

Alma Mater Studiorum
Università degli Studi di Bologna

Dottorato di Ricerca in Farmacologia e Tossicologia

Area 05 – Scienze Biologiche
S.S.D. BIO/14 – Farmacologia

**L'INFIAMMAZIONE INTESTINALE
NELL'ANIMALE SPERIMENTALE COME MODELLO
PER LO SVILUPPO DI NUOVI FARMACI:
RUOLO DELLA VIA TACHICHININERGICA
NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI**

Tesi di dottorato di:
DR.SSA MARIA GRAZIA URSINO

Docente Guida:
Prof. FABRIZIO DE PONTI

Coordinatore:
Prof. GIORGIO CANTELLI FORTI

XX ciclo

Anno accademico 2006/2007

INDICE

1. <i>Sommario</i>	4
2. <i>Introduzione</i>	5
2.1 Malattie infiammatorie intestinali	12
2.2 Modelli di infiammazione intestinale	26
2.3 Il sistema tachichininergico intestinale	38
2.4 Espressione e funzioni della sostanza P e del recettore NK ₁ nell' infiammazione intestinale	46
3. <i>Obiettivo della Ricerca</i>	51
4. <i>Materiale e Metodi</i>	52
4.1 Colite indotta da DNBS	52
4.1.1 Modello di colite acuta da DNBS nel ratto	53
4.1.2 Modello di colite cronica da DNBS nel ratto	56
5. <i>Risultati</i>	66
5.1 Valutazione del possibile ruolo protettivo dell'antagonista al recettore NK ₁ SSR140333 nel modello acuto da DNBS	66
5.2 Modello cronico da DNBS: messa a punto	83
5.3 Valutazione del possibile ruolo protettivo dell'antagonista al recettore NK ₁ SSR140333 nel modello cronico da DNBS	91
6. <i>Discussione</i>	96
7. <i>Conclusioni</i>	101

8. Pubblicazioni e presentazioni a congressi	102
9. Bibliografia	104

1. Sommario

Il trattamento con antagonisti ai recettori delle tachichinine ha dimostrato un effetto protettivo in modelli sperimentali di infiammazione.

In questo studio abbiamo testato gli effetti di un antagonista non peptidico del recettore NK₁, SSR140333, in un modello sperimentale di infiammazione intestinale nel ratto.

La colite è stata indotta utilizzando DNBS (acido 2,4-dinitrobenzensolfonico): la somministrazione intrarettale di quest'ultimo ci ha permesso di sviluppare un modello acuto di infiammazione intestinale e successivamente mettere a punto un modello cronico di colite nel ratto.

SSR140333 (3 e 10 mg/kg) è stato somministrato per via orale per 7 giorni, a partire dal giorno precedente l'induzione della colite (trattamento preventivo), per 5 giorni (trattamento curativo), a partire dal giorno 1 successivo l'induzione della colite (colite acuta), e per 7 giorni precedenti la riattivazione del processo infiammatorio.

L'infiammazione è stata valutata attraverso score macroscopici ed istologici, attività della mieloperossidasi e mediante la determinazione quantitativa dei livelli tissutali di citochine pro-infiammatorie (TNF- α) e neuropeptidi (sostanza P).

Il trattamento con SSR140333, preventivo (10 mg/kg) e curativo (3 e 10 mg/kg), esercita un effetto protettivo nella colite indotta da DNBS, contrastando l'aumento dello score macroscopico e microscopico e l'attività della MPO.

La somministrazione intrarettale di DNBS quattro settimane dopo la prima somministrazione determina il riacutizzarsi del fenomeno infiammatorio, che si riflette in un notevole incremento dello score del danno macroscopico e microscopico e dell'attività della mieloperossidasi.

Il trattamento preventivo con SSR140333 10 mg/kg sembra contrastare la riattivazione della colite.

Questi risultati mostrano che l'antagonista selettivo del recettore NK₁ SSR140333 migliora la colite sperimentale nel modello da DNBS, supportando l'ipotesi che la sostanza P sia attivamente coinvolta nell'infiammazione intestinale. Gli antagonisti ai recettori delle tachichinine potrebbero rappresentare un potenziale target terapeutico nelle malattie infiammatorie intestinali.

2. Introduzione

Nel tratto gastrointestinale si distinguono 4 strati funzionali comprendenti la *tonaca mucosa*, la più interna, costituita da epitelio prismatico semplice, pluristratificato solo nei suoi tratti estremi e uno strato di connettivo lasso, contenente fasci di cellule muscolari lisce, la *muscularis mucosae*; la *tonaca sottomucosa* formata da uno strato di connettivo lasso, ricco di vasi e di fibre nervose dove si spingono le ghiandole dell'epitelio; la *tonaca muscolare* costituita da 2 strati di muscolatura liscia, interna circolare ed esterna longitudinale ed infine la *tonaca avventizia o sierosa*, la più esterna formata da uno strato di connettivo lasso, ricco di vasi e tessuto linfoide e adiposo.

Motilità, secrezione ed assorbimento sono processi altamente organizzati ed integrati fra loro, alla cui regolazione partecipano meccanismi di tipo nervoso ed umorale.

Il tratto gastrointestinale consta di un'innervazione estrinseca (simpatica e parasimpatica) ed un'innervazione intrinseca, rappresentata dal *sistema nervoso enterico*. L'innervazione estrinseca raggiunge l'intestino attraverso il nervo vago ed i nervi mesenterici e pelvici, i quali contengono sia un numero elevato di fibre afferenti sensoriali che proiettano al sistema nervoso centrale attraverso i gangli delle radici dorsali ed il midollo spinale, sia fibre efferenti (simpatiche e parasimpatiche), modulando così alcune importanti funzioni a livello intestinale (1).

La parete intestinale ospita il sistema nervoso intrinseco capace di coordinare le varie funzioni digestive anche in assenza di qualsiasi connessione con il sistema nervoso centrale (2). Il sistema nervoso enterico è un sistema indipendente di integrazione, costituito da circa cento milioni di neuroni, distinti, dal punto di vista funzionale in neuroni sensoriali, interneuroni e motoneuroni. I neuroni enterici sono organizzati in due plessi gangliari maggiori: il plesso mienterico, o di Auerbach, localizzato tra la tonaca muscolare longitudinale e quella circolare, e quello sottomucoso, o di Meissner, localizzato tra la tonaca muscolare

circolare e la *muscularis mucosae*. Il plesso mienterico provvede prevalentemente all'innervazione della tonaca muscolare liscia della parete intestinale, mentre il plesso sottomucoso innerva prevalentemente le strutture della mucosa e, in particolare, l'epitelio ghiandolare, i vasi sanguigni sottomucosi e la *muscularis mucosae* (3).

Sulla base delle loro caratteristiche morfologiche, del contenuto chimico e delle proprietà elettrofisiologiche, è possibile identificare diverse categorie di neuroni enterici: i neuroni sensoriali formano una fitta rete di neuroni afferenti primari estrinseci (corpi cellulari localizzati al di fuori della parete intestinale) ed intrinseci (IPANs, corpo cellulare localizzato all'interno della parete intestinale) (4). Questi neuroni, che includono meccanocettori, chemocettori e termocettori, trasportano informazioni ai circuiti locali di integrazione e mandano fibre ai gangli prevertebrali ed al sistema nervoso centrale. Interneuroni e neuroni motori invece, interagendo con i tessuti effettori, come la muscolatura, le cellule secretorie ed i vasi sanguigni, regolano le funzioni digestive.

Milioni di connessioni sinaptiche fra neuroni enterici sono alla base dei circuiti che integrano l'informazione nell'ambito del sistema nervoso enterico; i neuroni enterici sono in grado di sintetizzare e rilasciare una vasta gamma di messaggeri chimici che fungono da neurotrasmettitori o da neuromodulatori. Tra questi, accanto ai classici neurotrasmettitori acetilcolina e noradrenalina, si annoverano numerosi neuropeptidi quali la sostanza P, il calcitonin gene related peptide (CGRP), mediatori non peptidici, quali amine, aminoacidi, purine e un gas labile, il monossido d'azoto. Queste sostanze svolgono una complessa attività di controllo sulle funzioni digestive e su quelle immunitarie del tratto digerente (2). Gangli e fibre nervose enteriche sono intimamente connesse alla glia enterica, che condivide proprietà morfologiche, strutturali e funzionali con gli astrociti presenti a livello del sistema nervoso centrale. Le cellule gliali forniscono un supporto di tipo trofico ai neuroni sintetizzando e rilasciando neurotrofine; recenti evidenze scientifiche indicano che la glia enterica sia capace di produrre interleuchina-6 (IL-6), interleuchina-1 β (IL-1 β) e tumor

necrosis factor (TNF- α), partecipando attivamente alla risposta immunitaria e ai processi infiammatori che si verificano a livello intestinale (5;6).

Un'altra importante caratteristica del sistema gastrointestinale è rappresentata dalla stretta interazione tra sistema nervoso enterico e sistema immunitario. La lamina propria e l'epitelio della mucosa intestinale ospitano al loro interno il cosiddetto tessuto linfoide associato al tratto digestivo (dall'inglese "*gut associated lymphoid tissue*" o GALT); esso contiene il 70-80% delle cellule immunitarie dell'organismo e rappresenta il più esteso organo effetore immunitario del corpo umano (7). Il GALT comprende un elevato numero di linfociti, cellule epiteliali specializzate distribuite sulla superficie delle placche di Peyer, ma anche mastociti, macrofagi e granulociti (7). I linfociti, a seconda del loro stato di maturazione, possono essere localizzati sull'epitelio intestinale, lamina propria o sulle placche di Peyer, influenzando in maniera diversa la risposta ai neuropeptidi ed alle citochine.

A livello del SNE i neuroni sono in grado di sintetizzare e secernere numerosi neuropeptidi, neurotrasmettitori peptidergici come il CGRP, il polipeptide intestinale vasoattivo (VIP), la somatostatina e la sostanza P (SP); linfociti, macrofagi e cellule enteroendocrine possono sintetizzare alcuni di questi neuropeptidi. La loro secrezione sembra essere influenzata da altri neuropeptidi, neurotrasmettitori, citochine, ormoni e farmaci che interagiscono a loro volta (7).

Recettori per vari neuropeptidi, inclusi sostanza P, CGRP, VIP e somatostatina, sono stati identificati in un considerevole numero di cellule immunitarie incluse quelle del GALT. Studi *in vitro* dimostrano che vari neuropeptidi sono in grado di indurre risposte cellulari negli immunociti. Ad esempio, la sostanza P è in grado di aumentare la produzione di IgA da parte dei linfociti B e di stimolare la proliferazione dei linfociti T, mentre la somatostatina esplica effetti opposti su queste risposte. Sperimentalmente è possibile indurre un processo infiammatorio intestinale, o peggiorarne il decorso, attraverso l'attivazione delle fibre nervose sensoriali che

rilasciano neuropeptidi. Tale fenomeno, che va sotto il nome di infiammazione neurogenica, potrebbe avere implicazioni cliniche per le malattie infiammatorie intestinali (8).

Numerosi studi condotti sia nell'uomo che in modelli animali di infiammazione intestinale hanno dimostrato che l'infiammazione può indurre cambiamenti strutturali e/o funzionali del sistema nervoso enterico. Il fenomeno descritto, meglio conosciuto come plasticità neuronale enterica, è un cambiamento adattativo messo in atto dai neuroni enterici, che modificano il loro fenotipo strutturale, funzionale o chimico allo scopo di mantenere l'omeostasi delle funzioni intestinali. A livello intestinale si realizza un "cross-talk" tra neuroni ed altri tipi cellulari (glia enterica, cellule muscolari lisce e cellule interstiziali del Cajal), facenti parte del microambiente intestinale, che alla fine conduce ai cambiamenti caratteristici della neuroplasticità in presenza di patologie gastrointestinali. In pazienti con IBD ed in modelli animali di infiammazione intestinale sono state osservate anomalie strutturali come ipertrofia ed iperplasia neuronale, iperplasia delle cellule gliali, degenerazione e necrosi assonale e delle cellule gangliari. Le alterazioni patologiche tipiche delle IBD sembrano essere correlate al tipo di patologia (morbo di Crohn vs. colite ulcerosa), alla zona della parete intestinale e all'appartenenza del tessuto esaminato ad un sito attivo di infiammazione. Il danno osservato potrebbe essere immuno-mediato poiché sia i neuroni sia la glia di pazienti con IBD espongono sulla loro superficie l'antigene del complesso maggiore di istocompatibilità di classe II, importante per la presentazione ai linfociti T; questo suggerisce un possibile legame tra la risposta nervosa e queste cellule infiammatorie. Diversi studi condotti in modelli animali di colite sperimentale hanno inoltre evidenziato una perdita indiscriminata di neuroni enterici a livello del plesso sottomucoso e mienterico durante il processo infiammatorio (9). Questi cambiamenti morfologico-strutturali sono accompagnati da modificazioni di tipo neurochimico: numerosi studi hanno evidenziato cambiamenti specifici nel coding e nell'espressione dei recettori presenti a livello dei neuroni enterici. SP e VIP sono stati studiati

molto estesamente nell'ambito delle malattie infiammatorie intestinali umane poiché è stato accertato un loro ruolo nei meccanismi dell'infiammazione.

