosszirányban felvágtuk, a bélsártól megtisztítottuk, majd hideg fiziológiás sóoldattal kiöblítettük. Ezután tiszta, hideg fiziológiás sóoldatot tartalmazó edényben kifesztítettük. A fekélyt tartalmazó 8 cm-es béldarabot digitális fényképezőgéppel (SAMSUNG DIGIMAX) dokumentáltuk, ezt követően a bél tömegét lemértük, és további vizsgálatokhoz készítettük elő.

### 3.2.1 A nyálkahártya makroszkópos analízise

A bélszakaszokon keletkezett gyulladás kiterjedését, a makroszkópikus károsodást számítógépes program (Scion Image Beta 4.0.2.) segítségével lemértük. A kapott értéket a 8 cm-es béldarab teljes területének %-ban ábrázoltuk. Az adott bélszakaszt hosszanti irányban feldaraboltuk úgy, hogy mindegyik sáv tartalmazza a gyulladást.

### 3.2.2 A nyálkahártyagyulladás mértékének súlyossága

A károsodás mértékének pontozása

A károsodás területének mérésén kívül, 0-10-ig pontoztuk a gyulladás mértékének súlyosságát<sup>[172]</sup>:

- |      |  |
|------|--|
| 0    | nincs károsodás  |
| 1    | egy helyen gyulladás, nincsenek fekélyek   |
| 2    | vonalszerű fekély, nincs szignifikáns gyulladás  |
| 3    | vonalszerű fekély, egy helyen gyulladással   |
| 4    | kettő vagy több fekély és/vagy gyulladás, fekély legalább egy helyen van   |
| 5    | kettő vagy több helyen fekély és/vagy gyulladás. A fekély vagy a gyulladás mértéke nagyobb, mint 1 cm              |
| 6-10 | kettő vagy több helyen fekély és/vagy gyulladás, a fekély vagy a gyulladás mértéke nagyobb, mint 2, 3, 4, 5, 6 cm. |

### 3.2.3 Colon súlymérés

Analitikai mérleggel lemértük a colon darabok súlyát (g).

### 3.2.4 Mieloperoxidáz aktivitás mérése

A mieloperoxidáz aktivitás meghatározása egy korábban leírt módszer szerint történt<sup>[173]</sup>. A 8 cm hosszú béldarabot lemértük, feldaraboltuk, majd homogenizáltuk (Ultra-turrax, T25 modell, IKA (Janke&Kunkel), 13500 rev/min; 2×30 s; 250 mg colon /1 ml puffer) hideg foszfát pufferben (50 mM, pH 6.0). Lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, majd 37°C -os vízfürdőre tettük és felolvasztottuk, ezt a lépést ismételtük háromszor, majd centrifugáltuk kétszer (10 perc, 14000 g). A felülúszót lefagyasztva tároltuk felhasználásig. A felülúszóból kivettünk 12 µl-t, és 280 µl O-dianizidinnel kevertük, a reakciót 10 µl 30%-os hidrogén peroxiddal indítottuk, és fotometriásan mértük 490 nm-en 90 másodperc rázás után. A mieloperoxidáz aktivitást mU/mg fehérje értékben fejeztük ki.

### 3.2.5 IL-6, TNF-α szint meghatározása

A colon minta súlyát lemértük, homogenizáltuk (Ultra-turrax, T25 modell, IKA (Janke&Kunkel), 13500 rev/min, 2×30 s jégen; 250 mg colon/1 ml puffer) módosított Greenburg pufferben (300 mmol/l NaCl, 15 mmol/l Tris, 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/l Triton X-100, 20 ng/ml pepsztatin A, 20 ng/ml leupeptin, 20 ng/ml aprotonin; pH 7,4). Ezt követően 30 percig lizáltuk jégen a homogenizátumot, majd 14000 rpm-el 4°C-on 10 percig centrifugáltuk mintáinkat<sup>[174]</sup>.

Az IL-6 szintet ELISA kittel határoztuk meg, a gyártó cég utasításai szerint (R&D Systems Inc.). 450 nm hullámhosszon mértük az optikai denzitást, a korrekciós mérés 540 nm-en történt. A legkisebb detektálható koncentráció 21 pg/ml volt. Eredményeinket pg/mg fehérjére vonatkoztattuk.

A TNF-α méréshez TNF-α ELISA kitet használtunk (R&D Systems Inc.). A mérést a gyártó által küldött leírás alapján végeztük, 450 nm-en. A legkisebb detektálható koncentráció 10 pg/ml volt. Eredményeinket pg/mg fehérjére vonatkoztattuk.

### 3.2.6 Szöveti LTB<sub>4</sub> szint meghatározása

A colon mintákat homogenizáltuk (Ultra-turrax, T25 modell, IKA (Janke&Kunkel), 13500 rev/min 2×30 s jégen; 250 mg colon/1 ml puffer) Tris pH 7,4 pufferben (100 mmol/l NaCl, 1 mM/l CaCl<sub>2</sub>, 1mg/ml D-glükóz, 28 mM indomethacin). Ezt követően 15000 rpm-el 4°C-on 15 percig centrifugáltuk mintáinkat. A felülúszókból meghatároztuk az LTB<sub>4</sub> szintet ELISA kittel (R&D Systems Inc.). A mérést a gyártó által küldött leírás alapján végeztük, 450 nm-en, a korrekciós mérés 540 nm-en történt. A legkisebb detektálható koncentráció 10 pg/ml volt. Eredményeinket pg/mg fehérjére vonatkoztattuk<sup>[175]</sup>.

### 3.2.7 Szövetteni vizsgálatok

#### Fixálás

Mintáinkat 4 %-os paraformaldehid oldatban egy éjszakán keresztül 4°C-on fixáltuk. Fixálás után a mintákat szövettani kazettába helyeztük és 0,05 M Foszfát pufferben (PB) mostuk<sup>[163, 164]</sup>.

### Dehidratálás

A víztelenítés felszálló alkohol sorozatban, illetve xilolban történt. Ezután egy éjszakán keresztül paraffinban (57°C) inkubáltuk a mintáinkat. Az előkészített mintákat paraffinba ágyasztuk. Szánkamikrotómmal 8 µm vastagságú metszeteket készítettünk. A 8 µm-es metszeteket zselatinos tárgylemezre helyeztük, melyeket előzőleg alkohol: ecetsav 1:1 arányú keverékével zsírtalanítottunk<sup>[163, 164]</sup>.

### Deparaffinálás

Xilolba, majd csökkenő koncentrációjú alkohol sorozatba (abszolút etanol, 96%-, 80%-, 70% etanol) vittük mintáinkat, majd a sorozat végén desztillált vízbe helyeztük azokat<sup>[163, 164]</sup>.

### Hematoxilin-eozin festés

A festés a sejtmagot, riboszómákban gazdag citoplazma-területeket liláskék színben, míg a sejtek citoplazmáját rózsaszín vagy vöröses színben festi meg<sup>[165]</sup>. A festési eljárás során mintáinkat először hematoxilin oldatban 5 percig inkubáltuk, majd a kékítés során csapvízben tartottuk őket 5 percig. Desztillált vizes mosás után újabb 1 perces inkubálás következett 1% eozin oldatban, majd a mintáinkat desztillált vízzel öblítettük<sup>[163, 164]</sup>.

### Toluidinkék festés

A Toluidinkék bázikus festék, ami a szövetek negatív töltésű csoportjaihoz kötődik, s liláskék színben fest<sup>[165]</sup>. Az eljárás során 2 percig tartottuk a metszeteket festőoldatban (toluidin 1,75%, ecetsav 0,2 M, Na-acetát 0,2 M), majd 3x2 perces desztillált vizes mosás után 70%-os etilalkohol oldatban 3 perc differenciálás következett<sup>[163, 164]</sup>.

A mintavétel A és B régióból történt (4. ábra):



4. ábra A szövettani metszetek mintavételi helyei

“A” minta: 1,5-2,5 cm közötti rész

“B” minta: 4,5-5,5 cm közötti rész

### Fénymikroszkópia

A képeket 40x, 100x, 400x nagyítással, Olympus (BX51) mikroszkóphoz kapcsolt digitális kamerával (Olympus DP11) készítettük.

### Morfometriai analízis

A szövettani fotókat (40x, 100x, 400x nagyítás) a Scion image számítógépes programmal analizáltuk (B4.02. version, Scion Corp.). Mértük a mucosa, submucosa vastagságát  $\mu\text{m}$ -ben. 400 x nagyításnál számoltuk a submucosában a neutrofil granulociták számát<sup>[164, 165]</sup>.

## 3.2.8 Felhasznált anyagok és vegyszerek

A terápiás hatásosság szempontjából vizsgálni kívánt anyagokat a Johnson & Johnson Gyógyszergyár szintetizálta, melyek a hisztamin H4 receptor antagonisták, a **JNJ 10191584** (5-chlorobenzimidazolyl N-methylpiperazine carboxamide)<sup>[176]</sup>, és LTA<sub>4</sub>H inhibitor **JNJ 26993135** (1-[4-(benzothiazol-2-yloxy)-benzyl]-piperidine-4-carboxil-sav)<sup>[140]</sup>. Az oldatokat, amelyeket a kezelése során felhasználtunk, naponta frissen készítettük, hordozó anyagként 20 % hidroxipropil  $\beta$  ciklodextrin (HPCD, Sigma Chemical Company) alkalmaztunk. A TNBS-t a Fluka Chemie AG-tól rendeltük. A TNF- $\alpha$ , IL-6 és LTB<sub>4</sub> ELISA assay kitért az R&D Systems Inc.-től szereztük be. A Bradford reagenst a Bio-Rad Kft-től, az összes többi anyag és reagens a Sigma Chemical Company-tól származott.

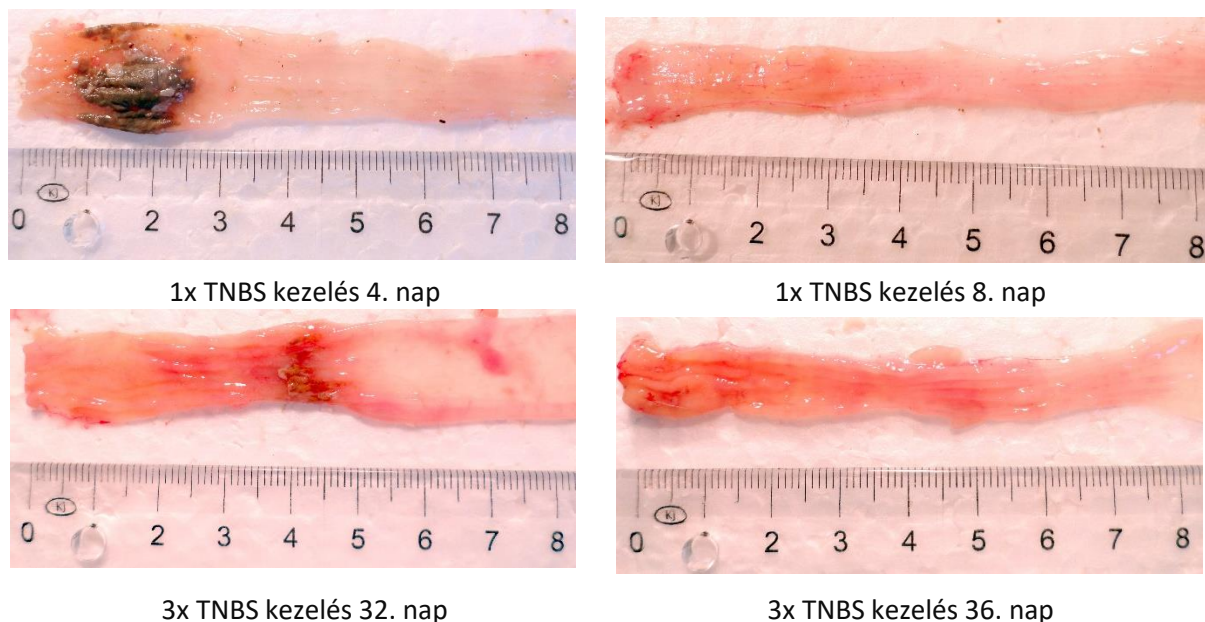
## 3.2.9 Statisztikai analízis

Munkám adatainak értékelése során a kétmintás student „t” próbát, valamint ANOVA-Bonferroni tesztet alkalmaztam. A kapott eredményeket oszlopdiagramokon ábrázoltuk, az értékeket  $\bar{x} \pm \text{SEM}$  (standard error of mean) formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$  valószínűségi értékben határoztuk meg.



## 4. Krónikus kísérleti eredmények

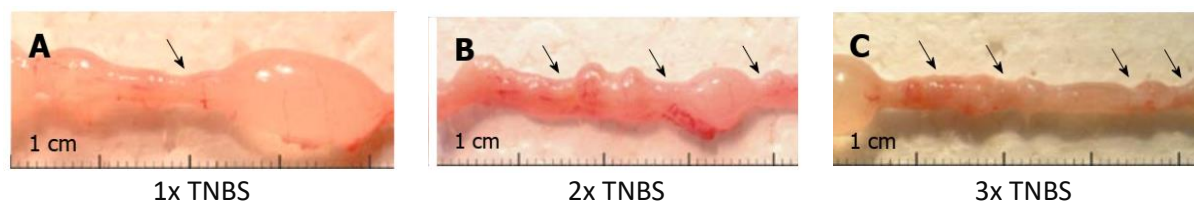
### 4.1 Makroszkópos gyulladási paraméterek vizsgálata krónikus TNBS kezelés után



5. ábra A TNBS kezelt állatok vastagbélének makroszkópos felvétele 1x TNBS kezelés esetén a 4. és 8. napon ;  
3x TNBS kezelés esetén a 32. és 36. napon

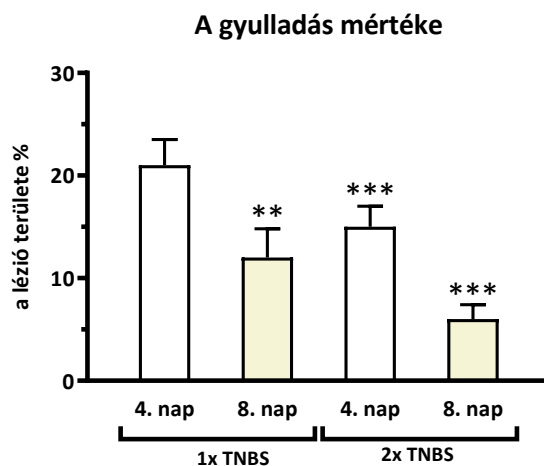
A TNBS kezeléssel a nyálkahártya az akut állapotoknak megfelelő gyulladási elváltozásokat mutatott az első TNBS kezelést követő 4. napon, mely a 8. npra csökkent (5. ábra), a sorozatos, 3x TNBS kezelés után a fekélyes terület nagysága gyakorlatilag nem volt mérhető.

Az 1x TNBS kezelés után a 90. napon közel 1 cm-es szűkület figyelhető meg, míg ez a 2x TNBS kezelés esetén többszöröződött. A 3x TNBS kezelés hatására a 90. napon a szűkület szinte a teljes eltávolított 8 cm-es bélszakaszra jellemző (6. ábra).



6. ábra A krónikus bélgyulladás mértéke a kísérletsorozat 90. napján A., 1x TNBS kezelt; B., 2x TNBS kezelt ; C., 3x TNBS kezelt patkányok esetén, a striktúrák helyeit nyíl jelöli

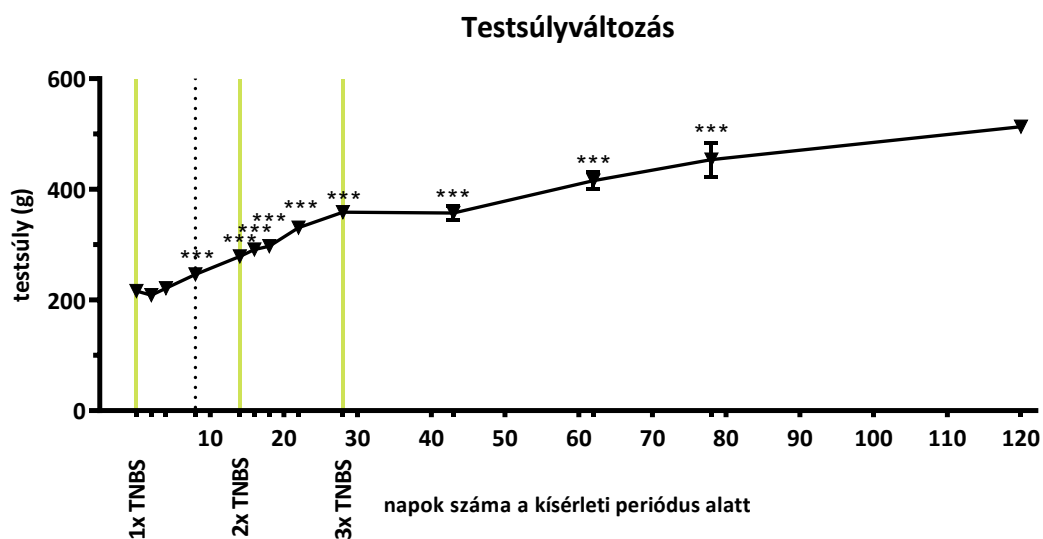
A TNBS kezelések után kialakult gyulladások (1x-, 2x TNBS kezelés) %-os változását tüntettük fel a következő ábrán (7. ábra). Megfigyelhető, hogy a két TNBS kezelés hatására akut gyulladás alakul ki, melynek kiterjedése a kezelés utáni 4. nap közel 25%-os, majd a 8. nap végére szignifikánsan csökkent. A 2x TNBS kezelés után a fekély nagysága kisebb lett az 1x kezeléshez képest. A 3x TNBS kezelés után gyakorlatilag nem volt mérhető a fekélyes terület nagysága.



7. ábra Az ismétlődő TNBS kezelések hatása a gyulladás mértékére  
A sérülés területének %-os változása a teljes vastagbél területéhez képest. T= SEM; n=8-16;  
\*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 az 1x TNBS kezelés 4. napjához viszonyítva

## 4.2 A testsúly változásának nyomon követése krónikus TNBS kezelés után

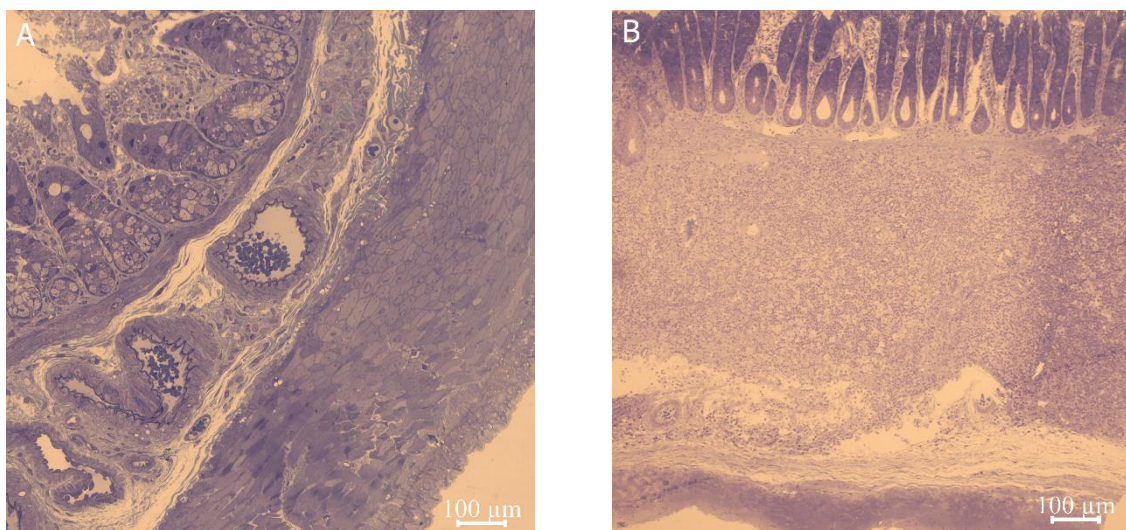
Az 1xTNBS kezelést követően testsúlycsökkenés figyelhető meg a 4. napig, majd a 8. naptól szignifikáns testtömegnövekedést tapasztaltunk. A 2x TNBS kezelés után további súlygyarapodás történt egészen a kísérleti periódus végéig. A 120. napra a kontrollal közel azonos súlygyarapodást tapasztaltunk (8. ábra).



8. ábra A TNBS kezelt patkányok testsúlya a krónikus kísérletsorozat során  
 T = SEM; n=8-16; \*\*\*p<0,001 a 0. napi súlyhoz viszonyítva

### 4.3 Krónikus TNBS kezelés utáni szövettani eredmények

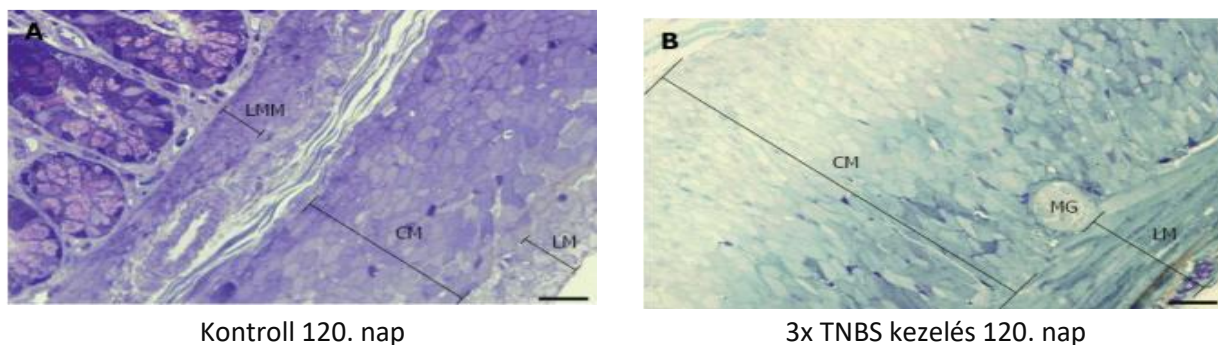
A kezelések számától függetlenül, a TNBS kezelés hatására a striktúrák megjelentek. A bélfalat felépítő lamina muscularis mucosae megvastagodott a kísérleti periódus 90. napjára, azonban a 120. napra a vastagsága a kontrollhoz hasonló volt. A striktúrák területén a hosszanti és körkörös izomrétegek vastagsága többszörösére emelkedett a kontroll csoportokhoz képest (9. ábra, 10. ábra).



