

XXXII. OTDK Biológia Szekció

A kénhidrogén protektív hatásának és a hem-oxigenáz enzimrendszer antioxidáns szerepének tanulmányozása kísérletes colitis patkánymodellben

Korsós Marietta Margaréta

Biológus mesterszakos hallgató I. évfolyam



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

TÉMAVEZETŐK:

Kedvesné Dr. Kupai Krisztina
tudományos munkatárs

Dr. Varga Csaba
egyetemi docens

PÉCS

2015

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
3. BEVEZETŐ	6
3.1. A gyulladásos bélbetegségek	6
3.2. Az oxidatív stressz és a gyulladásos mediátorok szerepe IBD-ben.....	7
3.3. Alkalmazott gyógyszeres kezelések	8
3.4. A HO enzimrendszer feltételezett hatásmechanizmusa.....	9
3.5. A kénhidrogén metabolizmusa, biológiai hatásai	11
3.6. H ₂ S-donorok terápiás alkalmazása	14
4. CÉLKITŰZÉSEK	16
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17
5.1. A TNBS indukálta colitis patkánymodell	17
5.2. Vizsgált állatcsoportok	17
5.3. Nyálkahártya gyulladás kiterjedésének meghatározása.....	18
5.4. Gyulladás paraméterek vizsgálata	19
5.4.1. Mieloperoxidáz (MPO) aktivitásmérés	19
5.4.2. TNF- α szöveti mennyiségének meghatározása ELIZA módszerrel.....	19
5.5. HO enzimaktivitás mérés.....	20
5.6. HO-1 enzim expressziós vizsgálat.....	21
5.7. H ₂ S-termelő enzimek expressziójának vizsgálata colon mintákban.....	21
5.8. Fehérjetartalom meghatározása	22
5.9. Statisztikai analízis	22
6. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK.....	23
6.1. A H ₂ S-donor kezelés hatása a TNBS indukálta nyálkahártya léziók kiterjedésére ..	23
6.2. A TNBS indukálta makroszkópos nyálkahártya gyulladás kiterjedése patkány vastagbélben.....	24
6.3. Gyulladás paraméterek változása a H ₂ S-donor kezelés hatására.....	25
6.3.1. Mieloperoxidáz enzim aktivitásának változása.....	25
6.3.2. A colonban mért szöveti TNF- α szint változása	26
6.4. TNBS illetve H ₂ S-donor hatása a HO-1 enzim expressziójára és a HO aktivitásra .	27

6.5. HO aktivitás gátló kezelés hatás a lézió kiterjedésére vastagbélben	28
6.6. H ₂ S-termelő enzimek expressziójának változása vastagbélben.....	29
7. ÖSSZEFOGLALÁS	30
8. IRODALOMJEGYZÉK	
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	
10. NYILATKOZAT	

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3-MST: 3-merkaptopiruvát-szulfutranszferáz enzim

5-ASA: 5-aminoszalicilsav

BSA: borjú szérum albumin (bovine serum albumine)

CAT: kataláz enzim

CBS: cisztation- β -szintáz

cGMP: ciklikus guanozin monofoszfát

CMC: karboxilmetil-cellulóz

CO: szén-monoxid

COX: ciklooxigenáz enzim

COX-1: ciklooxigenáz-1 enzim

COX-1: ciklooxigenáz-1 enzim

COX-2: ciklooxigenáz-2 enzim

COX-2: ciklooxigenáz-2 enzim

CSE/CGL: cisztation- γ -liáz

CSE: cisztation-gamma-liáz

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

Fe³⁺: három vegyértékű ferri vas

H₂O₂: hidrogén-peroxid

H₂S: kénhidrogén

HEPES: N-2-hidroxiethylpiperazin-N-2-etánszulfát

HO: hem-oxigenáz enzim

HO-1: hem-oxigenáz-1 enzim

HO-2: hem-oxigenáz-2 enzim

HO-3: hem-oxigenáz-3 enzim

HOCL: hipoklórsav

IBD: gyulladásos bélbetegségek (Inflammatory Bowel Diseases)

IL-1: interleukin-1

IL-6: interleukin-6

iNOS: indukálható nitrogénmonoxid-szintáz

MAPK: p38 mitogén aktivált protein kináz
MMP: mátrix metalloproteináz enzim
MPO: mieloperoxidáz enzim
MST: merkaptopiruvát-szulfutranszferáz
Na₂S: nátrium-szulfid
NaHS: nátrium-hidroszulfid
NF-κB: nukleáris faktor-kappa B
NO: nitrogén-monoxid
NOS: nitrogénmonoxid-szintáz enzim
NSAIDs: nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszerek (Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)
ONOO⁻: peroxinitrit
P5P: piridoxál-5-foszfát
PBS: foszfát puffer
PMSF: fenilmetil-szulfonil-fluorid
RONS: reaktív oxigén és nitrogén származékok
SASP: szulfaszalazin
SDS: nátrium-dodecil-szulfonát
sGC: szolubilis guanilát cikláz
SnPP: ón-protoporfirin IX
TNBS: 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsav
TNF-α: tumor nekrosis faktor-α
ZnPP: cink-protoporfirin

3. BEVEZETŐ

3.1. A gyulladásos bélbetegségek

A gyulladásos bélbetegségek (IBD, Inflammatory Bowel Disease) a gasztrointesztinális rendszer ismeretlen eredetű, krónikus kórképei. A hosszantartó gyulladásos folyamat következtében az érintett területek morfológiája és funkciója súlyosan károsodik. Két alapvető formájuk ismeretes: a colitis ulcerosa és a Crohn betegség. Elkülönítésük és a pontos diagnózis klinikai, endoszkópos és szövettani jellegzetességeik alapján lehetséges. Colitis ulcerosában a gyulladásos reakció csak a bél nyálkahártyájára és a submucosára lokalizálódik, és a gyulladt területek általában összefüggő szakaszokat alkotnak. Ennél a kórképnél a léziók és a felszíni fekélyek jellemzően a vastagbél területén jelennek meg, amelyek műtéti eltávolítása kuratív lehet. A Crohn betegséget transzmurális, granulomatózus gyulladás jellemzi. A bélfal egészére kiterjedő krónikus gyulladás miatt jellemző a bélfalvastagodás, gyakori a bélszakaszok közötti sipolyok megjelenése. A gasztrointesztinális traktus egészét érintheti, de leggyakrabban az ileum disztális részén, valamint a colonban jelentkezik. A gyulladt területek nem alkotnak összefüggő szakaszokat, ép és kóros területek váltakoznak (Strober, Ludviksson et al. 1998). Általános tünet mindkét betegségénél a véres hasmenés, a gyulladás miatt kialakuló láz és a tápanyagok felszívódási zavara miatt bekövetkező fogyás. A diagnózisok kis százalékában a két forma nem különböztethető meg, mely esetekben indeterminált colitistről beszélünk (Apgar 1991).

A gyulladásos bélbetegségek pontos etiológiája a mai napig ismeretlen. Egy multifaktoriális betegcsoportról van szó, amelynek kialakulása több tényező kölcsönhatásának eredménye. Az egyik tényezőnek a genetikai predispozíciót tekintik, a veleszületett vagy az élet során szerzett hajlamhoz feltehetően egyéb kiváltó tényezők is társulnak. A genetikai hajlamot számos genetikai és környezeti faktor befolyásolhatja. A helytelen életmódot, beleértve a mozgásszegény életvitelt, dohányzást, kiegyensúlyozatlan étrendet tekintik a legfőbb környezeti faktornak (Qin 2012). Egyes tanulmányok szerint a mikrobiális flóra jelentős szereppel bír a nyálkahártya gyulladás fenntartásában (Aranda, Sydora et al. 1997) Fiziológias körülmények között a gasztrointesztinális nyálkahártya-asszociált nyirokszerv (Gut Associated Lymphoid Tissue, GALT) tartja fenn az mikrobiális flóra egyensúlyát (Tezuka and Ohteki 2010). A GALT fontos szerepet játszik a

különböző élelmiszerek és probiotikus mikróbák szembeni orális tolerancia kialakulásában, illetve a nyálkahártya védelmében. Környezeti hatásokra felborulhat a bélnyálkahártya integritása, ami kontrollálatlan immunválaszt eredményezhet (Chandran, Sathaporn et al. 2003).

3.2. Az oxidatív stressz és a gyulladásos mediátorok szerepe IBD-ben

Az eddig említett tényezők mellett egyre nagyobb szerepet kap a gyulladásos bélbetegségek kutatásában az oxidatív stressz (Piechota-Polanczyk and Fichna 2014). Az élő sejtekben természetes módon keletkező szabadgyökök (RONS) az élettani, biokémiai, elektronátviteli reakciókban játszott szerepükből adódóan részt vesznek a sejtek közötti szignál transzdukcióban, enzimek aktiválásában és gátlásában, a sejtciklus szabályozásában, illetve apoptotikus és nekrotikus folyamatokban. A párosítatlan elektrontartalmuk miatt ezen molekulák rendkívül reakcióképesek, így sejtstruktúra és szövetkárosító hatással bírnak. Ha ezt a szervezet antioxidáns kapacitása már nem képes kivédeni, akkor beszélhetünk a redox-homeosztázis egyensúlyának felborulásáról, azaz oxidatív stresszről.

Kimutatták, hogy a bélepithélium károsodásában az oxidatív stressz kulcsfontosságú faktor (Bandyopadhyay, Biswas et al. 2001). Fő szerepét az epitheliális, mukozális és vaszkuláris károsodások kialakulásában látják. Az oxidatív stresszt kiváltó szabadgyökök termelődését fokozzák a különböző gyulladásos citokinek, melyek önmagukban és egymással kölcsönhatva is súlyosbítják az IBD lefolyását. Az akut fázis reakcióban szerepet játszó legfontosabb citokinek a TNF- α , IL-1 és IL-6, melyek pleiotróp hatásuk miatt fokozzák a gyulladás kiterjedését.

A gyulladt területen nagymértékű aktivált neutrofil granulocita szöveti infiltrációt írtak le. Ezen fehérvérsejtek a természetes immunválasz részei, szekretált proteolitikus enzimeik és reaktív metabolitjaik hozzájárulnak a mikróbák és más szervezatkárosító ágensek eliminációjához. A elhúzódó gyulladás eredményeként az aktivált immunsejtekből kontrollálatlanul proteolitikus enzimek (MPO, MMP) és prooxidáns tulajdonságú anyagok szabadulnak fel (H_2O_2 , HOCL) (Fialkow, Wang et al. 2007). A nagymértékben képződött szabadgyökök és enzimek kiterjedt szöveti károsodást idéznek elő vastagbélben (Bandyopadhyay, Biswas et al. 2001). Egyes kutatási eredmények szerint a RONS képes aktiválni transzkripciós faktorokat, mint például a NF- κ B-t (Nukleáris Faktor-kappa B),

amely számos gyulladást keltő gén expressziójának indukálásában szerepet játszik (Gloire, Legrand-Poels et al. 2006).

Fontos megemlíteni, hogy a bélepithélium sejtei fiziológiás körülmények között is termelnek RONS-t, amelynek valószínűleg a természetes immunitásban van szerepe. Ismeretes, hogy oxidatív stressz esetén megnő a bélepithélium sejteiben található indukálható nitrogén-monoxid szintetáz (iNOS) enzim aktivitása. A NOS izoformák által előállított nitrogén-monoxid (NO) fontos jelátvivő molekulaként funkcionál a szervezetben. Vazoaktív gázként szerepet játszik az értónus fiziológiás és patológiás értónus szabályozásában. Az iNOS által nagymennyiségben termelődött NO viszont kölcsönhatva a szabadgyökökkel, peroxinitritet képez, amely erősen toxikus molekula. A peroxinitrit növeli a sejtadhéziós molekulák expresszióját, és citokin-upregulációt vált ki (Dedon and Tannenbaum 2004).