Neuroni contenenti VIP sono aumentati e strutturalmente alterati in campioni tissutali ed in biopsie rettali di pazienti con morbo di Crohn, ottenuti sia da regioni infiammate che non infiammate; inoltre, il contenuto tissutale di VIP, misurato mediante metodiche radioimmunologiche, è significativamente aumentato rispetto ai controlli (10). Altri studi, peraltro, hanno mostrato invariati o addirittura ridotti livelli di VIP nel morbo di Crohn (11). I livelli di SP sono aumentati sia nel morbo di Crohn che nella colite ulcerosa (12).

In corso di infiammazione si hanno inoltre delle alterazioni dell'innervazione nitrgica che, come noto, rappresenta uno dei sistemi neuronali inibitori più importanti di tutto il SNE. La forma inducibile dell'enzima coinvolto nella sintesi del monossido d'azoto, iNOS, è interessata nei processi infiammatori. Diversi studi indicano una aumentata attività della NOS in pazienti con malattie infiammatorie intestinali (13;14).

Il processo infiammatorio può influenzare l'espressione di alcuni recettori o canali, che in presenza di IBD possono andare incontro a fenomeni di down-regulation (p.es. canale del potassio, IK1) o up-regulation (p.es. ASIC-3 e P2X₃).

Numerosi studi hanno fornito importanti informazioni sulle anomalie funzionali che interessano il tratto gastrointestinale in corso di infiammazione, in particolare i disturbi della motilità e della secrezione.

L'ispessimento dell'intera tonaca muscolare costituisce la principale alterazione strutturale in corso di infiammazione in vari modelli sperimentali. Le cellule muscolari lisce delle aree interessate subiscono un cambiamento fenotipico fino a diventare proliferative, secernono grandi quantità di collagene ed esprimono proteine contrattili atipiche (15). Studi di elettrofisiologia messi a punto in modelli animali di infiammazione intestinale hanno ulteriormente chiarito il meccanismo che sottende le

alterazioni motorie in presenza di infiammazione; nella cavia, la colite indotta da TNBS determina ipereccitabilità dei neuroni afferenti primari intrinseci (IPANs) nel plesso mienterico, con aumento dell'attività spontanea (16) ed una riduzione significativa dell'ampiezza e della durata del potenziale. Recentemente Linden et al. hanno dimostrato che l'ipereccitabilità dei neuroni AH potrebbe essere una conseguenza dell'attivazione della cicloossigenasi COX-2, suggerendo che l'inibizione della stessa potrebbe ripristinare la normale attività elettrica dei neuroni, e quindi normalizzare la motilità a livello del colon (17).

In molti modelli di infiammazione è stata riscontrata una diminuzione della secrezione non solo a livello del sito infiammato ma anche in regioni distanti, supportando l'ipotesi che l'infiammazione locale possa indurre cambiamenti sistemici o riflessi sui neuroni del plesso sottomucoso e mienterico.

La sopravvivenza ed il differenziamento neuronale sono garantiti dalla presenza di fattori neurotrofici, quali NGF (*nerve growth factors*), BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) e NT-3 (neurotrofina-3); le neurotrofine ed i loro recettori (trk A, trk B, trk C e p75) sono presenti nel SNE dell'adulto, suggerendo che il sistema neurotrofine/trk potrebbe esercitare molti effetti fisiologici, inclusi il mantenimento del fenotipo e l'integrità tissutale. Le neurotrofine hanno la capacità di modulare la sintesi ed il rilascio di neurotrasmettitori e neuropeptidi (p.es. CGRP), e risultano aumentati in diversi processi infiammatori, così come nelle IBD (18); è stato osservato che la loro neutralizzazione peggiora l'entità del danno nella colite indotta da TNBS, supportando l'ipotesi che i fattori neurotrofici rivestano un ruolo protettivo nell'infiammazione.

Molte molecole di diversa struttura chimica (citochine, eicosanoidi, radicali liberi, etc.) costituiscono i mediatori delle reazioni infiammatorie; la loro produzione avviene ad opera di cellule immunitarie attivate e di cellule tissutali strutturali, allo scopo di determinare la risposta immune dell'ospite. Una crescente quantità di dati avvalora il concetto che alterazioni della funzione enterica neuromuscolare e della funzione della

trasmissione di impulsi sensitivi al SNC siano una conseguenza della risposta immunitaria.

Anche le disfunzioni dei neuroni enterici, così come quelle del muscolo liscio, sembrano essere causate dalla risposta infiammatoria, che è caratterizzata da un incremento del livello di citochine pro-infiammatorie e da una alterazione di nel numero (densità) di numerosi neurotrasmettitori e recettori. Numerose osservazioni dimostrano che la risposta infiammatoria della parte intestinale coinvolge non solo cellule del sistema immunitario (linfociti, leucociti, macrofagi) ma prevede anche la partecipazione di cellule strutturali (cellule muscolari lisce, cellule gliali e neuroni). Nelle malattie infiammatorie intestinali e in alcuni modelli sperimentali di infiammazione, gli infiltrati infiammatori sono localizzati soprattutto nella mucosa e nella lamina propria, con minima invasione degli strati neuromuscolari, suggerendo che i mediatori dell'infiammazione (citochine, ecc.) vengano prodotti localmente dalle cellule residenti. Evidenze indirette indicano che anche i neuroni mienterici possono partecipare attivamente alla risposta immune locale. I meccanismi molecolari sottesi alle interazioni neuro-immunitarie sono stati studiati in maniera limitata nell'intestino; essi sembrano coinvolgere la secrezione di neuropeptidi (da parte di neuroni enterici e/o peptidergici) in grado, a loro volta, di influenzare la fase iniziale della risposta immunitaria primaria, da parte delle cellule immunitarie, e, successivamente, la risposta immunitaria secondaria svolta dalle cellule muscolari lisce .

Vari mediatori dell'infiammazione sono quindi in grado di influenzare o alterare, in maniera diretta o indiretta, i meccanismi di controllo della funzione motoria gastrointestinale; a loro volta, muscolatura liscia intestinale ed innervazione enterica possono partecipare attivamente alla risposta infiammatoria ed a quella immunitaria mediante la liberazione di sostanze biologicamente attive (p.es. alcuni neuropeptidi da parte di nervi intrinseci o estrinseci) o l'esposizione sulla membrana cellulare di particolari antigeni (p.es. l'espressione di MHC-II da parte di cellule muscolari e/o gliali enteriche).

L'acquisizione di nuovi dati riguardo i meccanismi sottesi alle interazioni neuro-immuni, e lo studio della plasticità neuronale nel sistema nervoso enterico, assumono quindi una notevole importanza, poiché potrebbero consentire lo sviluppo di nuove strategie per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici e delle alterazioni neuronali responsabili delle alterazioni motorie e/o secretorie, che si riscontrano in corso di patologie infiammatorie gastrointestinali.

2.1 Malattie infiammatorie intestinali

Le malattie infiammatorie intestinali (IBD, da *Inflammatory bowel Disease*), come il morbo di Crohn e la colite ulcerosa, sono condizioni infiammatorie croniche a carico del tratto gastrointestinale (19).

Il morbo di Crohn e la colite ulcerosa sono stati patologici caratterizzati da un'elevata incidenza ed invalidanti per i soggetti affetti. Solitamente hanno inizio in giovane età, e raggiungono il loro picco massimale tra i 20 e i 30 anni di età. Sebbene le due patologie mostrino alcune somiglianze nel meccanismo patologico e nel decorso clinico (dolore addominale, perdita di peso, diarrea e sanguinamento rettale), la malattia di Crohn e la colite ulcerosa possiedono alcune caratteristiche distintive. La colite ulcerosa coinvolge la mucosa colica sino alla sottomucosa e si estende senza soluzione di continuità dal retto prossimale sino al cieco, mentre la malattia di Crohn può interessare tutto il tratto gastroenterico e presenta due caratteristiche fondamentali, la segmentarietà e l'interessamento dell'intero spessore della parete intestinale (20); a differenza della colite ulcerosa, l'infiammazione è trasmurale, con formazione di ulcere particolarmente estese ed occasionalmente si ha la comparsa di granulomi (21).

Nonostante l'eziologia delle malattie infiammatorie intestinali sia ancora sconosciuta, esistono numerose evidenze che ne chiariscono la patogenesi: questi disordini sono il risultato dell'interazione di tre fattori genetici, microbiologici ed ambientali, interazioni che culminano

nell'attivazione del sistema immunitario mucosale e che, in ultimo, comportano infiammazione attiva e distruzione tissutale (21). Durante l'infiammazione, si ha liberazione, all'interno della mucosa intestinale, di fattori citoprotettivi come il transforming growth factor (TGF- α , TGF- β), l'epidermal growth factor (EGF), il keratinocyte growth factor (KGF), l'IL-11 e l'ormone della crescita, allo scopo di ristabilire l'integrità della barriera epiteliale.

In situazioni "normali", lo stato della mucosa intestinale è regolato da un bilancio tra citochine proinfiammatorie e antiinfiammatorie, le quali giocano un ruolo determinante nella modulazione del sistema immunitario. Le citochine sono rapidamente sintetizzate e secrete a seguito della stimolazione di cellule infiammatorie come linfociti, monociti, macrofagi intestinali, granulociti, cellule epiteliali, cellule endoteliali e fibroblasti. La sintesi è indotta dall'attivazione del fattore nucleare trascrizionale κ B, coinvolto nella regolazione di molti geni associati all'infiammazione .

La presentazione di un antigene, da parte di cellule specifiche (APC), determina l'attivazione di linfociti mucosali i quali provvederanno a secernere IFN- γ e IL-2. Quest'ultima promuove l'espansione clonale delle cellule T ed accresce le funzioni delle cellule T e delle cellule B. IFN- γ attiva, invece, le APC ed i macrofagi per produrre IL-12, guidando, in tal modo, la differenziazione delle cellule T nel tipo Th1 e la loro conseguente attivazione; queste ultime, a loro volta, produrranno IFN- γ , IL-2 e TNF- α . IFN- γ non è responsabile solo dell'attivazione delle cellule endoteliali, per accrescere l'espressione di molecole di adesione, facilitando in tal modo il reclutamento delle cellule infiammatorie, ma attiva inoltre i macrofagi i quali, in seguito, producono un largo numero di citochine proinfiammatorie, come TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e IL-18, radicali liberi dell'ossigeno e monossido d'azoto.

Negli individui normali, questa risposta infiammatoria è tenuta sotto controllo da citochine antiinfiammatorie, come IL-4, IL-10, IL-11 e IL-13. L'indebolimento dei meccanismi di regolazione conduce ad infiammazione e alle manifestazioni cliniche della malattia.

I linfociti CD4+ isolati da pazienti affetti da morbo di Crohn mostrano un profilo simil Th1, caratterizzato dalla produzione predominante di IFN- γ , IL-2 e TNF. Studi di immunocistochemica hanno inoltre dimostrato, nella mucosa intestinale di tali pazienti, elevati livelli di IL-12 e di IL-18. Quest'ultima citochina, secreta da APCs così come da macrofagi e da cellule dendritiche, ha un ruolo importante nella differenziazione delle cellule T CD4+ nel fenotipo Th1. Al contrario, i linfociti CD4+ isolati da pazienti affetti da colite ulcerosa mostrano un profilo simil Th2, caratterizzato da elevata produzione di IL-5.

Oltre all'attivazione immunitaria, una risposta immunitaria all'interno della mucosa del colon coinvolge la migrazione selettiva di cellule T native dalla circolazione periferica nelle placche di Peyer o nei nodi linfatici mesenterici ed il reclutamento di cellule T attivate verso il sito di infiammazione; tali migrazioni sono mediate da interazioni tra cellule endoteliali e specifici linfociti (19).