Kontroll 120. nap

3x TNBS kezelés 120. nap

9. ábra A bélfal szerkezetének felvétele toluidinkék festést követően, a 120. napon  
 A : kontroll B : 3x TNBS kezelés esetén



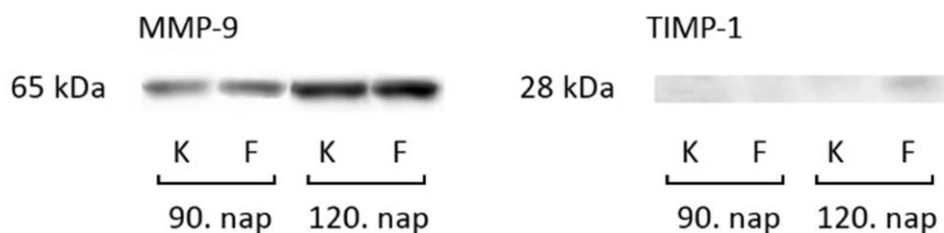
10 . ábra A bélfal külső izomrétegeinek felvétele toluidinkék festést követően, a 120. napon

A : kontroll B : 3x TNBS kezelés esetén

LMM : lamina muscularis mucosae, CM : belső körkörös izomréteg, LM : külső hosszanti zomréteg, MG : myenterikus ganglion, scale: 25 µm

## 4.4 MMP-9 és TIMP-1 expressziója krónikus TNBS kezelés után

Megvizsgáltuk az MMP-9 és TIMP-1 kifejeződést fehérje szinten (11. ábra, 12. ábra). Az MMP-9 fehérje expresszió kimutatható volt a kontroll mintából is, a 3x TNBS-sel kezelt állatok esetén szignifikáns különbséget tapasztaltunk a kontroll csoporthoz képest.

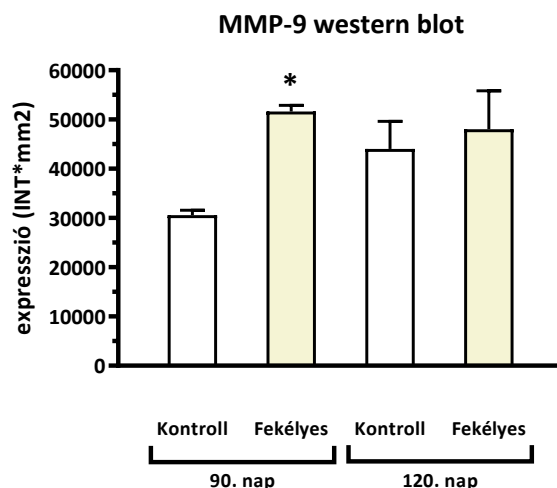


11. ábra Az MMP-9 és szöveti gátlójának (TIMP-1) fehérje expressziója

Kontroll (K), a vastagbél fekélyes (F), területén, a 3x TNBS kezelést követő 90. és 120. napon

Enyhe fokú fehérje expresszió növekedést tapasztaltunk a 120. napra a kezelt állatok esetében.

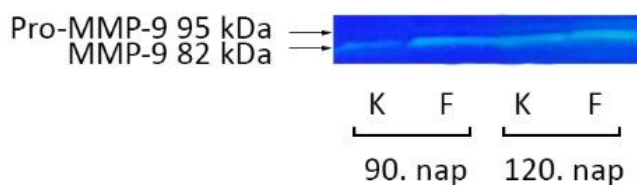
A TIMP-1 fehérje expressziót gyakorlatilag nem sikerült detektálni (11. ábra).



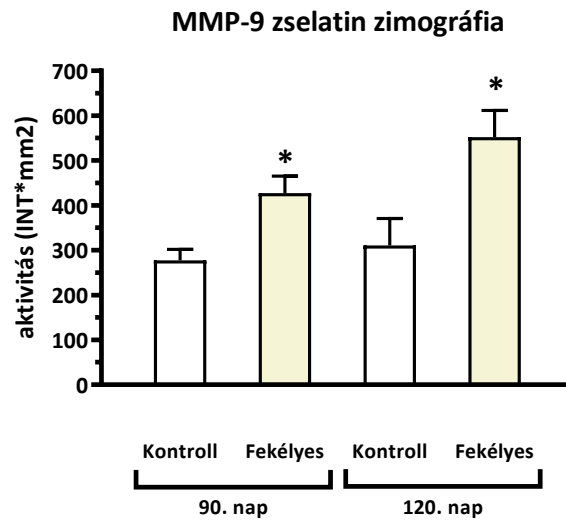
12. ábra MMP-9 fehérje expressziója a 3x TNBS kezelést követő 90. és 120. napon  
T= SEM; n=4-5; \*P<0,05; a 3x TNBS kezelést követő 90. napi kontroll állatokhoz viszonyítva

## 4.5 MMP-9 aktivitása krónikus TNBS kezelés után

A zselatin zimográfia alapján az MMP-9 aktív formája kifejezettebb a 90. és 120. nap között a fekélyes területen, mint a pro-MMP-9 szintje (13. ábra), valamint szignifikáns különbséget találtunk az MMP-9 aktivitásban mind a 90., mind a 120. napon a 3x TNBS kezelt csoportokban a kontrollokhoz képest (14. ábra).



13. ábra MMP-9 zselatin zimográfia  
Kontroll (K), a vastagbél fekélyes (F) területén, a 3x TNBS kezelést követő 90. és 120. napon



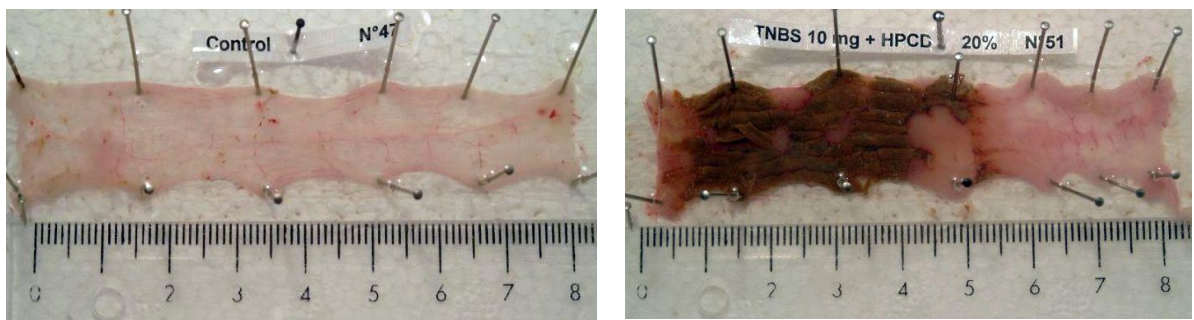
14. ábra MMP-9 aktivitás a 3x TNBS kezelést követő 90. és 120. napon  
T= SEM; n=4-5; \*P<0,05 a 3x TNBS kezelést követő 90. napon kontroll állatokhoz viszonyítva

A 3x TNBS kezelést követően az MMP-9 aktivitása szignifikáns különbséget mutatott, mind a 90. napon, mind a 120. napon a kontroll csoporthoz viszonyítva.

## 5. Akut kísérleti eredmények

### 5.1 A hisztamin H4 receptor antagonistista és az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása az állatok gyulladásási paramétereire akut TNBS kezelés után

A 15. ábra a kontroll állatok vastagbelének makroszkópikus felvételét, és a TNBS kezelés által okozott elváltozásokat mutatjuk be. A felvételen jól látszik, hogy TNBS kezelés hatására, a végbél felőli oldalon jelentős, összefüggő gyulladás és fekély alakult ki.



15. ábra Kontroll és TNBS kezelt állatok vastagbelének makroszkópos felvétele

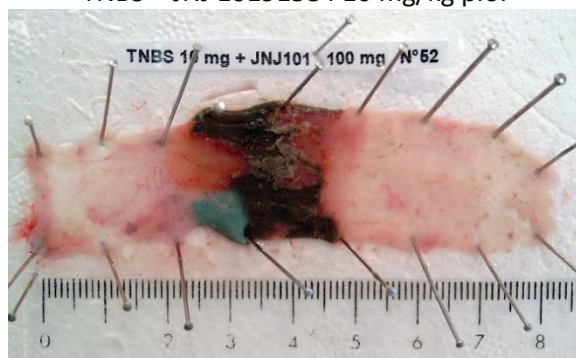
Az alábbi ábrán (16. ábra) a hisztamin H4 receptor antagonisták dóziszfüggő hatása látható. Jól látszik a fekélyes, gyulladt elváltozás a vastagbél középső szakaszán. Az irodalmi adatoknak megfelelően kisebb részben a rectum felőli végén, nagyobb mennyiségben a belek középső szakaszán jelenik meg általában a gyulladás. A reprezentatív fotók szemléltetik, hogy a hisztamin H4 receptor blokkoló dóziszfüggően csökkentette a gyulladás és fekély mértékét. A rectum felőli oldalon csökkent a károsodás, valamint csökkent a fekély mértéke is.



TNBS + JNJ 10191584 10 mg/kg p.o.



TNBS + JNJ 10191584 30 mg/kg p.o.



TNBS + JNJ 10191584 100 mg/kg p.o.

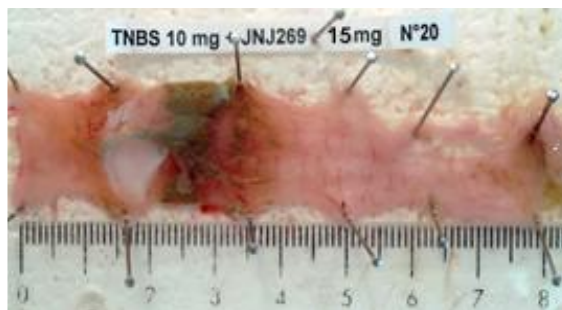
16. ábra A hisztamin H4 receptor antagonistával kezelt állatok vastagbelének makroszkópos felvétele



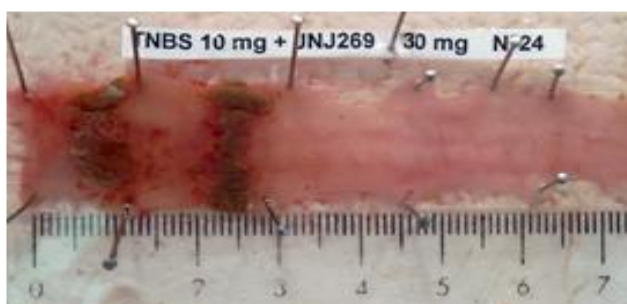
A 17. ábrán az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelések dóziszfüggő hatása látható. A képek jól mutatják a gyulladt területek szignifikáns csökkenését, valamint az összefüggő fekélyek méretének drasztikus változását.



TNBS + JNJ 26993135 5 mg/kg p.o.



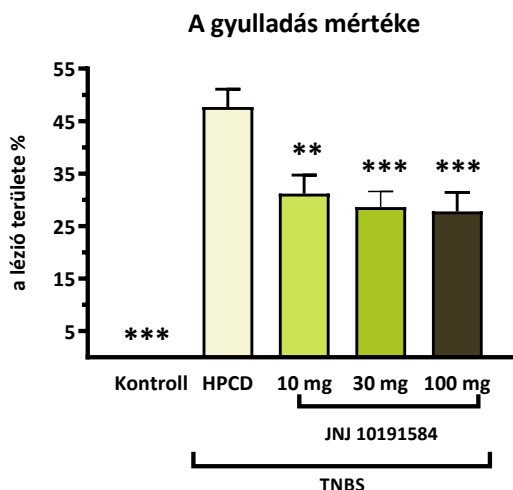
TNBS + JNJ 26993135 15 mg/kg p.o.



TNBS + JNJ 26993135 30 mg/kg p.o.

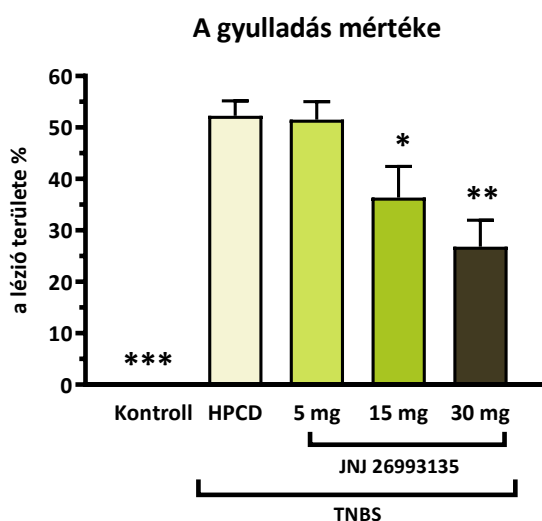
17. ábra LTA<sub>4</sub>H inhibitorral kezelt állatok vastagbelének makroszkópos felvétele

A kialakult gyulladások %-os változását tüntettük fel a következő ábrákon (18. ábra, 19. ábra). Megfigyelhető, hogy TNBS kezelés hatására közel 50%-os nagyságú szignifikáns gyulladás alakult ki az állatok vastagbelében. A hisztamin H<sub>4</sub> receptor antagonisták kezelése szignifikánsan csökkentette a gyulladások mértékét (18. ábra).



18. ábra A hisztamin H4 receptor antagonisták hatására a gyulladás mértékére, TNBS kezelés után. A sérülés területének %-os változása a teljes vastagbél területéhez képest. T= SEM; n=8-16; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 a TNBS+HPCD kezelt állatokhoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag

Megfigyelhető, hogy TNBS kezelés hatására kialakult szignifikáns gyulladást, az LTA<sub>4</sub>H inhibitor dóziszfüggően és szignifikánsan csökkentette (19. ábra).

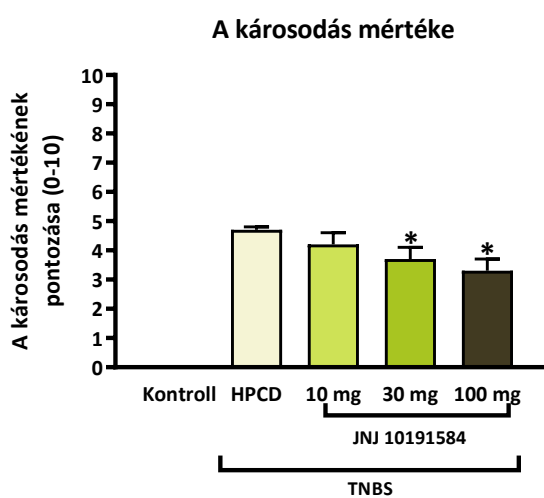


19. ábra Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor hatására a gyulladás mértékére, TNBS kezelés után. A sérülés területének %-os változása a teljes vastagbél területéhez képest. T= SEM; n=8-16; \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 a HPCD+TNBS kezelt állatokhoz viszonyítva, HPCD: vivőanyag

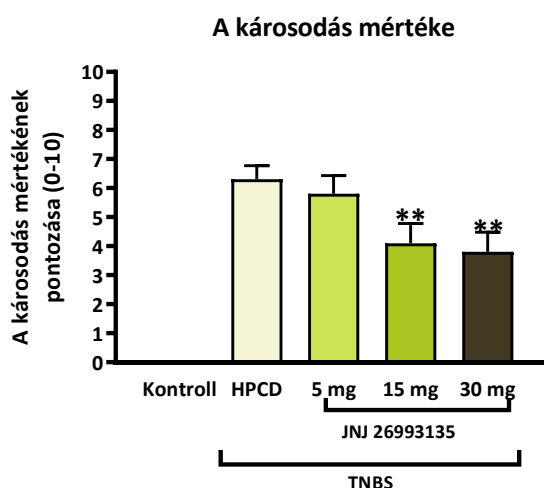
### 5.1.1 A hisztamin H4 receptor antagonistája és az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása a léziók nagyságára akut TNBS kezelés után

A TNBS+HPCD, valamint a hisztamin H4 receptor antagonistája és LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelése utáni makroszkópikus károsodások súlyosságát mutatjuk be a következő ábrákon. (20. ábra, 21. ábra). 0-10-ig pontoztuk a gyulladás mértékének súlyosságát.

A TNBS és az analógok oldószerének (HPCD) együttes kezelése szignifikáns súlyosságú colitist eredményezett. A hisztamin H4 receptor antagonistája (20. ábra) és a LTA<sub>4</sub>H inhibitorral (21. ábra) történt kezeléseket dóziszfüggően csökkentették a károsodás mértékét.



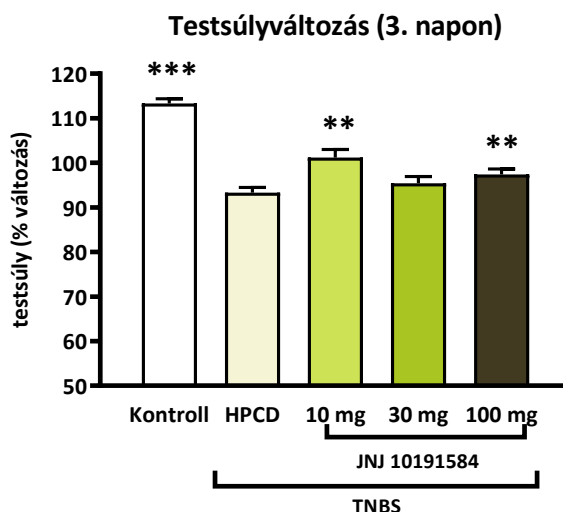
20. ábra A hisztamin H4 receptor antagonistája kezelés hatása a colon károsodásra, TNBS kezelés után  
T = SEM; n=8–16; \*P<0,05; a TNBS+HPCD kezelt csoporthoz viszonyítva, HPCD: vivőanyag



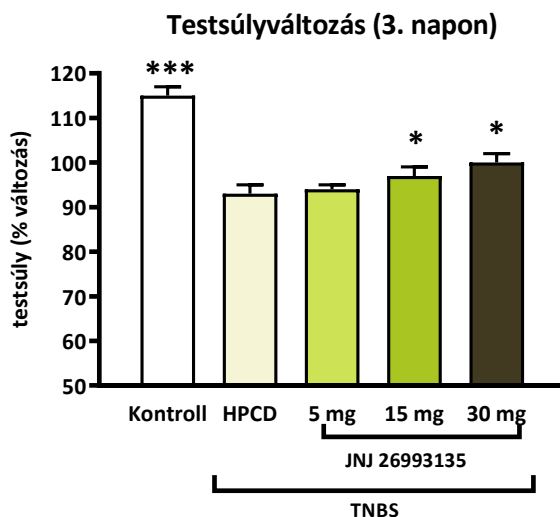
21. ábra Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása a colon károsodásra, TNBS kezelés után  
T = SEM; n=8–16; \*\*P<0,01; a TNBS+HPCD kezelt csoporthoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag

## 5.1.2 A hisztamin H4 receptor antagonistista és az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása az állatok testsúlyára akut TNBS kezelés után

A TNBS kezelést követően folyamatos testsúlycsökkenés figyelhető meg, a TNBS kezelés utáni 3. nap végére a HPCD kezelt állatokban ez a fogyás jelentős mértékű volt. Ezzel szemben a kontroll csoport testtömege folyamatosan gyarapodott. A hisztamin H4 receptor antagonistista kezelt állatokban szignifikáns testsúlygyarapodás volt megfigyelhető. (22. ábra) Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés szignifikánsan és dóziszfüggően növelte az állatok testsúlyát. (23. ábra).



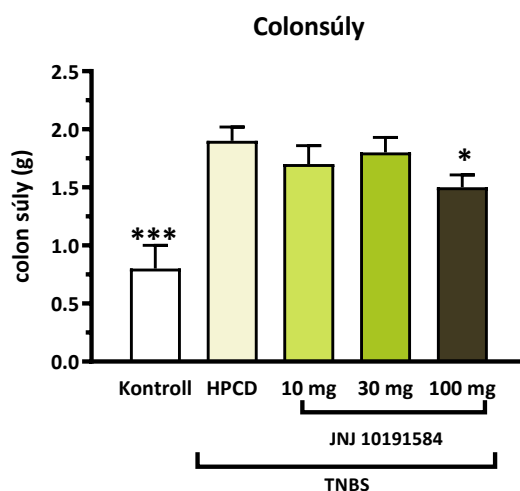
22. ábra A hisztamin H4 receptor antagonistista hatása a testsúly változásra, TNBS kezelés után T= SEM; n=8-16; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 a TNBS+HPCD csoporthoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag



23. ábra Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása a testsúly változásra, TNBS kezelés után T= SEM; n=8-16; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 a TNBS+HPCD csoporthoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag

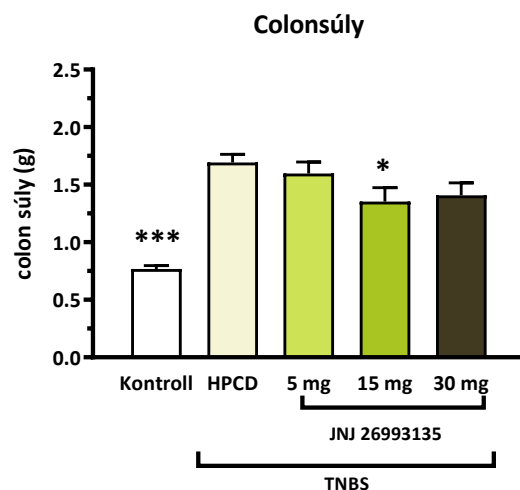
### 5.1.3 A hisztamin H4 receptor antagonistista és az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása az állatok colonsúlyára akut TNBS kezelés után

A gyulladás során jelentkező ödéma lényegesen megemeli a vastagbél tömegét és méretét. TNBS kezelést követően szignifikáns colonsúly növekedést tapasztaltunk. Ezt a hatást a hisztamin H4 receptor antagonistista és LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés jelentősen csökkentette (24. ábra, 25. ábra).



