

Terápiás lehetőségek a gyulladásoos bélbetegség állatkísérletes modelljében – összehasonlító vizsgálat

Comparative study of novel therapeutic possibilities in animal experimental model of inflammatory bowel disease

KOVÁCS TAMÁS^{1,§}, VARGA GABRIELLA^{2,§}, ÉRCES DÁNIEL², TÖKÉS TÜNDE², TISZLAVICZ LÁSZLÓ³, GHYCYZ MIKLÓS², VÉCSEI LÁSZLÓ⁴, BOROS MIHÁLY², KASZAKI JÓZSEF^{2,@}

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szeged

¹Gyermekklinika, Gyermeksebészeti Osztály (osztályvezető: Dr. Tornycs Szabolcs főorvos)

²Sebészeti Műtéttani Intézet (igazgató: Prof. Dr. Boros Mihály)

³Pathológiai Intézet (igazgató: Prof. Dr. Iványi Béla)

⁴MTA-SZTE Neurológiai Kutatócsoport, Szeged (igazgató: Prof. Dr. Vécsei László)

Bevezetés: A gyulladásoos bélbetegségek következménye a citokinek közvetítésével kialakuló súlyos lokális szöveti károsodás. Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a trinitro-benzol-szulfonsavval (TNBS) kiváltott kísérletes colitis subacut fázisára jellemző gyulladásoos válasz és a morfológiai elváltozások befolyásolhatóságát orális foszfatidil-kolin (PC) és N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor-antagonista kinurensav-terápia után. **Módszerek:** Kísérleteinket Sprague–Dawley-patkányok kontroll-, kezeletlen colitis (*ic* TNBS), 2%-os PC-vel dúsított táppal kezelt colitis (3 nap előkezelés + 3 nap TNBS indukció utáni kezelés) és a 6. napon kinurensavval kezelt colitis csoportjain végeztük ($n = 7$). A gyulladás mértékét a colon-mielperoxidáz- és a plazma-TNF- α -szintek mérésével jellemeztük. A szöveti károsodást hagyományos szövettani (haematoxylin-eosin) vizsgálattal, valamint *in vivo* konfokális laser scanning endomikroszkóppal (Optiscan Five1, Australia) vizsgáltuk. Meghatároztuk a microvascularis reakciót (FITC-dextrán-festés) és a nyálkahártya-struktúra változásait (akridin orange-festés) a colitis 6. napján. **Eredmények:** A kezeletlen colitises állatokban szignifikáns mielperoxidáz- és TNF- α -emelkedést, valamint az epithelialis struktúra jelentős károsodását figyeltük meg. Mindkét kezelési mód jelentősen csökkentette a gyulladásoos markerek szintjét, azonban az epithelialis struktúra megőrzésére csak a PC-előkezelés volt alkalmas: szignifikánsan csökkentette a kapillárisok és kripták károsodását, és növelte a kehelysejtek számát. A kinurensav-kezelés nem befolyásolta a morfológiai elváltozásokat. **Következtetés:** Orális PC-előkezeléssel a gyulladásoos reakció csökkenthető a vastagbélben. A kehelysejtek számának növelése révén ez ígéretes lehetőség lehet a gyulladásoos bélbetegségek kezelésére.

Kulcsszavak: colitis, foszfatidil-kolin, kinurensav, konfokális laser scanning endomikroszkópia

Introduction: The consequence of inflammatory bowel diseases (IBD) is cytokine-mediated severe local tissue damage. Our aim was to determine the extent of inflammatory response and to influence the morphologic changes during the subacute phase of trinitro-benzene sulfonic acid (TNBS)-induced experimental colitis by oral phosphatidylcholine (PC) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist kynurenic acid therapy. **Methods:** Sprague-Dawley rats were randomized to control, untreated colitis (*ic* TNBS), colitis fed with 2% PC-containing diet (3 days pre-treatment +3 days treatment after TNBS induction), colitis with kynurenic acid treatment (on day 6, $n = 7$) groups. The colitis was characterized by tissue myeloperoxidase and plasma TNF-alpha levels, the extent of tissue damage, structural changes in microvasculature (FITC-dextran staining) and mucosal injury (acridine orange staining) were determined by *in vivo* confocal laser scanning endomicroscopy (Optiscan Five1, Australia) and conventional histology (hematoxylin-eosin staining). **Results:** Significant elevation in myeloperoxidase and TNF-alpha levels with remarkable damage in epithelial structure was detected in the colitis group. Both treatment regimens significantly decreased the level of inflammatory activation but only PC pretreatment could preserve the number of goblet cells and the epithelial structure. Treatment with kynurenic acid did not alter the morphology changes. **Conclusion:** Oral PC pretreatment is a promising possibility in the therapy of IBDs through decreasing inflammatory reaction and increasing the number of goblet cells.

@ *Levelezési cím/Corr. address:* Dr. Kaszaki József, Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Sebészeti Műtéttani Intézet, 6720 Szeged, Pécsi u. 6., Tel.: +36 62 545 103, Fax: +36 62 545 743, E-mail: kaszaki.jozsef@med.u-szeged.hu

§ A szerzők közreműködése azonos mértékű.

Támogatás: OTKA K75161; TÁMOP-4.2.1/B-09/KONV-2010-0005

Keywords: colitis, phosphatidylcholine, kynurenic acid, confocal laser scanning endomicroscopy

Beérkezett: 2012. június 27.