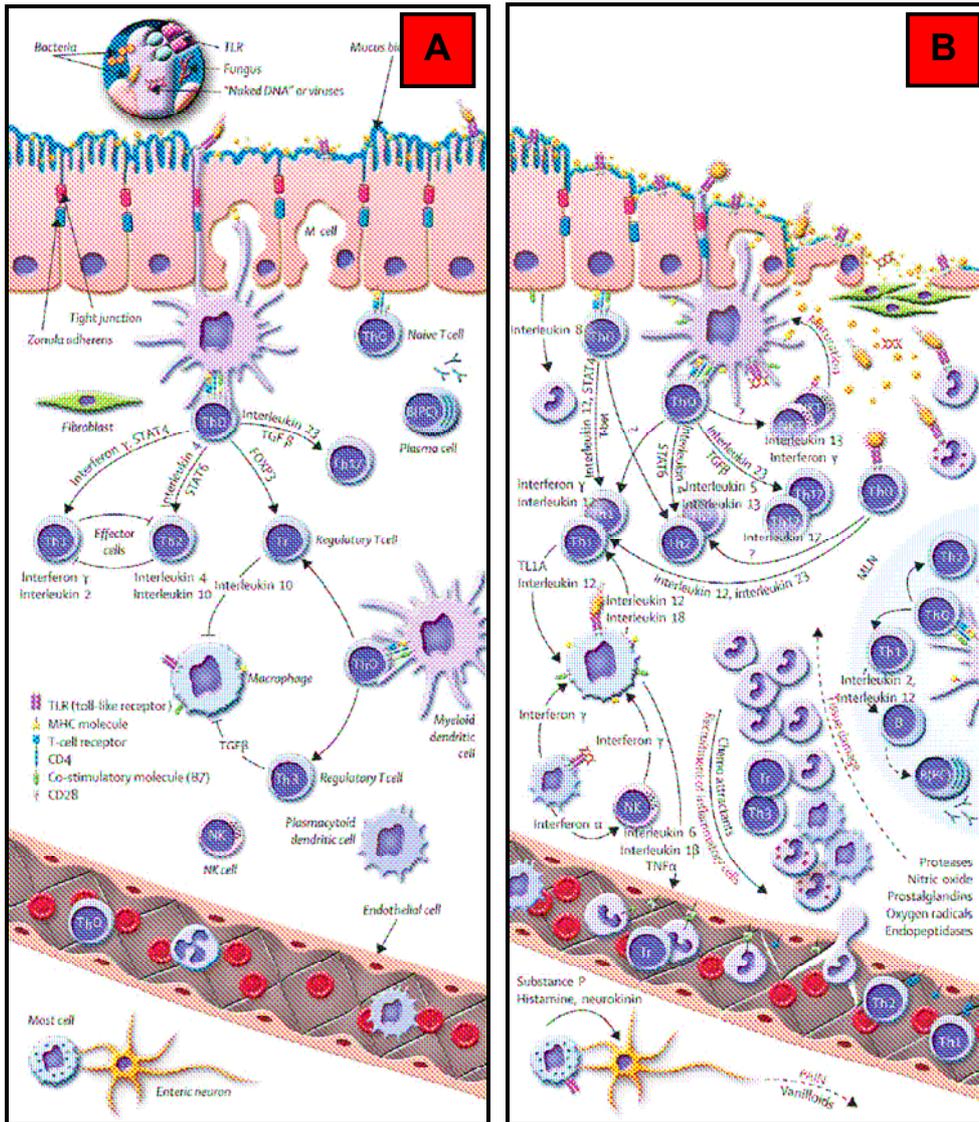


Figura 1. (A) Sistema immunitario intestinale in condizioni normali; **(B)** sistema immunitario intestinale nelle IBD (22).

Numerosi studi clinici hanno suggerito che fattori genetici possono aumentare la suscettibilità alle malattie infiammatorie intestinali; sono stati identificati molti geni specifici responsabili di questa suscettibilità, tra cui geni che codificano per antigeni HLA, tumor necrosis factor, IL-10, molecola di adesione intercellulare 1, chinina B1, inibitore della chinasi kB, tuttavia queste conoscenze non hanno del tutto chiarito la patogenesi della malattia né facilitato la diagnosi.

Attraverso lo screening con markers di DNA microsatellite del genoma di famiglie con membri affetti da IBD, sono stati identificati diversi loci di associazione con morbo di Crohn (locus IBD1 sul cromosoma 16) e colite ulcerosa (cromosoma 3, 5, 7 e 12) e con entrambe le patologie (cromosoma 18, 19 e cromosoma X), suggerendo che queste malattie condividono molte caratteristiche genetiche e nel meccanismo di induzione. La mappatura del cromosoma 16 ha permesso l'identificazione di un gene, almeno in parte responsabile di questa associazione: si tratta del gene che codifica per una proteina citoplasmatica presente sui macrofagi, NOD2 (anche chiamata CARD15, da *caspase activation and recruitment domain*). Quest'ultima potrebbe funzionare come recettore del pattern di riconoscimento dei lipopolisaccaridi batterici, forse regolando l'attivazione del fattore nucleare kB (NFkB) e l'apoptosi dei macrofagi (23). Pazienti affetti da morbo di Crohn, inclusi quelli con una storia familiare di malattie infiammatorie intestinali, hanno più probabilità di sviluppare varianti del gene NOD2 rispetto alle persone sane; queste varianti di NOD2 inducono una ridotta attivazione mastocitaria del NFkB in risposta al lipopolisaccaride. Individui omozigoti per varianti NOD2 mostrano una suscettibilità al morbo di Crohn 20 volte superiore; anche individui eterozigoti hanno un elevato rischio di sviluppare la malattia. Tuttavia, bisogna considerare che meno del 20% dei pazienti affetti da morbo di Crohn sono omozigoti per varianti NOD2. Un locus putativo che potrebbe essere associato all'insorgenza precoce di morbo di Crohn è presente sul cromosoma 5 in prossimità dei geni che codificano per diversi recettori delle citochine.

Recenti studi hanno avanzato un'ipotesi alternativa, che spiegherebbe la patogenesi delle malattie infiammatorie intestinali. L'utilizzo di modelli animali di infiammazione intestinale ha fornito utili informazioni per l'identificazione di alcune citochine responsabili della risposta infiammatoria; in particolare, la delezione genica dell'IL-12 o la neutralizzazione mediata da anticorpi ha mostrato un miglioramento dell'infiammazione intestinale in diversi modelli sperimentali. Tuttavia, il ruolo funzionale dell'IL-12 è stato recentemente rivalutato in seguito alla scoperta di un'altra citochina strettamente correlata alla prima, l'IL-23, la quale sembra essere un mediatore essenziale dell'infiammazione intestinale. Le ricerche eseguite hanno mostrato che l'IL-23 genera, a livello intestinale, una cascata di citochine proinfiammatorie, tra cui TNF- α , IL-6, interferon γ (IFN γ) e IL-17 (24). Il recettore dell'IL-23 è un eterodimero costituito dalla subunità $\beta 1$, anche presente a livello del recettore dell'IL-12 ed un'altra subunità espressa da cellule T attivate e cellule di origine mieloide. Particolare attenzione è stata rivolta alla capacità dell'IL-23 di promuovere la formazione di cellule T CD4⁺, che producono IL-17, denominate "*cellule Th17*"; queste cellule partecipano all'insorgenza del danno tissutale in numerose condizioni patologiche. Le cellule Th17 si distinguono dalle cellule tipo Th1 e Th2, e sembra che il transforming growth factor β (TGF β) e l'IL-6 determinino il loro differenziamento dalle cellule T native. Il TGF β e l'IL-6 inducono l'espressione del recettore dell'IL-23 sulle cellule Th17, rendendole così responsive all'IL-23. L'IL-17 è una citochina pleiotropica che agisce sia su cellule immunitarie che su altri tipi cellulari, largamente espressa nell'intestino di pazienti con IBD; l'IL-17 attivando cellule di tipo endoteliale ed epiteliale, promuove il richiamo di neutrofili nei tessuti interessati e stimola la produzione di citochine infiammatorie da parte dei macrofagi (Figura 2) (25).

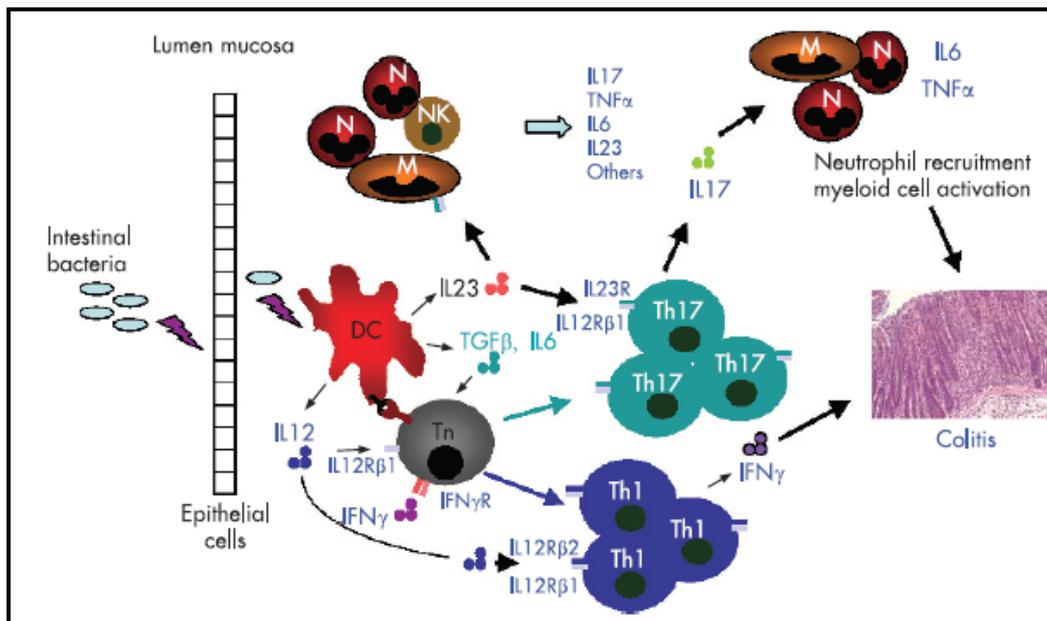


Figura 2. La stimolazione batterica della mucosa intestinale induce la produzione di citochine da parte delle cellule epiteliali, delle cellule dendritiche e dei macrofagi. $IFN\gamma$ e IL-12, agendo sulle cellule T $CD4^+$, promuovono il differenziamento di cellule tipo Th1, mentre $TGF\beta$ ed IL-6 partecipano alla formazione di cellule Th17; quest'ultime producono IL-17 ed esprimono il recettore per l'IL-23. L'IL-23 interviene nella risposta mediata dalle cellule Th17, con la conseguente produzione di citochine infiammatorie (IL-6, $TNF-\alpha$, IL-17), ed insorgenza del processo infiammatorio. (24).

Oltre ai fattori genetici, anche molti altri fattori possono contribuire allo sviluppo delle IBD; l'utilizzo di farmaci antinfiammatori non steroidei può aumentare la probabilità di insorgenza della malattia, probabilmente a causa di alterazioni della barriera epiteliale. Il fumo induce modificazioni del fenotipo; protegge infatti dalla colite ulcerosa ma aumenta il rischio di insorgenza del morbo di Crohn.

Studi eseguiti su modelli animale di colite hanno evidenziato l'importanza della flora batterica nel lume intestinale nello sviluppo delle IBD; lo sviluppo della colite "spontanea" nel ratto e nel topo necessita della presenza della flora batterica, infatti la colite non si sviluppa nei ceppi mutanti quando mantenuti in un ambiente privo di patogeni, mentre si sviluppa rapidamente quando gli animali sono colonizzati da batteri commensali. L'utilizzo di antibiotici ad ampio spettro e di probiotici si è

dimostrato clinicamente efficace in gruppi di pazienti con IBD, i quali presentano un maggior numero di batteri a livello dell'epitelio del colon (23).

Strategie terapeutiche attualmente impiegate nelle malattie infiammatorie intestinali

Le strategie terapeutiche attualmente impiegate hanno lo scopo di spegnere la fase acuta di attività e di prevenire le recidive (20). Gli agenti farmacologici impiegati nel trattamento del morbo di Crohn e della colite ulcerosa sono rappresentati dagli amminosalicilati, dai corticosteroidi e dagli immunomodulatori (azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina), la scelta dei quali dipenderà dall'obiettivo clinico (induzione o mantenimento della remissione), dall'estensione e severità dello stato morboso e dalle eventuali complicazioni (19).

In passato gli amminosalicilati sono stati considerati i farmaci di prima scelta per il trattamento della colite ulcerosa, ma studi più recenti hanno invece dimostrato che tali composti risultano relativamente inefficaci nell'induzione della remissione, con un NNT (*number needed to treat*) pari a 10; l'efficacia aumenta (NNT=8) se la dose giornaliera è pari o superiore a 3 g. Tali composti risultano più efficaci nella terapia di mantenimento (NNT=6) (26). La loro efficacia nel morbo di Crohn è invece controversa (19). I risultati di diversi studi suggeriscono infatti che la mesalamina nel morbo di Crohn è efficace per il mantenimento della remissione indotta da farmaci o chirurgicamente, ma il beneficio ottenuto non è superiore a quello prodotto dal placebo; ugualmente sulfasalazina e olsalazina non risultano superiori al placebo per il mantenimento della remissione. Per queste ragioni gli amminosalicilati non vengono prescritti per il mantenimento della remissione, a pazienti affetti da questo stato patologico (27). Nell'induzione della remissione, tali composti sono invece moderatamente efficaci, con un NNT=10, ma risultano più efficaci se utilizzati ad alte dosi (28).

I corticosteroidi sono indicati per il trattamento delle forme moderate e severe della colite ulcerosa e del morbo di Crohn, o per trattare quei pazienti che non rispondono alla terapia basata sull'impiego di amminosalicilati. Sebbene tali composti siano in grado di spegnere l'infiammazione attiva nella fase acuta, non sono altrettanto efficaci come agenti farmacologici di mantenimento; inoltre il loro uso a lungo termine è associato con un'elevata tossicità (19). I corticosteroidi si sono dimostrati efficaci nell'induzione della remissione in pazienti affetti dal morbo di Crohn. Tuttavia alcuni pazienti mostrano effetti avversi in seguito alla somministrazione di questi farmaci (pazienti steroide-intolleranti), altri subiscono un lieve o nessun miglioramento nell'attività infiammatoria (pazienti steroide-resistenti), mentre un ultimo gruppo di pazienti subisce un rapido aumento nell'attività infiammatoria, durante e subito dopo una riduzione della dose di corticosteroidi (pazienti steroide-dipendenti). Va infine sottolineato che gli effetti biologici dei corticosteroidi includono sia proprietà immunosoppressive sia antinfiammatorie, che si riflettono in effetti inibitori sul fattore nucleare κB , effetti sulla regolazione delle citochine proinfiammatorie, sulla funzione dei leucociti e sulla produzione degli eicosanoidi (29)

Gli immunomodulatori sono efficaci agenti di mantenimento per quei pazienti steroide-dipendente o dopo remissione indotta da ciclosporina ma sono caratterizzati da un inizio d'azione piuttosto lento e da seri effetti collaterali.