24. ábra A hisztamin H4 receptor antagonistista kezelés hatása a colonsúly változásra, TNBS kezelés után

T = SEM; n=8-16; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 a TNBS+HPCD csoporthoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag

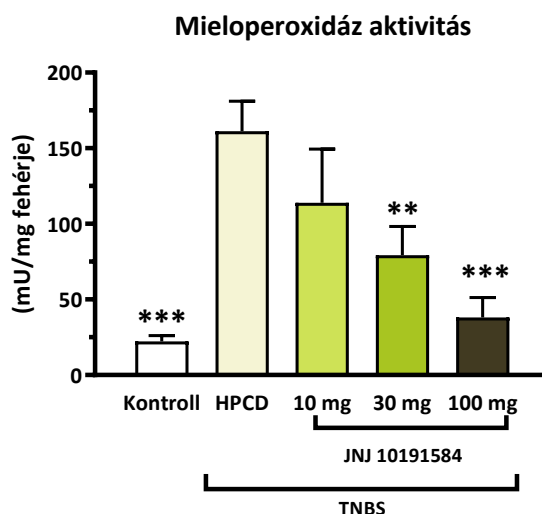


25. ábra Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása a colonsúly változásra, TNBS kezelés után

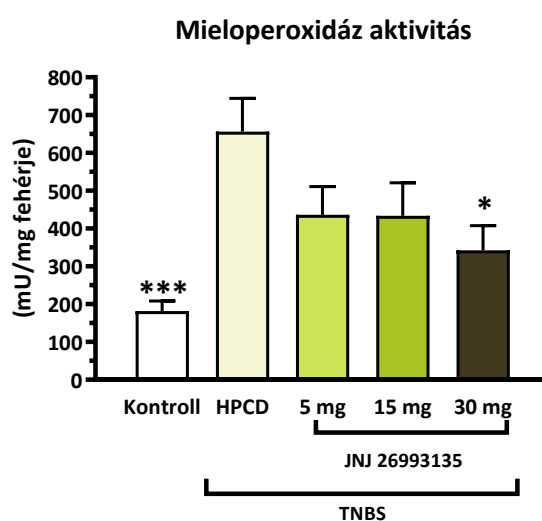
T = SEM; n=8-16; \*p<0,05; \*\*\*p<0,001 a TNBS+HPCD csoporthoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag

### 5.1.4 A hisztamin H4 receptor antagonistista és az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása a mieloperoxidáz aktivitásra akut TNBS kezelés után

A TNBS kezelés hatására egy másik fontos gyulladási paraméter, az MPO aktivitás is szignifikánsan megemelkedett a kontroll csoporthoz képest. Ez a fokozott MPO aktivitás a hisztamin H4 receptor antagonistista analóggal történt kezelés hatására szignifikánsan és dóziszfüggően csökkent (26. ábra). Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor dózisa jelentősen csökkentette az MPO aktivitás, mely hatása a legnagyobb dózis esetében szignifikáns volt (27. ábra).



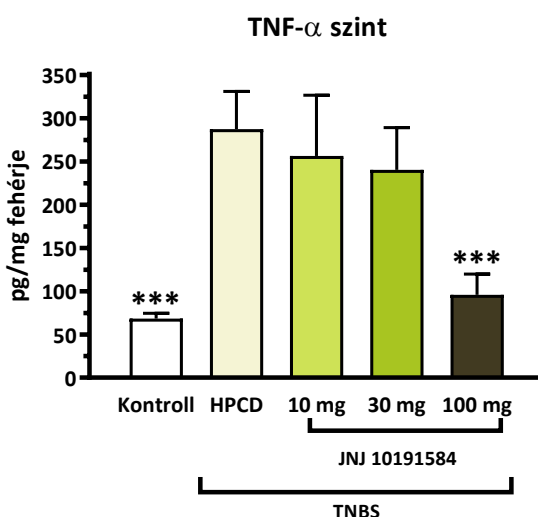
26. ábra A hisztamin H4 receptor antagonistista kezelés hatása az MPO aktivitásra, TNBS kezelés után  
T= SEM; n=8-16; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 a TNBS+HPCD kezelt állatokhoz viszonyítva, HPCD :  
vivőanyag



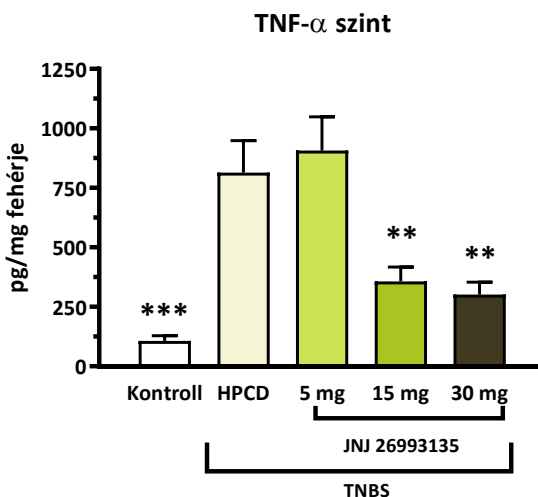
27. ábra Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása az MPO aktivitásra, TNBS kezelés után  
T= SEM; n=8-16; \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 a TNBS+HPCD kezelt állatokhoz viszonyítva,  
HPCD : vivőanyag

### 5.1.5 A hisztamin H4 receptor antagonistista és az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása a TNF- $\alpha$ szintre akut TNBS kezelés után

TNBS kezelést követően szignifikánsan megemelkedett a TNF- $\alpha$  szint a kontroll állatokhoz képest. A legnagyobb dózisú hisztamin H4 receptor antagonistista kezelés (100 mg/kg p.o.), valamint az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelése (15 és 30 mg/kg p.o.) hatására a TNF- $\alpha$  szint szignifikánsan lecsökkent (28. ábra, 29. ábra).



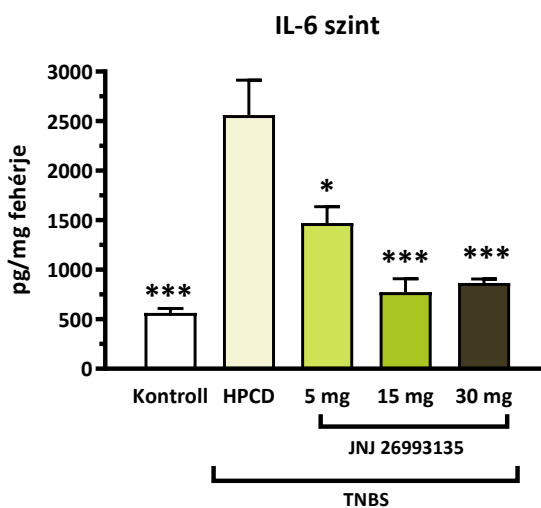
28. ábra A hisztamin H4 receptor antagonistista kezelés hatása a TNF- $\alpha$  szintre, TNBS kezelés után  
T= SEM; n=8-16; \*\*\*P<0,001 a TNBS+HPCD kezelt állatokhoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag



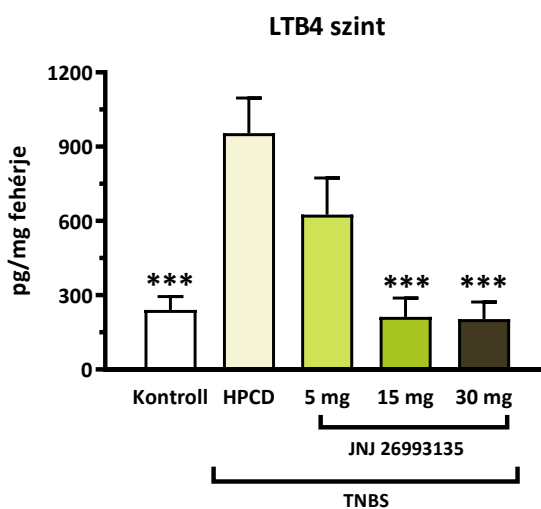
29. ábra Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása a TNF- $\alpha$  szintre, TNBS kezelés után  
T= SEM; n=8-16; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 a TNBS+HPCD kezelt állatokhoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag

### 5.1.6 Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása a colon IL-6 és LTB<sub>4</sub> szintjére

IL-6 és LTB<sub>4</sub> szintet az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés során mértünk. Az IL-6 szintje a TNBS kezelést követően megközelítőleg négyszeresére emelkedett a kontroll állatokhoz képest (30. ábra). A JNJ 26993135 15 mg/kg p.o. és 30 mg/kg p.o. dózis hatására az IL-6 és LTB<sub>4</sub> szint (31. ábra) szignifikánsan lecsökkent, és a kontroll körüli értékre esett vissza.



30. ábra Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása az IL-6 szintre, TNBS kezelés után  
T= SEM; n=8-16; \*P<0,05; \*\*\*P<0,001 a TNBS+ HPCD kezelt állatokhoz viszonyítva, HPCD :  
vivőanyag

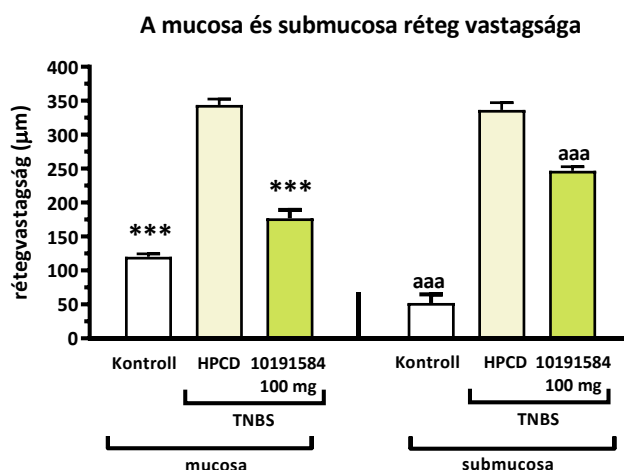


31. ábra Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása az LTB<sub>4</sub> szintre, TNBS kezelés után  
T= SEM; n=8-16; \*\*\*P<0,001 a TNBS+ HPCD kezelt állatokhoz viszonyítva, HPCD :  
vivőanyag



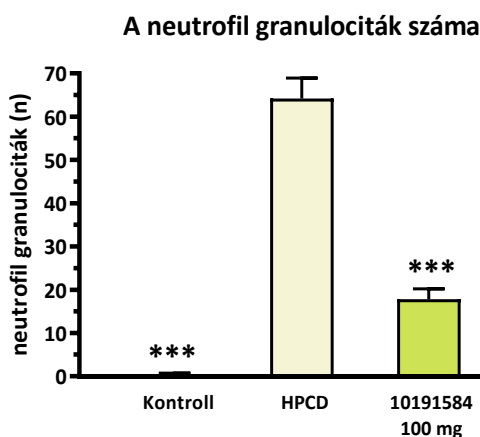
### 5.1.7 A hisztamin H4 receptor blokkoló kezelés hatásának szövettani értékelése

A TNBS kezelés szignifikánsan megemelte a colon mucosa és submucosa rétegek vastagságát a kontroll csoporthoz képest, amely jól tükrözi a szöveti károsodást, az ödémát kísérő sejt-beáramlást (32. ábra). A JNJ 10191584 kezelés (100 mg/kg p.o.) szignifikánsan csökkentette mind a mucosa, mind a submucosa réteg vastagságát (32. ábra), valamint szignifikánsan csökkentette a neutrofil granulociták számát (33. ábra) a TNBS kezeléshez képest.



32. ábra A hisztamin H4 receptor antagonisták hatására a colon mucosa és submucosa vastagságára, TNBS kezelés után.

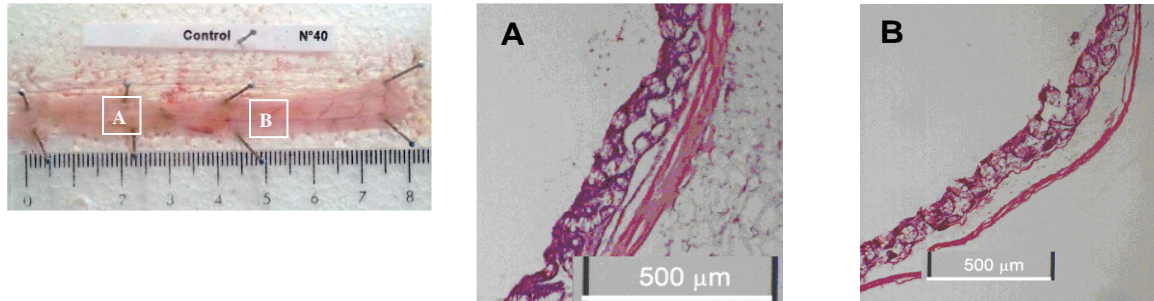
T = SEM; n=12; \*\*\*p<0,001 a TNBS+ HPCD mucosa csoporthoz viszonyítva; aaa p<0,001 a TNBS+ HPCD submucosa csoporthoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag



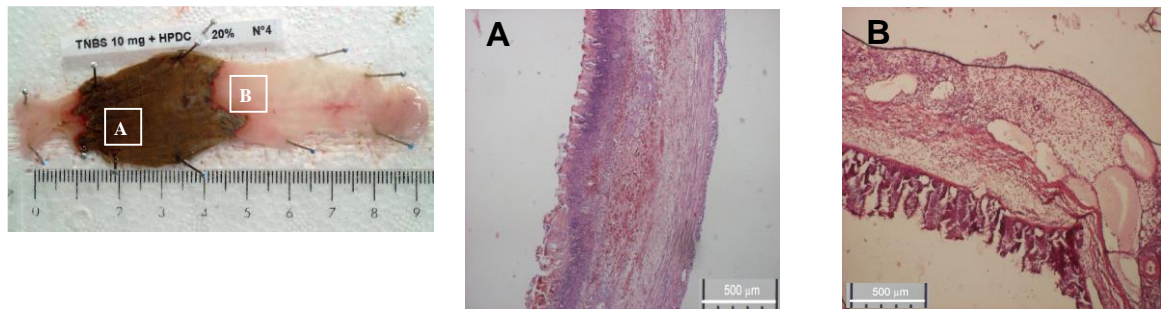
33. ábra A hisztamin H4 receptor antagonisták hatására a neutrofil granulociták számára, TNBS kezelés után.

T = SEM; n=12; \*\*\*p<0,001 a TNBS +HPCD csoporthoz viszonyítva, HPCD : vivőanyag

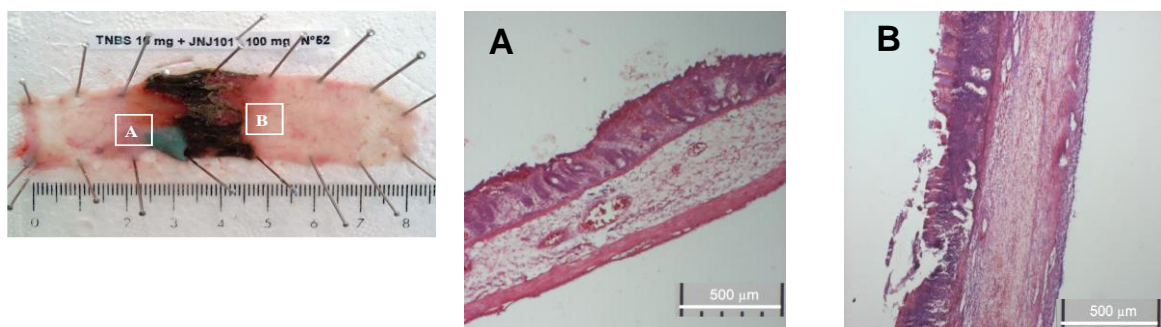
A makroszkópos elváltozások lokalizációjában különbséget tapasztaltunk, ez az oka annak, hogy a kezeléseket után 2 mintavételi helyről (A és B) is készítettünk szövettani felvételt (34. ábra, 35. ábra, 36. ábra). Ezeken megfigyelhető a nyálkahártyaréteg fekélyes elváltozása, a Lieberkühn-kripták csökkent száma, a nagymennyiségű neutrofil beszűrődés, a különböző szövettani rétegeknek a megvastagodása.



34. ábra Kontroll állatok vastagbelének szövettani felvétele, Hematoxilin eozin festés

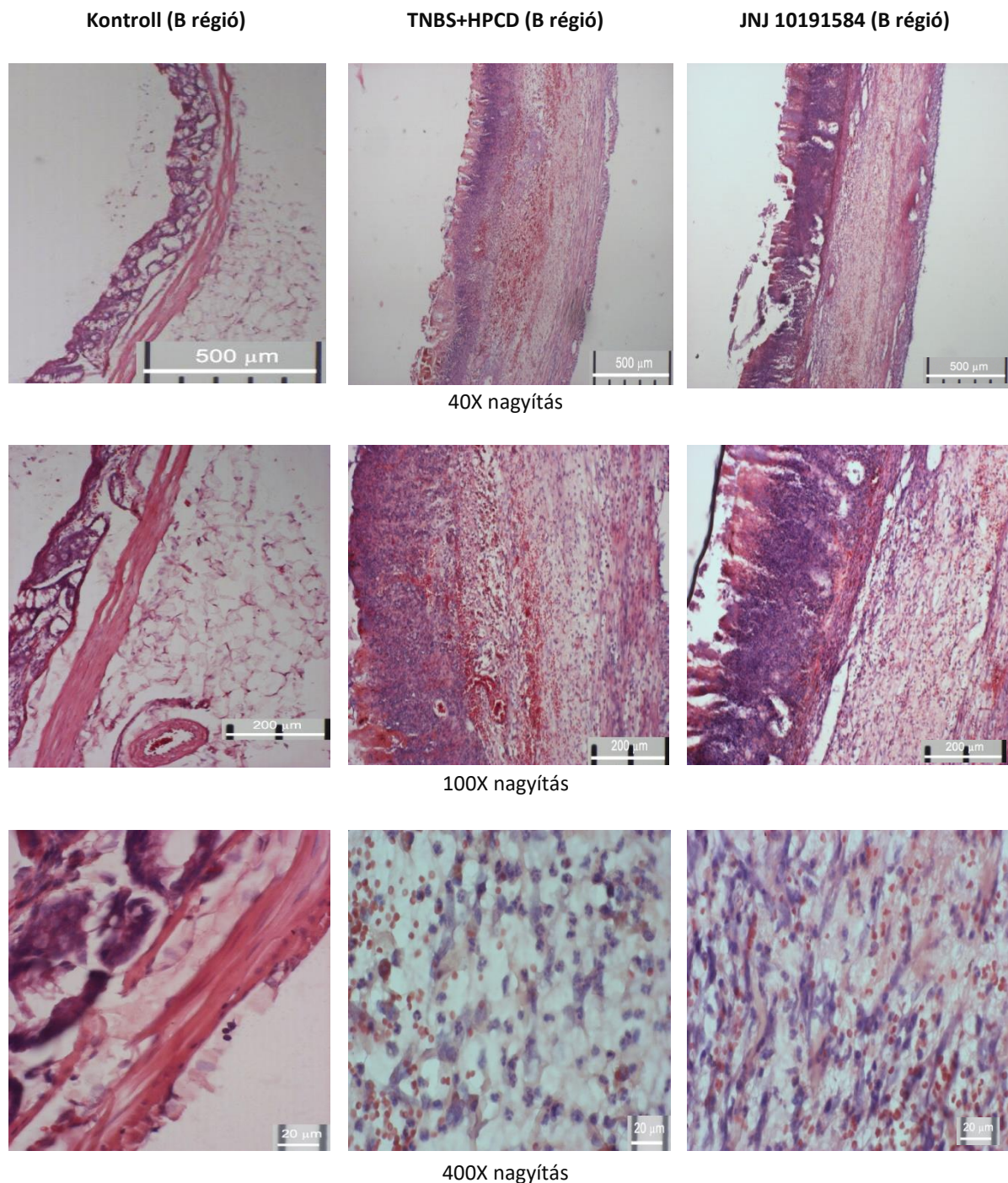


35. ábra TNBS+HPDC kezelt állatok vastagbelének szövettani felvétele, Hematoxilin eozin festés, HPDC: vivőanyag



36. ábra JNJ 10191584 100mg/kg p.o. kezelt állatok vastagbelének szövettani felvétele, Hematoxilin eozin festés

Szembevetjük az is, hogy a gyulladás érinti mind a mucosat, mind a submucosat. 3 különböző nagyításban mutatjuk be a fentebb leírt elváltozásokat hematoxilin-eozin (37. ábra) és toluidinkék festésnél (38. ábra). A felvételeken egyre jobban kivehetőek a beszűrődött limfociták, vörösvértestek és neutrofil granulociták.