A gyulladásos folyamat során az aktivált hízósejtekből és bazofil granulocitákból hisztamin és arachidonsav szabadul fel. Utóbbiból a ciklooxygenáz (COX) enzim hatására tromboxán és prosztaglandinok (PG), továbbá az 5-lipooxygenáz enzim hatására leukotriének szintetizálódnak. A prosztaglandinok központi szerepet töltenek be a fájdalom, láz és a gyulladás mediálásában, a leukotriének pedig további immunsejtek aktiválásán keresztül szabadgyökök és proteolitikus enzimek felszabadulását eredményezik. A COX enzimrendszernek eddig két izoformáját azonosították. Az indukálható COX-2 citokinek, bakteriális toxinok hatására indukálódik a gyulladásos szövetekben. Az általa szintetizált prosztaglandinok hozzájárulnak a gyulladás súlyosbodásához. A konstitutív COX-1 élettani szabályozó funkcióval rendelkezik, többek között a gyomor mukóza integritásának fenntartásában, és a vérlemezke aggregációban (Vane 2003).

A nagy mennyiségű pro-inflammatorikus mediátor jelenléte és az egyre növekvő számú aktivált fehérvérsejt egymással kölcsönhatva, illetve a gyulladást tovább erősítve mucosalis majd transmuralis léziók kialakulását idézik elő. Krónikus gyulladással járó bélbetegségekben az oxidatív stressz ilyen mértékű szövetkárosító hatását az endogén antioxidáns védekező mechanizmusok már nem képesek kivédeni.

3.3. Alkalmazott gyógyszeres kezelések

A jelenleg alkalmazott gyógyszeres kezelések elsősorban a gyulladásos aktiválódást próbálják gátolni, illetve a további szöveti károsodást megelőzni, és a gyógyult állapotot

fenntartani. Sebészi beavatkozásra a gyógyszeres terápia hatástalansága esetén kerül sor. A gyulladásos bélbetegségekben általánosan használt gyógyszerek hatásmechanizmusukat tekintve antiinflammációs vagy immunmoduláló szerek.

A legerősebb gyulladásgátlók a kortikoszteroidok, az akut rohamban a legfontosabb gyógyszerek. Hatásukat szisztémásan fejtik ki, emiatt hosszú távon súlyos mellékhatásokat alakíthatnak ki.

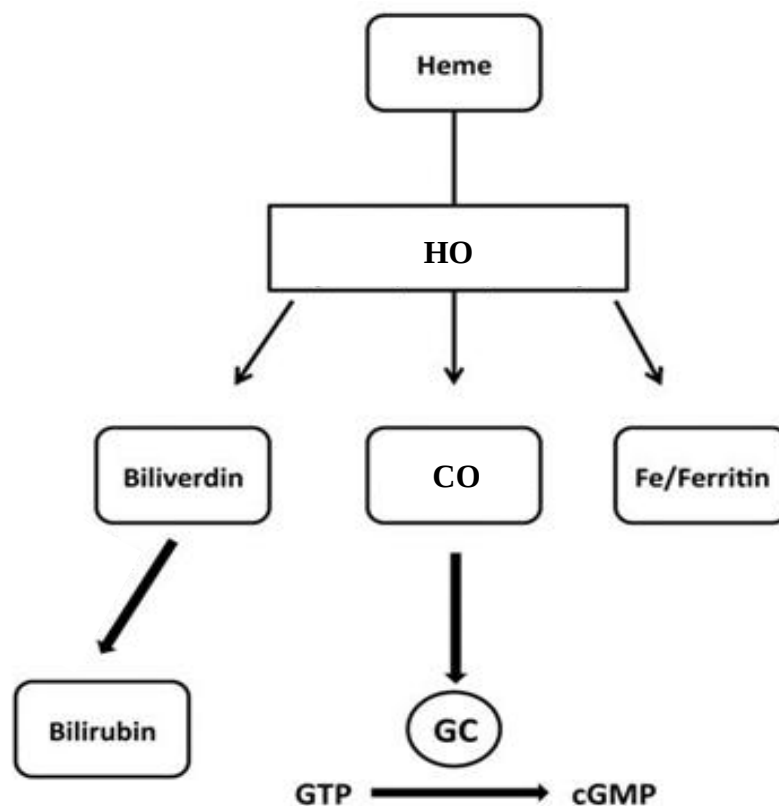
Az IBD kezelésére széles körben használt gyógyszercsoport a nem szteroid típusú gyógyszerek (NSAIDs; Non-Steroid Antiinflammatory Drugs), melyek hatásmechanizmusában alapvető a COX enzimrendszerrel való kapcsolatuk. A NSAID-ok nem szelektíven gátolják a COX enzimek működését, ezáltal a PG szintézist. A gátlás lehet irreverzibilis vagy reverzibilis, kompetitív. A bél nyálkahártyájával közvetlenül érintkezve csökkentik a gyulladást, rendelkeznek általános fájdalomcsillapító hatással és a PG-szint csökkenés miatt a gyulladás miatt kialakult lázat is mérséklék. A legismertebb NSAID-ok a különféle szalicilsav-, propionsav-, és ecetsav származékok. Ezen vegyületek számos jótékony hatásuk mellett ulcerogén hatással is rendelkeznek, mert többségük gátolja COX-2 és a konstitutív COX-1-t is, mely utóbbi gátlása gasztrointesztinális mellékhatások kialakulását eredményezi (Beck, Xavier et al. 2000, Takeuchi, Tanaka et al. 2002).

Az emésztőrendszer mikrobiális flórája egyes kutatások szerint szintén szerepet játszik a nyálkahártya gyulladás fenntartásában, ezért az IBD kiegészítő kezelésében antibiotikumokat is alkalmaznak. A gyulladásos folyamat gátlásának másik lehetséges támadási pontja az immunsejtek számának, illetve a gyulladásos citokinek mennyiségének csökkentése. Erre immunszuppresszorokat, vagy TNF- α inhibitorokat alkalmaznak (Billiet, Rutgeerts et al. 2014).

3.4. A HO enzimrendszer feltételezett hatásmechanizmusa

Az oxidatív stresszel szembeni endogén védekező mechanizmusok kutatása során a közelmúltban egy új enzimrendszer került előtérbe: a hem-oxigenáz enzimrendszer (HO). Tagjai a hemdegradáció kezdő lépését katalizálják (Tenhunen, Marver et al. 1969). A hem protoporfirin gyűrűkomplex, ami központi vasatomot tartalmaz. Számos fehérje és enzim tartalmaz hemet prosztetikus csoportként, ami képessé teszi ezen makromolekulákat az oxigénmolekula nagy affinitású és reverzibilis megkötésére. A HO enzimek lebontják a porfiringyűrűt, ami ekvimoláris mennyiségű biliverdint, ferri vasat (Fe^{3+}) és szén-

monoxidot (CO) eredményez. A biliverdin a máj által szintetizált biliverdin-reduktáz hatására bilirubinná alakul tovább (Tenhunen, Marver et al. 1969) (1. ábra).



1. ábra: A HO enzimrendszer katalizált hem metabolizmus. A HO enzimek katalizálják a hemdegradáció kezdő és sebesség meghatározó lépését. A reakció során ekvimoláris mennyiségű biliverdin, szabad vas és CO szabadul fel. A biliverdin a celluláris biliverdin-reduktáz hatására bilirubinná alakul, a CO a guanilát cikláz (GC) aktiválásán keresztül lokális vazodilatációt idéz elő, a prooxidáns ferri vas ferritinhez kötődve transzportálódik (Moody and Calvert 2011, által szerkesztve).

A HO enzimrendszernek három tagja ismert (Maines 1988). A konstitutív izoenzimek a HO-2 és HO-3, az indukálható forma a HO-1, amelyet Hsp 32-nek (Heatshock Protein 32) is neveznek. A HO-1 enzim fiziológias körülmények között legnagyobb mennyiségben a lépből mutatható ki (Braggins, Trakshel et al. 1986), de egyéb szövetekben is expresszálódik oxidatív stresszt indukáló faktorok hatására. Ilyen stimulusok lehetnek a nehézfém ionok, UV-sugárzás, iszkémia, hypoxia, NO (Maines 2005, Ryter, Alam et al. 2006). A konstitutív formák expresszióját és aktivitását ezen stimulusok nem befolyásolják szignifikánsan. A HO-2-t kimutatták az erek

simaizomrétegében és az endotélben. Feltételezhető, hogy a HO-2 hem metabolizmusa során felszabaduló CO szerepet játszik a lokális vazokonstriktó szabályozásában (Zakhary, Gaine et al. 1996). A HO-3-t számos más szövetből sikeresen izolálták, de pontos biológiai funkciója még ismeretlen (Wu and Wang 2005).

A kutatási eredmények alapján egyre több biológiai funkciót társítanak a HO által katalizált reakció termékeinek. A biliverdin és bilirubin protondonor tulajdonságuk miatt redukáló gyökök, így potenciálisan antioxidáns hatással bírnak. Ezzel szemben a folyamat során felszabaduló ferri vas prooxidáns tulajdonságú, amelyet az apoferritin köt meg. A folyamat harmadik terméke, a CO jelátvivő molekulaként gyulladáscsökkentő és antiapoptotikus hatással rendelkezik. Ezen biológiai hatások a mitogénaktivált protein kináz útvonal modulálásából eredeztethetők. A CO képes a sGC aktiválására, ezáltal a cGMP intracelluláris szintjének emelésére. Hasonlóan a NO-hoz, a sGC útvonalon hatva a CO szerepet játszhat a fizioiógias és patológiás értónus szabályozásában (Wu and Wang 2005). A HO és a NOS enzimrendszerek működése között számos hasonlóság figyelhető meg, és feltételezhető, hogy a két vazoaktív gáz modulálja egymás hatását (Foresti and Motterlini 1999).

Munkacsopórtunk korábbi eredményei alapján elmondható, hogy a HO-1 enzim fontos résztvevője az antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással rendelkező enzimeknek (Varga, Laszlo et al. 2007). Aktivitás növekedését tapasztalták TNBS indukálta vastagbél gyulladós patkánymodellben, illetve endogén szubsztátjának, a hemnek napi adagolásával. A HO-1 indukciója gyulladáscsökkentő folyamatokat képes indukálni. A gyulladás súlyosbodását tapasztalták, ha szintetikus metalloporfirinekkal gátolták a HO aktivitást. A gyulladós bélbetegségek kezelésére általánosan használt amino-szalicilsav származékok bizonyítottan fokozzák a HO aktivitását kísérletes körülmények között (Horvath, Varga et al. 2008).