La ciclosporina inizia la sua azione in maniera più rapida e trova impiego per il trattamento delle forme severe di colite ulcerosa e morbo di Crohn, non rispondenti alla terapia convenzionale (27). Tuttavia il suo utilizzo deve essere accompagnato dalla monitoraggio dei livelli sierici dei metaboliti attivi della ciclosporina, per evitare il raggiungimento di livelli tossici ed i potenziali rischi di ipertensione, nefrotossicità, squilibri elettrolitici, encefalopatia, tremori, mielosoppressione ed infezioni opportunistiche.

Il metotressato è stato recentemente indicato per il trattamento del morbo di Crohn steroide-dipendente poiché, in tale condizione, è in grado di indurre e di mantenere la remissione, anche se il suo impiego è limitato dal rischio potenziale di mielosoppressione, epatotossicità, effetti teratogeni ed abortigeni (19). La 6-mercaptopurina e l'azotioprina sono considerati farmaci di riferimento nel mantenimento della remissione sintomatica a lungo termine nel morbo di Crohn (27).

La scarsa efficacia e la limitata sicurezza riscontrate nelle terapie farmacologiche impiegate nel trattamento delle IBD, hanno stimolato la ricerca di migliori agenti terapeutici.

In passato il trattamento farmacologico era focalizzato sulla soppressione non specifica del processo infiammatorio. Le attuali conoscenze relative all'immunopatogenesi delle IBD hanno consentito l'introduzione di una vasta gamma di agenti biologici come vaccini, proteine ricombinanti, anticorpi ed acidi nucleici, che modulano i mediatori stessi dell'infiammazione (19).

Attualmente, nell'ambito delle nuove strategie terapeutiche, è riconosciuto l'utilizzo promettente dell'agente biologico *Infliximab*, introdotto nella pratica clinica nel 1997, ed attualmente impiegato per l'induzione e il mantenimento della remissione clinica nei pazienti con morbo di Crohn da moderato a severo e colite ulcerosa (19;30).

Infliximab è un anticorpo monoclonale anti TNF- α , una citochina ad azione proinfiammatoria nella malattia di Crohn e in altre condizioni infiammatorie croniche come l'artrite reumatoide e la psoriasi. Il TNF- α è prodotto principalmente da macrofagi attivati e linfociti T, oltre che da altre cellule. Tale citochina induce altre citochine proinfiammatorie come IL-1 e IL-6 ed accresce la migrazione dei leucociti inducendo l'espressione di molecole di adesione da cellule endoteliali e leucociti; inoltre, il TNF- α attiva i leucociti ed induce le metalloproteine. Nella lamina propria della parete intestinale di soggetti affetti da morbo di Crohn, il numero delle cellule che producono il TNF- α è nettamente aumentato rispetto ai soggetti sani. L'esatto livello di infliximab necessario per esercitare il suo effetto

terapeutico non è stato ancora determinato: alla dose di 1 mg/kg non è efficace nella malattia di Crohn e alla dose di 3 mg/kg non è stato testato. Il meccanismo d'azione di infliximab non è stato ancora completamente chiarito. La neutralizzazione del TNF- α solubile può essere ottenuta con differenti anticorpi anti- TNF- α , compreso CDP571 (un anticorpo IgG4 umanizzato) ed etanercept (una proteina di fusione chimerica consistente della porzione extracellulare del recettore del TNF- α p75, legata al dominio Fc dell'anticorpo umano di tipo IgG1).

CDP571 è però, nel morbo di Crohn, meno efficace rispetto ad infliximab mentre etanercept non è efficace: quest'evidenza ha suggerito che la semplice neutralizzazione del TNF- α non è il principale effetto terapeutico. Dopo la somministrazione endovenosa di infliximab, nel sangue si osserva un aumento del numero di linfociti e monociti e una riduzione nel numero dei neutrofili, suggerendo che la strategia anti- TNF- α provoca la *down-regulation* dell'espressione delle molecole di adesione e quindi una ridotta migrazione di queste cellule sull'organo bersaglio. Un effetto importante prodotto dall'infliximab consiste nella scomparsa di cellule infiammatorie dalla mucosa intestinale previamente infiammata; inoltre, studi di immunocistochimica eseguiti sulla mucosa intestinale 4 settimane prima e dopo il trattamento con infliximab, evidenziano una significativa riduzione nel numero di cellule T attivate, nella lamina propria, nonché dei monociti positivi al TNF- α e dei macrofagi. Questo effetto è dovuto alla lisi delle cellule infiammatorie che guidano il TNF- α legato alla membrana.

Il principale meccanismo attraverso il quale infliximab esplica il suo potere terapeutico è probabilmente l'induzione di apoptosi. Le cellule T della lamina propria dei pazienti con morbo di Crohn sono resistenti all'apoptosi. Luger et al. hanno dimostrato che infliximab, a concentrazioni terapeutiche, induce apoptosi dei monociti sanguigni periferici di soggetti volontari sani e di soggetti affetti da questa patologia, secondo un meccanismo dose-dipendente, attraverso l'attivazione di caspasi -8, -9 e -3 in una maniera Fas indipendente.

Hove et al. (31) hanno, invece, mostrato che infliximab induce apoptosi delle cellule T della lamina propria in vivo e in cellule T attivate da CD3/CD28.

Un gruppo di ricercatori di Amsterdam ha evidenziato che, in contrasto a etarnecept, infliximab si lega alle cellule della lamina propria ed apoptosi attraverso l'attivazione di caspasi -3 (32).

Infine, Ringheam et al. non hanno dimostrato l'apoptosi dei monociti ad opera di infliximab ma hanno evidenziato che il pre-trattamento dei monociti con questo agente biologico conduce ad una ridotta produzione del TNF- α e di altre citochine proinfiammatorie, a seguito della stimolazione con prodotti batterici.

Questi risultati indicano che infliximab induce lisi cellulare attraverso citotossicità dipendente dal complemento e citotossicità cellulare dipendente da anticorpi (33)

In aggiunta ad Infliximab, *adalimumab* e *certolizumab*, si sono rivelati efficaci nel trattamento dei pazienti con morbo di Crohn.

RDP58, un nuovo decapeptide antinfiammatorio, blocca la produzione del TNF- α a livello post-trascrizionale e inibisce anche la produzione di IFN- γ , IL-2 e IL-12 (34). Tale composto, somministrato per via orale, non viene assorbito sistemicamente ed è privo di tossicità.

Di recente, è stato suggerito un possibile trattamento alternativo delle IBD, basato sull'inibizione della fosfodiesterasi 4 (PDE4) (35); un'aumentata produzione di cAMP potrebbe inibire le proprietà proinfiammatorie e la capacità distruttiva sui tessuti, da parte dei leucociti. PDE4 è un enzima predominante nel metabolismo del cAMP nelle cellule infiammatorie. I potenziali effetti antiinfiammatori e immunomodulatori degli inibitori della PDE4 in leucociti umani, endoteliali ed epiteliali, sono stati ben documentati (35), suggerendo un possibile loro effetto nel trattamento delle IBD, grazie ad una riduzione nelle proprietà proinfiammatorie dei leucociti e nel mantenimento del flusso sanguigno mucosale.

Le nuove strategie terapeutiche attualmente in studio per il trattamento del morbo di Crohn mirano a modulare l'attività di alcune citochine infiammatorie, che giocano un ruolo chiave nell'ambito delle malattie infiammatorie intestinali. IL-12 ed IL-23 sono bersaglio di due agenti terapeutici *ABT-874* (fase II degli studi clinici) e *CNTO 1275*, due anticorpi umanizzati diretti contro le due citochine di interesse.

Ha mostrato una buona efficacia clinica *Visilizumab*, un anticorpo umanizzato anti-CD3, testato su pazienti con colite ulcerosa severa che non rispondono al trattamento con corticosteroidi.

Un altro interessante bersaglio terapeutico potrebbe essere rappresentato dal blocco del segnale necessario per l'attivazione delle cellule T: CTLA-4-Ig (abatacept), attualmente approvato nell'artrite reumatoide, è in fase II e III degli studi clinici, per valutarne l'efficacia nei pazienti con malattie infiammatorie intestinali.

In ultimo, sono in corso diversi studi clinici, che mirano a valutare l'efficacia clinica di *Natalizumab*, un anticorpo monoclonale diretto contro $\alpha 4$ -integrina, sull'induzione della remissione in pazienti con morbo di Crohn in fase attiva; l' $\alpha 4$ -integrina è una molecola di adesione che interviene nel processo di richiamo dei linfociti al sito di infiammazione (30).

Infine, non bisogna tralasciare il ruolo fondamentale che la microflora intestinale riveste nella patogenesi delle IBD. In condizioni normali, il sistema immunitario mucosale esibisce una bassa risposta nei confronti della microflora endogena; in individui geneticamente predisposti le IBD determinano una sorta di rottura nei confronti della tolleranza immunologica verso i batteri enterici commensali, con un conseguente squilibrio tra specie batteriche patogene e non patogene (36). Sebbene gli antibiotici siano in grado di ridurre l'invasione tissutale e di eliminare specie batteriche dannose, il loro uso a lungo termine è sconsigliato per il rischio di tossicità e per il probabile sviluppo di resistenza batterica.

Per ristabilire il delicato equilibrio della flora batterica intestinale è consigliata la somministrazione di specie batteriche utili, probiotici, prebiotici o prodotti derivanti dalla loro combinazione (simbiotici) (37).

I probiotici sono microrganismi vivi in grado di alterare la flora intestinale, ed aventi un effetto terapeutico. Sebbene l'attività probiotica sia più comunemente associata con lactobacilli e bifidobacteria, rientrano in questa categoria anche altre specie batteriche non patogene, inclusi *Escherichia coli* ed enterococchi, nonché organismi non batterici come il *Saccharomyces boulardii*.

Gli effetti protettivi degli agenti probiotici nell'infiammazione intestinale sono riconducibili a tre diversi meccanismi d'azione:

- ◆ inibizione dei batteri enterici patogeni;
- ◆ miglioramento della funzione della barriera epiteliale e della mucosa;
- ◆ alterazione dell'immunoregolazione.

L'inibizione della crescita e della funzione dei batteri enterici patogeni è stata attribuita alla riduzione del pH luminale, attraverso la produzione di acidi grassi a catena corta, ma anche alla secrezione di proteine battericide e alla prevenzione dell'aderenza epiteliale da parte degli stessi patogeni.

Il secondo meccanismo proposto potrebbe essere legato alla produzione di acidi grassi a catena corta, ad un'aumentata integrità della barriera e ad un'aumentata produzione di muco.

Infine l'immunoregolazione può essere alterata attraverso l'induzione dell'espressione dell'IL-10 e del *transforming growth factor β* , in seguito alla stimolazione nella produzione dell'immunoglobulina A e attraverso una diminuzione dell'espressione del TNF (37).

I prebiotici sono sostanze dietetiche, solitamente carboidrati non digeriti, che stimolano la crescita ed il metabolismo di batteri commensali enterici protettivi. Queste sostanze sono in grado di ristabilire l'equilibrio tra specie batteriche patogene e non patogene nell'ileo distale di pazienti affetti da morbo di Crohn o colite ulcerosa, attraverso diversi meccanismi. I prebiotici stimolano la crescita di bacilli produttori di acido lattico, i quali

successivamente sopprimono specie dannose attraverso una riduzione del pH luminale, l'induzione della resistenza alla colonizzazione, il blocco dell'aderenza epiteliale, e la secrezione di sostanze battericide. Il lactosaccarosio, i fruttooligosaccaridi, l'inulina, gli estratti d'orzo e la crusca promuovono la crescita di specie di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e stimolano la produzione di acidi grassi a catena corta, specialmente butirrato, il quale migliora la funzione della barriera epiteliale (37)

2.2 Modelli di infiammazione intestinale

Le malattie infiammatorie intestinali sono patologie multifattoriali la cui eziologia rimane tuttora sconosciuta. Numerose evidenze indicano che un'interazione tra sistema immunitario, suscettibilità genetica e ambiente, in particolare la flora batterica, possa contribuire alla loro patogenesi. Le componenti coinvolte nell'insorgenza delle IBD vengono solitamente suddivise in sei categorie, comprendenti la suscettibilità genetica, fattori ambientali, immunità acquisita, immunità innata, infiammazione non specifica e riparazione delle lesioni. Le prime tre componenti rappresentano eventi precoci del processo infiammatorio, mentre le ultime tre rappresentano una pathway finale comune di infiammazione e riparazione (38). Nel corso degli anni, lo sviluppo di modelli sperimentali di infiammazione intestinale ha permesso uno studio molto approfondito degli eventi precoci, l'analisi delle interazioni tra le diverse componenti e l'identificazione dei processi immunologici e dei geni che determinano suscettibilità, in una maniera che non sarebbe stata possibile nell'uomo. Questi modelli hanno fornito importanti informazioni per una maggiore comprensione dei meccanismi alla base dell'infiammazione e della patogenesi così come del trattamento delle patologie infiammatorie intestinali.(38). Un modello sperimentale ottimale dovrebbe possedere alcune caratteristiche: l'intestino dovrebbe esibire alterazioni morfologiche, infiammazione, sintomi, fisiopatologia e decorso identici alle IBD umane. La specie animale utilizzata dovrebbe avere un background genetico ben

definito ed un sistema immunitario ben caratterizzato; i reagenti utilizzati dovrebbero essere facilmente reperibili, e dovrebbero essere stati definiti i criteri per una manipolazione ed un trattamento di successo (39). I diversi modelli differiscono nel loro uso relativo e la scelta del modello sperimentale da utilizzare dipenderà dall'obiettivo dello studio: per esempio per testare l'attività di nuovi farmaci antiinfiammatori sono adatti modelli riproducibili che coinvolgono solo infiammazione non specifica. Lo studio della suscettibilità genetica o della immunità acquisita richiede necessariamente l'utilizzo di modelli più complessi in cui si possano studiare queste componenti.