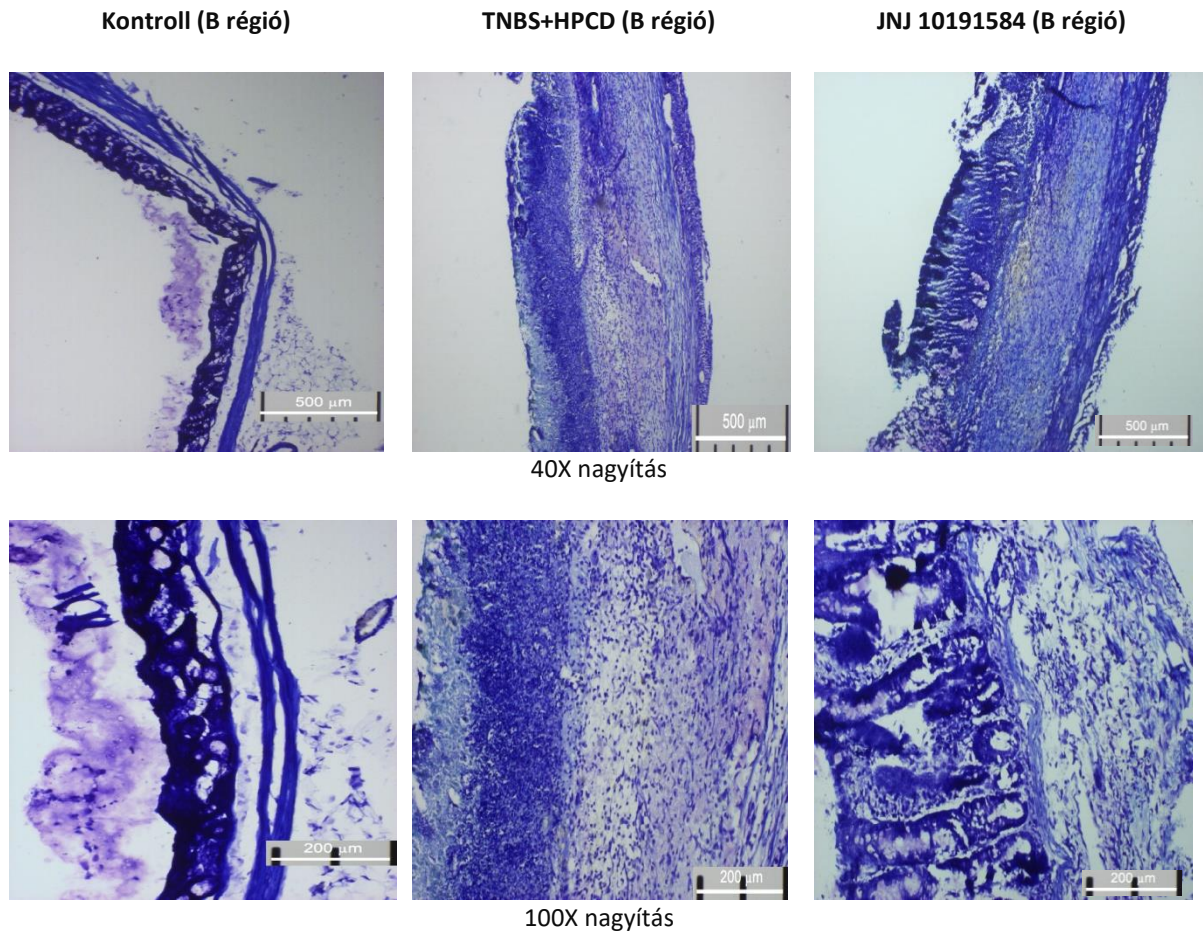


37. ábra Kontroll, TNBS+HPCD- és JNJ 10191584 kezelt állatok neutrofil infiltrációjának szövettani képei

Hematoxilin-eozin festés, HPCD: vivőanyag

Az új hisztamin H4 receptor antagonistá kezelé dóziszfüggően csökkentette a neutrofil granulocita infiltráció mértékét a TNBS+HPCD kezelt állatokhoz képest, melyet szövettani felvételeink is jól tükröznek.

Jól megfigyelhető, hogy JNJ 10191584 kezelé dóziszfüggően csökkentette az epithélium károsodását, a legnagyobb JNJ 10191584 kezelé során az epithélium integritása épen maradt. Újra jól kivehetőek a Lieberkühn-kripták, csak enyhe hyperémia figyelhető meg a metszeteken.



38. ábra Kontroll, TNBS+HPCD- és JNJ 10191584 kezelt állatok neutrofil infiltrációjának szövettani képei  
Toluidinkék festés, HPCD: vivőanyag

## 6. Eredmények megbeszélése

### 6.1 Krónikus vizsgálatok eredményeinek megbeszélése

A krónikus, többszöri TNBS kezeléseket követően az állatok testtömege a kísérleti periódus végén, a 120. napon alig különbözött a kontroll állatokétól. A bélgyulladás során a gyulladássos periódusok időtartamától, és a gyulladás intenzitásától függően változik a nyálkahártya károsodás mértéke.

Eredményeink alapján a többszöri TNBS kezelés következményeként csökkent a fekélyek nagysága az akut TNBS kezeléshez képest. Feltételezhető, hogy a periodikus akut gyulladássos folyamatok olyan folyamatokat indukálnak<sup>[177, 178]</sup>, amelyek elősegítik a nyálkahártya gyors regenerációját, a későbbiekben megakadályozzák a végleges károsodás kialakulását. Mindezek ellenére a folyamatos nyálkahártyakárosodás és javulás következtében a krónikus gyulladással járó szövdmények tovább súlyosbodtak, egyre nagyobb területen alakult ki fisztula vagy fibrózis, az ECM elemek kiegyensúlyozatlan szintézise és lebomlása miatt<sup>[178]</sup>.

#### 6.1.1 MMP-9 és TIMP-1 fehérje expresszió

Laboratóriumunk munkatársai által végzett elektronmikroszkópos morfometriai mérések során az izomsejtek között már a krónikus fázis 90. napján magasabb ECM felhalmozódást tapasztaltak<sup>[177]</sup>. Az ECM elemek túltermelődését a simaizomsejtek megváltozott MMP-9/TIMP-1 expressziója is okozhatja<sup>[179-184]</sup>. Az intenzív sejtpusztulás miatt az izomsejtek körül sejttermék halmozódott fel, amely szűkületek kialakulásához vezetett.

Vizsgálatunkban a kísérleti periódus 90. napján a 3x TNBS kezelt csoport MMP-9 fehérje szintje a vizsgált körkörös és hosszanti izomrétegben szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. A 120. napra enyhe emelkedést tapasztaltunk MMP-9 fehérje expresszióban a 3x TNBS-sel kezelt csoportban.

Az MMP-9 a bél többi szövettani rétegben jelentősebben változhat, melyet más tanulmányok is megerősítettek, miszerint az aktív MMP-9-nek csak egy része van jelen a muscularis rétegben<sup>[185]</sup>, a lamina propriában nagy mennyiségű MMP-9-et detektáltak, mely összhangban van az infiltrálódott neutrofil granulocita mennyiségével. Azonban több tanulmányban is fokozott MMP-9 szintet tapasztaltak a nem gyulladt területeken<sup>[181]</sup>. Ennek az lehet az oka, hogy a nem érintett területeken magasabb az MPO szintje<sup>[186]</sup>, nagy mennyiségű MMP-9-et tartalmazó polimorfonukleáris leukocita van jelen<sup>[181]</sup>. Az MMP-9 elsődleges lokalizációja a submucosa<sup>[187, 188]</sup>. Általánosságban elmondható, hogy az MMP-9 aktívan részt vesz a gyulladássos folyamatokban, lokalizációja miatt a musculáris réteg fehérje expressziós vizsgálata kevésbé reprezentatívan mutatja ezeket a változásokat. Ezzel egyidejűleg a TIMP-1 fehérje gyakorlatilag detektálhatatlan volt.

Az utóbbi években világossá vált, hogy az MMP-k az ECM elemek bontásán kívül részt vesznek az immunválasz szabályozásában, aktiválnak vagy gátolnak bizonyos citokineket, köztük a TNF- $\alpha$ -t is<sup>[189]</sup>. Mivel az MMP-k célzott gátlása hatással van a TNF- $\alpha$  szintjére, ez újabb lehetőséget vet fel a krónikus bélgyulladás kezelésében<sup>[87]</sup>, azonban egy másik tanulmány szerint az anti-MMP-9 terápia nem okozott klinikai remissziót az CU-ban<sup>[190]</sup>.

## 6.1.2 MMP-9 aktivitás

Erős MMP-9-aktivitást már korábban is igazoltak CD-ben zselatin zimográfiával<sup>[181]</sup>, hasonló növekedés volt megfigyelhető a fisztulákban, amely azt a felvetést erősíti, hogy az MMP-9 hozzájárul a fisztulaképződéshez<sup>[191]</sup>.

Kísérletünkben a krónikus periódus alatt növekvő aktív MMP-9 formát mutattuk ki.

## 6.2 Akut vizsgálatok eredményeinek megbeszélése

A IBD egyik formája a CD, melynek egzakt kezelése továbbra sem megoldott. A betegség megfelelő vizsgálatához, jobb megértéséhez szükség volt egy alkalmas állat modell bevezetésére. Számos modell létezik, de a TNBS modell<sup>[155]</sup> bizonyult az egyik legmegfelelőbbnek a bélgyulladás akut és krónikus tüneteinek vizsgálatára.

Jelenlegi munkánkban a TNBS 10 mg-os dózisát alkalmaztuk, hogy reprodukálható, de nem túlságosan súlyos, akut nyálkahártya-gyulladást idézzünk elő a vastagbélben. Ez a dózis megfelelőnek tűnt arra, hogy ne fokozza a magasabb TNBS dózisoknál megfigyelt mortalitást<sup>[113]</sup>.

A hapténnel kiváltott gyulladás jellemzői közé tartozik a károsodott Liberkün krypta szerkezet, a krypta atrófia, a granulomok, óriás sejtek, a bazális limfoid aggregáció, neutrofil és eozinophil infiltráció, és a bél teljes keresztmetszetének a károsodása<sup>[153, 155, 192-195]</sup>.

Irodalmi adataink szerint a neutrofil granulociták fontos szerepet játszanak a vastagbél gyulladással járó folyamataiban. Kísérletünk során a TNBS által kiváltott gyulladás a beadást követően 24 és 72 óra között éri el a maximumot<sup>[170, 196]</sup>. A TNBS kezelés 3. napján a makroszkópos sérülést magasabb MPO szint kísérte, a neutrofil infiltráció mértékének jelentős növekedése jellemezte<sup>[197, 198]</sup>. Későbbiekben munkacsoportunk az akut TNBS modell további molekuláris mechanizmusát vizsgálta<sup>[168, 199]</sup>.

A gyulladással járó citokinek kulcsfontosságú szerepet töltenek be a gyulladással járó folyamatokban. Jelenlegi munkánkban is azt tapasztaltuk, hogy a TNBS kezelés során a 3. napon a vastagbél TNF- $\alpha$  szintje jelentősen emelkedett<sup>[197, 198]</sup>.

## 6.2.1 A hisztamin H4 receptor antagonisták kezelés hatása a gyulladás kialakulására

A JNJ 10191584 hisztamin H4 receptor antagonisták száján át történő alkalmazásával a makroszkópikus sérülések dóziszfüggő és szignifikáns csökkenést tapasztaltunk, mind a léziók, mind pedig a kialakult gyulladások mértékét tekintve. A TNBS-okozta bél-tömeg növekedést a JNJ10191584 legnagyobb dózisa szignifikánsan csökkentette. Szövettanilag a TNBS okozta mucosa és submucosa nagymértékű megvastagodását a JNJ 10191584 hisztamin H4 receptor antagonisták csökkentette, ezt jól tükrözi a szövetkárosodás, és az ödéma nagyságának csökkenése. A TNBS kezelés+HPCD (vivőanyag) kezelt állatok testsúlya szignifikánsan csökkent, a JNJ 10191584 hatására a colon szöveti sérülése szignifikánsan csökkent, s ezzel arányosan az állatok étvágya és testsúlya is javult. Mindezt megerősíti egy másik hisztamin H4 receptor antagonisták tanulmány is, amely hasonlóképpen csökkentette a makroszkópikus sérülés kiterjedését, súlyossági pontszámát, a colonsúlyt, valamint gyengítette a gyulladás okozta testsúlycsökkenést. A szabad szemmel látható sérülést jelentős MPO szint emelkedés, fokozott neutrofil infiltráció kísérte. Ezt a szövettani vizsgálat is alátámasztotta<sup>[200]</sup>. Eredményeink alapján számos szabadalmi tanulmány lett beadvány, amely a hisztamin H4 receptor antagonisták igazolt gyulladáscsökkentő hatásán alapszik<sup>[201-211]</sup>. Mind a kísérletes vastagbélgyulladásos modellel kapcsolatos tanulmányok<sup>[155, 172, 212, 213]</sup>, mind a klinikai tanulmányok<sup>[214, 215]</sup> jelzik a neutrofil granulociták fontos szerepét a colon gyulladásos folyamataiban. A JNJ 10191584 dóziszfüggően csökkentette a magas MPO aktivitást, gátolta a neutrofil infiltrációt a submucosába. Egy másik tanulmányban a JNJ 777120 hasonlóképpen csökkentette az MPO emelkedést. Megemlítendő, hogy a hisztamin H4 receptor antagonisták befolyásolják egyéb, a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó sejtek működését is. Hatással vannak a hízósejtek funkciójára, migrációjára *in vitro* és *in vivo*, valamint csökkentik a zymosan indukált hashártyagyulladás súlyosságát<sup>[136]</sup>. A JNJ 777120 kezelés terápiás hatékonyságú volt gyulladásos és neuropátiás fájdalom-modellben, patkányokban<sup>[216]</sup>, valamint a JNJ 10191584 csökkenti az ideggyulladást és az oxidatív stresszt perifériás neuropátiás egérmodellben<sup>[217]</sup>.

Hízósejt degranuláció fordul elő a colonban, colitises betegeknél<sup>[218]</sup>. A hízósejtek fontos szerepet játszanak a haptén okozta fibrózis kialakulásában<sup>[219]</sup>, valamint az epitheliális gát zavart működésében, amely a vastagbélgyulladást kíséri<sup>[220, 221]</sup>. A vizsgálatok során megállapításra került az is, hogy a LTB<sub>4</sub>, mint gyulladásos mediátor részt vesz a TNBS indukálta gyulladásos folyamatokban<sup>[170, 196, 222, 223]</sup>. Ezen felül a hízósejtek fontos szerepet játszanak a TNF- $\alpha$  termelésben is<sup>[224]</sup>.

Eozinofil granulociták is részt vesznek a gyulladásos folyamatokban<sup>[218, 225-228]</sup>, és hisztamin H4 receptorral is rendelkeznek a hízósejtekhez hasonlóan<sup>[43, 229]</sup>.

A bazofil granulociták felhalmozódnak gyulladt szövetekben és ez a betegség súlyosbodásához, fellángolásához vezet<sup>[230]</sup>.

A gyulladást keltő citokinek termelődése vezető szerepet játszik a gyulladásos folyamatokban, és az anti-TNF- $\alpha$  kezelés alkalmazása fő irányvonala a IBD kezelésének<sup>[1]</sup>. A colon TNF- $\alpha$  szintje megemelkedik a TNBS indukálta colitisben<sup>[62, 231]</sup>, és a TNF- $\alpha$  szintézisének gátlása vagy TNF- $\alpha$  antitest alkalmazása csökkenti a gyulladások mértékét<sup>[113, 114]</sup>.

A JNJ 10191584 terápiás hatékonyságúnak bizonyult ebben a vastagbélgyulladásos patkánymodellben. Jelen vizsgálatainkban a colon emelkedett TNF- $\alpha$  szintjét szignifikánsan csökkentette az analóggal történő kezelés. Lehetséges, hogy a hisztamin H4 receptor antagonistá kezelésgátolta a gyulladást keltő citokinek bioszintézisét, és ezt tükrözte a TNF- $\alpha$  szint változása is. Csökkent a szöveti sérülés mértéke, és a környező szövetekbe beáramló -gyulladásos citokint termelősejtek mennyisége, a szöveti ödémásodás mértéke. Gátolta a MPO szint növekedését, a neutrofil granulociták beáramlását a vastagbél szövetbe. A jelenlegi eredmények alapján a hisztamin H4 receptor antagonistával történő kezelés egy új farmakológiai megközelítése lehet a bélgyulladás terápiájának.

## 6.2.2 Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelés hatása a gyulladásra

Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor -JNJ 26993135- szintén dózisfüggően csökkentette a vastagbél károsodásának mértékét, és annak intenzitását. A szájon át történő alkalmazást követően a JNJ 26993135 szignifikánsan csökkentette neutrofil infiltrációt, az MPO, IL-6 és a TNF- $\alpha$  szintjét.

A TNBS okozta vastagbélgyulladás során megemelkedett a colon LTB<sub>4</sub> szintje<sup>[170, 223, 232-236]</sup>, melyet a JNJ 26993135 kezelés dózisfüggően csökkentett. Lehetséges, hogy a szöveti sérülés mértékének csökkenése alacsonyabb LTB<sub>4</sub> szintet okoz, azonban nagyobb a valószínűsége annak, hogy a JNJ 26993135 gátolva az LTB<sub>4</sub> szintézist, csökkenti annak mennyiségét. További vizsgálatok igazolták, hogy az egyszeri dózisban alkalmazott 5-LO inhibitor, a Zileuton szintén csökkentette a makroszkópikus sérülés nagyságát, valamint a TNBS okozta magas MPO szintet<sup>[232]</sup>, azonban ez a hatás kevésbé volt hatékony, mint JNJ 26993135 esetén.

Klinikai tanulmányok bizonyítják, hogy a Zileuton és a FLAP inhibitor MK-591 magasabb dózisa májkárosító hatású és nem kívánt mellékhatásaik vannak<sup>[237, 238]</sup>. Mindkét anyag csökkenti a Lipoxin A<sub>4</sub> és Lipoxin B<sub>4</sub> mennyiségét, ezáltal kevésbé lesz gyulladásgátló hatású<sup>[239]</sup>. Egy stabil Lipoxin A<sub>4</sub> analóg gyulladást csökkentő hatású volt egér colitises modellben<sup>[240]</sup>, valamint a ZK-192 csökkentette a gyulladás mértékét egerekben<sup>[241]</sup>. A JNJ 26993135 szintén gátolta az LTB<sub>4</sub> termelést, azonban nem csökkentette a Lipoxin A<sub>4</sub> szintjét. Egy külsőleg alkalmazott gyulladásgátló gyógyszer a Bufexamac specifikusan gátolta az LTA<sub>4</sub>H enzimaktivitását, megakadályozta az LTB<sub>4</sub> termelést, és a neutrofil migrációt akut tüdőkárosodásban, egerekben<sup>[242]</sup>.

Colitisben megemelkedik a TNF- $\alpha$  és IL-6 szintje<sup>[1]</sup>, klinikai vizsgálatokban a citokinek célzó ellenanyagok terápiás lehetőséget jelenthetnek a colitis kezelésében<sup>[243, 244]</sup>, mennyisége - a JNJ 26993135 kezelés eredményei alapján- az LTA<sub>4</sub>H gátlók segítségével csökkenthető.

Mindezen eredmények alapján a JNJ 26993135, mint LTA<sub>4</sub>H inhibitor lehetőséget teremt a IBD egy új típusú, farmakológiai kezelésének kidolgozására.



## 7. Következtetések

Biokémiai, szövettani, valamint molekuláris biológiai eredményeink alapján a következőket állapíthatjuk meg:

- I. Az ECM elemek felhalmozódásában szerepet játszik az MMP-9 és TIMP-1, mely a szűkületek kialakulásához vezet. Jelen krónikus vizsgálatainkban mi az MMP-9 expressziójának és aktivitásának emelkedését tudtuk igazolni.
- II. Krónikus modellünk esetében a TIMP-1 fehérje változását nem tudtuk igazolni a 90. és 120 napon.
- III. A hisztamin H4 receptor antagonistá kezelési terápiás hatékonyságúnak bizonyult. Az analóggal történő kezelés csökkentette a gyulladásos paramétereket: mind a léziók kiterjedését és súlyosságát, a colon ödéma mértékét, a mucosa és submucosa gyulladásának mértékét, és a neutrofil granulociták beáramlását. Csökkentette a gyulladásos citokin TNF- $\alpha$  szintet, gátolta az MPO enzim aktivitás növekedését.
- IV. Az LTA<sub>4</sub>H inhibitor kezelési szintén dóziszfüggően csökkentette gyulladásos paramétereket: mind a léziók kiterjedését és súlyosságát, a colon ödéma mértékét, mind gyulladásos citokinek (IL-6 és TNF- $\alpha$ ) szinteket, gátolta az LTB<sub>4</sub> szintet, gátolta az MPO enzim aktivitás növekedését és a neutrofil granulociták beáramlását.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném őszinte hálámat kifejezni témavezetőimnek, **Dr. Varga Csabának**, és **Dr. Bagyánszki Máriának** a doktori tanulmányaim támogatásáért. Útmutatójuk, hasznos tanácsaik segítettek dolgozatom megírásában.

Külön köszönettel tartozom **Prof. Dr. Fekete Évának** kemény, de ösztönző szavaiért, munkacsoportjának: **Dr. Bódi Nikolettnek**, Dr. Talapka Petrának, Dr. Szalai Zitának segítségéért.

Prof. **Dr. Toldi Józsefnek**, aki mindvégig támogatott és türelemmel meghallgatott tanulmányaim idején, pályafutásom során, és lehetőséget biztosított a tanszéken, hogy mindezeket megvalósítsam.

Őszinte barátsággal köszönöm Dr. Kis Zsoltnak, Hoffmann Alexandrának, Juhász Katalinnak, akik mindvégig ösztönöztek, segítették munkámat.

Szeretném megköszönni munkacsoportunk volt- és jelenlegi tagjainak segítségét Almási Nikolettának, Amin Al Awarnak, Börzsei Denisenek, Csonka Anettnak, Dr. Hegyköziné Dr. Veszélka Médeának, Dr. Horváth Krisztinának, Dr. Kupai Krisztinának, Dr. László Ferencnek, ifjabb †Dr. László Ferencnek, Dr. Molnár Andornak, Dr. Pósa Anikónak, Dr. Szabó Renátának, és Török Szilviának.

Az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék valamennyi volt- és jelenlegi dolgozójának is köszönöm, akik meghatározó személyiségei voltak pályafutásomnak.

Végül, de nem utolsósorban szeretném kifejezni legmélyebb hálámat családomnak és barátaimnak. Ez a disszertáció nem lett volna lehetséges **férjem** türelme és végtelen támogatása nélkül.