3.5. A kénhidrogén metabolizmusa, biológiai hatásai

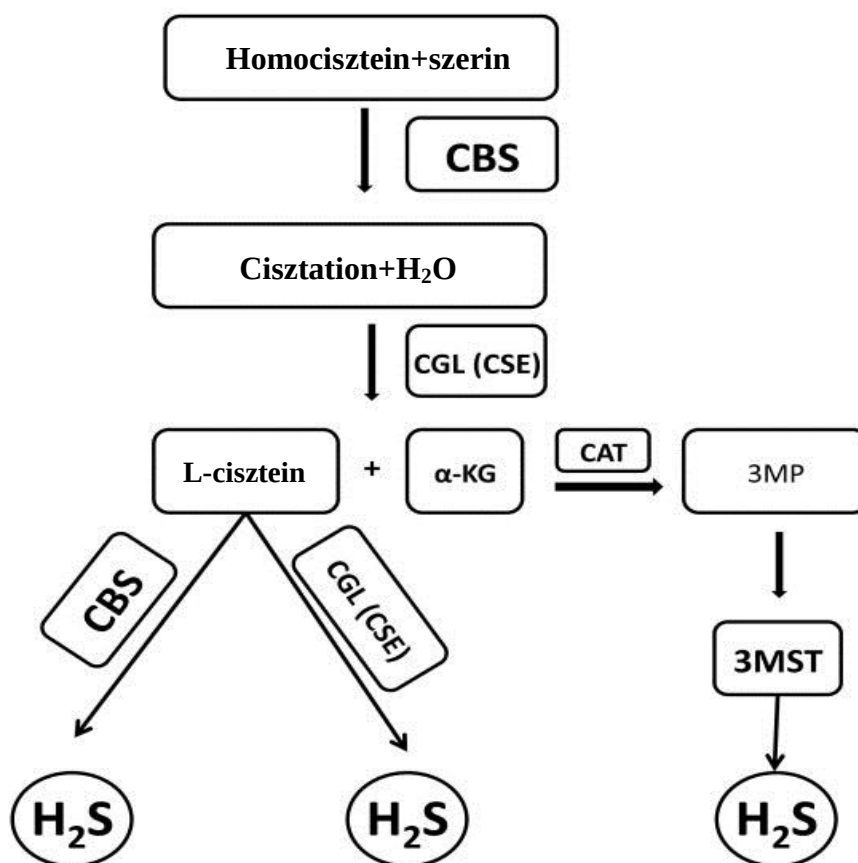
A kénhidrogén (H_2S) fizikai paramétereit tekintve színtelen, gyúlékony, vízben oldható, kismolekula-tömegű gáz, jellegzetes szaggal. Néhány évtizede is elsősorban toxikus és nagy mennyiségben környezetszennyező gázként tartották számon (Szabo 2012), habár Warenycia és munkatársai már 1989-ben leírták, hogy a patkány agyszövet természetes körülmények között is tartalmaz viszonylagos magas koncentrációban ($54 \mu M$)

H₂S-t (Warenycia, Goodwin et al. 1989). Az utóbbi években bebizonyosodott, hogy a H₂S fontos mediátor az emlős szervezetben a NO és CO mellett, így fontos jelátvivő molekulaként funkcionál (Vandiver and Snyder 2012). Számos tanulmány beszámol a H₂S széles koncentrációtartományban (10-300 µM) kifejtett hatásairól. A szakirodalmi adatok alapján a H₂S koncentráció különféle szövetekben változatos értéket mutat: agyban 47-166 µM (Goodwin, Francom et al. 1989, Savage and Gould 1990); májban 26 µM (Ogasawara, Isoda et al. 1994); de leírtak már 144 µM-t is (Mitchell, Savage et al. 1993); vesében is változó koncentrációt állapítottak meg, 40 (Ogasawara, Isoda et al. 1994), illetve 200 µM-t (Mitchell, Savage et al. 1993); szívben 130 µM-t (Ogasawara, Isoda et al. 1994); tüdőben pedig 30 µM-t (Dorman, Moulin et al. 2002). Valószínűsíthető, a H₂S koncentrációkban tapasztalt ekkora mértékű eltérések a különböző detektálási eljárásoknak és módszereknek tudható be. Egy 2008-ban megjelent publikáció eredményei alapján a H₂S szöveti és szérum koncentrációja három nagyságrenddel is alacsonyabb lehet az eddig megállapított értékeknél (Furne, Saeed et al. 2008), mindazonáltal a szerteágazó biológiai folyamatokban betöltött moduláló szerepe elfogadott.

A H₂S gázotranszmitterként a koncentrációjától függően számos fiziológiai vagy patofiziológiai folyamat szabályozásában részt vesz (Szabo 2007, Kimura, Shibuya et al. 2012). A NO-hoz hasonlóan, a H₂S is részt vesz az értónus és a vérnyomás modulálásában, a K⁺-csatorna aktivitásának szabályozásán, és ezen keresztül a celluláris cGMP szint növelésén keresztül. Egerekben a H₂S-t előállító CSE enzim genetikai deléciójával a vérnyomás növekedését figyelték meg (Yang, Wu et al. 2008). A kardiovaszkuláris rendszerben több tanulmány is beszámol az exogén úton bejuttatott H₂S citoprotektív hatásáról (Johansen, Ytrehus et al. 2006, Szabo 2007). A H₂S-el végzett prekondíció sikeresen csökkentette az iszkémia/reperfúzió során létrejött miokardiális sérülés kiterjedését patkány szívben (Hu, Chen et al. 2008). A H₂S a gasztrointesztinális rendszerben szerepet játszik a nyálkahártya réteg integritásának megőrzésében és a gyomor mukóza vérkeringésének fenntartásában (Kolluru, Shen et al. 2013).

A gyulladásos folyamatokban moduláló szerepet tölt be. Csökkenti a leukocita adhéziót és az immunsejtek gyulladt területre történő migrációját (Zanardo, Brancialeone et al. 2006). Génexpressziót szabályozó hatása révén csökkenti a proinflammatorikus mediátorok, gyulladásos citokinek, kemokinek és enzimek mennyiségét, és indukálja a neutrofil granulociták apoptózisát (Dufton, Natividad et al. 2012, Wallace, Ferraz et al. 2012).

A H_2S enzimatis bioszintézise L-ciszteinből indul, melyet három enzim katalizál: a cisztation- γ -liáz (CGL, de ugyancsak elfogadott rövidítése a CSE is); cisztation- β -szintáz (CBS) és a cink-dependens 3-merkaptopiruvát-szulfutranszferáz (3-MST). Az enzimatis útvonalak összefoglalása a 2. ábrán látható.



2. ábra: A H_2S bioszintézisének enzimatis útvonala. Az emlős szervezetben három enzimatis útvonalon történik a H_2S bioszintézise. A cisztation- β -szintáz (CBS) H_2S -t állít elő L-ciszteinből, ezzel párhuzamosan a cisztationin keletkezését is katalizálja homociszteinből. A képződött cisztationin a cisztation- γ -liáz (CSE) szubsztrátja, melyből az enzim L-cisztein keletkezésén keresztül állít elő H_2S -t. A 3-merkaptopiruvát-szulfutranszferáz (3-MST) a cisztein-aminotranszferáz (CAT) enzimmal együttműködve L-ciszteinből H_2S -t termel α -ketoglutarát (α -KG) jelenlétében (Moody and Calvert 2011).

Ezen enzimek szövetspecifikus lokalizációval rendelkeznek. A CBS jellemzően a központi idegrendszerben és a májban található nagyobb mennyiségben, a CSE enzimet egyéb szövetekben (pl.: máj, kardiovaszkuláris rendszer, simaizomsejtek) írták le, míg a 3-MST az agyban és az endotélrétegben expresszálódik (Kolluru, Shen et al. 2013). Azonban

beszámoltak már a CBS és CSE együttes előfordulásáról májban és vesében (Calvert, Coetzee et al. 2010), illetve nagy mennyiségben expresszálnak a vastagbél nyálkahártyájában. A vékony- és vastagbél nyálkahártyája önmaga előállít H_2S -t, ahogyan a lumenben található számos baktériumtörzs is. A relatíve nagy koncentrációban felszabaduló H_2S -t az epitheliális sejtek mitokondriális enzimszrendszere képes eliminálni, az epithélium rétege pedig, mint „metabolikus barrier” gátat szab a H_2S lokális felszívódásának. Egyes kutatások szerint a colon epithelsejtjei a H_2S energiaforrásként való hasznosításához leginkább adaptálódott sejtek. Feltételezések szerint a H_2S gasztrointesztinális rendszerben betöltött protektív hatása ennek a mechanizmusnak is tulajdonítható (Chan and Wallace 2013).

Az endogén H_2S fő forrásai a CBS és a CSE, konzervált szerkezettel rendelkező hemfehérjék, melyek piridoxál-5-foszfátot (P5P) igényelnek kofaktorként a működésükhöz. Szubcelluláris elhelyezkedésüket tekintve a CSE és CBS elsődlegesen a citoplazmában, a 3-MST mind a mitokondriumban mind pedig a sejtplazmában megtalálható. Mindezek mellett nem kizárt, hogy a H_2S nem enzematikus módon, a glükóz, glutation, szerves és szervetlen poliszulfidok átalakulásán keresztül is keletkezhet, de ennek a pontos mechanizmusa még nem tisztázott (Kolluru, Shen et al. 2013).

Napjainkban az endogén H_2S élettani hatásairól rendelkezésre álló ismeretanyag folyamatosan bővül, és egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a patofiziológias folyamatokban betöltött protektív szerepének.

3.6. H_2S -donorok terápiás alkalmazása

A H_2S emittáló vegyületeket nevezzük H_2S -donoroknak. A H_2S -t felszabadító vegyületek széleskörű hatásmechanizmussal rendelkeznek, melyek közül kiemelendő a gyulladásgátló hatásuk. Napjainkban a H_2S -donorok potenciális terápiás hatékonysága még vitatott. Ellentmondás, hogy a donor vegyületek fejlesztése még korai fázisában tart, miközben a H_2S , mint gáztranszmitter tanulmányozása évtizedek óta zajlik. Továbbá, annak ellenére, hogy a H_2S szerteágazó élettani hatással és számos biológiai funkcióval bír, az egyes H_2S -donorok vizsgálata csak egy jól körülhatárolt területen zajlik (Song, Ng et al. 2014).

A H_2S rokon vegyületeit gyakran alkalmazzák kísérletes körülmények között H_2S -donorként, mint például a nátrium-szulfidot (Na_2S) és nátrium-hidroszulfidot ($NaHS$). A

Na₂S beadás csökkentette a gyulladásos citokinek szintjét rágsáló modellben (Esechie, Kiss et al. 2008), és akut arthritis esetén is regisztrálták anti-inflammatorikus hatását (Andruski, McCafferty et al. 2008). A NAHS gátolta a leukocita adhéziót, az ödéma kialakulását, és így csökkentette a gyulladás mértékét rágsálómodellben (Zanardo, Brancaleone et al. 2006). Ezen vegyületek hátránya a rövid életidő, a H₂S felszabadulása a hidrolízisük miatt gyors, emiatt esetükben nehéz egy állandó celluláris H₂S-szintet fenntartani (Song, Ng et al. 2014).

Az emlős szervezeten kívül számos más organizmus előállít természetes kén tartalmú vegyületeket, amelyek H₂S-donorként viselkednek in vivo/in vitro. A legismertebb a fokhagymában (*Allium sativum*) található allicin, és a különféle gombatorzsek által előállított ergotionein és lenthionin. Többek között antioxidáns és tumorelles hatással rendelkeznek. A természetes H₂S-donor vegyületekből enzimátikus vagy nem enzimátikus útvonalakon keresztül H₂S szabadul fel a szervezetben.