Bevezetés

A gyulladáshoz vezető bélbetegségek (Crohn-betegség és colitis ulcerosa) krónikus, relapsusokkal tarkított, ismeretlen etiológiájú kórképek. A gyulladás következtében a belek morfológiája súlyosan károsodik; colitis ulcerosában fekélyek és pseudopolypok alakulnak ki, míg a Crohn-betegséget transmurális, granulomatózus gyulladás jellemzi, stricturákkal, perianális és belek közötti sipolyokkal, tályogokkal. A jelenleg alkalmazott konzervatív kezelési módok elsősorban a gyulladáshoz vezető aktiválódást próbálják gátolni, illetve a relapsusokat megelőzni, helyi és szisztémás antiinflammatorikus vagy immunmoduláns ágensekkel.¹ Sebészi beavatkozásként colitis ulcerosában proctocolectomia és anális mucosectomia ileoanostomiával kuratív lehet, Crohn-betegségben a konzervatív terápia hatástalansága esetén limitált bélresectiók, fistulák, tályogok szanálása jöhet szóba.

A gyulladás során az egyik legjelentősebb proinflammatorikus citokin, a tumornecrosis-faktor-alfa (TNF- α) a jelátvitel fontos komponense. Hatását részben közvetlenül, további citokinek aktiválásán keresztül, illetve egyes gének expressziójának gátlásán keresztül fejti ki.² A másik jelentős összetevő a fehérvérsejtek aktiválódási folyamata, melynek során a leukocyták interakcióba lépnek az endotheliummal, extravasálódnak, és toxikus szabad gyököket generálnak,³ amelyek további citokinfelszabadulást okozhatnak.

Az elmúlt évtizedekben és az elmúlt években is számos állatkísérletes és humánvizsgálat irányult a gyulladáshoz vezető bélbetegség, azaz a colitis következményeinek befolyásolására. Új terápiás lehetőséget jelenthetett Forrest és munkatársai megfigyelése is: e szerzők emelkedett L-kinurenin-szintet mutattak ki gyulladáshoz vezető bélbetegségben szenvedő betegek vérében.⁴ Az L-kinurenin-kinurénsav útvonal a triptofán-metabolizmus része, melynek kórtani jelentőségét számos neurodegeneratív betegség esetében már igazolták. A kinurénsav az N-metil-D-aszpartát (NMDA) típusú glutamát-receptor-antagonista hatás alapján potens endogén neuroprotektív szernek bizonyult a központi idegrendszerben.⁵ Jól ismert, hogy a glutamát a központi idegrendszer fő excitatorikus neurotranszmittere, de a molekula az enterális idegrendszerben (ENS) is jelen van, és az ENS neuronjaiban nagyszámú NMDA-receptor expresszálódik.^{6,7} A feltételezések szerint a glutamát-receptorok fontos szerepet töltenek be a gyulladáshoz vezető bélbetegségekkel kapcsolatos nociceptióban, de az NMDA-receptorok perifériás gátlásának következménye nem teljesen ismert: ez a jelátviteli útvonal a gastrointestinalis traktusban

jórészt még feltérképezetlen, élettani és gyulladáshoz vezető körülmények között egyaránt.⁸

A gyulladáshoz vezető bélbetegségeket jellemző kórállapot továbbá, közelmúltban feltárt eleme, hogy colitis ulcerosában szenvedő betegeknél a colonepitheliumot borító mucin foszfatidil-kolin (PC) komponensének mennyisége jelentősen lecsökken,⁹ ezért különös jelentősége lehet az étrend részeként a gastrointestinalis rendszerbe jutó PC-tartalmú anyagoknak. Korábbi vizsgálatainkban a biomembránokat alkotó PC exogén bevétele gyulladáshoz vezető^{10,11} és ischaemiás folyamatokban^{12,13} is protektív hatásának bizonyult. PC alkalmazása csökkentette az intestinalis stricturák kialakulását¹⁴ is, és a klinikai tapasztalatok szerint a nyák PC-szintjének emelkedése a tünetek javulásával és a gyulladáshoz vezető aktivitás csökkenésével jár együtt.¹⁵

A humán gyulladáshoz vezető bélbetegségek kísérletes modellezésére széles körben alkalmazott eljárás a trinitro-benzol-szulfonsav (TNBS) intracolonalis alkalmazásával kiváltott colitis,¹⁶ amely rágszálókban több mint 8 héten át tartó, transmurális bélgyulladást idéz elő, kifejezett súlyvesztéssel, morfológiai elváltozásokkal, valamint a TNF- α -szint emelkedésével és szöveti granulocytákkumulációval.^{17–19}

Célkitűzésünk szerint a fentiek alapján megvizsgáltuk a peroralis PC-előkezelés és az acut kinurénsav-kezelés gyulladáscsökkentő hatását, különös tekintettel a colonnyálkahártya-destructio befolyásolhatóságára. A morfológiai változások dinamikájának *in vivo* követését fluoreszcens konfokális pásztázó laser-endomikroszkóppal végeztük, az eredményeket konvencionális histopathológiai vizsgálattal hasonlítottuk össze.