*A kísérletek elvégzéséhez az alábbi pályázatok nyújtottak támogatást:*

EFOP-3.6.1-16-2016-00008

GINOP-2\_3\_2-15-2016-00030

ÚNKP 20391-3/2018/FEKUSTRAT

## 9. Irodalomjegyzék

- [1] M.F. Neurath, Cytokines in inflammatory bowel disease, *Nat Rev Immunol*, 14 (2014) 329-342.
- [2] B. Crohn, presented to the library of the New York Academy of Medicine and reproduced with their permission., 1932.
- [3] L.L. Troncoso, A.L. Biancardi, H.V. de Moraes, C. Zaltman, Ophthalmic manifestations in patients with inflammatory bowel disease: a review, *World J Gastroentero*, 23 (2017) 5836-5848.
- [4] T. Greuter, S.R. Vavricka, Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease - epidemiology, genetics, and pathogenesis, *Expert Rev Gastroent*, 13 (2019) 307-317.
- [5] C. Abraham, J.H. Cho, Inflammatory bowel disease, *N Engl J Med*, 361 (2009) 2066-2078.
- [6] K. Geboes, P. Van Eyken, Inflammatory bowel disease unclassified and indeterminate colitis: the role of the pathologist, *J Clin Pathol*, 62 (2009) 201-205.
- [7] M. Aloji, L. Birimberg-Schwartz, S. Buderus, I. Hojsak, J.M. Fell, J. Bronsky, G. Veereman, S. Koletzko, R. Shaoul, E. Miele, D. Turner, R.K. Russell, Treatment Options and Outcomes of Pediatric IBDU Compared with Other IBD Subtypes: A Retrospective Multicenter Study from the IBD Porto Group of ESPGHAN, *Inflamm Bowel Dis*, 22 (2016) 1378-1383.
- [8] J. Cosnes, C. Gower-Rousseau, P. Seksik, A. Cortot, Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology*, 140 (2011) 1785-1794.
- [9] N.A. Molodecky, I.S. Soon, D.M. Rabi, W.A. Ghali, M. Ferris, G. Chernoff, E.I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, H.W. Barkema, G.G. Kaplan, Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review, *Gastroenterology*, 142 (2012) 46-54 e42; quiz e30.
- [10] J. Burisch, N. Pedersen, S. Cukovic-Cavka, M. Brinar, I. Kaimakliotis, D. Duricova, O. Shonova, I. Vind, S. Avnstrom, N. Thorsgaard, V. Andersen, S. Krabbe, J.F. Dahlerup, R. Salupere, K.R. Nielsen, J. Olsen, P. Manninen, P. Collin, E.V. Tsianos, K.H. Katsanos, K. Ladefoged, L. Lakatos, E. Bjornsson, G. Ragnarsson, Y. Bailey, S. Odes, D. Schwartz, M. Martinato, G. Lupinacci, M. Milla, A. De Padova, R. D'Inca, M. Beltrami, L. Kupcinkas, G. Kiudelis, S. Turcan, O. Tighineanu, I. Mihu, F. Magro, L.F. Barros, A. Goldis, D. Lazar, E. Belousova, I. Nikulina, V. Hernandez, D. Martinez-Ares, S. Almer, Y. Zhulina, J. Halfvarson, N. Arebi, S. Sebastian, P.L. Lakatos, E. Langholz, P. Munkholm, g. EpiCom, East-West gradient in the incidence of inflammatory bowel disease in Europe: the ECCO-EpiCom inception cohort, *Gut*, 63 (2014) 588-597.
- [11] R.H. Duerr, D.A. Neigut, Molecularly defined HLA-DR2 alleles in ulcerative colitis and an antineutrophil cytoplasmic antibody-positive subgroup, *Gastroenterology*, 108 (1995) 423-427.
- [12] J. Satsangi, K.I. Welsh, M. Bunce, C. Julier, J.M. Farrant, J.I. Bell, D.P. Jewell, Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease, *Lancet*, 347 (1996) 1212-1217.
- [13] G. Lee, K.H. Jung, D. Shin, C. Lee, W. Kim, S. Lee, J. Kim, H. Bae, Cigarette Smoking Triggers Colitis by IFN-gamma(+) CD4(+) T Cells, *Frontiers in Immunology*, 8 (2017).
- [14] T.C. Liu, J.T. Kern, K.L. VanDussen, S.S. Xiong, G.E. Kaiko, C.B. Wilen, M.W. Rajala, R. Caruso, M.J. Holtzman, F. Gao, D.P.B. McGovern, G. Nunez, R.D. Head, T.S. Stappenbeck, Interaction

between smoking and ATG16L1(T300A) triggers Paneth cell defects in Crohn's disease, *Journal of Clinical Investigation*, 128 (2018) 5110-5122.

[15] J. Cosnes, Smoking and Diet: Impact on Disease Course?, *Dig Dis*, 34 (2016) 72-77.

[16] D. Owczarek, T. Rodacki, R. Domagala-Rodacka, D. Cibor, T. Mach, Diet and nutritional factors in inflammatory bowel diseases, *World J Gastroenterol*, 22 (2016) 895-905.

[17] A.N. Ananthakrishnan, Epidemiology and risk factors for IBD, *Nat Rev Gastro Hepat*, 12 (2015) 205-217.

[18] A. Racine, F. Carbonnel, S.S. Chan, A.R. Hart, H.B. Bueno-de-Mesquita, B. Oldenburg, F.D. van Schaik, A. Tjonneland, A. Olsen, C.C. Dahm, T. Key, R. Luben, K.T. Khaw, E. Riboli, O. Grip, S. Lindgren, G. Hallmans, P. Karling, F. Clavel-Chapelon, M.M. Bergman, H. Boeing, R. Kaaks, V.A. Katzke, D. Palli, G. Masala, P. Jantchou, M.C. Boutron-Ruault, Dietary Patterns and Risk of Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results from the EPIC Study, *Inflamm Bowel Dis*, 22 (2016) 345-354.

[19] A.N. Ananthakrishnan, Environmental triggers for inflammatory bowel disease, *Curr Gastroenterol Rep*, 15 (2013) 302.

[20] S.P. Jorgensen, J. Agnholt, H. Glerup, S. Lyhne, G.E. Villadsen, C.L. Hvas, L.E. Bartels, J. Kelsen, L.A. Christensen, J.F. Dahlerup, Clinical trial: vitamin D3 treatment in Crohn's disease - a randomized double-blind placebo-controlled study, *Aliment Pharmacol Ther*, 32 (2010) 377-383.

[21] A.N. Ananthakrishnan, Editorial: Vitamin D and IBD: Can We Get Over the "Causation" Hump?, *Am J Gastroenterol*, 111 (2016) 720-722.

[22] N.A. Theochari, A. Stefanopoulos, K.S. Mylonas, K.P. Economopoulos, Antibiotics exposure and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review, *Scand J Gastroentero*, 53 (2018) 1-7.

[23] H. Khalili, L.M. Higuchi, A.N. Ananthakrishnan, J.M. Richter, D. Feskanich, C.S. Fuchs, A.T. Chan, Oral contraceptives, reproductive factors and risk of inflammatory bowel disease, *Gut*, 62 (2013) 1153-1159.

[24] A. Abautret-Daly, E. Dempsey, A. Parra-Blanco, C. Medina, A. Harkin, Gut-brain actions underlying comorbid anxiety and depression associated with inflammatory bowel disease, *Acta Neuropsychiatr*, 30 (2018) 275-296.

[25] D.C. Baumgart, S.R. Carding, Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology, *Lancet*, 369 (2007) 1627-1640.

[26] X.Y. Gui, J. Li, A. Ueno, M. Iacucci, J.M. Qian, S. Ghosh, Histopathological Features of Inflammatory Bowel Disease are Associated With Different CD4(+) T Cell Subsets in Colonic Mucosal Lamina Propria, *Journal of Crohns & Colitis*, 12 (2018) 1448-1458.

[27] J.D. Simmons, C. Mullighan, K.I. Welsh, D.P. Jewell, Vitamin D receptor gene polymorphism: association with Crohn's disease susceptibility, *Gut*, 47 (2000) 211-214.

[28] Y. Zhulina, V. Hahn-Stromberg, A. Shamikh, C.G. Peterson, A. Gustavsson, N. Nyhlin, A. Wickbom, J. Bohr, L. Bodin, C. Tysk, M. Carlson, J. Halfvarson, Subclinical inflammation with increased neutrophil activity in healthy twin siblings reflect environmental influence in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Inflamm Bowel Dis*, 19 (2013) 1725-1731.

[29] R. Cooney, D. Jewell, The genetic basis of inflammatory bowel disease, *Dig Dis*, 27 (2009) 428-442.

- [30] I. Cleynen, J.R. Gonzalez, C. Figuera, A. Franke, D. McGovern, M. Bortlik, B.J. Crusius, M. Vecchi, M. Artieda, M. Szczypiorska, J. Bethge, D. Arteta, E. Ayala, S. Danese, R.A. van Hogezaand, J. Panes, S.A. Pena, M. Lukas, D.P. Jewell, S. Schreiber, S. Vermeire, M. Sans, Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project, *Gut*, 62 (2013) 1556-1565.
- [31] J. Seiderer, S. Brand, K.A. Herrmann, F. Schnitzler, R. Hatz, A. Crispin, S. Pfennig, S.O. Schoenberg, B. Goke, P. Lohse, T. Ochsenkuhn, Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study, *Inflamm Bowel Dis*, 12 (2006) 1114-1121.
- [32] R.H. Duerr, K.D. Taylor, S.R. Brant, J.D. Rioux, M.S. Silverberg, M.J. Daly, A.H. Steinhardt, C. Abraham, M. Regueiro, A. Griffiths, T. Dassopoulos, A. Bitton, H. Yang, S. Targan, L.W. Datta, E.O. Kistner, L.P. Schumm, A.T. Lee, P.K. Gregersen, M.M. Barmada, J.I. Rotter, D.L. Nicolae, J.H. Cho, A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene, *Science*, 314 (2006) 1461-1463.
- [33] K. Cadwell, J.Y. Liu, S.L. Brown, H. Miyoshi, J. Loh, J.K. Lennerz, C. Kishi, W. Kc, J.A. Carrero, S. Hunt, C.D. Stone, E.M. Brunt, R.J. Xavier, B.P. Sleckman, E. Li, N. Mizushima, T.S. Stappenbeck, H.W.t. Virgin, A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells, *Nature*, 456 (2008) 259-263.
- [34] S. Zamani, M.R. Zali, H.A. Aghdaei, L.A. Sechi, M. Niegowska, E. Caggiu, R. Keshavarz, N. Mosavari, M.M. Feizabadi, Mycobacterium avium subsp paratuberculosis and associated risk factors for inflammatory bowel disease in Iranian patients, *Gut Pathogens*, 9 (2017).
- [35] Y. Hanada, S. Khanna, E.V. Loftus, L.E. Raffals, D.S. Pardi, Non-Clostridium difficile Bacterial Infections Are Rare in Patients With Flares of Inflammatory Bowel Disease, *Clin Gastroenterol H*, 16 (2018) 528-533.
- [36] M.K. Pezhouh, J.A. Miller, R. Sharma, D. Borzik, O. Eze, K. Waters, M.A. Westerhoff, A.M. Parian, M.G. Lazarev, L. Voltaggio, Refractory inflammatory bowel disease: is there a role for Epstein-Barr virus? A case-controlled study using highly sensitive Epstein-Barr virus encoded small RNA1 in situ hybridization, *Hum Pathol*, 82 (2018) 187-192.
- [37] J.M. Davies, M.T. Abreu, The innate immune system and inflammatory bowel disease, *Scand J Gastroenterol*, 50 (2015) 24-33.
- [38] M.W. Khan, A.A. Kale, P. Bere, S. Vajjala, E. Gounaris, K.C. Pakanati, Microbes, intestinal inflammation and probiotics, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 6 (2012) 81-94.
- [39] S.G. Standring, Henry,, Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice / editor-in-chief, Susan Standring ; section editors, Neil R. Borely ... [et al.]. 40th ed., anniversary ed. (2008).
- [40] S.C. Bischoff, Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells, *Semin Immunopathol*, 31 (2009) 185-205.
- [41] M.M. Wouters, Histamine antagonism and postinflammatory visceral hypersensitivity, *Gut*, 63 (2014) 1836-1837.
- [42] J.A. Jablonowski, N.I. Carruthers, R.L. Thurmond, The histamine H4 receptor and potential therapeutic uses for H4 ligands, *Mini Rev Med Chem*, 4 (2004) 993-1000.
- [43] T.M. Reher, D. Neumann, A. Buschauer, R. Seifert, Incomplete activation of human eosinophils via the histamine H4-receptor: evidence for ligand-specific receptor conformations, *Biochem Pharmacol*, 84 (2012) 192-203.

- [44] A. Fabisiak, J. Włodarczyk, N. Fabisiak, M. Storr, J. Fichna, Targeting Histamine Receptors in Irritable Bowel Syndrome: A Critical Appraisal, *J Neurogastroenterol Motil*, 23 (2017) 341-348.
- [45] A.W. Ford-Hutchinson, Leukotriene B4 in inflammation, *Crit Rev Immunol*, 10 (1990) 1-12.
- [46] J. Murray, C. Ward, J.T. O'Flaherty, I. Dransfield, C. Haslett, E.R. Chilvers, A.G. Rossi, Role of leukotrienes in the regulation of human granulocyte behaviour: dissociation between agonist-induced activation and retardation of apoptosis, *Br J Pharmacol*, 139 (2003) 388-398.
- [47] E.H. Shin, H.Y. Lee, Y.S. Bae, Leukotriene B4 stimulates human monocyte-derived dendritic cell chemotaxis, *Biochem Biophys Res Commun*, 348 (2006) 606-611.
- [48] M. Peters-Golden, W.R. Henderson, Jr., Leukotrienes, *N Engl J Med*, 357 (2007) 1841-1854.
- [49] V.L. Ott, J.C. Cambier, J. Kappler, P. Marrack, B.J. Swanson, Mast cell-dependent migration of effector CD8+ T cells through production of leukotriene B4, *Nat Immunol*, 4 (2003) 974-981.
- [50] T. Shimizu, O. Radmark, B. Samuelsson, Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (1984) 689-693.
- [51] J.Z. Haeggstrom, Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B4 biosynthesis, *J Biol Chem*, 279 (2004) 50639-50642.
- [52] R.J. Xavier, D.K. Podolsky, Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Nature*, 448 (2007) 427-434.
- [53] M.T. Abreu, Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function, *Nat Rev Immunol*, 10 (2010) 131-144.
- [54] L.W. Peterson, D. Artis, Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis, *Nat Rev Immunol*, 14 (2014) 141-153.
- [55] A.K. Claes, N. Steck, D. Schultz, U. Zahringer, S. Lipinski, P. Rosenstiel, K. Geddes, D.J. Philpott, H. Heine, G.A. Grassl, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DeltamsbB triggers exacerbated inflammation in Nod2 deficient mice, *PLoS One*, 9 (2014) e113645.
- [56] M. Hausmann, S. Kiessling, S. Mestermann, G. Webb, T. Spottl, T. Andus, J. Scholmerich, H. Herfarth, K. Ray, W. Falk, G. Rogler, Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation, *Gastroenterology*, 122 (2002) 1987-2000.
- [57] D.N. Seril, J. Liao, G.Y. Yang, C.S. Yang, Oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models, *Carcinogenesis*, 24 (2003) 353-362.
- [58] M.B. Grisham, Role of reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease, *Current Opinion in Gastroenterology*, 9 (1993) 971-980.
- [59] T. Kitahora, K. Suzuki, H. Asakura, T. Yoshida, M. Suematsu, M. Watanabe, S. Aiso, M. Tsuchiya, Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease, *Dig Dis Sci*, 33 (1988) 951-955.
- [60] G. Aviello, U.G. Knaus, ROS in gastrointestinal inflammation: Rescue or Sabotage?, *Br J Pharmacol*, (2016).
- [61] T. Karrasch, C. Jobin, NF-kappaB and the intestine: friend or foe?, *Inflamm Bowel Dis*, 14 (2008) 114-124.
- [62] A. Geremia, D.P. Jewell, The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory bowel disease, *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 6 (2012) 223-237.

- [63] A. Franke, D.P. McGovern, J.C. Barrett, K. Wang, G.L. Radford-Smith, T. Ahmad, C.W. Lees, T. Balschun, J. Lee, R. Roberts, C.A. Anderson, J.C. Bis, S. Bumpstead, D. Ellinghaus, E.M. Festen, M. Georges, T. Green, T. Haritunians, L. Jostins, A. Latiano, C.G. Mathew, G.W. Montgomery, N.J. Prescott, S. Raychaudhuri, J.I. Rotter, P. Schumm, Y. Sharma, L.A. Simms, K.D. Taylor, D. Whiteman, C. Wijmenga, R.N. Baldassano, M. Barclay, T.M. Bayless, S. Brand, C. Buning, A. Cohen, J.F. Colombel, M. Cottone, L. Stronati, T. Denson, M. De Vos, R. D'Inca, M. Dubinsky, C. Edwards, T. Florin, D. Franchimont, R. Gearry, J. Glas, A. Van Gossum, S.L. Guthery, J. Halfvarson, H.W. Verspaget, J.P. Hugot, A. Karban, D. Laukens, I. Lawrance, M. Lemann, A. Levine, C. Libioulle, E. Louis, C. Mowat, W. Newman, J. Panes, A. Phillips, D.D. Proctor, M. Rugeiro, R. Russell, P. Rutgeerts, J. Sanderson, M. Sans, F. Seibold, A.H. Steinhardt, P.C. Stokkers, L. Torkvist, G. Kullak-Ublick, D. Wilson, T. Walters, S.R. Targan, S.R. Brant, J.D. Rioux, M. D'Amato, R.K. Weersma, S. Kugathasan, A.M. Griffiths, J.C. Mansfield, S. Vermeire, R.H. Duerr, M.S. Silverberg, J. Satsangi, S. Schreiber, J.H. Cho, V. Annese, H. Hakonarson, M.J. Daly, M. Parkes, Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci, *Nat Genet*, 42 (2010) 1118-1125.
- [64] M.A. Engel, M.F. Neurath, New pathophysiological insights and modern treatment of IBD, *J Gastroenterol*, 45 (2010) 571-583.
- [65] L.W. Collison, V. Chaturvedi, A.L. Henderson, P.R. Giacomini, C. Guy, J. Bankoti, D. Finkelstein, K. Forbes, C.J. Workman, S.A. Brown, J.E. Rehg, M.L. Jones, H.T. Ni, D. Artis, M.J. Turk, D.A. Vignali, IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population, *Nat Immunol*, 11 (2010) 1093-1101.
- [66] V. Vijayan, S. Mueller, E. Baumgart-Vogt, S. Immenschuh, Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract, *World J Gastroenterol*, 16 (2010) 3112-3119.
- [67] L. Zhang, Y. Zhang, W. Zhong, C. Di, X. Lin, Z. Xia, Heme oxygenase-1 ameliorates dextran sulfate sodium-induced acute murine colitis by regulating Th17/Treg cell balance, *J Biol Chem*, 289 (2014) 26847-26858.
- [68] T. Takagi, Y. Naito, K. Mizushima, Y. Hirai, A. Harusato, T. Okayama, K. Katada, K. Kamada, K. Uchiyama, O. Handa, T. Ishikawa, Y. Itoh, Heme oxygenase-1 prevents murine intestinal inflammation, *J Clin Biochem Nutr*, 63 (2018) 169-174.
- [69] D.G. Binion, G.A. West, E.E. Volk, J.A. Drazba, N.P. Ziats, R.E. Petras, C. Fiocchi, Acquired increase in leucocyte binding by intestinal microvascular endothelium in inflammatory bowel disease, *Lancet*, 352 (1998) 1742-1746.
- [70] C.A. de La Motte, V.C. Hascall, A. Calabro, B. Yen-Lieberman, S.A. Strong, Mononuclear leukocytes preferentially bind via CD44 to hyaluronan on human intestinal mucosal smooth muscle cells after virus infection or treatment with poly(I.C), *J Biol Chem*, 274 (1999) 30747-30755.
- [71] S. Kessler, H. Rho, G. West, C. Fiocchi, J. Drazba, C. de la Motte, Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation, *Clin Transl Sci*, 1 (2008) 57-61.
- [72] J. Webber, S. Meran, R. Steadman, A. Phillips, Hyaluronan orchestrates transforming growth factor-beta1-dependent maintenance of myofibroblast phenotype, *J Biol Chem*, 284 (2009) 9083-9092.

- [73] L.J. Reingold, A.S. Kimball, P. Schmierlin-Ren, S.R. Owens, E. Zimmermann, Intestinal Fibrosis and Wound Healing in Experimental Crohn's Disease: Effect of Pegylated Murinized Rabbit Anti-Mouse TNF, *Gastroenterology*, 144 (2013) S408-S408.
- [74] C.E. Hills, P.E. Squires, TGF-beta 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Therapeutic Intervention in Diabetic Nephropathy, *Am J Nephrol*, 31 (2010) 68-74.
- [75] M.V. Lenti, A. Di Sabatino, Intestinal fibrosis, *Molecular Aspects of Medicine*, 65 (2019) 100-109.
- [76] M. Shah, D.M. Foreman, M.W.J. Ferguson, Neutralizing Antibody to Tgf-Beta(1,2) Reduces Cutaneous Scarring in Adult Rodents, *Journal of Cell Science*, 107 (1994) 1137-1157.
- [77] M. Shah, D.M. Foreman, M.W.J. Ferguson, Neutralization of Tgf-Beta(1) and Tgf-Beta(2) or Exogenous Addition of Tgf-Beta(3) to Cutaneous Rat Wounds Reduces Scarring, *Journal of Cell Science*, 108 (1995) 985-1002.
- [78] S. O'Sullivan, J.F. Gilmer, C. Medina, Matrix Metalloproteinases in Inflammatory Bowel Disease: An Update, *Mediat Inflamm*, (2015).
- [79] R. Visse, H. Nagase, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - Structure, function, and biochemistry, *Circulation Research*, 92 (2003) 827-839.
- [80] Y. Naito, T. Yoshikawa, Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease, *Mol Aspects Med*, 26 (2005) 379-390.
- [81] J. Hu, P.E. Van den Steen, Q.X. Sang, G. Opdenakker, Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases, *Nat Rev Drug Discov*, 6 (2007) 480-498.
- [82] C. Medina, M.W. Radomski, Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318 (2006) 933-938.
- [83] G. Rogler, M. Hausmann, Factors Promoting Development of Fibrosis in Crohn's Disease, *Front Med-Lausanne*, 4 (2017).
- [84] A. Kofla-Dlubacz, M. Matusiewicz, M. Krzystek-Korpaczka, B. Iwanczak, Correlation of MMP-3 and MMP-9 with Crohn's Disease Activity in Children, *Digest Dis Sci*, 57 (2012) 706-712.
- [85] P. Nighot, R. Al-Sadi, M. Rawat, S.H. Guo, D.M. Watterson, T. Ma, Matrix metalloproteinase 9-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability contributes to the severity of experimental DSS colitis, *Am J Physiol-Gastr L*, 309 (2015) G988-G997.
- [86] H.C. Liu, N.R. Patel, L. Walter, S. Ingersoll, S.V. Sitaraman, P. Garg, Constitutive expression of MMP9 in intestinal epithelium worsens murine acute colitis and is associated with increased levels of proinflammatory cytokine Kc, *Am J Physiol-Gastr L*, 304 (2013) G793-G803.
- [87] L. Goffin, S. Fagagnini, A. Vicari, C. Mamie, H. Melhem, B. Weder, C. Lutz, M. Scharl, G. Rogler, Y. Chvatcheko, M. Hausmann, Anti-MMP-9 Antibody: A Promising Therapeutic Strategy for Treatment of Inflammatory Bowel Disease Complications with Fibrosis (vol 22, pg 2041, 2016), *Inflammatory Bowel Diseases*, 23 (2017) E25-E25.
- [88] F. Rieder, J. Brenmoehl, S. Leeb, J. Scholmerich, G. Rogler, Wound healing and fibrosis in intestinal disease, *Gut*, 56 (2007) 130-139.
- [89] M. Roulis, R.A. Flavell, Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease, *Differentiation*, (2016).
- [90] S.B. Hanauer, Inflammatory bowel disease, *N Engl J Med*, 334 (1996) 841-848.