Mindemellett számos szintetikus H₂S-donor vegyületet kifejlesztettek, amelyek kémiailag heterogén tulajdonságúak. Előnyük, hogy előállításuk során szabályozható a H₂S-felszabadulás mértéke. Kiemelném közülük a NSAID-származékokat, ahol a NSAID gyökhöz H₂S-t felszabadító csoportot kapcsoltak. Hasonlóan az eredeti NSAID aktív hatóanyagához, gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek, de emellett csökkentik a gasztrointesztinális toxicitást. A mezalamin vagy meszalazin (5-aminoszalicilsav) az egyik leggyakrabban alkalmazott, gyenge hatású NSAID-ok aktív hatóanyaga. A mezalamin H₂S-donor vegyülete, az ATB-429 nemcsak a colitis súlyosságát redukálta le az egereken végzett kísérlet ideje alatt, hanem szignifikánsan csökkentette a MPO aktivitást és a gyulladásos markerek expresszióját. Mindezen hatások a mezalamin esetében nem voltak megfigyelhetők (Fiorucci, Orlandi et al. 2007). A H₂S-releasing naproxen származék (ATB-346) esetében hasonlókat figyeltek meg. Gyulladáscsökkentő aktivitása hasonló az alap NSAID gyógyszeréhez, viszont használata mellett a gyulladás miatt kialakult léziók és fekélyek szignifikánsan gyorsabb gyógyulását regisztrálták (Wallace, Caliendo et al. 2010, Wallace, Ferraz et al. 2012). A széles körben alkalmazott diklofenák is jelentős mértékű gasztrointesztinális toxicitással rendelkezik. Származéka, az ATB-337 csökkentette a gasztrointesztinális károsodást, miközben hasonló mértékben szupresszáta a prosztaglandin szintézist, mint a diklofenák (Wallace, Caliendo et al. 2007).

A H₂S-t felszabadító NSAID származékokkal elvégzett nagyszámú kísérlet alátámasztja azt a feltevést, miszerint ezen vegyületek új terápiás lehetőséget biztosíthatnak a gyulladásos bélbetegségek kezelésében.

4. CÉLKITŰZÉSEK

Kísérleteink első részében a TNBS indukálta colitis patkánymodellben a H₂S-donor hatásának vizsgálatát tűztük ki. Vizsgálataink során tisztázni kívántuk, hogy

- a TNBS által kiváltott colon lézió kiterjedésére milyen hatással van a különböző dózisokban alkalmazott H₂S-donor kezelés?
- az akut bélgyulladás modellben a gyulladásos paraméterek (szöveti TNF- α szint, MPO aktivitás) milyen mértékű változása következik be a H₂S-donor kezelés hatására?
- a H₂S dózis-hatás függésének ismeretében melyik a leghatásosabb H₂S-dózis?
- hogyan változik a colonocyták H₂S-termelő enzimapparátus expressziója az etanollal és TNBS-sal kezelt állatok esetében?

Munkánk következő szakaszában a H₂S-donor és a HO enzimrendszer közötti kölcsönhatásokat vizsgáltuk. Ehhez a leghatásosabbnak bizonyult H₂S-donor dózissal folytattuk tovább a kezelést, miközben vizsgáltuk a HO enzimrendszer változásait. Arra kerestük a választ, hogy a továbbra is alkalmazott TNBS indukálta colitis modellben

- a leghatásosabb H₂S-dózis milyen hatást fejt ki a HO enzimrendszer aktivitására és a HO-1 enzim expressziójára?
- hogyan befolyásolja a HO enzimaktivitás gátló anyag (SnPP, ón-ptoroporfirin) a H₂S protektív hatását?

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. A TNBS indukálta colitis patkánymodell

A humán gyulladásos bélbetegségek kísérletes modellezésére az egyik széles körben alkalmazott eljárást, a TNBS (2, 4, 6-trinitrobenzol-szulfonsav) által kiváltott colitist alkalmaztuk patkányban (Morris, Beck et al. 1989). Ez a rágsáló modell jól reprodukálja a colitis ulcerosa-ban szenvedő betegekre jellemző patológiai elváltozásokat a vastagbélben. A TNBS-t (10 mg/állat) 50%-os etanolban oldottuk, amely már önmagában is károsítja a nyálkahártyát és megkönnyíti az anyag bejutását a sejtek közé. Az epiteliális gát sérülését követően gyulladásos kaszkád mechanizmusok indulnak meg. A TNBS, amely egy haptén vegyület, képes kötődni a vastagbél nyálkahártya saját fehérjéihez, s ezen haptén-fehérje komplexek az interleukin-12 és a T helper-1 közvetítette immunválaszt váltanak ki. Az aktivált makrofágok gyulladásokeltető mediátorokat szabadítanak fel, amelyek elhúzódozó immunválaszt generálnak, és ez a bélfal minden rétegét érintő gyulladásához vezet (Kawada, Arihiro et al. 2007). Rágsálókban több, mint 8 héten át tartó, krónikus transmurális bélgyulladást idéz elő, kifejezett súlyvesztéssel, morfológiai elváltozásokkal, szöveti TNF- α szint emelkedéssel, és granulocita akkumulációval.

A TNBS-t intracolonalisan egy 8 cm hosszúságú polietilén kanül segítségével juttattuk be, átmeneti dietil-éteres bódítás mellett. A kezelést az állatok 12 órás éhezése előzött meg. A mintavétel minden esetben a kezelést követően 72 órával történt.

5.2. Vizsgált állatcsoportok

Kísérleteinkben 200-250 gramm közötti hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat standard körülmények között (hőmérséklet, világítás, páratartalom) tartottuk. A patkányok csapvizet kaptak és standard granulát patkánytápot (Bioplan, Isaszeg) fogyasztottak. A kísérleteket a Szegedi Tudományegyetem által elfogadott Állatkísérletes Etikai Kódex előírásai szerint végeztük. Az állatokat csoportokra bontva kezeltük a TNBS beadástól számítva 72 órán keresztül.

A kísérletek első sorozatánál az állatok egy csoportja semmilyen kezelésben nem részesült (KONTROLL). A további csoportok mindegyikénél elvégeztük a TNBS intracolonalis beadását, majd az állatok egy része nem részesült további kezelésben (TNBS). A H₂S-termelő enzimek expressziójának vizsgálatához kialakítottunk egy olyan csoportot, amelyben az állatok csak a TNBS oldószerét, 50 %-os etanolt kaptak

intracolonalis úton a kísérlet első napján. A további csoportok a TNBS kezelést követően Lawesson's reagenst kaptak H₂S-donorként hét különböző dózisban (60; 15; 7,5; 3,75, 1,87; 0.83 µM/ 0,5 ml karboxi-metil-cellulóz/ állat) per os, napi két alkalommal. A 72 órás periódus alatt a kezelések során pozitív kontrollként szulfaszalazint (SASP) alkalmaztunk. A SASP a meszalazin kéntartalmú származéka, melynek aktív hatóanyaga a szalicilsav. Kutatócsoportunk korábbi eredményeire támaszkodva a meszalazin (5-aminoszalicilsav) gyulladáscsökkentő hatása mellett a HO aktivitásnövelő, és ezáltal protektív szerepét is vártuk (Horvath, Varga et al. 2008). A szulfaszalazint orális úton juttattuk be, napi két alkalommal 25 mg/ttkg dózisban, fiziológiás (NaCl 0,9%) sóoldatban oldva.

Munkánk második felében a HO-enzimaktivitás gátlására egy szintetikus metalloporfirint, ón-protoporfirint (SnPP; 30 µM/kezelés/állat) használtunk, melynek beadása napi egy alkalommal, subcutan injekció formájában történt, TNBS és H₂S-donor előkezelést követően vagy anélkül.

Az állatcsoportok és az alkalmazott kezelések vázlatszerű összefoglalása (n=4-11):

- **KONTROLL** (TNBS beadás és további kezelés sem történt)
- **TNBS** (10 mg/250 µl 50%-os etanol/állat; intracolonalis beadás)
- **ETOH** (250 µl 50%-os etanol/állat; intracolonalis beadás)
- **TNBS+SASP** (szulfaszalazin; 25 mg/ttkg insaline; napi 2x; per os)
- **TNBS+H₂S** (Lawesson's reagens; 60; 30; 15; 7.5; 3,75; 1,87; 0,93 µM/ 0,5 ml karboxi-metil-cellulóz/állat; napi 2x; per os)
- **SnPP KONTROLL** (ón-protoporfirin; 30 µM/állat/kezelés; subcutan; nincs megelőző TNBS és H₂S-donor kezelés)
- **TNBS+H₂S+SnPP** (ón-protoporfirin; 30 µM/állat/kezelés; subcutan; van megelőző TNBS, illetve a megfelelő dózisú H₂S-donorról való kezelés)

5.3. Nyálkahártya gyulladás kiterjedésének meghatározása

Minden csoportban az állatok cervikális diszlokációját követően, a hasfal felnyitása után, a distalis colon anustól számított 8 cm-es szakaszát eltávolítottunk. A bélszakaszt hosszanti irányban felmetszettük és hideg foszfát pufferban (0,2 M NaH₂PO₄ oldat/250 ml desztillált víz; pH. 7,4) való átmosás után kipreparáltuk. A kezelések hatására a vastagbél nyálkahártyájában bekövetkező gyulladás illetve lézió kiterjedését planimetriás analízissel határoztuk meg. A gyulladt terület százalékos kiterjedését a 8 cm-es bélszakaszhoz

viszonyítva fejeztük ki, melyet a munkacsoportunk által kifejlesztett program segítségével határoztuk meg (STAT_2_1_1).

5.4. Gyulladásí paraméterek vizsgálata

5.4.1. Mieloperoxidáz (MPO) aktivitásmérés

A mieloperoxidáz enzim az aktivált neutrofil granulocitákból szabadul fel, melyek szöveti infiltrációja megfigyelhető akut gyulladás során. Így a MPO enzimaktivitásával jól jellemezhető a gyulladás mértéke (Bradley, Christensen et al. 1982). A minták homogenizálását a feldarabolt colon tömegéhez viszonyított mennyiségű (250 mg colon/ 1 ml puffer), 0,5 % hexadecil-trimetil-ammónium bromidot (HETAB) tartalmazó foszfát pufferben (50 mM, pH 6,0), jégen végeztük, Ultra-turrax homogenizáló (Ultra-turrax T25 IKA-Labortechnik) segítségével. A mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd 37 °C-on vízfürdőben felolvasztottuk. A fenti folyamatot háromszor megismételtük. Ezt követően mintáinkat centrifugáltuk (1000 rpm; 4 °C; 15 perc), majd a felülúszóval dolgoztunk tovább. A MPO méréseinkhez peroxidázt használtunk standardként (0;0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 U/ml). A mérés során 96-lyukú Elisa plate-be tettünk 280 µl O-dianizidin39 dihidrokloridot (0,167 mg/ml foszfát puffer). Ehhez adtunk a felülúszónkból vagy a standardunkból 12 µl-t és a reakciót 10 µl 0,03%-os hidrogén-peroxiddal indítottuk. 90 másodperces rázatás után 490 nm-en Elisa reader (Benchmark Microplate reader, Bio-Rad Labs) segítségével mértük a kialakult színváltozásokat.

Eredményeinket mU/ mg fehérjére vonatkoztattuk.

5.4.2. TNF- α szöveti mennyiségének meghatározása ELIZA módszerrel

A TNF- α az egyik legjelentősebb citokin az akut fázis reakcióban, így mennyisége alkalmas a gyulladás mértékének leírására. Kísérleteinkben a Hycult biotechnology b.v. (Hbt) patkány TNF- α HK102-es számú Elisa kitet használtuk a kithez küldött protokoll alapján.