Anyagok és módszerek

A kísérletekhez 28 hím Sprague–Dawley Wistar-patkány (300 g) csoportjait használtuk, a vizsgálatokat a NIH irányelvei alapján (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) végeztük a Szegedi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága jóváhagyásával.

Colitisindukció

Az állatok a colitisindukció előtt 12 órán keresztül éheztek, majd a vastagbélgyulladást TNBS (40 mg/kg 0,25 ml 25%-os etanolban) intracolonalis beöntésével idéztük elő,¹⁶ átmeneti éteres bódítás mellett. Az álműtött csoport egyedeit a TNBS oldószerével kezeltük.

Sebészi beavatkozás és haemodynamikai monitorozás

Az állatokat a beöntést követő 6. napon Na-pentobarbitál (50 mg/tskg i.p.) altatás mellett hanyatt fekvő helyzetben fűthető műtőasztalra helyeztük. Tracheostomiát végeztünk a spontán légzés biztosítására, majd a jobb oldali vena jugularis kanülálása (PE50-es kanül) után az állatok Ringerlaktát-infúziót (10 ml/kg/h) kaptak a kísérlet végéig. Az állatok vérnyomásának és szívfrekvenciájának mérése céljából kanüláltuk az arteria carotis communist, a haemodynamikai adatok folyamatos monitorozása SPEL Advanced Cardiosys 1.4 adatgyűjtő szoftver (Experimetria Ltd., Budapest) alkalmazásával történt.

A plazma-TNF- α mérése

A vizsgálatok végén a vena cava inferiorból 0,5 ml vérmintát vettünk EDTA-s polipropilén csövekbe, melyeket 20 percen keresztül 1000 g-vel centrifugáltuk (4 °C). Ezt követően a mintát lefagyasztottuk, és a mérések időpontjáig -70 °C-on tároltuk. A plazma-TNF- α koncentrációját kereskedelmi forgalomban kapható enzimkapcsolt immunosorbent-assay segítségével határoztuk meg (Quantikine ultrasensitive ELISA kit; Biomedica Hungaria Kft., Magyarország). A detektálható minimum TNF- α -koncentráció 0,5 pg/ml, a módszer inter- és intra-assay koefficiens értéke 10%-nál alacsonyabb volt.

A mieloperoxidáz enzim aktivitásának mérése

A vastagbéliszöveti mieloperoxidáz (MPO) enzim aktivitása a szövetbe akkumulálódott neutrophil granulocytaktívációt jellemzi, amelyet Kuebler metodikája alapján határoztunk meg.²⁰ A szövetet 0,1 mM polimetilszulfonil-fluoridot tartalmazó Trisz-HCl pufferrel (0,1 M, pH = 7,4) homogenizáltuk, majd 4 °C-on 20 percig 4000 g-vel centrifugáltuk. A kapott üledéket pH 6,0-os 0,05 M-os K-foszfát + 0,5%-os hexadecil-trietil-ammonium-bromid pufferrel tártuk fel. A feltárt anyag felülúszójának MPO-tartalma a hozzáadott hidrogén-peroxidból hidroxil-gyököt szabadít fel, amely a tetrametil-benzidinnel reagálva 450 nm-nél fotometrálnálható színreakciót ad. Az MPO enzimaktivitását a minta fehérjetartalmára vonatkoztatva adtuk meg.

Konvencionális szövettani vizsgálat

Teljes vastagságú bélmintákat vettünk minden csoportban, 6%-os formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, 4 μ m vastag metszetekre vágtuk, és haematoxylin-eosinnal festettük. Vizsgáltuk a leukocytainfiltrációt, a szövetkárosodás mértékét Riley-féle semikvantitatív módszerrel határoztuk meg²¹ a következő kritériumok szerint: 1. PMN-sejtek akut gyulladással beszűrődése a lamina propriaiban (0–3), 2. kriptatályogok (0–3), 3. mucinhiány (0–3), 4. felszíni sejtingegritás (0–3), 5. krónikus gyulladással beszűrődés, kerek sejtek a lamina propriaiban (0–3), 6. a kriptaszer-

kezet szabálytalansága (0–3), 7. transmuralis vagy csak a lamina propriaát érintő károsodás (0–1), diffúz vagy focalis károsodás (0–1).

A szövetkárosodás *in vivo* vizsgálata

A distalis colonnyálkahártya-károsodás mértékét *in vivo* szövettani vizsgálómódszerrel, fluoreszcens konfokális pásztázó laser-endomikroszkópia segítségével határoztuk meg (Five1, Optiscan Pty. Ltd., Melbourne, Victoria, Australia), a vizsgálatokat két független személy végezte (KT és VG). Az anustól 8 cm-re proximálisan a colon lumenét megnyitottuk, a nyálkahártyát feltártuk. A mucosa microvascularis szerkezetét fluoreszcens isothiocianát-dextran (FITC-dextran; 150 KDa, 20 mg/mL fiziológiás sóoldatban, Sigma Chem., 0,3 ml i.v.) adása után vizsgáltuk. Az eszköz objektívét a vastagbél-nyálkahártyára helyeztük, és 5 perccel a festék beadása után (1 scan/kép, 1024 \times 512 pixel és 475 \times 475 μ m képenként) konfokális képeket készítettünk. A nyálkahártya szerkezeti változásait akridin orange fluoreszcens festék (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) felszíni alkalmazása után vizsgáltuk. A felesleges festéket 2 perccel a képek készítése előtt fiziológiás sóoldattal lemostuk a nyálkahártyáról.