- [91] W. Selby, Pathogenesis and therapeutic aspects of Crohn's disease, *Vet Microbiol*, 77 (2000) 505-511.
- [92] A. Sawczenko, B.K. Sandhu, Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland, *Arch Dis Child*, 88 (2003) 995-1000.
- [93] S.E. Lakhan, A. Kirchgessner, Neuroinflammation in inflammatory bowel disease, *J Neuroinflammation*, 7 (2010) 37.
- [94] A.L. Hart, S.C. Ng, Crohn's disease, *Medicine*, 39 (2011) 229-236.
- [95] R.S. Choung, F. Princen, T.P. Stockfisch, J. Torres, A.C. Maue, C.K. Porter, F. Leon, B. De Vroey, S. Singh, M.S. Riddle, J.A. Murray, J.F. Colombel, P.S. Team, Serologic microbial associated markers can predict Crohn's disease behaviour years before disease diagnosis, *Aliment Pharmacol Ther*, 43 (2016) 1300-1310.
- [96] J.Y. Xiang, Q. Ouyang, G.D. Li, N.P. Xiao, Clinical value of fecal calprotectin in determining disease activity of ulcerative colitis, *World J Gastroenterol*, 14 (2008) 53-57.
- [97] G. Fiorino, W. Fries, S.A. De La Rue, A.C. Malesci, A. Repici, S. Danese, New drug delivery systems in inflammatory bowel disease: MMX and tailored delivery to the gut, *Curr Med Chem*, 17 (2010) 1851-1857.
- [98] G.R. Lichtenstein, Budesonide Multi-matrix for the Treatment of Patients with Ulcerative Colitis, *Dig Dis Sci*, 61 (2016) 358-370.
- [99] A.K. Azad Khan, J. Piris, S.C. Truelove, An experiment to determine the active therapeutic moiety of sulphasalazine, *Lancet*, 2 (1977) 892-895.
- [100] L.J. Egan, W.J. Sandborn, Drug therapy of inflammatory bowel disease, *Drugs Today (Barc)*, 34 (1998) 431-446.
- [101] W. Guo, Y. Zhao, Z. Zhang, N. Tan, F. Zhao, C. Ge, L. Liang, D. Jia, T. Chen, M. Yao, J. Li, X. He, Disruption of xCT inhibits cell growth via the ROS/autophagy pathway in hepatocellular carcinoma, *Cancer Lett*, 312 (2011) 55-61.
- [102] P.M. Graham, J.Z. Li, X. Dou, H. Zhu, H.P. Misra, Z. Jia, Y. Li, Protection against peroxynitrite-induced DNA damage by mesalamine: implications for anti-inflammation and anti-cancer activity, *Mol Cell Biochem*, 378 (2013) 291-298.
- [103] P. Ispas-Szabo, M.M. Friciu, P. Nguyen, Y. Dumoulin, M.A. Mateescu, Novel self-assembled mesalamine-sucralfate complexes: preparation, characterization, and formulation aspects, *Drug Dev Ind Pharm*, 42 (2016) 1183-1193.
- [104] A. Otley, A.H. Steinhart, Budesonide for induction of remission in Crohn's disease, *Cochrane Database Syst Rev*, (2005) CD000296.
- [105] A. Rezaie, M.E. Kuenzig, E.I. Benchimol, A.M. Griffiths, A.R. Otley, A.H. Steinhart, G.G. Kaplan, C.H. Seow, Budesonide for induction of remission in Crohn's disease, *Cochrane Database Syst Rev*, (2015) CD000296.
- [106] S. Sahasranaman, D. Howard, S. Roy, Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines, *Eur J Clin Pharmacol*, 64 (2008) 753-767.
- [107] Y. Mazor, E. Koifman, H. Elkin, Y. Chowers, N. Krivoy, A. Karban, E. Efrati, Risk factors for serious adverse effects of thiopurines in patients with Crohn's disease, *Curr Drug Saf*, 8 (2013) 181-185.

- [108] A. Swaminath, R. Taunk, G. Lawlor, Use of methotrexate in inflammatory bowel disease in 2014: A User's Guide, *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 5 (2014) 113-121.
- [109] A. Levine, M. Kori, J. Kierkus, R. Sigall Boneh, M. Sladek, J.C. Escher, E. Wine, B. Yerushalmi, J. Amil Dias, R. Shaoul, G. Veereman Wauters, M. Boaz, G. Abitbol, A. Bousvaros, D. Turner, Azithromycin and metronidazole versus metronidazole-based therapy for the induction of remission in mild to moderate paediatric Crohn's disease : a randomised controlled trial, *Gut*, 68 (2019) 239-247.
- [110] C.N. Bernstein, Antibiotic use and the risk of Crohn's disease, *Gastroenterol Hepatol (N Y)*, 9 (2013) 393-395.
- [111] J.F. Machado, V. Oya, C.S. Coy, A.M. Morcillo, S.D. Severino, C. Wu, V.C. Sgarbieri, M.M. Vilela, Whey and soy protein supplements changes body composition in patients with Crohn's disease undergoing azathioprine and anti-TNF-alpha therapy, *Nutr Hosp*, 31 (2015) 1603-1610.
- [112] M.F. Neurath, I. Fuss, B.L. Kelsall, E. Stuber, W. Strober, Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice, *J Exp Med*, 182 (1995) 1281-1290.
- [113] T.M. Woodruff, T.V. Arumugam, I.A. Shiels, R.C. Reid, D.P. Fairlie, S.M. Taylor, A potent human C5a receptor antagonist protects against disease pathology in a rat model of inflammatory bowel disease, *J Immunol*, 171 (2003) 5514-5520.
- [114] G. Boschetti, S. Nancey, F. Sardi, X. Roblin, B. Flourie, D. Kaiserlian, Therapy with anti-TNFalpha antibody enhances number and function of Foxp3(+) regulatory T cells in inflammatory bowel diseases, *Inflamm Bowel Dis*, 17 (2011) 160-170.
- [115] A. Di Sabatino, S.L.F. Pender, C.L. Jackson, J.D. Prothero, J.N. Gordon, L. Picariello, L. Rovedatti, G. Docena, G. Monteleone, D.S. Rampton, F. Tonelli, G.R. Corazza, T.T. Macdonald, Functional modulation of crohn's disease myofibroblasts by anti-tumor necrosis factor antibodies, *Gastroenterology*, 133 (2007) 137-149.
- [116] N.H. Kim, D.I. Park, Y.S. Kim, C.S. Eun, J.M. Cha, S.N. Hong, B.I. Jang, J.W. Kim, D.H. Kim, H.W. Kang, C.H. Choi, E.S. Kim, J.P. Im, H. Yoon, Long-term efficacy and safety of CT-P13, a biosimilar of infliximab, in patients with inflammatory bowel disease: A retrospective multicenter study, *J Gastroen Hepatol*, 33 (2018) 479-479.
- [117] U. Wong, R.K. Cross, Expert opinion on interleukin-12/23 and interleukin-23 antagonists as potential therapeutic options for the treatment of inflammatory bowel disease, (2019).
- [118] S.B. Hanauer, B.G. Feagan, G.R. Lichtenstein, L.F. Mayer, S. Schreiber, J.F. Colombel, D. Rachmilewitz, D.C. Wolf, A. Olson, W. Bao, P. Rutgeerts, A.I.S. Group, Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial, *Lancet*, 359 (2002) 1541-1549.
- [119] J.F. Colombel, W.J. Sandborn, P. Rutgeerts, R. Enns, S.B. Hanauer, R. Panaccione, S. Schreiber, D. Byczkowski, J. Li, J.D. Kent, P.F. Pollack, Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial, *Gastroenterology*, 132 (2007) 52-65.
- [120] S. Schreiber, M. Khaliq-Kareemi, I.C. Lawrance, O.O. Thomsen, S.B. Hanauer, J. McColm, R. Bloomfield, W.J. Sandborn, P.S. Investigators, Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease, *N Engl J Med*, 357 (2007) 239-250.

- [121] K. Papamichael, G.J. Mantzaris, L. Peyrin-Biroulet, A safety assessment of anti-tumor necrosis factor alpha therapy for treatment of Crohn's disease, *Expert Opin Drug Saf*, 15 (2016) 493-501.
- [122] M. Saruta, K.A. Papadakis, Lymphocyte homing antagonists in the treatment of inflammatory bowel diseases, *Gastroenterol Clin North Am*, 43 (2014) 581-601.
- [123] M. Poulakos, J.D. Machin, J. Pauly, Y. Grace, Vedolizumab: A New Opponent in the Battle Against Crohn's Disease and Ulcerative Colitis, *J Pharm Pract*, (2015).
- [124] W.J. Sandborn, P. Rutgeerts, C. Gasink, D. Jacobstein, B. Zou, J. Johanns, B.E. Sands, S.B. Hanauer, S. Targan, S. Ghosh, W.J.S. de Villiers, J.F. Colombel, B.G. Feagan, Long-term efficacy and safety of ustekinumab for Crohn's disease through the second year of therapy, *Aliment Pharm Ther*, 48 (2018) 65-77.
- [125] Rachel Rebecca Barrett, L.S. Johnson, S. Singh, K.L.-. Barney, D.-T. Shih, P. Giblin, S. Brodeur, N. Nagaraja, COMPOUND TARGETING IL - 23A AND TNF - ALPHA AND USES THEREOF Patent No. : US 10 , 059 , 763 B, (2015).
- [126] L. Peyrin-Biroulet, S. Demarest, A. Nirula, Bispecific antibodies: The next generation of targeted inflammatory bowel disease therapies, *Autoimmun Rev*, 18 (2019) 123-128.
- [127] P.G. Kotze, A. Spinelli, J. Warusavitarne, F. Di Candido, K. Sahnan, S.O. Adegbola, S. Danese, Darvadstrocel for the treatment of patients with perianal fistulas in Crohn's disease, *Drugs Today (Barc)*, 55 (2019) 95-105.
- [128] J. Panes, D. Garcia-Olmo, G. Van Assche, J.F. Colombel, W. Reinisch, D.C. Baumgart, A. Dignass, M. Nachury, M. Ferrante, L. Kazemi-Shirazi, J.C. Grimaud, F. de la Portilla, E. Goldin, M.P. Richard, M.C. Diez, I. Tagarro, A. Leselbaum, S. Danese, A.C.S.G. Collaborat, Long-term Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy (Cx601) for Complex Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease, *Gastroenterology*, 154 (2018) 1334-+.
- [129] S. Uraz, G. Tahan, H. Aytakin, V. Tahan, N-acetylcysteine expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic acid-induced colitis in rats, *Scand J Clin Lab Invest*, 73 (2013) 61-66.
- [130] C. Romagnoli, T. Marcucci, L. Picariello, F. Tonelli, M.T. Vincenzini, T. Iantomasi, Role of N-acetylcysteine and GSH redox system on total and active MMP-2 in intestinal myofibroblasts of Crohn's disease patients, *Int J Colorectal Dis*, 28 (2013) 915-924.
- [131] M. Kolgazi, N. Jahovic, M. Yuksel, F. Ercan, I. Alican, Alpha-lipoic acid modulates gut inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats, *J Gastroenterol Hepatol*, 22 (2007) 1859-1865.
- [132] M.S. Baliga, N. Joseph, M.V. Venkataranganna, A. Saxena, V. Ponemone, R. Fayad, Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations, *Food Funct*, 3 (2012) 1109-1117.
- [133] E.A. Al-Suhaimi, N.A. Al-Riziza, R.A. Al-Essa, Physiological and therapeutical roles of ginger and turmeric on endocrine functions, *Am J Chin Med*, 39 (2011) 215-231.
- [134] J.K. Triantafyllidis, A. Triantafyllidi, C. Vagianos, A. Papalois, Favorable results from the use of herbal and plant products in inflammatory bowel disease: evidence from experimental animal studies, *Annals of gastroenterology : quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 29 (2016) 268-281.

- [135] C.L. Hofstra, P.J. Desai, R.L. Thurmond, W.P. Fung-Leung, Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells, *J Pharmacol Exp Ther*, 305 (2003) 1212-1221.
- [136] R.L. Thurmond, P.J. Desai, P.J. Dunford, W.P. Fung-Leung, C.L. Hofstra, W. Jiang, S. Nguyen, J.P. Riley, S. Sun, K.N. Williams, J.P. Edwards, L. Karlsson, A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties, *J Pharmacol Exp Ther*, 309 (2004) 404-413.
- [137] B. Schirmer, T. Rezniczek, R. Seifert, D. Neumann, Proinflammatory role of the histamine H4 receptor in dextrane sodium sulfate-induced acute colitis, *Biochem Pharmacol*, 98 (2015) 102-109.
- [138] C.D. Funk, Leukotriene modifiers as potential therapeutics for cardiovascular disease, *Nat Rev Drug Discov*, 4 (2005) 664-672.
- [139] O. Werz, D. Steinhilber, Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors, *Pharmacol Ther*, 112 (2006) 701-718.
- [140] N.L. Rao, P.J. Dunford, X. Xue, X. Jiang, K.A. Lundeen, F. Coles, J.P. Riley, K.N. Williams, C.A. Grice, J.P. Edwards, L. Karlsson, A.M. Fourie, Anti-inflammatory activity of a potent, selective leukotriene A4 hydrolase inhibitor in comparison with the 5-lipoxygenase inhibitor zileuton, *J Pharmacol Exp Ther*, 321 (2007) 1154-1160.
- [141] A. de Buck van Overstraeten, A. Wolthuis, A. D'Hoore, Surgery for Crohn's disease in the era of biologicals: a reduced need or delayed verdict?, *World J Gastroenterol*, 18 (2012) 3828-3832.
- [142] U. Navaneethan, V. Lourdasamy, B. Njei, B. Shen, Endoscopic balloon dilation in the management of strictures in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of non-randomized trials, *Surg Endosc*, (2016).
- [143] P. Giuffrida, M. Pinzani, G.R. Corazza, A. Di Sabatino, Biomarkers of intestinal fibrosis - one step towards clinical trials for stricturing inflammatory bowel disease, *United European Gastroenterol J*, 4 (2016) 523-530.
- [144] R.H. Waterston, K. Lindblad-Toh, E. Birney, J. Rogers, J.F. Abril, P. Agarwal, R. Agarwala, R. Ainscough, M. Alexandersson, P. An, S.E. Antonarakis, J. Attwood, R. Baertsch, J. Bailey, K. Barlow, S. Beck, E. Berry, B. Birren, T. Bloom, P. Bork, M. Botcherby, N. Bray, M.R. Brent, D.G. Brown, S.D. Brown, C. Bult, J. Burton, J. Butler, R.D. Campbell, P. Carninci, S. Cawley, F. Chiaromonte, A.T. Chinwalla, D.M. Church, M. Clamp, C. Clee, F.S. Collins, L.L. Cook, R.R. Copley, A. Coulson, O. Couronne, J. Cuff, V. Curwen, T. Cutts, M. Daly, R. David, J. Davies, K.D. Delehaunty, J. Deri, E.T. Dermitzakis, C. Dewey, N.J. Dickens, M. Diekhans, S. Dodge, I. Dubchak, D.M. Dunn, S.R. Eddy, L. Elnitski, R.D. Emes, P. Eswara, E. Eyas, A. Felsenfeld, G.A. Fewell, P. Flicek, K. Foley, W.N. Frankel, L.A. Fulton, R.S. Fulton, T.S. Furey, D. Gage, R.A. Gibbs, G. Glusman, S. Gnerre, N. Goldman, L. Goodstadt, D. Grafham, T.A. Graves, E.D. Green, S. Gregory, R. Guigo, M. Guyer, R.C. Hardison, D. Haussler, Y. Hayashizaki, L.W. Hillier, A. Hinrichs, W. Hlavina, T. Holzer, F. Hsu, A. Hua, T. Hubbard, A. Hunt, I. Jackson, D.B. Jaffe, L.S. Johnson, M. Jones, T.A. Jones, A. Joy, M. Kamal, E.K. Karlsson, D. Karolchik, A. Kasprzyk, J. Kawai, E. Keibler, C. Kells, W.J. Kent, A. Kirby, D.L. Kolbe, I. Korf, R.S. Kucherlapati, E.J. Kulbokas, D. Kulp, T. Landers, J.P. Leger, S. Leonard, I. Letunic, R. Levine, J. Li, M. Li, C. Lloyd, S. Lucas, B. Ma, D.R. Maglott, E.R. Mardis, L. Matthews, E. Mauceli, J.H. Mayer, M. McCarthy, W.R. McCombie, S. McLaren, K. McLay, J.D. McPherson, J. Meldrim, B. Meredith, J.P. Mesirov, W. Miller, T.L. Miner, E. Mongin, K.T. Montgomery, M. Morgan, R. Mott, J.C. Mullikin, D.M. Muzny, W.E. Nash, J.O. Nelson, M.N. Nhan, R. Nicol, Z. Ning, C. Nusbaum, M.J. O'Connor, Y. Okazaki, K. Oliver, E.O. Larty, L. Pachter, G. Parra, K.H. Pepin, J. Peterson, P. Pevzner,

R. Plumb, C.S. Pohl, A. Poliakov, T.C. Ponce, C.P. Ponting, S. Potter, M. Quail, A. Reymond, B.A. Roe, K.M. Roskin, E.M. Rubin, A.G. Rust, R. Santos, V. Sapojnikov, B. Schultz, J. Schultz, M.S. Schwartz, S. Schwartz, C. Scott, S. Seaman, S. Searle, T. Sharpe, A. Sheridan, R. Shownkeen, S. Sims, J.B. Singer, G. Slater, A. Smit, D.R. Smith, B. Spencer, A. Stabenau, N.S. Strange-Thomann, C. Sugnet, M. Suyama, G. Tesler, J. Thompson, D. Torrents, E. Trevaskis, J. Tromp, C. Ucla, A.U. Vidal, J.P. Vinson, A.C. von Niederhausern, C.M. Wade, M. Wall, R.J. Weber, R.B. Weiss, M.C. Wendl, A.P. West, K. Wetterstrand, R. Wheeler, S. Whelan, J. Wierzbowski, D. Willey, S. Williams, R.K. Wilson, E. Winter, K.C. Worley, D. Wyman, S. Yang, S.P. Yang, E.M. Zdobnov, M.C. Zody, E.S. Lander, M.G.S. Consor, Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, *Nature*, 420 (2002) 520-562.

[145] R.S. Blumberg, L.J. Saubermann, W. Strober, Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease, *Curr Opin Immunol*, 11 (1999) 648-656.

[146] S. Prattis, A. Jurjus, Spontaneous and transgenic rodent models of inflammatory bowel disease, *Lab Anim Res*, 31 (2015) 47-68.

[147] A. Mizoguchi, Animal Models of Inflammatory Bowel Disease, *Prog Mol Biol Transl*, 105 (2012) 263-320.

[148] S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann, M.F. Neurath, Chemically induced mouse models of intestinal inflammation, *Nat Protoc*, 2 (2007) 541-546.

[149] M. Kawada, A. Arihiro, E. Mizoguchi, Insights from advances in research of chemically induced experimental models of human inflammatory bowel disease, *World J Gastroentero*, 13 (2007) 5581-5593.

[150] D.A. Sussman, R. Santaolalla, S. Strobel, R. Dheer, M.T. Abreu, Cancer in inflammatory bowel disease: lessons from animal models, *Current Opinion in Gastroenterology*, 28 (2012) 327-333.

[151] J.Z. Chen, X.F. Huang, The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications, *Cancer Biol Ther*, 8 (2009) 1313-1317.

[152] M. Boirivant, I.J. Fuss, A. Chu, W. Strober, Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4, *Journal of Experimental Medicine*, 188 (1998) 1929-1939.

[153] M. Neurath, I. Fuss, W. Strober, TNBS-colitis, *Int Rev Immunol*, 19 (2000) 51-62.

[154] S. Wirtz, M.F. Neurath, Mouse models of inflammatory bowel disease, *Adv Drug Deliv Rev*, 59 (2007) 1073-1083.

[155] G.P. Morris, P.L. Beck, M.S. Herridge, W.T. Depew, M.R. Szewczuk, J.L. Wallace, Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon, *Gastroenterology*, 96 (1989) 795-803.

[156] M.F. Neurath, I. Fuss, B.L. Kelsall, D.H. Presky, W. Waegell, W. Strober, Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance, *J Exp Med*, 183 (1996) 2605-2616.