Az előkészítés során Greenburger puffert (NaCl 300 mmol/l; TRIS 15 mmol/l; MgCl 2 mmol/l; Pepstatin-A 100 ng/ml; Leupeptin 100 ng/ml; Aprotonin 100 ng/ml; pH 7.4) alkalmaztunk. A minták homogenizálását (Ultra Thurrax; 13000 rpm; 2x30 s) ötszörös volumenű pufferban, jégen végeztük. Ezt követően lecentriguáltuk (30 perc; 10000 g; 4 °C) mintáinkat, majd a felülúszóval dolgoztunk tovább, amelyet a méréshez ötszörösére hígítottuk. A mérésnél a fenti kithez küldött protokoll alapján elkészítettük a szükséges

oldatokat. A reakció első lépéseként a kapott platekre felvittük a TNF- α standardsorozatból és a mintáinkból 100-100 μ l-t. A módszer alapja, hogy a platek aljára fixált elsődleges antitest az inkubációs idő alatt (2 óra; 37°C) megkötötte a mintáinkban jelen lévő TNF- α -t, majd a feleslegben alkalmazott oldatot háromszori mosással eltávolítottuk. Az ezt követően felvitt biotinált TNF- α ellenes antitesttel (100 μ l) 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten végeztünk inkubációt, amely hozzákötődött a TNF- α -elsődleges antitest komplexhez. A továbbiakban újabb háromszori mosást követően, streptavidin-peroxidáz enzim konjugátumot (100 μ l; 1 óra inkubációs idő szobahőmérsékleten; 3x mosás) adtunk a reakcióelegyhez, majd pedig szubsztrátként tetrametil-benzidint (TMB; 100 μ l; 25 perc; 25 °C, sötétben) alkalmaztunk. A reakciót citromsav oldattal (100 μ l) leállítottuk, a spektrofotometriás mérést 450 nm-en végeztük el.

Eredményeinket pg/mg fehérjére vonatkoztattuk.

5.5. HO enzimaktivitás mérés

Munkacsoportunk már számos előző kísérlet során bizonyította, hogy a HO-enzim egy fontos résztvevője az antioxidáns enzimrendszereknek. Aktivitásnövekedését tapasztalták TNBS indukálta colitisben, így aktivitásának monitorozása egy fontos szempont lehet a gyulladáscsökkentő hatásának feltérképezésében.

Kísérletünkben a HO enzimaktivitást colon szövetből határoztuk meg. Tenhunen módszerén változtatva, a hemdegradáció során keletkező bilirubin mennyiséget mértük spektrofotometriás módszerrel (Tenhunen 1969). A porított minták homogenizálását (Ultra Thurrax, 2x30 mp, 13500 rpm) jégen végeztük, négyszeres mennyiségű homogenizáló pufferban (pH 7.4), ami tartalmazott: 10 mM HEPES-t; 32mM szacharózt; 0,1 mM EDTA-t; 10 μ g/ml tripszin inhibitort; 10 μ /ml leupeptint; 10 μ g/ml aprotonint és 1 mM DTT-t. Ezt követően a mintákat 20 percig, 15000 g-vel, 4 °C-on lecentrifugáltuk, majd a felülúszóval dolgoztunk tovább. A reakció során 1,5 ml inkubáló oldatot (pH 7.4) használtunk, ami tartalmazott: 100 mM KH₂PO₄-t; 2 mM MgCl₂x6H₂O-ot; 1 mM PMSF-t; 2 mM glükóz-6-foszfátot; 0,14 U/ml glükóz-6-foszfát-dehidrogenázt; 120 μ g/ml biliverdin-reduktázt és 15 μ M hemint. A mérésnél az inkubáló oldathoz 150 μ l minta felülúszót adtunk, majd a reakciót 100 μ l NADPH (150 μ M) hozzáadásával elindítottuk, ezt követően a mintákat 37 °C-on inkubáltuk egy órán keresztül. A reakció leállításához jeges fürdőt alkalmaztunk.

Standardként bilirubin oldatot használtunk (58,47 µg/ml; 10 µM). Vak csoportként NADPH-mentes reakció elegyet alkalmaztunk, amit azonnal lemértünk. A mérések 464 és 530 nm-en történtek, így a keletkezett bilirubin mennyiségét a különböző nm-n mért optikai denzitás értékek különbsége alapján számoltuk ki.

Eredményeinket nmol bilirubin/óra/mg fehérjére vonatkoztatva adtuk meg.

5.6. HO-1 enzim expressziós vizsgálat

Kísérleteinkben a SunRed Biological Company patkány HO-1 201-11-0677-es számú Eliza kitet használtuk a kithez küldött protokoll alapján. A módszer alapja, hogy a megkötött HO-1 enzimhez biotonnal konjugált antitest, majd a streptavidin-torma peroxidáz és a kromogén szubsztátok hozzáadásával az enzim mennyiségével korreláló színreakció játszódik le, amely spektrofotometriásan detektálható. A minták előkészítését két lépésben, homogenizálással és centrifugálással végeztük el. Mintáinkat foszfát pufferben (1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄) homogenizáltuk (Ultra Turrax; 13000 rpm; 2x30 másodperc; jégen). A centrifugálás (20 perc; 3000 rpm; 4 °C) után a felülúszóval dolgoztunk tovább.

A mérésnél a fenti kithez küldött protokoll alapján elkészítettük a szükséges oldatokat. A reakció első lépéseként a kapott platekre felvittünk a vak oldatból és a standard hígítási sorozatból 50-50 µl-t két-két oszlopra, a mintáinkból pedig 40 µl-t. A mintáinkhoz hozzáadtunk 10 µl biotinált HO-1 ellenes antitestet és 50 µl streptavidin-torma peroxidáz konjugátumot, a standardsorunkhoz csak az utóbbit. Ezt követően 1 órán keresztül, 37 °C -on végeztünk inkubációt, majd automatizált mosás következett. Mindhárom reakcióelegyhez 50-50 µl Chromogen A és B oldatot adtunk, majd fénytől elzárva 10 percig 37 °C inkubáltuk a reakcióelegyeket. A reakció leállítása után 15 perccel, a spektrofotometriás mérést 450 nm-en végeztük el.

Eredményeinket ng fehérje/ml-ben adtuk meg.

5.7. H₂S-termelő enzimek expressziójának vizsgálata colon mintákban

A colon mintákban a CBS és a CSE enzim expresszióját ELISA technika segítségével határoztuk meg. A CBS enzim expressziójának detektálásához a SunRed Biological Company patkány CBS 201-11-5125-ös számú Eliza kitet használtuk, a CSE enzim vizsgálatához pedig az azonos gyártótól származó patkány CBE 201-11-5124-es számú kitet. Mindkét esetben a kithez küldött protokoll alapján jártunk el.

A minták előkészítését mindkét esetben, két lépésben, homogenizálással és centrifugálással végeztük el. Mintáinkat foszfát pufferben (1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄) homogenizáltuk (Ultra Turrax; 13000 rpm; 2x30 másodperc; jégen). A centrifugálás (20 perc; 3000 rpm; 4 °C) után a felülúszóval dolgoztunk tovább. A továbbiakban az expresszió detektálásához használt protokoll a felhasznált antitestek kivételével megegyezik.

A mérésnél az adott kithoz küldött protokoll alapján elkészítettük a szükséges oldatokat. A reakció első lépéseként a kapott platekre felvittünk a vak oldatból és a standard hígítási sorozatból 50-50 µl-t két-két oszlopra, az előkészített mintáinkból pedig 40 µl-t. A mintáinkhoz hozzáadtunk a megfelelő 10 µl mennyiségű biotinált CBS vagy CSE ellenes antitestet és 50 µl streptavidin-torma peroxidáz konjugátumot, a standardsorunkhoz csak az utóbbit. A vak oldatunkhoz nem adtuk egyiket sem. Ezt követően 1 órán keresztül, 37 °C -on végeztünk inkubációt, majd automatizált mosás következett. Mindhárom reakcióelegyhez 50-50 µl Chromogen A és B oldatot adtunk, majd fénytől elzárva 10 percig 37 °C inkubáltuk a reakcióelegyeket. A reakció leállítása után 10 percen belül elvégeztük a spektrofotometriás mérést, 450 nm-en.

Eredményeinket százalékban (%) fejeztük ki, a vak oldatot tekintettük viszonyítási alapnak.

5.8. Fehérjetartalom meghatározása

A mintáinkban lévő összfehérje mennyiséget Bradford módszerrel határoztuk meg. A módszer azon alapszik, hogy a Bradford reagens hozzákötődve a fehérjéhez megváltoztatja az oldat fényelnyelését. Standard sorunkhoz (0-10µg/ml) szarvasmarha szérumalbumint használtunk (BSA). A szövet homogenizátumokból a szükséges hígítás után 20 µl-t tettünk 980 µl desztillált vízhez. Ezt követően a standard sorhoz, és a mintáinkhoz is 200-200 µl Bradford reagenst adtunk. A reakcióelegyekből 200-200 µl-t kimértünk a 96 lyukú plate-be, és 595 nm-n fotometráltunk.

Eredményeinket mg fehérje/ml-ben adtuk meg.

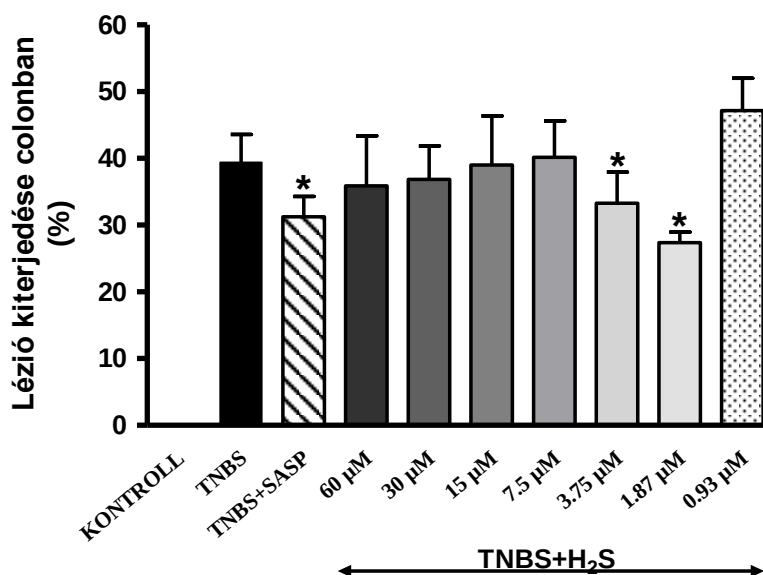
5.9. Statisztikai analízis

Az adatokat átlag±S.E.M.-ként vannak kifejezve. A statisztikai szignifikanciát kétmintás student „t”- teszttel állapítottuk meg, az eltéréseket p<0,05 esetén tekintettük szignifikánsnak.

6. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

6.1. A H₂S-donor kezelés hatása a TNBS indukálta nyálkahártya léziók kiterjedésére

A TNBS által kiváltott colitis modell jól reprodukálja a humán gyulladásos bélbetegségekre jellemző makroszkópos, szöveti és immunológiai elváltozásokat. A TNBS indukálta nyálkahártya léziók kiterjedésének vizsgálatánál 100 %-nak a kipreparált 8 cm-es bélszakasz területét tekintettük, továbbá a gyulladás súlyosságát a colon lézió mértékével jellemeztük. A TNBS kezelés hatására nagy kiterjedésű gyulladást hoztunk létre a vizsgált bélszakaszon az abszolút kontroll csoporthoz viszonyítva (0 ± 0 vs. $39,39 \pm 4,18$ %). Az ismert hatású szulfaszalazin, mint pozitív kontroll szignifikánsan lecsökkentette a gyulladt terület kiterjedését ($39,39 \pm 4,18$ vs. $31,24 \pm 3,0387$ %). A H₂S-donor vastagbél lézióra gyakorolt hatását egy hat pontos dózis-hatás görbével határoztuk meg. A H₂S-donor kezelés a 3,75 μ M és 1,87 μ M dózison mutatott lézió csökkenést ($39,39 \pm 4,18$ vs. $33,28 \pm 4,6824$ %; $39,39 \pm 4,18$ vs. $27,3971 \pm 1,5493$ %), ez alatt és felett nem tudtunk protekciót kiváltani a H₂S további adagolásával per os. A planimetriás analízisnél kapott eredményeink alapján a leghatásosabb dózishoz a 2x1,87 μ M-os dózis bizonyult, ugyanis ez nagyobb százalékosan csökkentette a lézió nagyságát, mint a pozitív kontrollként alkalmazott szulfaszalazin ($11,9929$ vs. $8,15$ %). Eredményeinket a 3. ábra foglalja össze.



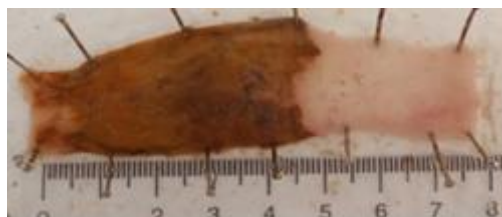
3. ábra: A TNBS indukálta colon lézió kiterjedésének százalékos változása szulfaszalazin és különböző dózisokban alkalmazott H₂S-donor kezelés hatására. A csoportok értékeit százalékban fejeztük ki és átlag $\pm$ S.E.M.-ben adtuk meg (n=4-11). *P<0,05 a TNBS csoporthoz viszonyítva.

6.2. A TNBS indukálta makroszkópos nyálkahártya gyulladás kiterjedése patkány vastagbélben

A TNBS-kezelt (B) patkányok vastagbelében az általunk vizsgált 8 cm-es szakaszon súlyos és nagy kiterjedésű fekélyes gyulladás alakult ki a kezelést követő 72 órában, amely makroszkóposan is megfigyelhető az abszolút kontroll (A) csoporthoz képest. A gyulladás transzmurálisan a rectalis végtől proximalis irányban átlagosan 4-5 cm-ig terjedt, ezen a szakaszon a teljes nyálkahártya gyulladása mellett, a bélfal megvastagodása is jellemző volt. A pozitív kontrollként alkalmazott szulfaszalazin (TNBS+SASP) láthatóan lecsökkentette a gyulladás kiterjedését (C). A H₂S-donor kezelés hatására a léziók kiterjedése és a nyálkahártya gyulladás súlyossága dózis-függően lecsökkent a TNBS csoportéhoz viszonyítva. A digitális felvételek vizsgálatából is arra a következtetésre jutottunk, hogy a 2x1,87 µM/állat/nap H₂S-donor dózissal figyelhető meg a legnagyobb mértékű lézió csökkenés (D). A makroszkópos felvételeket a 4. ábrán láthatjuk.



A: KONTROLL



B: TNBS



C: TNBS+SASP



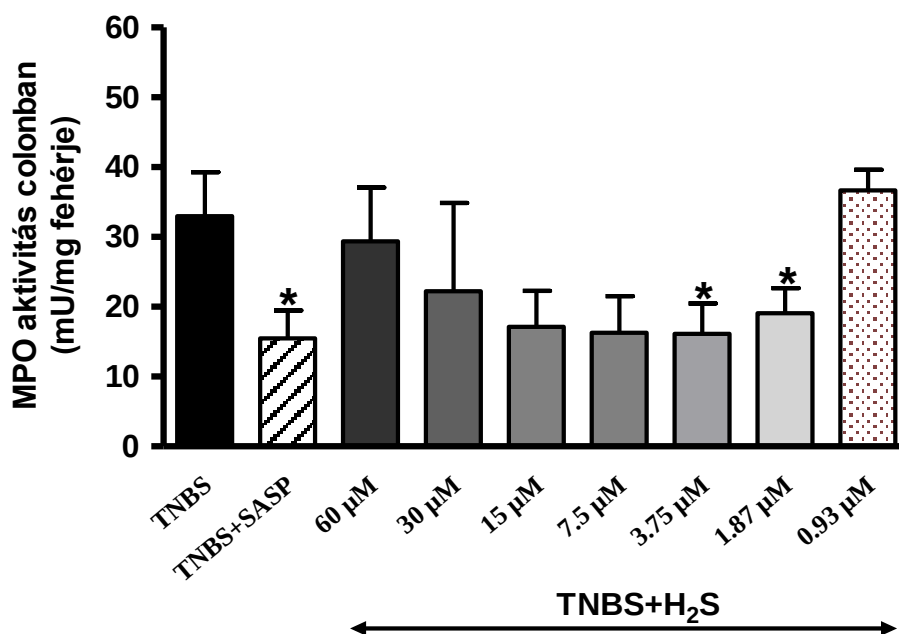
D: TNBS+H₂S_1,87 µM

4. ábra: Szulfaszalazin és H₂S-donor hatása a TNBS indukált nyálkahártya gyulladás kiterjedésére patkány vastagbélben. A TNBS kezelés hatására nagy kiterjedésű, összefüggő fekélyes gyulladás alakult ki a vizsgált bélszakaszon, amelyet a szulfaszalazin és a 2x1,87 µM-os dózisban alkalmazott H₂S-donor kezelés jól láthatóan lecsökkentett. (n=4-11)

6.3. Gyulladásos paraméterek változása a H₂S-donor kezelés hatására

6.3.1. Mieloperoxidáz enzim aktivitásának változása

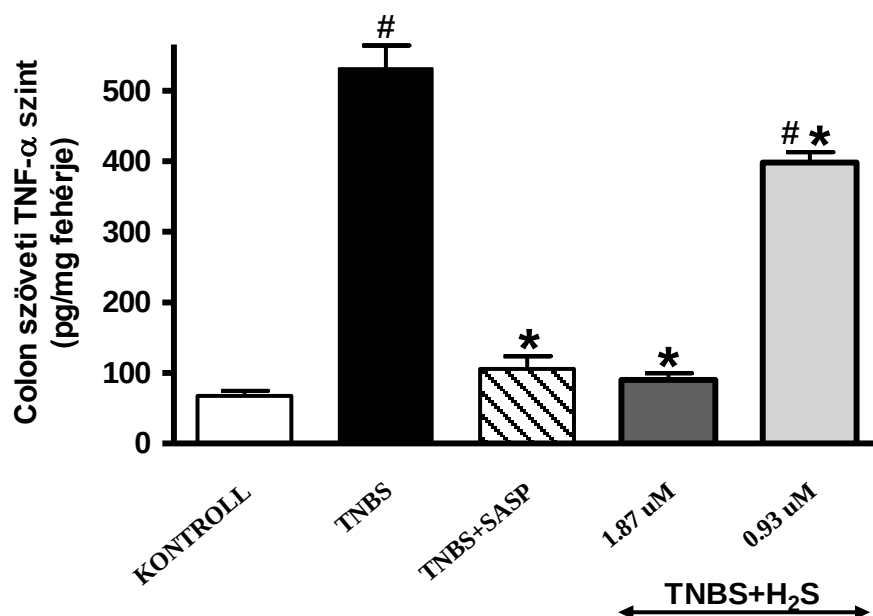
A mieloperoxidáz enzim (MPO) a szervezetben a gyulladás helyén, lokálisan az aktivált granulocitákból szabadul fel, így enzimaktivitása jól jellemzi a gyulladás mértékét. A TNBS csoporthoz viszonyítva a kapott eredményeink korrelálnak a lézió nagyságánál tapasztaltakkal (5. ábra). A szulfaszalazin szignifikánsan lecsökkentette a MPO enzimaktivitást ($15,49 \pm 4,0$ vs. $42,98 \pm 10,09$ mU/mg fehérje), ahogyan a 3.75, illetve a 1.87 μ M dózisú H₂S-donor kezelés is ($16,12 \pm 4,36$; $19,07 \pm 3,56$ vs. $42,98 \pm 10,09$ mU/mg fehérje). A többi H₂S-donor dózis esetében nem tapasztaltunk szignifikáns enzimaktivitás csökkenést. A 0,93 μ M dózisú H₂S-donor kezelésnél a H₂S feltételezett protektív hatása már nem nyilvánult meg ($36,67 \pm 2,95$ vs. $42,98 \pm 10,09$ mU/mg fehérje).



5. ábra: A H₂S-donor kezelés hatása a MPO enzimaktivitásra TNBS kezelt állatokban. A TNBS kezelés hatására megnövekedett MPO szintet a szulfaszalazin, és a 3.75 illetve az 1.87 μ M dózisú H₂S-donor kezelés szignifikánsan lecsökkentette. Kapott eredményeinket mU/ mg fehérje értékben fejeztük ki és átlag $\pm$ S.E.M.-ben adtuk meg (n=4-8). *P<0,05 a TNBS csoporthoz viszonyítva.

6.3.2. A colonban mért szöveti TNF- α szint változása

Kísérletünk során az általunk mért másik fontos gyulladásos paraméter a TNF- α szintje colon szövetben. Az abszolút kontroll (KONTROLL) csoportban elvégzett TNF- α szint mérés eredménye azt mutatja, hogy az állatokban a colitis indukció előtt nem volt jelen gyulladás. A TNBS csoportban mért TNF- α szint nagymértékű, szignifikáns növekedést mutatott a kontroll csoporthoz képest ($531,67 \pm 31,96$ vs. $67,67 \pm 6,75$ pg/mg fehérje), ezzel bizonyítottuk az indukció sikerességét. A TNBS csoporthoz képest szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a pozitív kontrollként alkalmazott szulfasalazinnal kezelt állatok esetében ($105,79 \pm 17,76$ vs. $531,67 \pm 31,96$ pg/mg fehérje), illetve a 1.87 és az 0.93 μ M. H₂S-donor dózissal kezelt állatok esetében is (6. ábra). Utóbbi dózis esetén a KONTROLL csoporthoz képest szignifikáns TNF- α szint növekedést mértünk ($398,32 \pm 14,31$ vs. $67,67 \pm 6,75$ pg/mg fehérje)

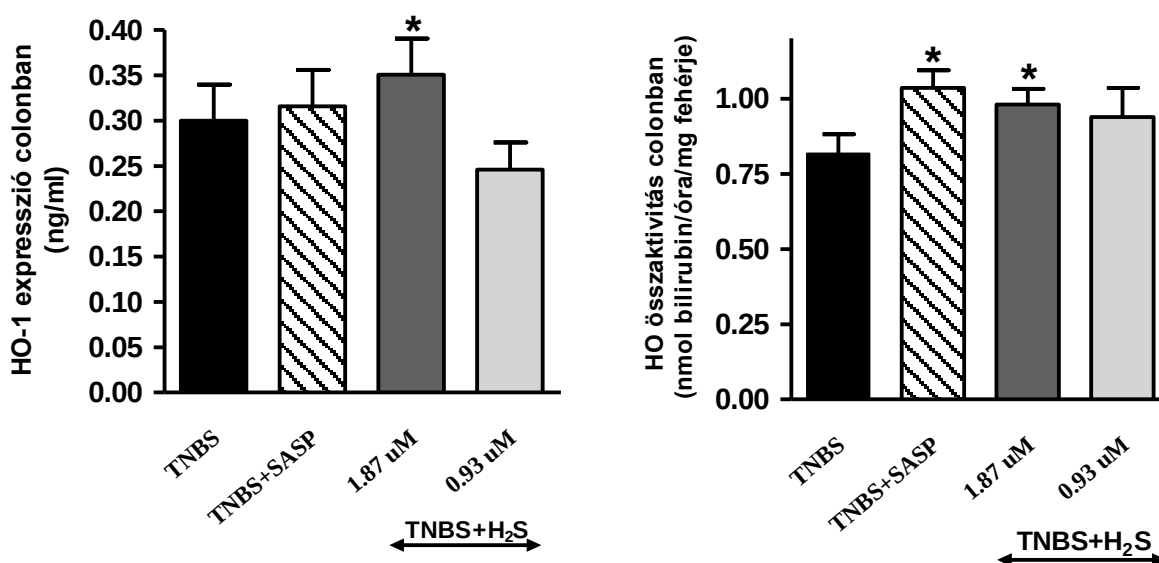


6. ábra. A H₂S-donor kezelés hatása a szöveti TNF- α szintre TNBS kezelt állatokban. A TNBS által kiváltott, a KONTROLL csoporthoz képest szignifikánsan emelkedett szöveti TNF- α szintet a szulfasalazin, illetve a két, legalacsonyabb H₂S-donor dózis szignifikánsan lecsökkentette. Kapott eredményeinket pg/ mg fehérje értékben fejeztük ki és átlag $\pm$ S.E.M.-ben adtuk meg (n=4-8). #p<0,05 a KONTROLL, *P<0,05 a TNBS csoporthoz viszonyítva.