I modelli animali di infiammazione intestinale sono stati suddivisi in cinque differenti categorie: modelli genetici, suddivisi a loro volta in modelli di geni knockout (KO) e modelli di topi e ratti transgenici; modelli di colite spontanea; modelli di colite inducibile (di tipo chimico e di tipo immunologico); modelli di trasferimento adottivo ed infine modelli antigene-specifici e batterici (Tabella 1) (39).

Tabella 1. Tabella esemplificativa di alcuni tra i principali modelli sperimentali di IBD.

CARATTERISTICHE			
	Specie animale	Alterazioni dei mediatori dell'infiammazione/citochine	Patologia
			Componenti delle IBD coinvolte
MODELLI DI COLITE INDUCIBILI			
DNBS/etanolo	Ratto, topo, coniglio, cavia.	> PGE2, LTB4, IL-1, IL-6, IL-3/GMCSF	Acuta e cronica Granulomi occasionali Distribuzione continua Ulcere focali
DSS	Topo, ratto, cavia.	> PGE2, TXB2, LTB4, IL-2, IL-4, IL-6	Acuta e cronica No granulomi Distribuzione continua
Acido acetico	Ratto, topo, coniglio, cavia.	> LTB4, PGE2, TXB2, istamina, platelet-activating factor, NO	Acuta No granulomi Distribuzione continua
Indometacina	Ratto, cane, coniglio.	Non studiata	Acuta e cronica Granulomi Distribuzione discontinua Ulcere focali
			Inflammazione non specifica, immunità innata, riparazione lesioni; <immunità specifica e geni.
			Inflammazione non specifica, immunità innata, ambiente; < riparazione lesioni
			Inflammazione non specifica, riparazione lesioni; < immunità innata
			Inflammazione non specifica, riparazione lesioni, immunità innata, fattori ambientali; < genetica

MODELLI IMMUNOLOGICI		
Ciclosporina A	Topo > IFN γ , IL-2, IL-1 β , TNF- α , granzyme A	Acuta e cronica No granulomi Distribuzione continua Infiammazione non specifica, immunità innata, immunità specifica; <riparazione lesioni
Complesso immune	Ratto, coniglio > PGE2, PGI2, TXB2, LTB4, LTC4, IL-1, antagonista del recettore IL-1, SP, CGRP	Acuta No granulomi Distribuzione continua Infiammazione non specifica, riparazione lesioni; < immunità innata
MODELLI GENETICI (transgenici e Knockout)		
IL-2-KO/IL-2 receptor KO	Topo Deficit IL-2	Acuta e cronica No granulomi Distribuzione continua Genetica, fattori ambientali, immunità specifica; < immunità innata
IL-10 KO	Topo Deficit IL-10, >IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6	Cronica Granulomi Variazioni a seconda della zona Genetica, fattori ambientali, immunità specifica; < immunità innata
T cell receptor mutante	Topo Non studiata	Acuta e cronica No granulomi Distribuzione continua Genetica, immunità specifica; < immunità innata; < fattori ambientali

HLA-B27	Ratto	INF- γ , IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α	Cronica > Acuta No granulomi Distribuzione continua (colon)	Genetica, immunità specifica, fattori ambientali, immunità innata, infiammazione non specifica; < riparazione di lesioni
MODELLI DI COLITE SPONTANEA				
C3H/HeJBir	Topo	> IFN- γ , IL-2, antigeni batterici enterici	Acuta e cronica No granulomi Distribuzione continua localmente	Genetica, fattori ambientali, immunità specifica; < immunità innata
Cotton-top tamarin	Scimmia	> LTb4	Cronica > ulcera, acuta No granulomi Distribuzione continua	Genetica, fattori ambientali; < immunità innata; < infiammazione non specifica; < immunità specifica
MODELLI DI TRASFERIMENTO ADOTTIVO				
CD4+ /SCID	Topo	TNF- α , IL-1, IL-6, IFN- γ , IL-3	Cronica > acuta granulomi occasionali Distribuzione continua	fattori ambientali, immunità specifica; < genetica; < immunità innata; < infiammazione non specifica
MODELLI ANTIGENE- SPECIFICI E BATTERICI				

PG-PS	Ratto	<p>> PGE2, NO, IL-1, IL-6, Acuta e cronica antagonista recettore IL-1, granulomi IKB, attivazione chinina- Distribuzione discontinua callicreina</p>	<p>fattori ambientali, immunità innata, infiammazione non specifica; < genetica; immunità specifica; < riparazione di lesioni</p>
--------------	-------	--	---

La nostra attenzione si è focalizzata sui modelli sperimentali di colite indotta tramite l'utilizzo di sostanze chimiche ed apteni, nello specifico il modello da acido 2,4 dinitrobenzenesolfonico (DNBS) ed il modello del sodio destrano solfato (DSS); questi modelli hanno fornito importanti informazioni per una maggiore comprensione dei meccanismi alla base dell'infiammazione e della patogenesi così come del trattamento delle patologie infiammatorie intestinali. In particolare, molti modelli animali sono stati utilizzati per lo studio delle alterazioni funzionali (disturbi della motilità e della secrezione) indotte dall'infiammazione. Linden et al. e Boyer et al. hanno osservato apoptosi dei neuroni mienterici nel modello di colite da TNBS. L'induzione della colite, soprattutto nelle 12 ore successive la somministrazione di TNBS, determina una perdita di neuroni pari al 20%; i gangli mienterici sono ricchi in neutrofili, mentre i linfociti compaiono in un periodo successivo. La perdita neuronale persiste per circa 56 giorni, fino a completa risoluzione del processo infiammatorio (40). Diversi studi hanno dimostrato che il danno infiammatorio può coinvolgere aree distanti dal sito dell'infiammazione.

Le alterazioni motorie e/o contrattili osservate in modelli sperimentali di infiammazione possono anche essere messe in relazione con le modificazioni della densità dei recettori per i neurotrasmettitori, ma studi specifici in proposito sono scarsi. Nell'ileite sperimentale della cavia sono state dimostrate alterazioni dell'espressione di recettori adrenergici (41). In particolare è stata evidenziata una *up-regulation* dei recettori α -adrenergici unitamente ad una *down-regulation* dei recettori β -adrenergici. Questo fenomeno è stato considerato come una conseguenza della denervazione parziale dell'intestino infiammato. In un altro studio, si è mostrato come la degranolazione dei mastociti, la formazione di monossido d'azoto e la produzione di leucotrieni costituiscano i principali meccanismi coinvolti nella regolazione adrenergica (41). Recentemente Blandizzi et al. hanno dimostrato che, nella colite indotta da DNBS nel ratto, si ha una *up-regulation* del recettore α_{2A} -adrenergico a livello del sistema nervoso enterico; i recettori adrenergici α_2 contribuiscono ad un aumentato

controllo inibitorio della trasmissione colinergica e adrenergica a livello sia dei siti infiammati che non infiammati (42).

Citochine, eicosanoidi, radicali liberi, etc., sono mediatori delle reazioni infiammatorie; esse vengono prodotte da cellule immunitarie attivate e cellule tissutali strutturali, e determinano la risposta immune dell'ospite. L'identificazione dell'espressione di alcune citochine pro-infiammatorie, quali IL-1 β , IL-6 e il tumor necrosis factor-alfa (TNF- α), ha indotto a valutare il ruolo dei diversi mediatori dell'infiammazione nelle alterazioni funzionali del tratto gastrointestinale in presenza di colite; in modelli sperimentali è stata dimostrata un'aumentata espressione di queste citochine nella mucosa infiammata del colon (43;44), ed una diretta correlazione tra i livelli delle suddette citochine e la severità del danno infiammatorio (43;45).

A molte citochine è stato attribuito il ruolo di mediatori della funzione nervosa enterica. L'IL-1 β , il TNF- α e l'IL-6 esogeni alterano il rilascio di neurotrasmettitori da parte di preparati neuromuscolari di digiuno di ratto (46;47) e l'IL-1 sembra essere coinvolta nei disordini mioelettrici nella colite sperimentale indotta nel coniglio (48); inoltre l'IL-1 induce il NOS in neuroni mienterici di ratto (49), così come si verifica nelle malattie infiammatorie intestinali e nelle ileiti sperimentali (50). L'accresciuta produzione di NO è in grado di alterare la trasmissione inibitoria nitrgica, inoltre il monossido d'azoto stesso è in grado di svolgere un importante ruolo quale mediatore della flogosi. Nell'ileite sperimentale indotta nella cavia, l'inibizione del NOS diminuisce la risposta infiammatoria (51).

Il modello sperimentale di colite da DNBS, che ha sostituito in molti laboratori il modello da TNBS (acido 2,4,6 trinitrobenzensulfonico) a causa della minore pericolosità del DNBS e grazie all'induzione di un tipo di infiammazione cronica e di ulcerazione molto simile a livello del colon, è ampiamente utilizzato in ambito scientifico per lo studio delle malattie infiammatorie intestinali (IBD), per la sua semplicità, riproducibilità, adattabilità ad animali di piccola taglia e per la sua natura non invasiva.; si tratta di un modello animale ben validato in cui è possibile indurre

l'infiammazione in maniera piuttosto rapida (il time course va da una settimana fino ad un massimo di 8 settimane a seconda della specie utilizzata ed alla riattivazione o meno della colite), e maggiormente attendibile non solo poiché coinvolge un aptene immunologico ma anche perché al danno mucosale indotto dall'etanolo segue immediatamente una fase cronica di infiammazione.

Tuttavia, il modello da DNBS, così come il modello da DSS, manifestano alcune problematiche associate al loro utilizzo: nella colite da TNBS il background genetico sembra influenzare la immunopatogenesi, con una maggior risposta di tipo Th2 nei topi BALB/c e di tipo Th1 nei topi SJL. Inoltre anche la specie utilizzata è molto importante, infatti il ratto sviluppa una colite da TNBS di tipo distale caratterizzata da una marcata fibrosi e persino da stenosi, mentre il topo spesso tende a sviluppare una pancolite. Entrambi i modelli inizialmente causano danno alla barriera epiteliale, con il coinvolgimento di neutrofili e macrofagi nelle fasi iniziali del processo infiammatorio (52).

Questo modello di infiammazione prevede l'induzione della colite nel ratto in seguito alla somministrazione intrarettale di DNBS, un allergene sensibilizzante da contatto, in una soluzione al 50% di etanolo, la cui funzione è quella di permettere la penetrazione del DNBS attraverso la parete intestinale, in seguito alla rottura della barriera epiteliale (38). La suscettibilità al DNBS è variabile tra ciascun animale, ma generalmente si sviluppa una ipersensibilità di tipo ritardato che progredisce in colite cronica.

Il DNBS è un composto altamente reattivo e la sua somministrazione intrarettale risulta in una necrosi acuta, normalmente transmurale, probabilmente causata da un danno ossidativo (38).

Lo studio di questo modello ha evidenziato che il DNBS, in assenza di etanolo, è tossico per le cellule epiteliali intestinali, suggerendo che alcune delle infiammazioni indotte dalla somministrazione intrarettale di DNBS potrebbero essere il risultato di un danno tissutale mediato dallo stesso.

Tuttavia l'esatto meccanismo attraverso il quale il DNBS induce il danno sulle cellule epiteliali è tuttora sconosciuto.

Recentemente è stato evidenziato come il colon di ratto sia capace di metabolizzare il DNBS, con la conseguente produzione di una larga quantità di metaboliti ossigenati reattivi come il superossido, l'idroperossido di idrogeno ed il radicale ossidrilico; la formazione di questi ossidanti all'interno della mucosa potrebbe risultare estremamente dannosa e potrebbe dare inizio ad una risposta infiammatoria (53).