A TNBS-kezelt állatokban különálló, aktív, gyulladt területeket vizsgáltunk, és ezeket hasonlítottuk össze a kezelt és kontrollcsoportokkal, 4 kritériumon alapuló semikvantitatív pontrendszerrel: I. a hajszálerek szerkezete (0 – normális; 1 – festékkilépés, de az érszerkezet felismerhető; 2 – károsodás, és az érszerkezet felismerhetetlen); II. kriptakárosodás/denudatio (0 – nincs károsodás; 1 – látóterenként legalább egy felismerhetetlen kriptaszerkezet; 2 – látóterenként több mint egy felismerhetetlen kriptaszerkezetű terület vagy több mint 30%-ban denudált kripták); III. oedema (0 – nincs oedema; 1 – mérsékelt epithelialis duzzanat; 2 – súlyos oedema); IV. hámsejtek körvonalai (0 – normális, tiszta körvonalak; 1 – elmosódott körvonalak; 2 – nincs normális sejtkontúr). Látóterenként megszámláltuk a nyáksejteket, és meghatároztuk a mirigyekhez való arányukat (nyáksejtek száma / mirigyek száma).

Kísérleti csoportok és protokoll

Az állatok első csoportja ($n = 7$) csak oldószert kapott intracolonalisan (25% etanol), és kontrollként szolgált. A többi csoport egyedeinél ($n = 7$) TNBS (40 mg/kg) intracolonalis alkalmazásával vastagbélgyulladást idéztünk elő. A 3. csoport tagjainál kinurénsav- (Sigma Chem. USA) kezelést alkalmaztunk a kísérlet 6. napján i.v. infúzióban (25 mg/kg/ml). A 4. csoportban a TNBS-indukció előtt három napon keresztül, majd a TNBS-indukciót követően még három napig speciális diétát alkalmaztunk (Ssniff Speciáldiäten, Ssniff GmbH, Soest, Germany), az állatok 2%-os PC- (1,2-diacylglycero-3-phosphocholine, R45, Lipoid GmbH, Ludwigshafen) tartalmú tápot, míg az 1., 2. és 3. csoport tagjai normál tápot kaptak. Vizsgálatainkat a colitisindukciót követő 6. napon végeztük. Műtéti előkészítést

követően konfokális laser scanning endomikroszkópos vizsgálatokat végeztünk, majd szövetmintát vettünk a konvencionális histopathológiai vizsgálatra.

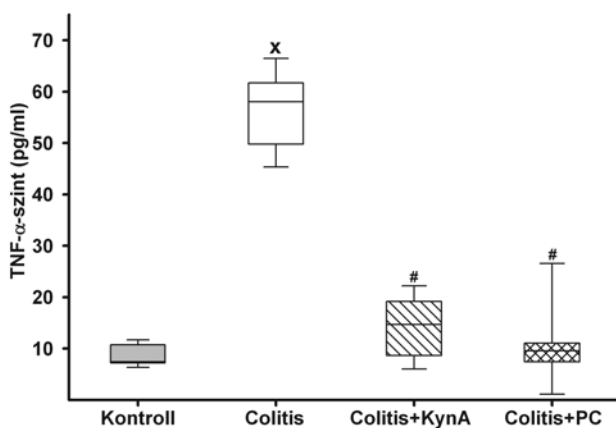
Statistikai analízis

Az adatok kiértékelését statisztikai szoftvercsomag segítségével végeztük (SigmaStat for Windows, Jandel Scientific, Németország), nem parametriás módszereket alkalmazva. A csoportok közötti különbségek meghatározása Kruskal–Wallis- és Dunn-próbával történt. A grafikonokon a median értéket és az interkvartilis félterjedelmet ábrázoltuk. A szignifikanciaszintet $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

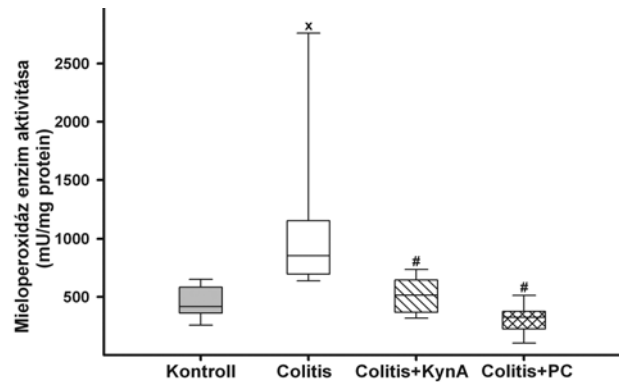
Eredmények

A vizsgálatok 6. napján nem tapasztaltunk eltérést a kontroll- és a colitises állatok keringési paramétereiben (vérnyomás, szívfrekvencia). Ugyanakkor a kezeletlen colitis esetében a plazma-TNF- α -szint jelentős, szignifikáns emelkedését mértük a kontrollértékekhez képest, amelyet a kinurénsav- és a PC-kezelés egyaránt szignifikáns mértékben csökkentett (1. ábra). TNBS hatására jelentős leukocyt-akkumuláció alakult ki a proximális colonban, melyet a szöveti MPO-aktivitás szignifikáns emelkedése jelzett. A colitis által indukált MPO-szint növekedését mindkét alkalmazott kezelés hatékonyan csökkentette (2. ábra).