6.4. TNBS illetve H₂S-donor hatása a HO-1 enzim expressziójára és a HO aktivitásra

Feltételezéseink szerint az exogén úton bejuttatott H₂S különféle jelátviteli útvonalak indukálásával fejtheti ki protektív hatását TNBS indukálta colitis modellben, amelyek szerves részét képezheti a HO enzimrendszer. Ismeretes, hogy a TNBS indukálta colitis patkánymodellben megnövekszik az indukálható HO-1 enzim expressziója. Munkacsoportunk által előzőleg elvégzett kísérleti eredmények azt bizonyítják, hogy a vastagbélben mérhető HO-1 alap expresszió minimális (Varga, Laszlo et al. 2007). A colitis indukciót követő H₂S-donor kezelésnél azt tapasztaltuk (7. ábra), hogy további szignifikáns HO-1 expresszió növekedést csak az 1.87 μ M dózissal tudtunk elérni ($0,35\pm0,04$ vs. $0,23\pm0,04$ ng/ml).

Ezzel szemben a HO-enzim összaktivitás vizsgálatánál azt figyelhető meg (7. ábra), hogy a TNBS csoporthoz képest mind a szulfaszalazin ($1,04\pm0,06$ vs. $0,82\pm0,06$ nmolbilirubin/óra/mg fehérje), mind pedig az eddigi eredményeink alapján a leghatásosabbnak bizonyult 1.87 μ M dózisú H₂S-donor növelte a HO aktivitást ($0,98\pm0,05$ vs. $0,82\pm0,06$ nmol bilirubin/óra mg fehérje).

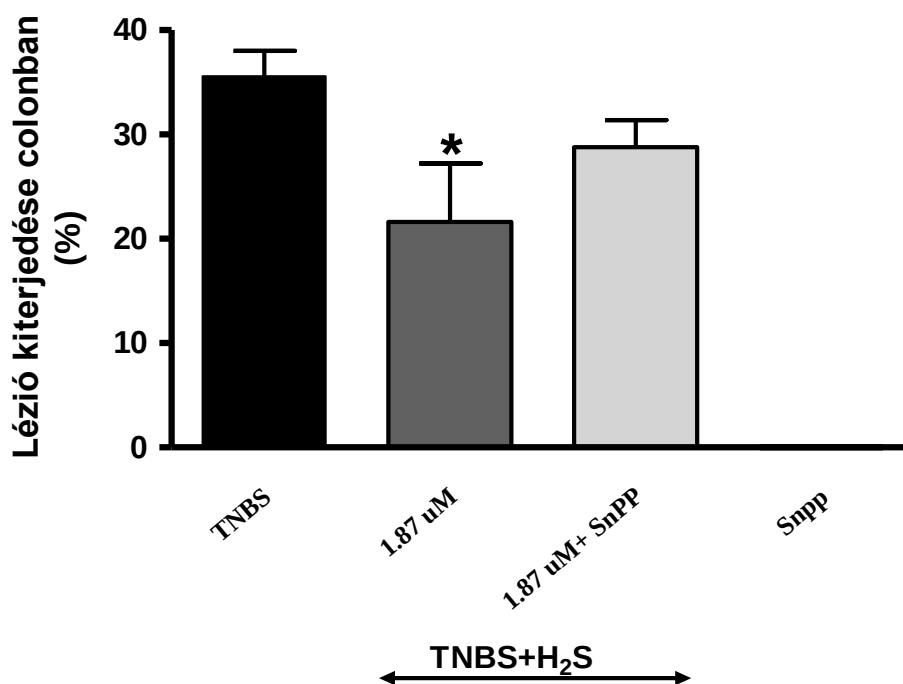


7. ábra. H₂S-donor kezelés hatása a HO összaktivításra és a HO-1 enzim expressziójára TNBS indukálta colitis modellben. Eredményeinket a HO aktivitás vizsgálatnál nmol bilirubin/óra/ mg fehérjére vonatkoztattuk, HO-1 expresszivitásnál ng/ml-ben adtuk meg, illetve átlag $\pm$ S.E.M.-ben fejeztük ki. *P<0,05 a TNBS csoporthoz viszonyítva (n=4-8).

6.5. HO aktivitás gátló kezelés hatás a lézió kiterjedésére vastagbélben

Szintetikus metalloporfirinekkal nem-specifikusan gátolni lehet a HO aktivitást. Kísérletünk során azt tapasztaltuk, hogy az SnPP (ón-protoporfirin) önmagában adva nem indukálja lézió kialakulását patkány vastagbélben (8. ábra).

TNBS kezelés hatására kialakult léziót a leghatásosabbnak bizonyult, 1.87 μM dózisú H_2S -donor szignifikánsan lecsökkentette ($35,6 \pm 2,4$ %-ról $21,6 \pm 5,6$ %-ra). A colitis indukciót követő, illetve a H_2S -donor kezeléssel párhuzamosan történő napi SnPP adagolás viszont megnövelte a lézió kiterjedését vastagbélben a TNBS+ H_2S _1.87 μM csoporthoz képest ($21,6 \pm 5,6$ %-ról $28,8 \pm 2,6$ %-ra nőtt a gyulladás százalékos kiterjedése). Mindezek alapján elmondható, hogy a SnPP-nel történő kezelés hatására a HO enzim aktivitása gátlás alá kerül, miközben a H_2S feltételezett protektív hatása eltűnik, és a gyulladás súlyosbodása tapasztalható.



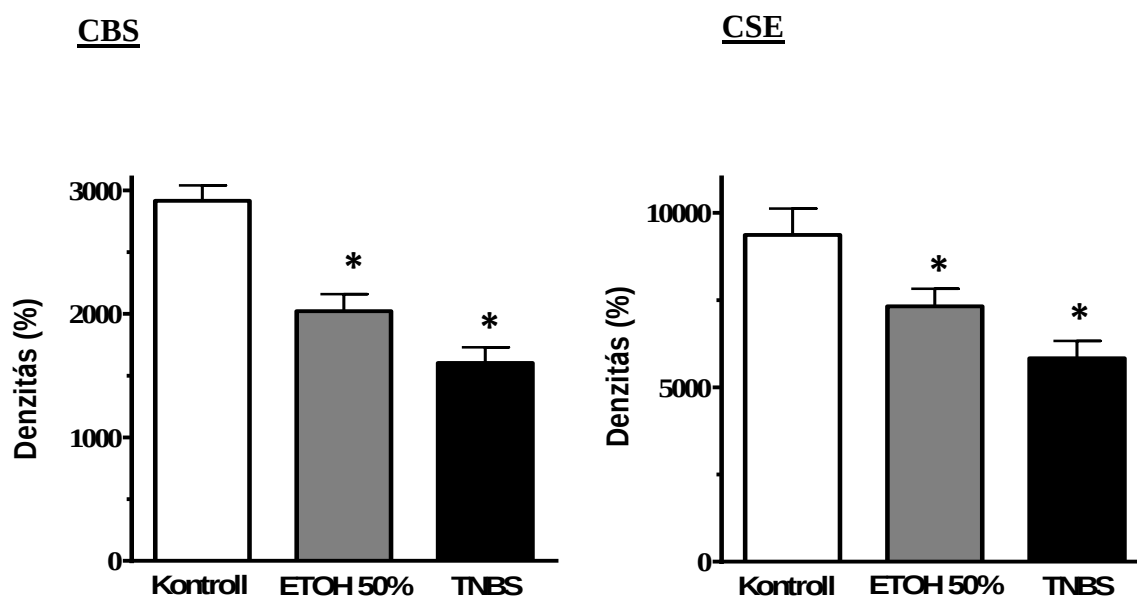
8.ábra HO aktivitás gátló kezelés hatása a gyulladásos lézió kiterjedésére patkány vastagbélben. Kapott eredményeinket százalékban fejeztük ki és átlag $\pm$ S.E.M.-ben adtuk meg (n=7-10). *P<0,05 a TNBS csoporthoz viszonyítva.

6.6. H₂S-termelő enzimek expressziójának változása vastagbélben

A TNBS indukálta colitis modellben nagymértékben károsodik a vastagbél epithéliuma, ahogyan a colonocyták H₂S-termelő enzimapparátusa is. Feltételezésünk szerint ennek következtében a vastagbél lumen lokális H₂S koncentrációja lecsökken, amelyet az általunk bevitt H₂S-donor dóziszfüggően pótolni képes. Mindezek bizonyítására mértük a CBS és CSE enzimek expresszióját a colon mintákban. A TNBS kezelés után azt tapasztaltuk, hogy mind a CBS mind pedig a CSE enzim expressziója szignifikánsan lecsökkent a kontroll csoport értékeihez képest (2917±123 vs. 1602±127% és 9370±752 vs. 5835±497%).

. Valószínűsíthető, hogy a TNBS oldószereként használt etanol önmagában nagymértékű roncsoló hatással rendelkezik. Ezt bizonyítja, hogy a kontroll csoport értékeihez képest a CBS (2917±123 vs. 2022±137 %) és a CSE (9370±752 vs. 7320±506 %) enzim expressziója szignifikánsan lecsökkent.

Eredményeinket százalékban (%) kifejezve a 9. ábrán láthatjuk.