[157] A.A. te Velde, M.I. Verstege, D.W. Hommes, Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis, *Inflamm Bowel Dis*, 12 (2006) 995-999.

[158] I.C. Lawrance, F. Wu, A.Z. Leite, J. Willis, G.A. West, C. Fiocchi, S. Chakravarti, A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B, *Gastroenterology*, 125 (2003) 1750-1761.

- [159] S. Fichtner-Feigl, I.J. Fuss, C.A. Young, T. Watanabe, E.K. Geissler, H.J. Schlitt, A. Kitani, W. Strober, Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis, *J Immunol*, 178 (2007) 5859-5870.
- [160] Z. Zhang, M. Zheng, J. Bindas, P. Schwarzenberger, J.K. Kolls, Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis, *Inflamm Bowel Dis*, 12 (2006) 382-388.
- [161] L.R. Fitzpatrick, K. Meirelles, J.S. Small, F.J. Puleo, W.A. Koltun, R.N. Cooney, A new model of chronic hapten-induced colitis in young rats, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 50 (2010) 240-250.
- [162] P. Talapka, L.I. Nagy, A. Pal, M.Z. Poles, A. Berko, M. Bagyanszki, L.G. Puskas, E. Fekete, N. Bodi, Alleviated mucosal and neuronal damage in a rat model of Crohn's disease, *World J Gastroenterol*, 20 (2014) 16690-16697.
- [163] E. Fekete, I. Benedeczky, J.P. Timmermans, B.A. Resch, D.W. Scheuermann, Sequential pattern of nerve-muscle contacts in the small intestine of developing human fetus. An ultrastructural and immunohistochemical study, *Histology and Histopathology*, 11 (1996) 845-850.
- [164] N. Bodi, P. Talapka, M.Z. Poles, E. Hermes, Z. Jancso, Z. Katarova, F. Izbeki, T. Wittmann, E. Fekete, M. Bagyanszki, Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus, *Microcirculation*, 19 (2012) 316-326.
- [165] C. Varga, K. Horvath, A. Berko, R.L. Thurmond, P.J. Dunford, B.J. Whittle, Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat, *Eur J Pharmacol*, 522 (2005) 130-138.
- [166] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72 (1976) 248-254.
- [167] P. Talapka, A. Berko, L.I. Nagy, L. Chandrakumar, M. Bagyanszki, L.G. Puskas, E. Fekete, N. Bodi, Structural and molecular features of intestinal strictures in rats with Crohn's-like disease, *World J Gastroenterol*, 22 (2016) 5154-5164.
- [168] K. Horvath, C. Varga, A. Berko, A. Posa, F. Laszlo, B.J. Whittle, The involvement of heme oxygenase-1 activity in the therapeutic actions of 5-aminosalicylic acid in rat colitis, *Eur J Pharmacol*, 581 (2008) 315-323.
- [169] A. Posa, R. Szabo, K. Kupai, Z. Barath, Z. Szalai, A. Csonka, M. Veszeka, M. Gyongyosi, Z. Radak, R. Menesi, I. Pavo, A.M. Berko, C. Varga, Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2, *Oxid Med Cell Longev*, 2015 (2015) 876805.
- [170] N.K. Boughton-Smith, J.L. Wallace, G.P. Morris, B.J. Whittle, The effect of anti-inflammatory drugs on eicosanoid formation in a chronic model of inflammatory bowel disease in the rat, *Br J Pharmacol*, 94 (1988) 65-72.
- [171] B.J. Whittle, C. Varga, A. Berko, K. Horvath, A. Posa, J.P. Riley, K.A. Lundeen, A.M. Fourie, P.J. Dunford, Attenuation of inflammation and cytokine production in rat colitis by a novel selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase, *Br J Pharmacol*, 153 (2008) 983-991.
- [172] N.K. Boughton-Smith, S.M. Evans, C.J. Hawkey, A.T. Cole, M. Balsitis, B.J. Whittle, S. Moncada, Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease, *Lancet*, 342 (1993) 338-340.
- [173] J. Kiss, D. Lamarque, J.C. Delchier, B.J. Whittle, Time-dependent actions of nitric oxide synthase inhibition on colonic inflammation induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats, *Eur J Pharmacol*, 336 (1997) 219-224.

- [174] T. Ten Hove, A. Corbaz, H. Amitai, S. Aloni, I. Belzer, P. Graber, P. Drillenburger, S.J. van Deventer, Y. Chvatchko, A.A. Te Velde, Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice, *Gastroenterology*, 121 (2001) 1372-1379.
- [175] E. Gounaris, M.J. Heiferman, J.R. Heiferman, M. Shrivastav, D. Vitello, N.R. Blatner, L.M. Knab, J.D. Phillips, E.C. Cheon, P.J. Grippo, K. Khazaie, H.G. Munshi, D.J. Bentrem, Zileuton, 5-Lipoxygenase Inhibitor, Acts as a Chemopreventive Agent in Intestinal Polyposis, by Modulating Polyp and Systemic Inflammation, *Plos One*, 10 (2015).
- [176] J.A. Jablonowski, C.A. Grice, W. Chai, C.A. Dvorak, J.D. Venable, A.K. Kwok, K.S. Ly, J. Wei, S.M. Baker, P.J. Desai, W. Jiang, S.J. Wilson, R.L. Thurmond, L. Karlsson, J.P. Edwards, T.W. Lovenberg, N.I. Carruthers, The first potent and selective non-imidazole human histamine H4 receptor antagonists, *J Med Chem*, 46 (2003) 3957-3960.
- [177] P. Talapka, L.I. Nagy, A. Pal, M.Z. Poles, A. Berko, M. Bagyanszki, L.G. Puskas, E. Fekete, N. Bodi, Alleviated mucosal and neuronal damage in a rat model of Crohn's disease, *World J Gastroenterol*, 20 (2014) 16690-16697.
- [178] L.R. Lopetuso, V. Petito, D. Zambrano, D. Orlando, A. Dal Lago, L. Serrichio, A. Papa, A. Gasbarrini, F. Scaldaferri, Gut Microbiota: A Key Modulator of Intestinal Healing in Inflammatory Bowel Disease, *Digest Dis*, 34 (2016) 202-209.
- [179] H. Matthes, H. Herbst, D. Schuppan, A. Stallmach, S. Milani, H. Stein, E.O. Riecken, Cellular localization of procollagen gene transcripts in inflammatory bowel diseases, *Gastroenterology*, 102 (1992) 431-442.
- [180] M.F. Graham, Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-an update, *Inflamm Bowel Dis*, 1 (1995) 220-227.
- [181] M.D. Baugh, M.J. Perry, A.P. Hollander, D.R. Davies, S.S. Cross, A.J. Lobo, C.J. Taylor, G.S. Evans, Matrix metalloproteinase levels are elevated in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 117 (1999) 814-822.
- [182] B. von Lampe, B. Barthel, S.E. Coupland, E.O. Riecken, S. Rosewicz, Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease, *Gut*, 47 (2000) 63-73.
- [183] R.B. Heuschkel, T.T. MacDonald, G. Monteleone, M. Bajaj-Elliott, J.A. Smith, S.L. Pender, Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease, *Gut*, 47 (2000) 57-62.
- [184] C. Medina, A. Santana, M.C. Paz, F. Diaz-Gonzalez, E. Farre, A. Salas, M.W. Radomski, E. Quintero, Matrix metalloproteinase-9 modulates intestinal injury in rats with transmural colitis, *J Leukoc Biol*, 79 (2006) 954-962.
- [185] B.A. Moore, C.L. Manthey, D.L. Johnson, A.J. Bauer, Matrix metalloproteinase-9 inhibition reduces inflammation and improves motility in murine models of postoperative ileus, *Gastroenterology*, 141 (2011) 1283-1292, 1292 e1281-1284.
- [186] L. Kruidenier, I. Kuiper, W. van Duijn, M.A.C. Mieremet-Ooms, R.A. van Hogezaand, C.B.H.W. Lamers, H.W. Verspaget, Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease, *J Pathol*, 201 (2003) 17-27.
- [187] L. Herszényi, Proteolyticus enzimrendszerek és sejtkenetikai paraméterek vizsgálata emésztőszervi betegségekben, (2008) 149.

- [188] Q. Gao, M.J. Meijer, F.J. Kubben, C.F. Sier, L. Kruidenier, W. van Duijn, M. van den Berg, R.A. van Hogezaand, C.B. Lamers, H.W. Verspaget, Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 in intestinal tissue of patients with inflammatory bowel diseases, *Dig Liver Dis*, 37 (2005) 584-592.
- [189] C. Becker-Pauly, S. Rose-John, TNF $\alpha$  cleavage beyond TACE/ADAM17: matrix metalloproteinase 13 is a potential therapeutic target in sepsis and colitis, *EMBO molecular medicine*, 5 (2013) 902-904.
- [190] W.J. Sandborn, B.R. Bhandari, C. Randall, Z.H. Younes, T. Romanczyk, Y. Xin, E. Wendt, H. Chai, M. McKeivitt, S. Zhao, J.S. Sundy, S. Keshav, S. Daneseh, Andecaliximab [Anti-matrix Metalloproteinase-9] Induction Therapy for Ulcerative Colitis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2/ 3 Study in Patients With Moderate to Severe Disease, *Journal of Crohns & Colitis*, 12 (2018) 1021-1029.
- [191] C.J. Bailey, R.M. Hembry, A. Alexander, M.H. Irving, M.E. Grant, C.A. Shuttleworth, Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine, *J Clin Pathol*, 47 (1994) 113-116.
- [192] Y. Yamada, S. Marshall, R.D. Specian, M.B. Grisham, A comparative analysis of two models of colitis in rats, *Gastroenterology*, 102 (1992) 1524-1534.
- [193] P. Hoffmann, J.M. Zeeh, J. Lakshmanan, V.S. Wu, F. Procaccino, M. Reinshagen, J.A. McRoberts, V.E. Eysselein, Increased expression of transforming growth factor alpha precursors in acute experimental colitis in rats, *Gut*, 41 (1997) 195-202.
- [194] M.I. Torres, M. Garcia-Martin, M.I. Fernandez, N. Nieto, A. Gil, A. Rios, Experimental colitis induced by trinitrobenzenesulfonic acid: an ultrastructural and histochemical study, *Dig Dis Sci*, 44 (1999) 2523-2529.
- [195] B.J. Whittle, M. Cavicchi, D. Lamarque, Assessment of anticolitic drugs in the trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) rat model of inflammatory bowel disease, *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 225 (2003) 209-222.
- [196] N.K. Boughton-Smith, J.L. Wallace, B.J.R. Whittle, Relationship between arachidonic acid metabolism, myeloperoxidase activity and leukocyte infiltration in a rat model of inflammatory bowel disease.
- [197] Varga Cs, Cavicchi M, Lamarque D, Delchier JC, W. BJ, Rapid induction of the antioxidant, heme oxygenase-1 (HO-1) in human intestinal epithelial cells: Interaction with glutathione levels. , *GASTROENTEROLOGY*, 120 (2001).
- [198] Varga Cs, Cavicchi M, Orsi A, Lamarque D, Delchier JC, Rees D, W. BJ, Beneficial effect of P54, a novel curcumin preparation in TNBS-induced colitis in rats *GASTROENTEROLOGY*, 120 (2001).
- [199] C. Varga, F. Laszlo, P. Fritz, M. Cavicchi, D. Lamarque, K. Horvath, A. Posa, A. Berko, B.J.R. Whittle, Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat, *European Journal of Pharmacology*, 561 (2007) 164-171.
- [200] P.J. Dunford, C. Varga, R.L. Thurmond, B.J. Whittle, Histamine H4 receptor antagonism attenuates toll-like receptor signaling and inhibits experimental colitis in the rat, *Gastroenterology*, 130 (2006) A689-A689.
- [201] B. Hogan li Reed, Product And Method For Treating Diarrhea, MAREGADE RX LLC, US, 2018.



- [202] M. Bacani Genesis, W. Chai, P. Edwards James, C. Smith Russell, S. Tichenor Mark, D. Venable Jennifer, J. Wei, 2,4-diaminopyrimidine Derivatives As Histamine H4 Modulators, JANSSEN PHARMACEUTICA NV, WO, 2018.
- [203] B. Hogan li Reed, Product And Method For Treating Diarrhea, MAREGADE RX LLC, US, 2017.
- [204] M. Conza, B. Hickey Magali, S. Horns, S. Lochner, Benzoimidazol-2-yl Pyrimidine Modulators Of The Histamine H4 Receptor, JANSSEN PHARMACEUTICA NV, US, 2017.
- [205] H.U.I. Cai, F. Chavez, J. Dunford Paul, J. Greenspan Andrew, P. Meduna Steven, A. Quiroz Jorge, M. Savall Brad, L. Tays Kevin, L. Thurmond Robin, J. Wei, L. Wolin Ronald, X. Zhang, Diamino-pyridine, Pyrimidine, And Pyridazine Modulators Of The Histamine H4 Receptor, JANSSEN PHARMACEUTICA NV, US, 2017.
- [206] P. Edwards James, E. Kindrachuk David, M. Mapes Christopher, J. Pippel Daniel, D. Venable Jennifer, Benzoimidazol-2-yl Pyrimidines And Pyrazines As Modulators Of The Histamine H4 Receptor, JANSSEN PHARMACEUTICA NV, US, 2016.
- [207] M. Conza, B. Hickey Magali, S. Horns, S. Lochner, Benzoimidazol-2-yl Pyrimidine Modulators Of The Histamine H4 Receptor, JANSSEN PHARMACEUTICA NV, US, 2016.
- [208] I. Berrebi-Bertrand, X. Billot, T. Calmels, M. Capet, S. Krief, O. Labeeuw, J.-M. Lecomte, N. Levoine, X. Ligneau, P. Robert, J.-C. Schwartz, 6,11-dihydro-5h-benzo[d]imidazo[1,2-a]Azepines Derivatives As Histamine H4 Receptor Ligands, US, 2016.
- [209] L. Thurmond Robin, A. Wadsworth Scott, Use Of Histamine H4 Antagonist For The Treatment Of Post-operative Adhesions, JANSSEN PHARMACEUTICA NV, EP, 2015.
- [210] P. Edwards James, K. Neff Danielle, M. Smith Deborah, D. Venable Jennifer, Thieno- And Furo-pyrimidine Modulators Of The Histamine H4 Receptor, EDWARDS JAMES P, NEFF DANIELLE K, SMITH DEBORAH M, VENABLE JENNIFER D, JANSSEN PHARMACEUTICA NV, US, 2015.
- [211] P. Edwards James, E. Kindrachuk David, M. Mapes Christopher, J. Pippel Daniel, D. Venable Jennifer, Benzoimidazol-2-yl Pyrimidines And Pyrazines As Modulators Of The Histamine H4 Receptor, JANSSEN PHARMACEUTICA NV, US, 2015.
- [212] X. Guo, W.P. Wang, J.K. Ko, C.H. Cho, Involvement of neutrophils and free radicals in the potentiating effects of passive cigarette smoking on inflammatory bowel disease in rats, *Gastroenterology*, 117 (1999) 884-892.
- [213] F.F. Sun, P.S. Lai, G. Yue, K. Yin, R.G. Nagele, D.M. Tong, R.F. Krzesicki, J.E. Chin, P.Y. Wong, Pattern of cytokine and adhesion molecule mRNA in hapten-induced relapsing colon inflammation in the rat, *Inflammation*, 25 (2001) 33-45.
- [214] Y. Raab, B. Gerdin, S. Ahlstedt, R. Hallgren, Neutrophil mucosal involvement is accompanied by enhanced local production of interleukin-8 in ulcerative colitis, *Gut*, 34 (1993) 1203-1206.
- [215] G. Kristjansson, P. Venge, A. Wanders, L. Loof, R. Hallgren, Clinical and subclinical intestinal inflammation assessed by the mucosal patch technique: studies of mucosal neutrophil and eosinophil activation in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome, *Gut*, 53 (2004) 1806-1812.
- [216] G.C. Hsieh, P. Chandran, A.K. Salyers, M. Pai, C.Z. Zhu, E.J. Wensink, D.G. Witte, T.R. Miller, J.P. Mikusa, S.J. Baker, J.M. Wetter, K.C. Marsh, A.A. Hancock, M.D. Cowart, T.A. Esbenshade, J.D. Brioni, P. Honore, H4 receptor antagonism exhibits anti-nociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain models in rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 95 (2010) 41-50.

- [217] M.D. Sanna, L. Lucarini, M. Durante, C. Ghelardini, E. Masini, N. Galeotti, Histamine H-4 receptor agonist-induced relief from painful peripheral neuropathy is mediated by inhibition of spinal neuroinflammation and oxidative stress, *Brit J Pharmacol*, 174 (2017) 28-40.
- [218] S.C. Bischoff, J. Wedemeyer, A. Herrmann, P.N. Meier, C. Trautwein, Y. Cetin, H. Maschek, M. Stolte, M. Gebel, M.P. Manns, Quantitative assessment of intestinal eosinophils and mast cells in inflammatory bowel disease, *Histopathology*, 28 (1996) 1-13.
- [219] X. Xu, S. Weksler-Zangen, A. Pikarsky, O. Pappo, D. Wengrower, S.C. Bischoff, M. Pines, A. Rivkind, E. Goldin, F. Levi-Schaffer, Mast cells involvement in the inflammation and fibrosis development of the TNBS-induced rat model of colitis, *Scand J Gastroenterol*, 37 (2002) 330-337.
- [220] J. Stein, J. Ries, K.E. Barrett, Disruption of intestinal barrier function associated with experimental colitis: possible role of mast cells, *Am J Physiol*, 274 (1998) G203-209.
- [221] F. Barreau, L. Ferrier, J. Fioramonti, L. Bueno, Neonatal maternal deprivation triggers long term alterations in colonic epithelial barrier and mucosal immunity in rats, *Gut*, 53 (2004) 501-506.
- [222] J.L. Wallace, W.K. MacNaughton, G.P. Morris, P.L. Beck, Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 96 (1989) 29-36.
- [223] D. Rachmilewitz, P.L. Simon, L.W. Schwartz, D.E. Griswold, J.D. Fondacaro, M.A. Wasserman, Inflammatory mediators of experimental colitis in rats, *Gastroenterology*, 97 (1989) 326-337.
- [224] S.C. Bischoff, A. Lorentz, S. Schwengberg, G. Weier, R. Raab, M.P. Manns, Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue, *Gut*, 44 (1999) 643-652.
- [225] Y. Raab, K. Fredens, B. Gerdin, R. Hallgren, Eosinophil activation in ulcerative colitis: studies on mucosal release and localization of eosinophil granule constituents, *Dig Dis Sci*, 43 (1998) 1061-1070.
- [226] S.P. Hogan, M.E. Rothenberg, Review article: The eosinophil as a therapeutic target in gastrointestinal disease.
- [227] M. Lampinen, M. Carlson, P. Sangfelt, Y. Taha, M. Thorn, L. Loof, Y. Raab, P. Venge, IL-5 and TNF-alpha participate in recruitment of eosinophils to intestinal mucosa in ulcerative colitis, *Dig Dis Sci*, 46 (2001) 2004-2009.
- [228] M. Lampinen, M. Carlson, L.D. Hakansson, P. Venge, Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease, *Allergy*, 59 (2004) 793-805.
- [229] W.P. Fung-Leung, R.L. Thurmond, P. Ling, L. Karlsson, Histamine H4 receptor antagonists: The new antihistamines?
- [230] M. Sarfati, K. Wakahara, L. Chapuy, G. Delespesse, Mutual Interaction of Basophils and T Cells in Chronic Inflammatory Diseases, *Front Immunol*, 6 (2015) 399.
- [231] C.K. Ameho, A.A. Adjei, E.K. Harrison, K. Takeshita, T. Morioka, Y. Arakaki, E. Ito, I. Suzuki, A.D. Kulkarni, A. Kawajiri, S. Yamamoto, Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis, *Gut*, 41 (1997) 487-493.
- [232] J.L. Wallace, C.M. Keenan, An orally active inhibitor of leukotriene synthesis accelerates healing in a rat model of colitis, *Am J Physiol*, 258 (1990) G527-534.

- [233] B. Zingarelli, F. Squadrito, P. Graziani, R. Camerini, A.P. Caputi, Effects of zileuton, a new 5-lipoxygenase inhibitor, in experimentally induced colitis in rats, *Agents Actions*, 39 (1993) 150-156.
- [234] R. Holma, P. Salmenpera, A. Riutta, I. Virtanen, R. Korpela, H. Vapaatalo, Acute effects of the cys-leukotriene-1 receptor antagonist, montelukast, on experimental colitis in rats, *Eur J Pharmacol*, 429 (2001) 309-318.
- [235] D. Camuesco, M. Comalada, M.E. Rodriguez-Cabezas, A. Nieto, M.D. Lorente, A. Concha, A. Zarzuelo, J. Galvez, The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression, *Br J Pharmacol*, 143 (2004) 908-918.
- [236] R. Gonzalez, F.S. de Medina, O. Martinez-Augustin, A. Nieto, J. Galvez, S. Risco, A. Zarzuelo, Anti-inflammatory effect of diosmectite in hapten-induced colitis in the rat, *Br J Pharmacol*, 141 (2004) 951-960.
- [237] W.P. Beierschmitt, J.D. McNeish, R.J. Griffiths, A. Nagahisa, M. Nakane, D.E. Amacher, Induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by inhibitors of 5-lipoxygenase (5-LO): studies in rats and 5-LO knockout mice, *Toxicol Sci*, 63 (2001) 15-21.
- [238] C.J. Hawkey, L.M. Dube, L.V. Rountree, P.J. Linnen, J.F. Lancaster, A trial of zileuton versus mesalazine or placebo in the maintenance of remission of ulcerative colitis. The European Zileuton Study Group For Ulcerative Colitis, *Gastroenterology*, 112 (1997) 718-724.
- [239] N. Chiang, C.N. Serhan, S.E. Dahlen, J.M. Drazen, D.W. Hay, G.E. Rovati, T. Shimizu, T. Yokomizo, C. Brink, The lipoxin receptor ALX: potent ligand-specific and stereoselective actions in vivo, *Pharmacol Rev*, 58 (2006) 463-487.
- [240] A.T. Gewirtz, L.S. Collier-Hyams, A.N. Young, T. Kucharzik, W.J. Guilford, J.F. Parkinson, I.R. Williams, A.S. Neish, J.L. Madara, Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis, *J Immunol*, 168 (2002) 5260-5267.
- [241] S. Fiorucci, J.L. Wallace, A. Mencarelli, E. Distrutti, G. Rizzo, S. Farneti, A. Morelli, J.L. Tseng, B. Suramanyam, W.J. Guilford, J.F. Parkinson, A beta-oxidation-resistant lipoxin A4 analog treats hapten-induced colitis by attenuating inflammation and immune dysfunction, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (2004) 15736-15741.
- [242] Q. Xiao, N. Dong, X. Yao, D. Wu, Y. Lu, F. Mao, J. Zhu, J. Li, J. Huang, A. Chen, L. Huang, X. Wang, G. Yang, G. He, Y. Xu, W. Lu, Bufexamac ameliorates LPS-induced acute lung injury in mice by targeting LTA4H, *Sci Rep*, 6 (2016) 25298.
- [243] P. Rutgeerts, G. Van Assche, S. Vermeire, Review article: Infliximab therapy for inflammatory bowel disease--seven years on, *Aliment Pharmacol Ther*, 23 (2006) 451-463.
- [244] H. Ito, Novel therapy for Crohn's disease targeting IL-6 signalling, *Expert Opin Ther Targets*, 8 (2004) 287-294.