A hagyományos fénymikroszkópos histopathológiai vizsgálat során a kontrollcsoportban ép vastagbélmucosaszervezetet figyelhettünk meg, leukocyt-infiltrációt nem tapasztaltunk. A TNBS-indukció utáni 6. napon jelentős mucosakárosodás volt megfigyelhető a kezeletlen colitises csoportban, amely pontszerűen a lamina propria réteget

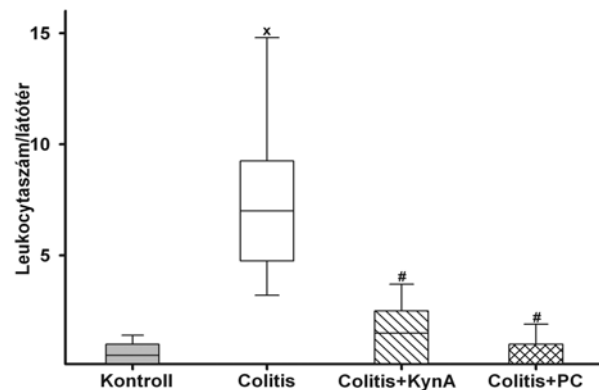


1. ábra. A plazma-TNF- α változása a kontroll- (szürke box), a kezeletlen colitises (fehér box), a kinurénsavval (KynA) kezelt colitises (sávozott fehér box) és a foszfátidil-kolinnal (PC) kezelt (rácsos fehér box) csoportokban. A box-plot grafikonon a median értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. $^x p < 0,05$ a kontrollcsoportoz képest; $^# p < 0,05$ az I/R csoportoz képest

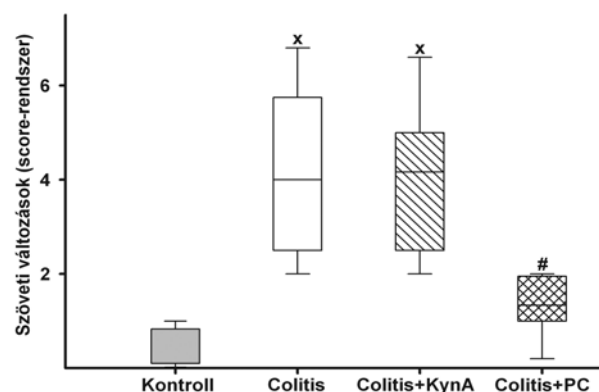


2. ábra. A colon mieloperoxidáz-aktivitása a kontroll- (szürke box), a kezeletlen colitises (fehér box), a kinurénsavval (KynA) kezelt colitises (sávozott fehér box) és a foszfátidil-kolinnal (PC) kezelt (rácsos fehér box) csoportokban. A box-plot grafikonon a median értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. $^x p < 0,05$ a kontrollcsoportoz képest; $^# p < 0,05$ az I/R csoportoz képest

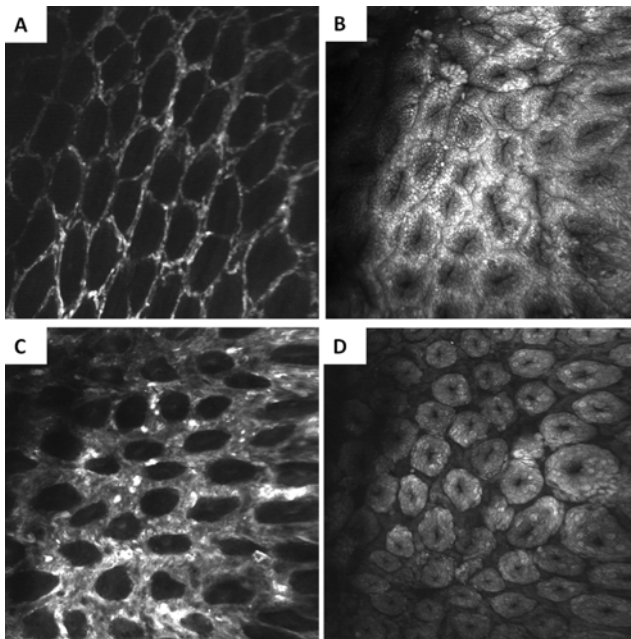
A



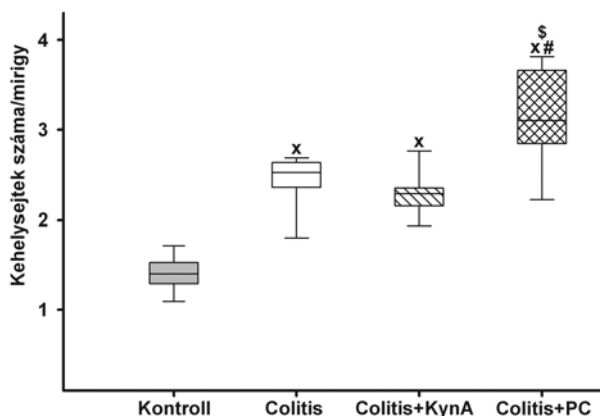
B



3. ábra. A colon leukocyt-infiltráció (A) és a konvencionális szövettani score (B) változása a kontroll- (szürke box), a kezeletlen colitises (fehér box), a kinurénsavval (KynA) kezelt colitises (sávozott fehér box) és a foszfátidil-kolinnal (PC) kezelt (rácsos fehér box) csoportokban. A box-plot grafikonon a median értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. $^x p < 0,05$ a kontrollcsoportoz képest; $^# p < 0,05$ az I/R csoportoz képest