Durante i giorni successivi alla somministrazione del clistere, da un punto di vista istopatologico, sono evidenti foci distinte di necrosi acuta ed infiammazione, cui si associano criptiti focali; quest'ultime sono caratterizzate da un incremento nel numero e nelle dimensioni delle cellule presenti nelle cripte. L'incremento nel numero di cellule potrebbe riflettersi in un'aumentata proliferazione come possibile meccanismo di riparazione tissutale in risposta al DNBS. Alterazioni strutturali sono visibili a tutti i livelli della mucosa del colon di ratto; la perdita delle giunzioni intercellulari a livello dell'epitelio riflette la progressione del processo infiammatorio dalle regioni basali a quelle apicali, intaccando altresì lo spessore della mucosa .

Il danno acuto è seguito da infiammazione cronica con infiltrazione di leucociti polimorfonucleati nella lamina propria della parete intestinale. Nei ratti è possibile osservare delle ulcere soprattutto nel sito di iniezione del clistere, mentre fibrosi focali possono comparire in tempi successivi. Nel topo invece, non sono visibili grosse ulcere; si può eventualmente verificare la formazione di un granuloma, eccetto quando il reattivo è somministrato nello stomaco del ratto (38).

In questo modello è stata osservata un marcata riduzione nell'assorbimento di acqua da parte della mucosa infiammata, effetto che potrebbe contribuire alla diarrea tipica di questo modello e delle IBD; queste alterazioni della funzione epiteliale potrebbero essere causate, direttamente o indirettamente, dai prodotti rilasciati dai mastociti attivati.

L'infiltrazione di leucociti polimorfonucleati nella lamina propria, l'accumulo di elementi della matrice extracellulare, l'infiammazione transmurale e l'edema nell'area affetta, la comparsa di ulcere e la desquamazione dell'epitelio, nonché la presenza di linfociti, suggeriscono una specifica risposta autoimmune al DNBS . Mentre nel ratto, la patogenesi, sebbene sconosciuta, è probabilmente di natura immunologica, nel topo la colite indotta da DNBS sembra essere una classica risposta di ipersensibilità ritardata in seguito al contatto con questo allergene. Queste risposte immunitarie sono mediate da cellule T che rispondono ad autoantigeni modificati da un aptene e formati in seguito al legame covalente dell'aptene, il dinitrofenile, sull'autoantigene. Tali reazioni nel topo sono regolate da cellule B e da altri sottotipi di cellule T (38).

In questo modello i macrofagi isolati producono grandi quantità di IL-12, mentre i linfociti secernono IFN- γ e IL-2; le evidenze scientifiche citate suggeriscono che la colite in questo modello è mediata da una risposta simil-Th-1, costituendo quindi un modello di morbo di Crohn (39).

Questo modello di infiammazione è stato utilizzato nell'indagine clinica per lo sviluppo ed il saggio di molecole terapeutiche di potenziale utilizzo nel trattamento delle patologie umane; numerosi sono gli studi fatti a questo proposito: l'utilizzo di immunomodulatori in questo modello ha dimostrato una riduzione del danno epiteliale (54); il trattamento con Nimesulide (55) ha mostrato una riduzione della formazione dell'edema infiammatorio, probabilmente con un meccanismo correlato alla inibizione della produzione di prostaglandina E2 a livello della pathway della COX-2, la somministrazione di antagonisti non selettivi del recettore dell'endotelina (ET)_{A/B} migliora la progressione del danno tissutale, specialmente se queste molecole sono somministrate prima.

Un periodo di 8 settimane è necessario per la completa risoluzione del processo infiammatorio. Diversi studi hanno dimostrato che il modello di colite indotta in seguito alla somministrazione di DNBS può essere utilizzato per lo sviluppo di un modello cronico di infiammazione intestinale; la seconda esposizione al DNBS determina, infatti, la

riattivazione della colite. Questo modello mostra quindi strette somiglianze di tipo istopatologico e clinico con il morbo di Crohn e riproduce il medesimo decorso della malattia, caratterizzata da fasi acute di infiammazione intervallate da periodi più o meno lunghi di remissione della sintomatologia.

Alcuni studi hanno dimostrato la possibilità di effettuare una prima somministrazione intrarettale di DNBS alla dose di 30 mg/ratto, seguita da una seconda somministrazione i.v. di 5 mg/kg per tre giorni consecutivi, sei settimane dopo la prima induzione della colite (56).

In studi più recenti la riattivazione del processo infiammatorio è stata ottenuta attraverso la somministrazione intrarettale di una stessa dose di DNBS (15 mg/ratto) a distanza di sei settimane (56).

Infine in uno studio nel topo è stato valutato: 1) l'effetto terapeutico della grelina sulla colite acuta (3 mg/topo di DNBS), somministrata a partire dal giorno 3 fino al giorno 6 successivi l'induzione della colite; 2) l'effetto preventivo della grelina sulla riattivazione della colite somministrata il giorno precedente la seconda somministrazione di DNBS (3 mg/topo al giorno 0; 1.5 mg/topo al giorno 9, che rappresenta approssimativamente la metà del periodo di risoluzione dell'infiammazione, che nel topo è pari a 14-21 giorni) (57).

Il meccanismo responsabile della riattivazione della colite non è stato ancora completamente chiarito. Il riaccendersi del processo infiammatorio nel colon distale non è esclusivamente una conseguenza del danno che è stato precedentemente indotto in quella regione, dal momento che non si è osservata riattivazione dell'infiammazione in ratti ai quali è stato somministrato TNBS per via endovenosa sei settimane dopo la somministrazione intrarettale di etanolo in una soluzione al 50%. Questo veicolo determina un danno mucosale molto esteso ed una intensa risposta infiammatoria (53;58). Una possibile spiegazione è che la somministrazione sistemica di TNBS in ratti precedentemente sensibilizzati comporta l'insorgenza di una reazione di ipersensibilità tipo 3, caratterizzata dalla formazione di un immuno-complesso che induce

una risposta infiammatoria locale. Un'altra possibilità è che la somministrazione di TNBS scateni una reazione di ipersensibilità (tipo 4) in cui il danno tissutale è mediato da cellule T (56).

L'utilizzo di questo modello cronico di colite da DNBS ha permesso di testare l'attività di un ampio numero di farmaci antinfiammatori utilizzati nella pratica clinica, per valutarne l'efficacia sulla prevenzione della riattivazione del processo infiammatorio.

2.3 Il sistema tachichinergico intestinale

Le tachichinine (TK), sostanza P (SP), neurochinina A (NKA) e neurochinina B (NKB), sono una famiglia di neuropeptidi strutturalmente caratterizzate dalla sequenza aminoacidica, Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, con un gruppo C-terminale ed un residuo X aromatico (Tyr o Phe) o idrofobico (Val o Ile); questa sequenza aminoacidica comune è essenziale per il legame e l'attivazione del recettore (59). Questi peptidi derivano da due proteine precursore, le preprotachichinine (PPTs), codificate da due diversi geni PPT. PPT-A contiene la sequenza che codifica sia per la sostanza P che per la NKA, mentre PPT-B codifica solo per la tachichinina NKB.

Sono stati identificati e caratterizzati tre diversi recettori per le tachichinine, denominati NK₁, NK₂, e NK₃: sono glicoproteine, appartenenti alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G, e strutturalmente costituiti da sette domini transmembrana con l'estremità amminica posta in sede extracellulare e la terminazione carbossilica intracellulare (Figura 3) (60).

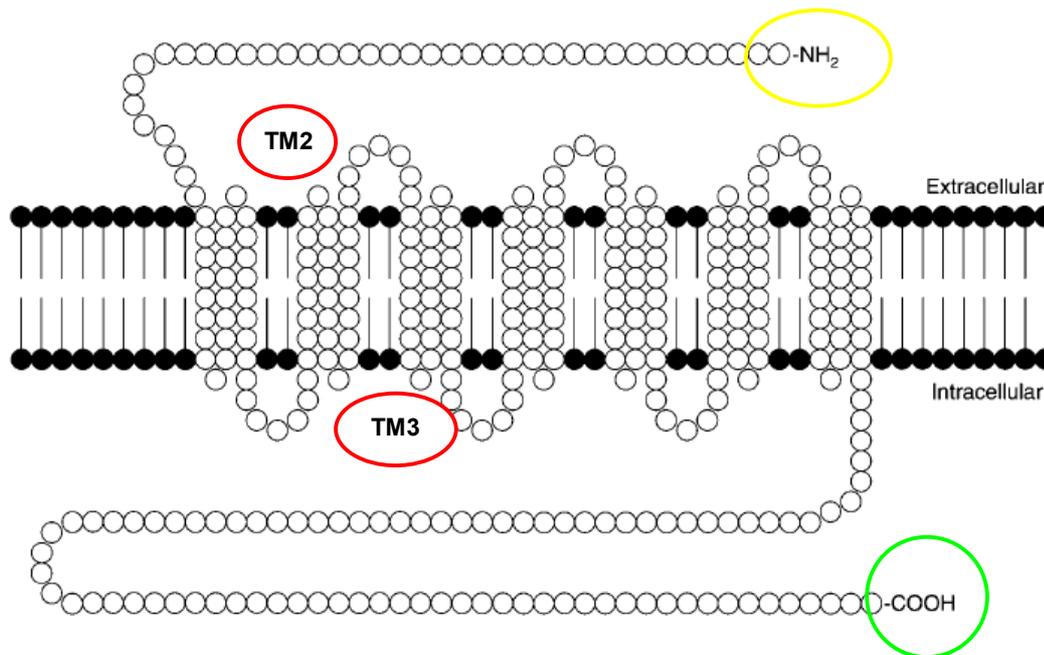


Figura 3. Struttura primaria dei recettori delle tachichinine. In rosso sono cerchiati il secondo ed il terzo dominio transmembrana fondamentali per il legame con l'agonista/antagonista; la porzione N-terminale (in giallo) determina l'affinità per uno specifico recettore; la porzione carbossilica, in verde, contiene residui di serina e treonina che, quando fosforilati, causano desensibilizzazione del recettore in risposta ad una continua stimolazione da parte dell'agonista.

Le TK si legano con affinità e potenza diversa ai vari sottotipi recettoriali: SP > NKA > NKB per il recettore NK₁; NKA > NKB > SP per il recettore NK₂ e NKB > NKA > SP per il recettore NK₃. La sequenza amminica terminale delle tachichinine determina la specificità recettoriale. Il secondo e terzo dominio transmembrana sono coinvolti nel legame con l'agonista/antagonista, mentre il terzo loop citoplasmatico è responsabile dell'interazione con la proteina G. La terminazione carbossilica contiene residui di serina e treonina che, quando fosforilati, causano desensitizzazione del recettore in risposta a d una continua stimolazione da parte dell'antagonista.

In particolare, il recettore NK1 umano consiste di 407 residui aminoacidici; la stimolazione del recettore con un agonista in molti tessuti e tipi cellulari causa attivazione della fosfolipasi C, che catalizza l'idrolisi dei fosfoinositidi nell'inositolo 1,4,5-trifosfato e diacilglicerolo. Questo secondo messaggero è quindi disponibile per la mobilitazione del calcio e per l'attivazione della proteina chinasi C (60).

Il gene che codifica per il recettore NK₁, definito TACR1, produce due varianti di splicing, che differiscono per la lunghezza della porzione C-terminale; le due isoforme del recettore mostrano alcune differenze quantitative nel processo di trasduzione del segnale e di desensitizzazione (61). Il gene che codifica per il recettore NK₂, definito TACR2, produce anch'esso due varianti di splicing: l'isoforma α , la più comune, e l'isoforma β , che mancando di un aminoacido nella sua sequenza forma un loop extracellulare, un loop intracellulare ed un dominio transmembrana (TM4). La presenza di questa delezione impedisce il legame delle TK all'isoforma β e quindi l'attivazione del segnale; sebbene alcuni studi escludano la possibilità che questo recettore rivesta un ruolo funzionale nell'ambito del sistema tachichinergico, non è da escludere una possibile interazione dello stesso con altri ligandi (62).

Infine, il gene che codifica per il recettore NK₃ è stato definito TAC3, ma non è stata ancora dimostrata l'esistenza di sottotipi recettoriali (63).

Nel tratto gastrointestinale umano ed animale, le tachichinine ed i relativi recettori mostrano un ampio pattern di distribuzione, sia a livello neuronale che in altri tipi cellulari. Le TK sono espresse da diverse tipologie di neuroni enterici, in particolare neuroni afferenti primari intrinseci (IPANs) del plesso mienterico e sottomucoso, interneuroni e motoneuroni eccitatori della muscolatura circolare e longitudinale, e da fibre nervose afferenti primarie estrinseche che originano dai gangli delle radici dorsali e raggiungono l'intestino attraverso i nervi simpatici ed i gangli prevertebrali (64). Le TK sono anche espresse su altre cellule intestinali, in particolare cellule enterocromaffini ed eosinofili.