# 10. Tartalmi összefoglaló

## Bevezetés

A gyulladássos bélbetegségek (inflammatory bowel diseases-IBDs) - aktív és nyugalmi szakaszok váltakozásával- az emésztőszervrendszer bármely területét érinthetik. A betegség kialakulásában számos környezeti és genetikai tényező vesz részt, valamint több egymásra ható molekuláris és immunvédelmi mechanizmus játszik szerepet. Főbb csoportjai a Crohn-betegség (CD), amely a gyomor-bélcsatorna bármely szakaszán előforduló, a bélfal minden szövettani réteget érintő krónikus gyulladás, ami az ileum disztális részén és a colonban jelentkezik leggyakrabban, valamint a colitis ulcerosa (CU), ahol a krónikus gyulladás összefüggő, a mucosa, felületesen a submucosa területét érinti, és a colonra lokalizálódik.

A tüneti kezelésekre számos gyógyszer típus alkalmazható: ilyen gyógyszer csoportok a *szalicilsav származékok*, melyek hatásukat helyileg, közvetlenül a nyálkahártyán fejtik ki. A *glükokortikoszteroidokat* súlyos esetekben alkalmazzák, mellékhatásai azonban nem elhanyagolhatók. Lokálisan alkalmazva hasonlóan hatékonyak, mint a szalicilsav származékok. Az *immunszuppresszív, immunmodulációs szerek* a szteroid rezisztencia esetén alkalmazandók. Az *antibiotikumok* antibakteriális hatásukat kifejtve csökkentik a betegség újbóli kialakulását. Az eddig alkalmazott *biológiai hatóanyagok* a gyulladáskeltő citokineket gátolják, növelik a regulátor T sejtek számát, ezáltal csökken a fekélyes területek nagysága, valamint a gyulladás mértéke. Hátrányuk, hogy alkalmazásuk rendkívül drága.

Az MMP-k cink- és kalciumfüggő proteolitikus enzimek, melyek részt vesznek az ECM átalakításában és lebontásában, valamint ezen funkción túlmutatva számos szerepet töltenek be a bélgyulladásban. Az MMP-9 a CD betegek vastagbéliszövetében expresszáldott leggyakoribb MMP, és ezért a IBD súlyosságának, aktivitásának meghatározásában biomarkernek tekinthető, különösen a krónikus vizsgálatok esetében. A fiziológiás körülmények között a szöveti MMP-inhibitor (TIMP) szabályozza az MMP-k működését, de ez a hatásuk számos gyulladás esetén nem érvényesül.

A hisztamin H4 blokkolók gátolják többek között a neutrofil infiltrációt és ezáltal is számos gyulladásos modellben pozitív hatásúnak bizonyultak.

A leukotriének és származékaik számos gyulladáskeltő hatással bírnak, így inhibitoraik lehetséges farmakológiai felhasználási lehetőségeket ígérnek.

A fentiek alapján az *egyéb lehetséges gyulladást csökkentő anyagok*, mint a szelektív hisztamin H<sub>4</sub> receptor antagonisták, LTA<sub>4</sub>H szelektív inhibitorok szájon át történő alkalmazása ígéretes kezelési terápiát jelenthet.

## Célkitűzések

Doktori munkám első részében azt vizsgáltuk, hogy a **krónikus** bélgyulladás esetén bizonyos szabályozó fehérjéknek milyen szerepe van a striktúrák kialakulásában:

- I. Hogyan változik az ECM-et szabályozó MMP-9 és TIMP-1 fehérje expressziója és aktivitása krónikus TNBS patkány modellben?

Munkám második felében a célunk az volt, hogy megvizsgáljuk:

- II. Hogyan változnak a gyulladási paraméterek hisztamin H4 receptor blokkoló hatására akut TNBS modellben?
- III. Hogyan befolyásolja az LTB<sub>4</sub> gátlása a CD-t akut TNBS modellben?

## Vizsgálati módszerek

### A gyulladósos bélbetegségek modellezése

Az általunk alkalmazott 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav- (TNBS) modell kémiai kiváltott gyulladósos modell. Egyszeri beadással akut-, többszöri, ismételt kezelés alkalmazásával krónikus gyulladást lehet előidézni, mely az irodalomban elfogadott, a Crohn-betegség tüneteit jól reprodukáló modell.

#### I. Krónikus vizsgálatok

- a. Krónikus TNBS modell (0, 2 és 4. héten 10 mg TNBS kezelés). Vizsgálat a 90. és 120. napon
- b. Gyulladási paraméterek meghatározása (lézió nagysága, léziók súlyossága, állatok testsúlyának változása)
- c. Szöveti vizsgálatok (hematoxilin-eozin és toluidinkék festés)
- d. A kísérleti periódus végén (MMP-9 és TIMP-1) fehérje expressziós és aktivitás vizsgálatokat végeztünk a vastagbél körkörös és hosszanti simaizomrétegeiből

#### II. Akut vizsgálatok

- a. Akut TNBS modell (10 mg TNBS kezelés)
- b. H4 hisztamin antagonisták vizsgálata
  - i. Különböző dózisu kezelése alkalmazása (4 napig)
  - ii. Gyulladási paraméterek meghatározása (lézió nagysága, léziók súlyossága, állatok testsúly változása, colon ödéma mérése, MPO aktivitás, gyulladáskeltő citokinek (TNF- $\alpha$ ) expressziójának mérése)
  - iii. Szöveti vizsgálatok (hematoxilin-eozin és toluidinkék festés), neutrofil granulociták számának meghatározása
- c. LTA<sub>4</sub>H inhibitor vizsgálata
  - i. Különböző dózisu kezelése alkalmazása (4 napig)
  - ii. Gyulladási paraméterek meghatározása (lézió nagysága, léziók súlyossága, állatok testsúly változása, colon ödéma mérése, MPO aktivitás, gyulladáskeltő citokinek (IL-6, TNF- $\alpha$ ,) és a szöveti LTB<sub>4</sub> expressziójának mérése)

## Eredmények

#### I. Krónikus vizsgálatok

- a. A gyulladás krónikus fázisában az MMP-9 fehérje expresszió szignifikánsan megnövekedett a 90. napon. Majd a 120. napra enyhén emelkedett volta kontrollhoz képest.
- b. Az MMP-9 aktivitás szintén emelkedett értéket mutatott.
- c. TIMP-1 expressziót a jelen kísérletben nem volt kimutatható mennyiségben.

#### II. Akut vizsgálatok

- a. H<sub>4</sub> hisztamin antagonisták száján át történő alkalmazása dóziszfüggően és szignifikánsan csökkentette a gyulladásos paramétereket (lézió nagysága, léziók súlyossága, szöveti gyulladások mértéke, neutrofil granulociták száma, állatok testsúly csökkenése, colon ödéma mértéke, MPO aktivitás megemelkedése, gyulladásokkeltő citokinek (TNF- $\alpha$ ) expressziójának mennyisége).
- b. LTA<sub>4</sub>H inhibitor száján át történő alkalmazása dóziszfüggően és szignifikánsan csökkentette a gyulladásos paramétereket (lézió nagysága, léziók súlyossága, állatok testsúly csökkenése, colon ödéma mértéke, MPO aktivitás megemelkedése, gyulladásokkeltő citokinek (IL-6, TNF- $\alpha$ ) és az LTB<sub>4</sub> expressziójának mennyisége).

### **Következtetés:**

- I. A krónikus TNBS modellben a betegséggel járó szövődmények súlyosbodtak, szűkületek alakultak ki.
  - a. A folyamatok során a jelentős MMP-9 expressziót és aktivitást mutattunk a lamina propriában. Az MMP-9 jól alkalmazható biomarkerként ebben a modellben is.
  - b. A TIMP-1 expresszió nem volt detektálható, így az irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a gyulladásos folyamatok során nem befolyásolja az MMP-k szintjét és aktivitását.
- II. Az akut TNBS modellben a hisztamin H<sub>4</sub> receptor antagonisták kezelése szignifikánsan és dóziszfüggően csökkentette a gyulladásos paramétereket.
- III. Az akut TNBS modellben az LTA<sub>4</sub>H inhibitorok kezelése szintén dóziszfüggően és szignifikánsan csökkentette a gyulladásos paramétereket.
- IV. A fentiek alapján a hisztamin H<sub>4</sub> receptor antagonisták és az LTA<sub>4</sub>H inhibitorok ígéretes farmakológiai támadáspontot jelenthetnek a bélgyulladások kezelésében.

# 11. Summary

## Introduction

Inflammatory bowel diseases (IBDs) characterized by relapsing-remitting phases inflammation can affect any part of the gastrointestinal tract. Numerous environmental and genetic factors are contribute to the pathogenesis of IBDs/diseases. Furthermore, several molecular interactions and immunological mechanisms are also involved. The major types of IBDs are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). CD is a multifactorial disorder with chronic inflammation involving any segment of the digestive tract and all layers of the gut wall. It occurs most often in the distal part of the ileum and in the colon. UC is accompanied by chronic inflammation of mucosal and submucosal area localized in the colon.

For symptomatic treatment, several types of drugs can be used: These are derivatives of salicylic acid, which affect locally on the mucosa. Glucocorticosteroids are used in severe cases, but the side effects are not negligible. The local effects of these drugs are similar to the salicylic acid derivatives. Immunosuppressive and immunomessive drugs are used in the case of steroid resistance. Antibiotics through their antibacterial effect can reduce the recurrence of the disease. The biologically active substances are used to inhibit the expression of pro-inflammatory cytokines, to increase the number of regulator T cells. Owing to this fact, the extent of the inflamed areas and the degree of inflammation decrease. Their disadvantage is that the usage is extremely expensive.

MMPs are zinc and calcium-dependent proteolytic enzymes which participate in dynamic formation and degradation of the extracellular matix, as well as in the intestinal inflammation. MMP-9 is the most common type of MMPs expressed in the colon of CD patients, and therefore it is considered to be as biomarker which evaluate the severity and activity of chronic gut inflammation. Under physiological conditions, a tissue inhibitor of MMP (TIMP) regulates the function of MMPs, but this effect is not completed in several cases.

Histamine H4 blockers inhibit the neutrofil infiltration and therefore they could be beneficial in several inflammatory diseases.

Leukotrienes and their derivatives have pro-inflammatory effects, thus their inhibitors seem to be potential targets of pharmacology.

Based on these data, oral administration of other candidates of anti-inflammatory substances, such as selective histamine H4 receptor antagonists or LTA<sub>4</sub>H selective inhibitors, may be promising therapeutic approach.

## Aims

In the first part of my study, we aimed to evaluate the role of different regulator proteins in the development of strictures in chronic inflammatory bowel disease:

- I. Are there any alterations in the expression and activity of ECM regulators, MMP-9 and TIMP-1 proteins in IBD?

In the second part of this study, our goal was to investigate:

- II. How do the inflammatory markers change using histamine H4 receptor blocker in acute TNBS model?
- III. How does the inhibition of LTB<sub>4</sub> affect the CD in acute TNBS model?

## Methods

### Modelling of Inflammatory Bowel Diseases

The 2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) model is used in our experiments as a chemically-induced animal model of gut inflammation. A single dose of TNBS can induce acute intestinal inflammation. Repeated TNBS-treatments cause the symptoms of CD accompanied by chronic gut inflammation.

- I. Chronic studies
  - a. Chronic TNBS model: (10 mg of TNBS treatment at the 0, 2nd and 4th weeks of 90- and 120-days experiments)
  - b. Determination of the markers of inflammation (lesion magnitude, severity of lesions, changes in body weight)
  - c. Histological examinations (toluidine blue staining)
  - d. At the end of the experimental period, the expression and activity of MMP-9 and TIMP-1 were measured from tissue homogenates originated from the circular and longitudinal smooth muscle layers of the colon
- II. Acute studies
  - a. Acute (72 hours) TNBS (10 mg) model
  - b. Study of H4 histamine antagonist
    - i. Use of treatments at different doses (4 days).
    - ii. Measurements of inflammatory parameters (lesion magnitude, severity of lesions, change in body weight, measurement of colon edema, MPO activity, pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ ) expression)
    - iii. Histological examinations (hematoxylin-eosin and toluidine blue staining), determination of the number of neutrophils
  - c. LTA<sub>4</sub>H inhibitor study
    - i. Use of treatments at different doses (4 days).
    - ii. Measurements of inflammatory parameters (lesion magnitude, severity of lesions, change in body weight, measurement of colon edema, MPO activity, pro-inflammatory cytokines, like IL-6, TNF- $\alpha$ , LTB<sub>4</sub> expression)



## Results

### I. Chronic experiments

- a. In the chronic phase of the inflammation, the expression of MMP-9 protein was significantly increased comparing to the control group at day 90, while it was slightly elevated at day 120.
- b. Activity of MMP-9 was also significantly elevated comparing to the control animals (at the 90<sup>th</sup> day).
- c. TIMP-1 was not detectable in the present experiment.

### II. Acute experiments

- a. Oral administration of H4 histamine antagonist was associated with significant and dose-dependent reduction of inflammatory parameters (lesion magnitude, shitchiness of lesions, degree of tissue inflammation, number of neutrofil granulocytes, weight of animals, degree of colon edema, increase in MPO activity, proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ ) expression).
- b. Oral administration of LTA<sub>4</sub>H inhibitor also reduced the inflammatory parameters significantly in dose-dependent way (lesion magnitude, lesions, decrease in body weight, degree of colon edema, increase in MPO activity, proinflammatory cytokines (IL-6, TNF- $\alpha$ ) and LTB<sub>4</sub> expression).

## Conclusion

- I. In **chronic TNBS model**, the disease-associated complications worsened, and strictures developed.
  - a. Significant MMP-9 protein expression and activity was demonstrated in the lamina propria. The MMP-9 is suitable as a biomarker in this model.
  - b. TIMP-1 expression was not detectable, which based on literature data, suggesting that it does not affect the level and activity of MMPs during this inflammatory process.
- II. In the **acute TNBS model**, the treatment of histamine H4 receptor antagonist significantly reduced the inflammatory parameters, depending on the applied dose.
- III. In the **acute TNBS model**, treatment with LTA<sub>4</sub>H inhibitor was also reduced the inflammatory parameters in a dose-dependent way and significantly reduced the inflammatory parameters.
- IV. Based on these findings, the histamine H4 receptor antagonists and LTA<sub>4</sub>H inhibitors may be crucial targets for drug development and therapy of gut inflammation.

## 12. Tudományos közlemények listája

MTMT azonosító : 10027758

### 12.1 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája

1. Talapka P\*, **Berko A\***, Nagy LI, Chandrakumar L, Bagyanszki M, Puskas LG, et al. Structural and molecular features of intestinal strictures in rats with Crohn's-like disease. World J Gastroenterol. 2016;22(22):5154-64.

**\*Megosztott elsőszereplőség** IF : **3,300**

2. Whittle BJ, Varga C, **Berko A**, Horvath K, Posa A, Riley JP, et al. Attenuation of inflammation and cytokine production in rat colitis by a novel selective inhibitor of leukotriene A4 hydrolase. Br J Pharmacol. 2008;153(5):983-91. IF : **6,810**

3. Varga C, Horvath K, **Berko A**, Thurmond RL, Dunford PJ, Whittle BJ. Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat. Eur J Pharmacol. 2005;522(1-3):130-8. IF : **3,040**

### 12.2 Folyóiratban megjelent egyéb közlemények listája

1. Szabo R, Borzsei D, Karacsonyi Z, Gesztelyi R, Nemes K, **Berko AM**, et al. Postconditioning-like effect of exercise: new paradigm in experimental menopause. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2019;316(2):H400-H7. IF : **3,569**

2. Heredi J, Cseh EK, **Berko AM**, Veres G, Zadori D, Toldi J, et al. Investigating KYNA production and kynurenergic manipulation on acute mouse brain slice preparations. Brain Res Bull. 2019;146:185-91. IF : **3,441**

3. Szabo R, Karacsonyi Z, Borzsei D, Juhasz B, Al-Awar A, Torok S, et al. Role of Exercise-Induced Cardiac Remodeling in Ovariectomized Female Rats. Oxid Med Cell Longev. 2018;2018:6709742. IF : **4,936**

4. Posa A, Szabo R, Kupai K, **Berko AM**, Veszeka M, Szucs G, et al. Cardioprotective Effect of Selective Estrogen Receptor Modulator Raloxifene Are Mediated by Heme Oxygenase in Estrogen-Deficient Rat. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:2176749. IF : **4,936**

5. Heredi J, **Berko AM**, Jankovics F, Iwamori T, Iwamori N, Ono E, et al. Astrocytic and neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the adult mouse brain. Brain Struct Funct. 2017;222(4):1663-72. IF : **4,231**

6. Posa A, Szabo R, Kupai K, Barath Z, Szalai Z, Csonka A, et al. Cardioprotective effects of voluntary exercise in a rat model: role of matrix metalloproteinase-2. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:876805. **IF : 4,936**
7. Posa A, Szabo R, Csonka A, Veszeka M, **Berko AM**, Barath Z, et al. Endogenous Estrogen-Mediated Heme Oxygenase Regulation in Experimental Menopause. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:429713. **IF : 4,936**
8. Talapka P, Nagy LI, Pal A, Poles MZ, **Berko A**, Bagyanszki M, et al. Alleviated mucosal and neuronal damage in a rat model of Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(44):16690-7. **IF : 3,300**
9. Szalai Z, Szasz A, Nagy I, Puskas LG, Kupai K, Kiraly A, et al. Anti-inflammatory effect of recreational exercise in TNBS-induced colitis in rats: role of NOS/HO/MPO system. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:925981. **IF : 4,936**
10. Posa A, Kupai K, Menesi R, Szalai Z, Szabo R, Pinter Z, et al. Sexual dimorphism of cardiovascular ischemia susceptibility is mediated by heme oxygenase. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:521563. **IF : 4,936**
11. Molnar AH, Varga C, **Berko A**, Rojik I, Parducz A, Laszlo F, et al. Inhibitory effect of vasopressin receptor antagonist OPC-31260 on experimental brain oedema induced by global cerebral ischaemia. *Acta Neurochir (Wien).* 2008;150(3):265-71. **IF : 1,929**
12. Molnar AH, Varga C, **Berko A**, Rojik I, Parducz A, Laszlo F, et al. Prevention of hypoxic brain oedema by the administration of vasopressin receptor antagonist OPC-31260. *Prog Brain Res.* 2008;170:519-25. **IF : 3,174**
13. Horvath K, Varga C, **Berko A**, Posa A, Laszlo F, Whittle BJ. The involvement of heme oxygenase-1 activity in the therapeutic actions of 5-aminosalicylic acid in rat colitis. *Eur J Pharmacol.* 2008;581(3):315-23. **IF : 3,040**
14. Varga C, Laszlo F, Fritz P, Cavicchi M, Lamarque D, Horvath K, et al. Modulation by heme and zinc protoporphyrin of colonic heme oxygenase-1 and experimental inflammatory bowel disease in the rat. *Eur J Pharmacol.* 2007;561(1-3):164-71. **IF : 3,040**
15. Szabolcs A, Tiszlavicz L, Kaszaki J, Posa A, **Berko A**, Varga IS, et al. Zerumbone exerts a beneficial effect on inflammatory parameters of cholecystokinin octapeptide-induced experimental pancreatitis but fails to improve histology. *Pancreas.* 2007;35(3):249-55. **IF : 2,958**
16. Czako L, Szabolcs A, Vajda A, Csati S, Venglovecz V, Rakonczay Z, Jr., et al. Hyperlipidemia induced by a cholesterol-rich diet aggravates necrotizing pancreatitis in rats. *Eur J Pharmacol.* 2007;572(1):74-81. **IF : 3,040**

- 
17. Szabolcs A, Varga IS, Varga C, **Berko A**, Kaszaki J, Letoha T, et al. Beneficial effect of resveratrol on cholecystokinin-induced experimental pancreatitis. *Eur J Pharmacol.* 2006;532(1-2):187-93. **IF : 3,040**
18. Molnar A, Balaspiri L, Galfi M, Laszlo F, Varga C, **Berko A**, et al. Inhibitory effects of different galanin compounds and fragments on osmotically and histamine-induced enhanced vasopressin secretion in rats. *Eur J Pharmacol.* 2005;516(2):174-9. **IF : 3,040**
19. Pavo I, Laszlo F, Morschl E, Nemcsik J, **Berko A**, Cox DA, et al. Raloxifene, an oestrogen-receptor modulator, prevents decreased constitutive nitric oxide and vasoconstriction in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol.* 2000;410(1):101-4. **IF : 3,040**