4. ábra. A distalis colonnyálkahártya *in vivo* szövettani felvételei fluoreszcens konfokális pásztázó laser endomikroszkópiával készítve, i.v. adott FITC-dextran (A, C) és akridin orange felszíni alkalmazása (B, D) után: kontrollnyálkahártya kapillaris hálózata (A); kontrollnyálkahártya felszíni struktúrája (B); colitises állatok nyálkahártyájának kapillaris hálózata (C); colitises állatok nyálkahártyájának felszíni struktúrája (D)



5. ábra. A kehelysejtek számának változása a kontroll- (szürke box), a kezeletlen colitises (fehér box), a kinurénsavval (KynA) kezelt colitises (sávozott fehér box) és a foszfatidil-kolinnal (PC) kezelt (rácsos fehér box) csoportokban. A box-plot grafikonon a median értéket és a szórás jellemzésére a 25 és 75 percentilis értékeket tüntettük fel. $^x p < 0,05$ a kontrollcsoporthoz képest; $^# p < 0,05$ az I/R csoporthoz képest

érintette, a felszíni mucinréteg hiányzott, és szignifikáns leukocita-infiltráció volt észlelhető. Mind a kinurénsav-, mind a PC-kezelés szignifikánsan csökkentette a leukocita-akkumulációt (3.A ábra). A gyulladt vastagbél morfológiai változásait, a mucosa és a mucinréteg károsodását csak a PC-előkezelés csökkentette szignifikáns mértékben,

a kinurénsav-kezelés lényegében hatástalan volt erre a paraméterre (3.B ábra).

Az *in vivo* vastagbél-nyálkahártya morfológiai vizsgálatkor a kezeletlen colitises csoportban kifejezett szöveti károsodást láttunk – kapillaris szerkezeti károsodással, oedemával, hámszájakkal, nyáksejtek eltűnésével, míg a kontrollcsoportban lényegi eltérést nem találtunk (4. ábra). TNBS hatására a fluoreszcens festék extravasziója a kapillaris rendszer roncsolódását jelezte, valamint kifejezett oedemaképződést észleltünk. Az akridin orange-festéssel a felszíni epithelium pusztulását, hámszájakkal, a kripták denudációját és a nyáktermelő sejtek számának fogyatkozását tettük láthatóvá. A PC-vel előkezelte állatoknál a destruktívot ki lehetett védeni, mind a kapillaris-, mind az epithelium szerkezete megtartott volt, és a kehelysejtek száma is magasabb volt a colitises csoport egyedeihez képest (5. ábra). A kinurénsavval kezelt állatoknál nem észleltünk jelentős hatást, itt továbbra is a súlyos szöveti károsodás képe látszott.

Megbeszélés

Kísérletes munkánkban a TNBS által okozott colitis subacut fázisára jellemző gyulladós választ és a morfológiai elváltozások befolyásolhatóságát vizsgáltuk, két új terápiás lehetőség összehasonlításával. Az orális PC-előkezelés és az NMDA-receptor-antagonista kinurénsav egyszeri adása jelentősen mérsékelte a gyulladós markereket, a TNF- α és a leukocita-aktiváció mértékét a gyulladás subacut fázisában. A további, részletes morfológiai vizsgálatok során a colitis alatt kialakult epithelium- és kapillaris szerkezeti károsodásról, valamint a mucintermelő kehelysejtek számának változásáról nyertünk adatokat. A strukturális károsodás feltérképezésére irányuló vizsgálatunk a PC-előkezelés hatékonyságát és a kinurénsav-kezelés hatástalanságát igazolták.

Az IBD pontos pathomechanizmusa még nem teljesen tisztázott, de a klinikai és kísérletes vizsgálatok alapján, a béltraktusban zajló kóros immunológiai reakció állhat a háttérben. Welters és munkatársai kapcsolatot fedeztek fel az NMDA-receptor-aktiváció és a leukocita-sejtvonalak között.²² Az NMDA-receptorok nemcsak a neuronokon, hanem az endotheliumon és immunkompetens sejteken is kimutathatók, ami közös szabályozó mechanizmusra utal.^{23,24} Az NMDA-receptorok inaktív lymphocytákon alig expresszálódnak, ehhez megfelelő stimulus szükséges,²⁵ ugyanakkor TNBS-colitisben nagyfokú expresszió észlelhető.²⁶ A glutamát az NMDA-receptorokon keresztül a polimorf magvú (PMN) granulocyták aktiválásához²⁷ és kifejezett intracelluláris Ca^{2+} -beáramláshoz vezet, ami citotoxikus hatású lehet. Igazolható tehát, hogy a béltraktusban az enterális idegrendszer és a cellularis immunrendszer közötti szabályozó folyamatokban az NMDA-receptorok aktiválásának kulcsszerepe van. Vizsgálatainkban az NMDA-antagonista-kezeléssel a colitis hatására kialakuló PMN-leukocita-infiltrációt és a gyulladá-

szos citokin felszaporodását gátolni tudtuk, azonban a kinurén-sav egyszerű adásával a gyulladás által indukált morfológiai változásokat nem sikerült csökkenteni. Az NMDA-antagonista terápiás hatásának igazolásához további kísérletek (ismételt alkalmazások) szükségesek.