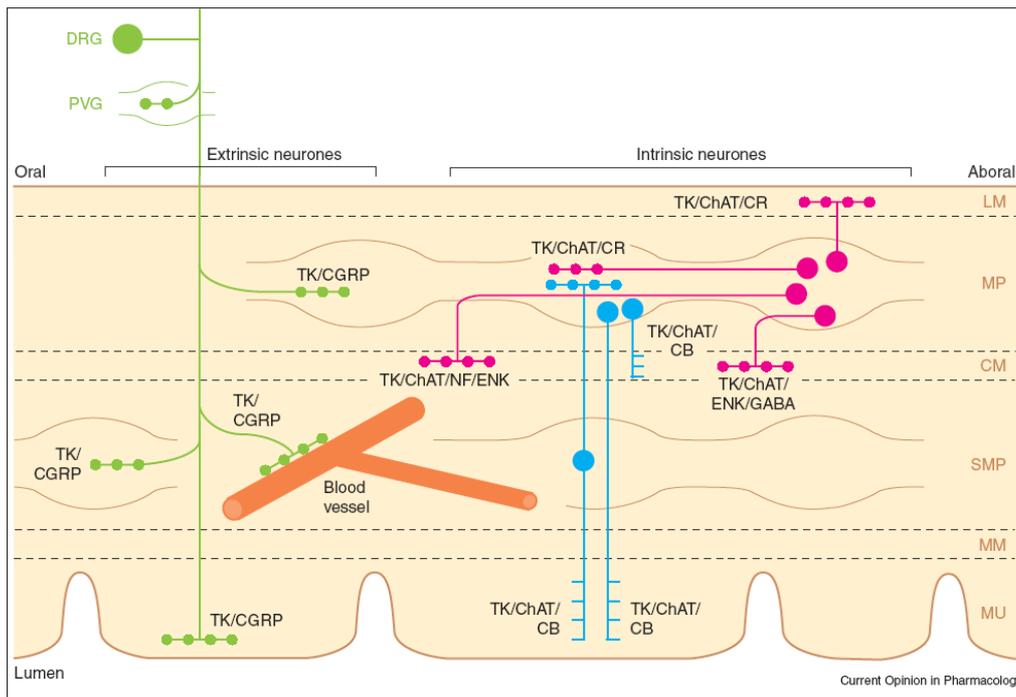


Figura 4. Rappresentazione schematica delle popolazioni neuronali positive alle tachichinine. I neuroni afferenti estrinseci originano dai gangli delle radici dorsali e per raggiungere l'intestino passano attraverso i gangli prevertebrali, mentre i neuroni intrinseci originano dal plesso mienterico e sottomucoso (59)

I recettori delle tachichinine NK1, NK2 e NK3, sono espressi da neuroni enterici, cellule interstiziali del Cajal (ICC), cellule muscolari ed epiteliali, ma anche a livello del sistema vascolare ed immunitario; sono distribuiti lungo tutti gli strati della parete intestinale, e la loro espressione cambia nelle diverse regioni del tratto gastrointestinale, ma è soprattutto specie-specifica. Nell'intestino di cavia, ratto e topo il recettore NK1 è localizzato su neuroni afferenti primari intrinseci, motoneuroni eccitatori ed inibitori, neuroni secretomotori, ICC e su cellule epiteliali e granulociti (65;66). Recentemente, (67) hanno dimostrato la presenza del recettore NK1 sulla muscolatura circolare e longitudinale di intestino di cavia. Nell'intestino umano, i recettori NK1 sono stati trovati anche a livello della muscularis mucosae, dei vasi sanguigni sottomucosali ed in alcune cellule immunitarie (66;68;69). Il recettore NK2 è localizzato su cellule muscolari lisce dello strato muscolare longitudinale e circolare, sulla muscularis mucosae; sugli enterociti e cellule enterocromaffini (59;66). Nell'intestino di ratto e cavia il recettore NK2 è espresso anche sulle cellule epiteliali e

sulle terminazioni nervose enteriche. In diversi studi eseguiti nel ratto e nella cavia il recettore NK2 è stato descritto su motoneuroni eccitatori, mentre altri studi eseguiti sulla cavia hanno evidenziato la presenza del recettore su fibre nervose discendenti (70). Nel colon umano il recettore NK3 ha una localizzazione prevalentemente neuronale. Nell'animale, i dati disponibili indicano che il recettore NK3 è localizzato sui corpi cellulari dei neuroni secretomotori e vasomotori del plesso sottomucoso, mentre nel plesso mienterico il recettore è contenuto nei neuroni afferenti primari intrinseci, sugli interneuroni ascendenti e discendenti e su motoneuroni inibitori ed eccitatori (71) (Figura 5). Le tabelle riportano la distribuzione dei recettori NK1, NK2 e NK3 nei diversi strati del tratto gastrointestinale umano (Tabella 2) e animale (topo, ratto, cavia; Tabella 3).

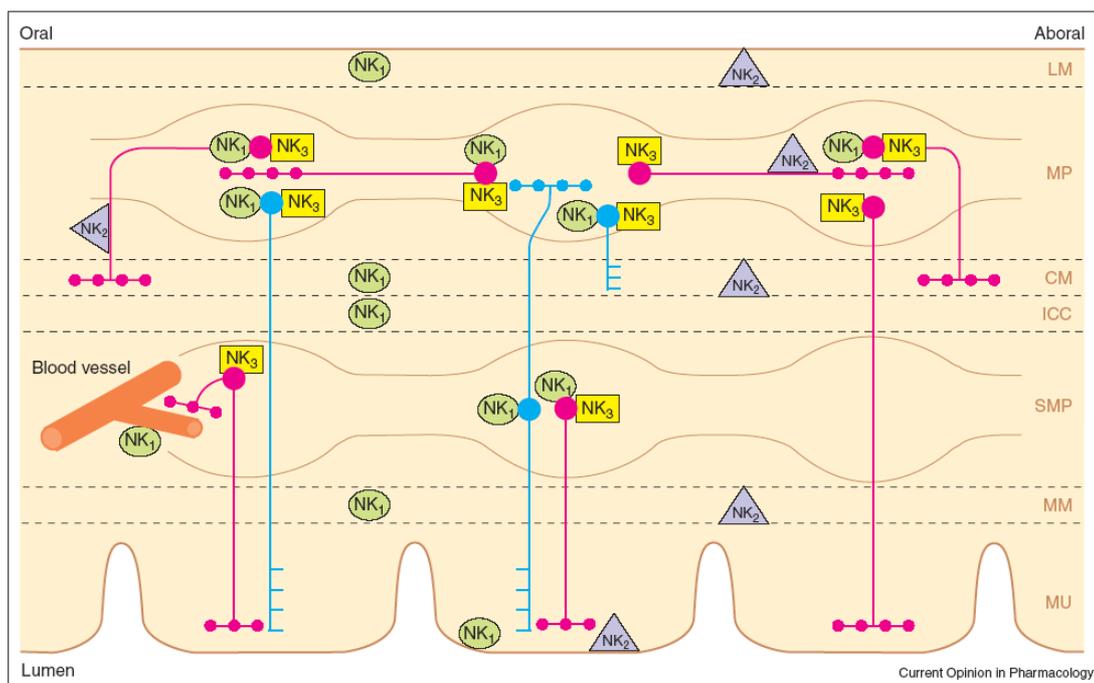


Figura 5. Distribuzione dei recettori delle tachichinine NK₁, NK₂ e NK₃ nel tratto gastrointestinale (59).

Tabella 2. Tabella riassuntiva della localizzazione dei recettori delle TK nel tratto GI umano

DISTRIBUZIONE	NK1	NK2	NK3
<i>Mucosa</i>	Cellule epiteliali, cripte, superficie luminale, fibre nervose	Nessun dato disponibile	Nessun dato disponibile
<i>Lamina propria e sottomucosa</i>	Fibre nervose, cellule endoteliali, poche cellule infiammatorie	Poche cellule infiammatorie	Nessun dato disponibile
<i>Muscularis mucosae</i>	Cellule muscolari lisce	Cellule muscolari lisce	Nessun dato disponibile
<i>Plesso sottomucoso</i>	Fibre nervose e vescicole	Corpo cellulare dei neuroni, varicosità nervose	Corpo cellulare dei neuroni, varicosità nervose
<i>Muscolatura circolare</i>	Cellule muscolari, ICC	Cellule muscolari, varicosità nervose	Cellule muscolari
<i>Plesso mienterico</i>	Corpo cellulare dei neuroni, cellule endoteliali	Corpo cellulare dei neuroni, varicosità nervose	Corpo cellulare dei neuroni
<i>Muscolatura longitudinale</i>	Cellule muscolari lisce, ICC	Cellule muscolari lisce	Cellule muscolari lisce

Tabella 3. Tabella riassuntiva della localizzazione dei recettori delle TK nel topo, ratto e cavia (PM plesso mienterico, PSM plesso sottomucoso, MC muscolatura circolare, ML muscolatura longitudinale, CML cellule muscolari lisce, + intensa, ++ molto intensa, - dati non disponibili) (72).

	NK1			NK2			NK3		
	Topo	Ratto	Cavia	Topo	Ratto	Cavia	Topo	Ratto	Cavia
NEURONI									
PM	++	++	+	-	-	-	++	++	++
PSM	++	++	+	-	-	-	++	++	++
TERMINAZIONI NERVOSE									
ML	-	-	-	-	++	++	-	-	-
MC	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PM	-	-	-	-	++	++	-	-	-
PSM	-	-	-	-	++	+	-	-	-
ICC									
ICC-PM	++	++	++	-	+	-	-	-	-
CELL. MUSC. LISCE									
ML	-	-	-	++	+	+	++	++	++
MC est.	-	-	-	+	+	+	-	-	-
MC int.	-	-	-	++	+	++	++	++	++
VILLI									
CML	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterociti	-	-	-	-	-	++	-	-	-

La trasmissione nervosa enterica coinvolge diversi tipi di neurotrasmettitori: acetilcolina (ACh) e tachichinine agiscono da co-trasmettitori eccitatori a livello muscolare e neuronale.

I neuropeptidi sono considerati mediatori chiave nella comunicazione tra neuroni (in particolare neuroni sensoriali) e cellule effettrici (cellule muscolari, ghiandole e cellule immunitarie), e rivestono numerose funzioni nell'ambito del sistema gastrointestinale.

Studi di immunoistochimica ed analisi quantitative eseguite al microscopio elettronico, hanno evidenziato una colocalizzazione di ACh e TK a livello dei motoneuroni eccitatori. Le TK esplicano la loro azione sull'attività motoria intestinale, stimolando o inibendo questo processo, a seconda del tipo e della localizzazione del recettore coinvolto; questa azione può dipendere dall'attivazione diretta del muscolo, ma anche dalla stimolazione dei motoneuroni enterici che eccitano il muscolo in seguito al rilascio di ACh. I recettori delle TK sono direttamente coinvolti nella trasmissione nervosa dai motoneuroni eccitatori ai muscoli (73); i recettori NK1 e NK2 sono entrambi localizzati sulle cellule muscolari lisce, ma il recettore NK1 ha anche una distribuzione preferenziale sulle ICC. Il recettore NK3, prevalentemente localizzato sui neuroni enterici, media la contrazione colinergica della muscolatura intestinale (73). SP e NKA possono anche deprimere l'attività motoria intestinale attraverso il rilascio di neurotrasmettitori inibitori, come l'ossido nitrico (l'effetto è mediato dal recettore NK3 e dal recettore NK1 sulle vie motorie inibitorie) (74).

Le TK partecipano al controllo neuronale dell'attività secretoria intestinale stimolando la secrezione di fluidi ed elettroliti attraverso l'attivazione dei recettori localizzati sui neuroni secretomotori e sulle cellule epiteliali.

Nella cavia, la secrezione di elettroliti è mediata dai recettori NK1 e NK3 sui neuroni colinergici e non-colinergici del plesso sottomucoso, mentre la stimolazione dei recettori NK2 è priva di effetto (75;76). Nel ratto, l'attività secretoria stimolata dal sistema tachichininergico coinvolge tutti e tre i recettori; l'effetto mediato dal recettore NK2 è strettamente dipendente dalla formazione di prostaglandine (77;78). Uno studio *in vitro* sulla

mucosa di colon umano ha dimostrato che la SP stimola la secrezione di acido cloridrico attraverso una pathways che coinvolge neuroni enterici, mastociti, istamina e prostaglandine (79). Nel maiale, SP e NKA stimolano la secrezione gastrica di acido e pepsinogeno (80) e, attraverso la stimolazione del recettore NK1, la secrezione esocrina ed endocrina dal pancreas (81).

Gli effetti delle TK sulla circolazione a livello intestinale possono condurre a vasodilatazione o vasocostrizione. La SP, attraverso l'attivazione del recettore NK1, può controllare la permeabilità vascolare, un processo che normalmente nell'intestino è sotto il diretto controllo dell'enzima EC 3.4.24.11 (cell-surface enzyme neutral endopeptidase) (82).

2.4 Espressione e funzioni della sostanza P e del recettore NK₁ nell'infiammazione intestinale

Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato che la sostanza P ed il recettore NK1 rivestono un ruolo importante nella fisiopatologia delle malattie infiammatorie intestinali: un'alterata funzionalità del sistema tachichininergico intestinale può determinare l'insorgenza di disturbi di tipo motorio, secretorio ed immunologico caratterizzanti queste patologie.