9. ábra: CBS és CSE expressziójának változása TNBS és etanollal történő kezelés után patkány vastagbélben. Kapott eredményeinket százalékban fejeztük ki és átlag±S.E.M.-ben adtuk meg (n=7-10). *P<0,05 a KONTROLL csoporthoz viszonyítva.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyulladásos folyamatok vizsgálatánál egyre nagyobb figyelmet fordítanak a szervezet természetes védekező mechanizmusainak tanulmányozására, melyek aktiválódása védelmet nyújthat a károsító tényezőkkel szemben. Szervezetünk egyik ilyen antioxidáns és gyulladáscsökkentő enzimrendszere a HO enzimrendszer (Abraham and Kappas 2008). Az emlős szervezetben vazoaktív gázként, fiziológiásan termelődő H_2S -ről 1996-ban írták le elsőként, hogy szabályozó funkcióval rendelkezik (Abe and Kimura 1996). Azóta számos tanulmány megerősítette ezt, kiegészítve gyulladást csökkentő protektív szerepével (Szabo 2007, Esechie, Kiss et al. 2008, Kimura, Shibuya et al. 2012, Kolluru, Shen et al. 2013). A HO katalizálta hem metabolizmus és a H_2S indukálta jelátviteli folyamatok között összefüggés feltételezhető (Pae, Lee et al. 2009, Kajimura, Fukuda et al. 2010). Vizsgálataink során a vastagbél gyulladásos modellben vizsgáltuk a H_2S protektív hatását, valamint a protekcióban résztvevő mechanizmusok biokémiai hátterét, különös tekintettel a HO útvonalra.

A 2,4,6-trinitrobenzol-szulfonsavval (TNBS) kiváltott vastagbélgyulladás modellt elsőként Morris és munkatársai írták le 1989-ben (Morris, Beck et al. 1989). Az általunk elvégzett kísérlet során sikeresen reprodukáltuk a gyulladásos bélbetegségekre jellemző tünetcsoportot patkány modellben. A kísérlet 72 órás időtartama alatt, a TNBS beadástól számított 24 órában már jelentkeztek a bélgyulladásra jellemző tünetek, úgymint hasmenés, véres széklet, fogyás. A TNBS és az azt követő kezelések invazív mivolta ellenére a kísérletünk során elhanyagolható volt a mortalitás mértéke.

Feltételeztük, hogy a pozitív kontrollként alkalmazott kéntartalmú szulfaszalain (SASP), és a H_2S -donorként használt Lawesson's reagens egyes dózisaik különböző mértékben befolyásolják a TNBS által kiváltott gyulladás mértékét vastagbélben, és a kezelés hatására megnövekedett gyulladásos paraméterek szintjét.

A disztális colon minták planimetriás analízise, és a colon MPO aktivitás mérése során egymással korreláló eredményeket kaptunk, így sikerült felállítanunk a H_2S -donor dózis-hatás görbéjét. Az általunk ebben a kísérletsorozatban használt dózisokat szakirodalmi adatok, és előzetes beállítások alapján határoztuk meg. Eredményeink alapján a 60-7,5 μM dózistartományban alkalmazott H_2S -donor kezelések túl magas dózisúnak bizonyultak, mivel a lézió kiterjedését és a gyulladás hatására megnövekedett MPO szintet nem, vagy csak kis mértékben csökkentették. A 3,75 és 1,87 μM dózisonál tapasztaltuk a

legkifejezettebb gyulladáscsökkentő hatását a H₂S-nek. Ezen dózisoknál a colon lézió kiterjedése, és a megnövekedett MPO aktivitás is szignifikánsan lecsökkent a TNBS csoporthoz képest. A SASP esetében is megfigyeltük a nyálkahártyagyulladás kiterjedésének, és a MPO aktivitás csökkenését. A 0.93 µM koncentrációban alkalmazott H₂S már nem fejtett ki protektív hatást. Mivel ezt tapasztaltuk a további méréseink során is, így megállapítható, hogy az általunk használt legalacsonyabb, 0.93 µM-os H₂S-donor dózis már nem rendelkezik detektálható gyulladáscsökkentő hatással TNBS indukált colitis modellben.

A szakirodalmi adatok alapján a TNBS a bélfal epithéliumába jutva gyulladásos kaskád mechanizmusokat indukál, amelynek részeként megnövekszik a szöveti TNF-α szintje (Kawada, Arihiro et al. 2007). Méréseink alapján megállapítottuk, hogy a TNBS kezelés hatására valóban nagymértékű szöveti TNF-α szint növekedés detektálható colon mintákban, amely 3.75 és 1.87 µM dózisú H₂S-donor kezeléssel szignifikánsan csökkenthető. Számos tanulmány beszámol a H₂S gyulladáscsökkentő hatásának molekuláris hátteréről, melyben fő szerepet a génexpressziót szabályozó hatásának tulajdonítanak. Ennek révén csökkenti a proinflammatorikus mediátorok, gyulladásos citokinek, kemokinek és enzimek mennyiségét, és indukálja a neutrofil granulociták apoptózisát (Kimura, Shibuya et al. 2012, Wallace, Ferraz et al. 2012, Chan and Wallace 2013). A gyulladásos paraméterek vizsgálata során kapott eredményeink összhangban állnak a szakirodalmi megfigyelésekkel. Ezek alapján igazoltuk, hogy a kísérletes körülmények között exogén úton bejuttatott H₂S-donor –és így a H₂S- gyulladáscsökkentő és citoprotektív hatással rendelkezik gyulladásos modellben.

Colitis modellben bizonyítottan megnövekszik a reaktív gyökök mennyisége (Grisham, Volkmer et al. 1991), amely a gyulladás helyén valószínűleg endogén antioxidáns rendszereket indukál (Lih-Brody, Powell et al. 1996). Munkacsoportunk korábbi kutatásai során igazolta, hogy TNBS indukálta colitis patkánymodellben megnövekszik a HO aktivitás, illetve az indukálható HO-1 expressziója (Varga, Laszlo et al. 2007, Horvath, Varga et al. 2008). Mindebből feltételezhető, hogy az oxidatív stressz indukáló faktora a HO enzimrendszernek, és a HO indukálta hem metabolizmus termékei gyulladáscsökkentő hatással rendelkeznek. Kísérletünkben a SASP szignifikánsan megnövelte a HO aktivitást, a HO-1 expressziónál pedig jelentős növekedést tapasztaltunk esetében. A SASP egy kéntartalmú NSAID, melynek aktív hatóanyaga az 5-ASA. Megelőző kísérletek alapján elmondható, hogy az 5-ASA kezelés terápiás hatást mutat

colitis modellben, és feltételezhető a HO enzimrendszerrel való interakciója a gyulladáscsökkentő hatás kifejtésében (Horváth, Ph.D. dissz., 2008.)

Munkánk során a leghatásosabb dózissnak bizonyult, 1.87 μM H_2S -donor kezelés mind a HO aktivitást, mind pedig a HO-1 expressziót szignifikánsan tovább növelte colitis indukció után, patkány vastagbélben.

Összegezve eddigi eredményeinket, munkánk során a TNBS által kiváltott colitis patkánymodellben az 1.87 μM dózisú H_2S -donor kezelés protektív hatásának bizonyult. Szignifikánsan csökkentette a colonban kialakult lézió mértékét, ahogyan a gyulladásos paraméterek (TNF-alfa szint, MPO aktivitás) szintjét, és szignifikánsan megnövelte a HO aktivitást, illetve az indukálható HO-1 enzim expresszióját is. Mindezek után felmerült a kérdés, hogy miként fejtheti ki protektív hatását az általunk exogén úton bejuttatott H_2S .

Feltételezéseink szerint a HO-nak szerepe lehet a H_2S mediálta protekcióban, Ennek bizonyítására HO aktivitás inhibitorát alkalmaztunk. A szintetikus metalloporfirinek (cink-, kobalt-, mangánprotoporfin) gátolják a HO aktivitást (Chernick, Martasek et al. 1989, Smith, Alam et al. 1993). Az általunk választott ón-protoporfin, a hem kompetitív szubsztrátjaként a HO enzim katalitikus régiójához bekötődve gátolja annak enzimatisz aktivitását (Sardana and Kappas 1987). Kísérletünkben az SnPP-vel 30 μM dózisban, naponta subcutan injekció formájában kezeltük az állatokat. Eredményeink alapján az egészséges bélben az ón-protoporfin nem indukálta lézió kialakulását. A colitis indukciót követő 1.87 μM -os H_2S -donor kezeléssel protekciót váltottunk ki. Az ezt követő SnPP kezelés hatására a gyulladás súlyosbodását figyeltük meg, a nyálkahártya lézió kiterjedése jelentős megnőtt. Ebből arra következtethetünk, hogy a H_2S -donorral kiváltott protekció a HO aktivitás gátlásakor elvész.

A H_2S -donor kezelés hatására a gasztrointesztinális rendszerben működő HO enzimrendszer változásairól mindeztidáig kevés adat áll rendelkezésünkre, de egyéb szervekben, szövetekben számos tanulmány beszámol a H_2S és a HO enzimrendszer kapcsolatáról. A HO katalizálta reakció egyik terméke a CO, amely a H_2S -hez hasonlóan vasoaktív gázként funkcionál, és jelátviteli molekulaként több módon is befolyásolja a célszövet génexpresszióját. Megfigyelték, hogy a H_2S -donor (NaHS) beadása megnövelte a HO-1 enzim expresszióját kísérletesen kiváltott miokardiális iszkémia/reperfúzió során endothélben, simaizom sejtekben és szívizomszövetben. Feltételezhető, hogy a H_2S -donor által kiváltott protekció a HO-1/CO és CBS/ H_2S útvonalak kölcsönhatásának eredménye (Qingyou, Junbao et al. 2004, Zhu, Shao et al. 2008). A HO-1 gén deléciójával a H_2S protektív hatása nem érvényesült (Zuidema, Peyton et al. 2011). Hasonló eredményeket

publikáltak gyulladásos folyamatokban. Lipopoliszacharidokkal aktivált makrofágokkal végzett kísérletek során megállapították, hogy a NaHS kezelés gátolta az iNOS expresszióját, és ezáltal a NO felszabadulást. HO aktivitásgátló SnPP kezelés megszüntette a H₂S NO-felszabadulást moduláló hatását (Oh, Pae et al. 2006). Különböző típusú H₂S-donorokkal kezelve a humán podocita sejteket, a HO-1 enzim aktivitása is expressziója is megnövekedett in vitro (D'Araio, Shaw et al. 2014). Az újabb kutatási eredmények alapján feltételezik, hogy csak az indukálható HO-1 izoenzim hozható összefüggésbe a H₂S mediálta protektív hatásokkal. A H₂S-donor kezelések hatására a HO-2 izoenzim paraméterei nem mutattak változást (D'Araio, Shaw et al. 2013).

Kísérletünkben vizsgáltuk továbbá a H₂S termelő enzimek expressziójának változásait a különböző módon kiváltott vastagbélgyulladásos modellben. Feltételeztük, hogy a gyulladás során sérült epithél réteg elégtelen mennyiségű H₂S-t állít elő. Eredményeink alapján az exogén úton bejuttatott H₂S-donor protektív hatását azáltal is kifejezheti, hogy pótolja a vastagbél lumen lecsökkent H₂S tartalmát.

Az általunk kapott eredmények és a szakirodalmi adatok alapján arra következtethetünk, hogy az endogén HO-1/CO és a H₂S által mediált útvonalak egymással kölcsönhatásban állnak. Munkánkkal igazoltuk a H₂S gyulladáscsökkentő hatását colitis patkánymodellben, amely egybevág a szakirodalomban fellelhető megfigyelésekkel. A H₂S védőhatása a HO enzimrendszer aktiválásán keresztül is történik, viszont ennek bizonyítása, illetve a mechanizmus pontos feltérképezése még további kísérletek alapját képezi. Mindezekből feltételezhető, hogy a gyulladásos bélbetegségek esetében jelenleg alkalmazott terápiás készítményeknél hatékonyabb kezelést jelenthet a H₂S-donorok alkalmazása, mivel ezek gyulladáscsökkentő hatásuk mellett endogén antioxidáns mechanizmusokat is aktiválnak.