A PC protektív hatását részben lokálisan, részben szisztémásan fejtheti ki. A PC a bélnyálkahártya hydrophobicitására felelős mucin alapvető komponense. A mucin PC-tartalma bizonyítottan csökken TNBS alkalmazása után,⁹ valamint colitis ulcerosában szenvedő betegek nyákjában is.^{28,29} Az elvékonyodott mucin nem képes hatékony barrierként működni, rajta keresztül átjuthatnak és a hámsejtekkel kapcsolatba kerülhetnek a bélben levő baktériumok, és immunválaszt kiváltva elindíthatják a gyulladásos kaskádát.^{27,29} Kísérletünkben a PC hatására megemelkedett a mucintermelő kehelysejtek száma, ami a mucin kiemelt jelentőségét jelzi a gyulladás megelőzésében, illetve a regeneráció folyamatában.

Mindezt tovább erősítik azok a korábbi adatok, amelyek a PC jótékony hatását írták le a gastrointestinalis traktus gyulladásos állapotaiban.^{12,15} Humánvizsgálatban 3 hónapos PC-kezelés hatására a krónikusan aktív colitis betegek zömében remissiót vagy a betegség klinikai aktivitásának szignifikáns javulását sikerült elérni a szteroidkezelés elhagyása mellett.¹⁵ Az orálisan bejuttatott PC nemcsak helyileg képes a gyulladást befolyásolni, felszívódása után a kolin-metabolit a kolinerg antiinflammációs útvonalon keresztül, a macrophagok és PMN-leukocyták gátlását is okozhatja.³⁰ A PMN-akkumuláció csökkenését vizsgálatainkban a szöveti MPO-szint változása is megerősítette.

Modellünkben *in vivo* körülmények között figyelhetjük meg a TNBS hatására kialakult kifejezett epithelium- és kapilláris szerkezet-roncsolódást és a PC-kezelés protektív hatását, ami a nyáktermelő sejtek számának növelésében is megmutatkozott. A táplálékkal bejuttatott PC-előkezelés megőrizte a nyálkahártya integritását, és a kehelysejtek száma nem csökkent. Kinurén-sav adásával ezt a protektív hatást nem tudtuk elérni. A különbség oka a PC-kezelés hosszabb időtartama lehet. Az állatok a gyulladás kiváltása előtt és az akut fázisban is kezelést kaptak, míg a kinurén-savat csak egy alkalommal, a már kialakult, florid colitist követő szakaszban alkalmaztuk. Mindkét szer hatásmechanizmusának kulcsfontosságú eleme lehet a plazma-TNF- α szintjének csökkentése. Kimutatták, hogy TNBS-colitisben a TNF- α a mucingének expresszióját gátolja, valamint hogy TNF- α -ellenes antitestekkel a nyáktermelő sejtek és a nyák megfoghatósága megelőzhető.³¹ A leukocytá-akkumuláció és a TNF- α szintjének csökkentése a kinurén-sav-kezelés kedvező tulajdonságaira utal, így mindezek alapján feltehetjük, hogy a szer dózisának változtatásával vagy ismételt adásával a hatékonyság fokozható lesz.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a colonban TNBS hatására kialakuló súlyos gyulladásos folyamat számos elemét sikeresen tudtuk befolyásolni *per os* PC-előkezeléssel és az endogén NMDA-receptor-antagonista kinurén-sav-kezeléssel. A PC-kezelés hatékonyan bizonyult a következményes szöveti destrukció kivédésére is, így ígé-

retes lehetőségnek tarthatjuk a gyulladásos bélbetegségek terápiájában a relapsusok és a sebészi beavatkozást igénylő szövődmények számának csökkentésére.

Irodalomjegyzék

- ¹ Braus NA, Elliott DE: Advances in the pathogenesis and treatment of IBD. *Clin Immunol* 2009; 132: 1–9
- ² Treede I, Braun A, Jeliaskova P, Giese T, Füllekrug J, Griffiths G, Stremmel W, Eehalt R: TNF-alpha-induced up-regulation of pro-inflammatory cytokines is reduced by phosphatidylcholine in intestinal epithelial cells. *B M C Gastroenterol* 2009; 9: 53
- ³ Babbs CF: Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 169–81
- ⁴ Forrest CM, Youd P, Kennedy A, Gould SR, Darlington LG, Stone TW: Purine, kynurenine, neopterin and lipid peroxidation levels in inflammatory bowel disease. *J Biomed Sci* 2002; 9: 436–42
- ⁵ Klivényi P, Toldi J, Vécsei L: Kynurenines in neurodegenerative disorders: therapeutic consideration. In: *Frontiers in Clinical Neuroscience: Neurodegeneration and neuroprotection*. *Adv Exp Med Biol* 2004; 541: 169–83
- ⁶ Giaroni C, Zanetti E, Chiaravalli AM, Albarello L, Dominioni L, Capella C, Lecchini S, Frigo G: Evidence for a glutamatergic modulation of the cholinergic function in the human enteric nervous system via NMDA receptors. *Eur J Pharmacol* 2003; 476: 63–9
- ⁷ Liu MT, Rothstein JD, Gershon MD, Kirchgessner A: Glutamatergic enteric neurons. *J Neurosci* 1997; 17: 4764–84
- ⁸ Varga G, Ércses D, Fazekas B, Fülöp M, Kovács T, Kaszaki J, Fülöp F, Vécsei L, Boros M: N-Methyl-D-aspartate receptor antagonism decreases motility and inflammatory activation in the early phase of acute experimental colitis in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 217–25
- ⁹ Braun A, Treede I, Gotthardt D, Tietje A, Zahn A, Ruhwald R, Schoenfeld U, Welsch T, Kienle P, Erben G, Lehmann WD, Füllekrug J, Stremmel W, Eehalt R: Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 1705–20
- ¹⁰ Tőkés T, Erős G, Bebes A, Hartmann P, Várszegi Sz, Varga G, Kaszaki J, Gulya K, Ghyczy M, Boros M: Protective effects of a phosphatidylcholine-enriched diet in lipopolysaccharide-induced experimental neuroinflammation in the rat. *Shock* 2011; 36: 458–65
- ¹¹ Erős G, Kaszaki J, Czobel M, Boros M: Systemic phosphatidylcholine pretreatment protects canine esophageal mucosa during acute experimental biliary reflux. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 271–9
- ¹² Ghyczy M, Torday C, Kaszaki J, Szabo A, Czobel M, Boros M: Oral phosphatidylcholine pretreatment decreases ischaemia-reperfusion-induced methane genera-

- tion and the inflammatory response in the small intestine. *Shock* 2008; 30: 596–602
- ¹³ Gera L, Varga R, Torok L, Kaszaki J, Szabo A, Nagy K, Boros M: Beneficial Effects of Phosphatidylcholine During Hindlimb Reperfusion. *J Surg Res* 2007; 139: 45–50
- ¹⁴ Mourelle M, Guarner F, Malagelada JR: Polyunsaturated phosphatidylcholine prevents stricture formation in a rat model of colitis. *Gastroenterology* 1996; 110: 1093–7
- ¹⁵ Stremmel W, Merle U, Zahn A, Autschbach F, Hinz U, Eehalt R: Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis. *Gut* 2005; 54: 966–71
- ¹⁶ Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL: Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96: 795–803
- ¹⁷ Tatsumi Y, Lichtenberger LM: Molecular association of trinitrobenzenesulfonic acid and surface phospholipids in the development of colitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 110: 780–9
- ¹⁸ Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, Alexopoulou L, Haralambous L, Meyer zum Büschenfelde KH, Strober W, Kollias G: Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1743–50
- ¹⁹ Kiss J, Lamarque D, Delchier JC, Whittle BJ: Time-dependent actions of nitric oxide synthase inhibition on colonic inflammation induced by trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 1997; 336: 219–24
- ²⁰ Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE: Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int J Microcirc* 1996; 16: 89–97
- ²¹ Riley SA, Mori V, Goldman MJ, Dutt S, Herd ME: Microscopic activity in ulcerative colitis: what does it mean? *Gut* 1991; 32: 174–8
- ²² Welters ID, Hafer G, Menzebach A, Mühling J, Neuhäuser C, Browning P, Goumon Y: Ketamine inhibits transcription factors activator protein 1 and nuclear factor-kappaB, interleukin-8 production, as well as CD11b and CD16 expression: studies in human leukocytes and leukocytic cell lines. *Anesth Analg* 2010; 110: 934–41
- ²³ Boldyrev AA, Kazey VI, Leinsoo TA, Mashkina AP, Tyulina OV, Johnson P, Tuneva JO, Chittur S, Carpenter DO: Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 133–9
- ²⁴ Miglio G, Varsaldi F, Lombardi G: Human T lymphocytes express N-methyl-D-aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1875–83
- ²⁵ Mashkina AP, Cizkova D, Vanicky I, Boldyrev AA: NMDA receptors are expressed in lymphocytes activated both in vitro and in vivo. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 901–7
- ²⁶ Zhou Q, Caudle RM, Price DD, Del Valle-Pinero AY, Verne GN: Selective up-regulation of NMDA-NR1 receptor expression in myenteric plexus after TNBS induced colitis in rats. *Molecular Pain* 2006; 2: 3
- ²⁷ Kim-Park WK, Moore MA, Hakki ZW, Kowolik MJ: Activation of the neutrophil respiratory burst requires both intracellular and extracellular calcium. *Ann NY Acad Sci* 1997; 832: 394–404
- ²⁸ Eehalt R, Braun A, Karner M, Füllekrug J, Stremmel W: Phosphatidylcholine as a constituent in the colonic mucosal barrier – Physiological and clinical relevance. *Biochem Biophys Acta* 2010; 1801: 983–93
- ²⁹ Eehalt R, Wagenblast J, Erben G, Lehmann WD, Hinz U, Merle U, Stremmel W: Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in intestinal mucus of ulcerative colitis patients. A quantitative approach by nanoelectrospray – tandem mass spectrometry. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 737–42
- ³⁰ Tracey KJ: Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 2007; 117: 289–96
- ³¹ Dharmani P, Leung P, Chadee K: Tumor necrosis factor- α and Muc2 mucin play major roles in disease onset and progression in dextran sodium sulphate-induced colitis. *PLoS One* 2011; 6: e25058