Nel colon di pazienti con colite ulcerosa in fase attiva è stata osservata un'aumentata espressione della SP (83), mentre altri studi hanno invece mostrato una minore positività delle fibre nervose a questo neuropeptide in presenza di colite ulcerosa (84). Controversi sono i risultati ottenuti nella malattia di Crohn: una significativa diminuzione dei livelli mucosali della SP è stata osservata in pazienti con morbo di Crohn (85). Altri studi hanno invece suggerito una aumentata immunoreattività delle fibre nervose alla SP (86). Mantyh et al. hanno riportato un'aumentata espressione del neuropeptide sui neuroni enterici di pazienti con morbo di Crohn in fase attiva e quiescente, ma non sui neuroni enterici di pazienti con colite ulcerosa (87).

In alcuni studi eseguiti su biopsie ottenute da pazienti affetti da morbo di Crohn e colite ulcerosa, i siti di legame della SP sono risultati aumentati a livello dei vasi sanguigni (arteriole e vene), noduli linfatici (88), così come sui neuroni enterici, vasi sanguigni sottomucosali, cellule infiammatorie della lamina propria e cellule epiteliali (66), suggerendo che il sistema SP-recettore NK1 possa rappresentare il principale circuito immunoregolatore coinvolto nelle IBD. Tuttavia, altri studi hanno evidenziato che, nella colite ulcerosa, l'espressione del recettore resta confinata nelle regioni di colon in cui l'infiammazione è in fase attiva, mentre si osserva up-regulation del recettore in biopsie, patologicamente attive e non, ottenute da pazienti con morbo di Crohn (87).

Un'aumentata espressione del recettore è stata osservata sui neuroni enterici di pazienti con morbo di Crohn, e non sui neuroni enterici di pazienti con colite ulcerosa; queste differenze potrebbero essere legate ad un diverso meccanismo neuronale coinvolto nelle due patologie (87). È stato ipotizzato che il fenomeno di up-regulation del recettore NK1 nelle IBD possa essere direttamente correlato ad un'aumentata espressione di alcune citochine proinfiammatorie; nei macrofagi umani, IL-1 β e TNF- α inducono un aumento nell'espressione del recettore attraverso un meccanismo che coinvolge il fattore di trascrizione nucleare κ B (NF- κ B) (89). NF- κ B può altresì modulare l'espressione del recettore nelle cellule T in risposta alla stimolazione da parte di IL-12 e IL-18, mentre l'IL-10 che inibisce la risposta Th1, è in grado di bloccare questa attivazione (90). NF- κ B gioca un ruolo importante nella risposta infiammatoria nelle IBD e la sua attivazione (91), nella colite da DSS, è immediatamente precedente l'up-regulation del recettore NK1, suggerendo quindi, una stretta interazione tra NF- κ B - SP - recettore NK1 nell'infiammazione intestinale.

Un altro potenziale meccanismo che potrebbe coinvolgere la SP ed il recettore NK1 nella fisiopatologia delle IBD è stato suggerito da uno studio eseguito su campioni di mucosa di colon ottenuta da pazienti con IBD: è stato osservato un incremento nella secrezione di mediatori mastocitari in risposta alla SP rispetto ai campioni sani (92). Questa osservazione

potrebbe indicare un'interazione funzionale esistente tra SP e mastociti nell'infiammazione intestinale. Questo studio è stato successivamente supportato da Riegler et al. che hanno evidenziato come la SP, attraverso il recettore NK1, stimoli il rilascio di istamina dalla mucosa di colon normale, la quale a sua volta, modula la secrezione di acido cloridrico in risposta alla SP (79).

L'up-regulation nell'espressione del recettore NK1 che si osserva sulle cellule infiammatorie della lamina propria e sui vasi sanguigni sottomucosali, può essere coinvolta nella migrazione di granulociti, linfociti e monociti nei tessuti infiammati, mentre l'espressione sulle cellule endoteliali può spiegare il processo di angiogenesi, ovvero la proliferazione, la migrazione ed il differenziamento di strutture simili ai capillari. Bisogna infine considerare il ruolo centrale che riveste il recettore NK1 nell'immunomodulazione mucosale, facilitando la proliferazione dei linfociti e stimolando la produzione di citochine infiammatorie da parte dei macrofagi. Da un punto di vista clinico, l'aumentata espressione del recettore NK1 sulla superficie delle cellule epiteliali potrebbe essere implicata nella patogenesi della diarrea caratteristica delle IBD. Numerose sono le evidenze scientifiche a supporto di questa ipotesi. Il trattamento di ratti con capsaicina, che selettivamente agisce sui neuroni sensoriali primari, o con antagonisti al recettore NK1, riduce in maniera significativa la secrezione di fluidi, la permeabilità mucosale e l'infiammazione intestinale in modelli animali di infiammazione acuta e cronica. L'importanza della SP e del suo recettore nell'insorgenza della diarrea è sottolineata da ulteriori studi che hanno dimostrato un aumento nell'espressione dell'mRNA del recettore NK1 nell'epitelio intestinale di ratto precedentemente esposto alla tossina A di *Clostridium difficile* (93); topi knock-out per lo stesso recettore non mostrano gli effetti secretori e l'insorgenza del danno infiammatorio indotto da *Clostridium difficile* (93).

Antagonisti dei recettori delle tachichinine: implicazioni terapeutiche

Nell'ambito degli antagonisti dei recettori delle tachichinine, il primo farmaco ad ottenere l'autorizzazione all'immissione in commercio è stato *Aprepitant*, capostipite di una nuova classe di farmaci che agisce come antagonista competitivo selettivo del recettore NK₁. Il farmaco, registrato con procedura centralizzata a livello europeo, è indicato per la prevenzione della nausea associata alla chemioterapia altamente e moderatamente emetogena, sia nella fase acuta che ritardata. L'azione sui recettori NK₁ determina un blocco del riflesso emetico a livello del centro del vomito nel troncoencefalo.

In uno studio pubblicato di recente è stato esaminato l'effetto di una singola dose dell'antiemetico aprepitant sulla propulsione gastrointestinale in soggetti sani. Aprepitant non induce cambiamenti nella funzione propulsiva del tratto intestinale. Una maggiore produzione di sostanza P o l'up-regulation del recettore NK₁ sono quindi coinvolte in alcuni disturbi della motilità intestinale; di conseguenza, bisogna considerare la possibilità che antagonisti del recettore NK₁ possano rappresentare un nuovo approccio terapeutico in queste patologie (94).

Nella tabella sottostante sono riportati alcuni degli antagonisti dei recettori delle tachichinine attualmente in sviluppo clinico:

Antagonista	Target molecolare	Indicazione terapeutica
Ezlopitant	Recettore NK ₁	IBS, Emesi (Fase II)
AV608	Recettore NK ₁	IBS
Vofopitant	Recettore NK ₁	Emesi
Nepadutant	Recettore NK ₂	IBS (d-c) (Fase IIa)
Saredutant	Recettore NK ₂	IBS (d-c)
Talnetant	Recettore NK ₃	IBS (d-c)
DNK333	Recettori NK ₁ /NK ₂	IBS-d
SSR241586	Recettori NK ₃ /NK ₂	IBS

Le tachichinine ed i relativi recettori rappresentano un sistema effettore con un ampio range di attività a livello neuronale, sulle cellule muscolari, mucosali, endoteliali, immunitarie o infiammatorie. Recenti dati preclinici ed evidenze cliniche hanno suggerito un marcato coinvolgimento delle tachichinine in numerose patologie.

Nel tratto gastrointestinale i recettori delle tachichinine hanno mostrato un ampio pattern di distribuzione e la possibilità di mediare numerose funzioni. Tuttavia, i trials clinici, non hanno finora fornito risultati incoraggianti, eccetto nel caso di aprepitant come antiemetico, nell'utilizzo di nuovi agenti terapeutici. Inoltre, antagonisti dei recettori NK1, che hanno mostrato potenti effetti analgesici nel dolore viscerale, si sono dimostrati inefficaci nell'uomo (95). Antagonisti dei recettori delle tachichinine potrebbero risultare efficaci nel trattamento dei disordini funzionali gastrointestinali, come la sindrome dell'intestino irritabile, ma anche in questo ambito non sono stati ancora forniti dati definitivi (70). Molti studi in modelli animali hanno evidenziato come il blocco contemporaneo dei tre diversi recettori delle tachichinine possa fornire risultati promettenti. È stato dimostrato che l'iperalgia viscerale è indotta dalla stimolazione dei recettori NK1 e NK2 a livello spinale da parte dei ligandi endogeni, SP e NKA. La combinazione di antagonisti NK1 e NK2 riduce l'ipersensibilità viscerale rispetto all'utilizzo di un singolo antagonista, supportando l'ipotesi che il contemporaneo utilizzo di antagonisti delle tachichinine possa rappresentare un efficace target terapeutico nel trattamento dell'iperalgia viscerale (96).

Nella cavia, il blocco simultaneo dei tre recettori determina un'inibizione della propulsione intestinale pari a circa il 50% (97).

Risulta sempre più convincente l'ipotesi che lo sviluppo di antagonisti efficaci nel bloccare simultaneamente più sottotipi recettoriali, possa fornire un migliore esito terapeutico, rispetto all'utilizzo di antagonisti con attività selettiva verso un singolo recettore.

3. Obiettivo della ricerca

Diversi studi hanno dimostrato che l'infiammazione può essere associata a cambiamenti nell'espressione delle tachichinine (sostanza P, NKA, NKB) sia nell'uomo che in modelli animali. Il pool neuronale di sostanza P e l'espressione del recettore NK₁ risultano notevolmente aumentati in pazienti con malattie infiammatorie intestinali. L'ipotesi che una perturbazione nel sistema tachichinergico possa essere alla base del fenomeno infiammatorio a livello intestinale è stata supportata da numerose evidenze scientifiche che hanno messo in luce gli effetti benefici di antagonisti ai recettori delle tachichinine nei modelli sperimentali di infiammazione.

Il primo obiettivo della nostra ricerca è quello di valutare il possibile effetto protettivo dell'antagonista selettivo al recettore NK₁, SSR140333, nel modello acuto di infiammazione intestinale da acido 2,4 dinitrobenzensulfonico (DNBS) nel ratto. La colite indotta da DNBS è un modello sperimentale di infiammazione intestinale altamente riproducibile e piuttosto semplice; l'infiammazione transmurale e l'attivazione immunitaria riscontrabili nella colite indotta da DNBS mostrano strette somiglianze con quanto si verifica nel morbo di Crohn.

Il secondo obiettivo del nostro studio è quello di sviluppare e mettere a punto un modello cronico di colite da DNBS nel ratto che riproduca il decorso clinico delle malattie infiammatorie croniche intestinali umane, caratterizzate da periodi di attività del processo infiammatorio intervallati da fasi più o meno lunghe di remissione della sintomatologia, e successivamente, valutare l'effetto protettivo dell'antagonista SSR140333 sulla riattivazione della colite.

4. Materiale e metodi

In questo studio sono stati utilizzati ratti Sprague Dawley di sesso maschile (peso 180-200 g; Harlan Italy, S. Pietro al Natisone (UD), Italia). Gli animali sono stati mantenuti nello stabulario del Dipartimento di Farmacologia, in ambiente controllato, e nutriti con pellets ed acqua durante tutta la durata dello studio.

Gli animali sono stati manipolati tutti i giorni per almeno una settimana prima dell'inizio delle procedure sperimentali e sono stati pesati tutti i giorni a partire dal giorno precedente l'induzione della colite.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti nel rispetto delle linee guida della Direttiva CEE 86/609 sull'uso degli animali sperimentali (D. Lgs. 116/92); il protocollo è stato approvato dal Comitato Etico per l'uso di animali sperimentali dell'Università di Bologna ed è stato autorizzato da Ministero della Salute (Decreto N. 58/2002 B e 38/2005 B).

4.1 Colite indotta da DNBS

I ratti sono stati leggermente anestetizzati attraverso l'inalazione di etere (Sigma Chemicals) per garantire il risveglio dell'animale dopo 4-5 minuti.

Abbiamo disciolto 15 mg/ratto di DNBS in una soluzione al 50% di etanolo in acqua, per un volume totale di 0,25 ml; l'etanolo viene utilizzato per rompere la barriera epiteliale e permettere così la penetrazione del DNBS negli strati più profondi della parete intestinale. Abbiamo instillato la soluzione così ottenuta nel lume del colon distale di ogni animale, usando un catetere intrarettale di plastica (PE90), della lunghezza di 8 cm, in modo tale da raggiungere la fessura splenica. Durante il procedere dell'esperimento abbiamo attentamente controllato l'eventuale espulsione della soluzione dal retto al momento del risveglio dell'animale, tenendone conto nella valutazione finale.

Negli esperimenti di controllo, gli animali hanno ricevuto 0,25 ml di una soluzione allo 0,9% di NaCl.

I ratti appartenenti ai diversi gruppi sperimentali (gruppo di controllo non infiammati, gruppi infiammati ed infiammati trattati con farmaco) sono stati mantenuti in gabbie separate durante tutto il corso dell'esperimento. I ratti sono stati sacrificati al giorno 6, giorno in cui l'infiammazione raggiunge il picco massimo.

4.1.1 Modello di colite acuta da DNBS nel ratto

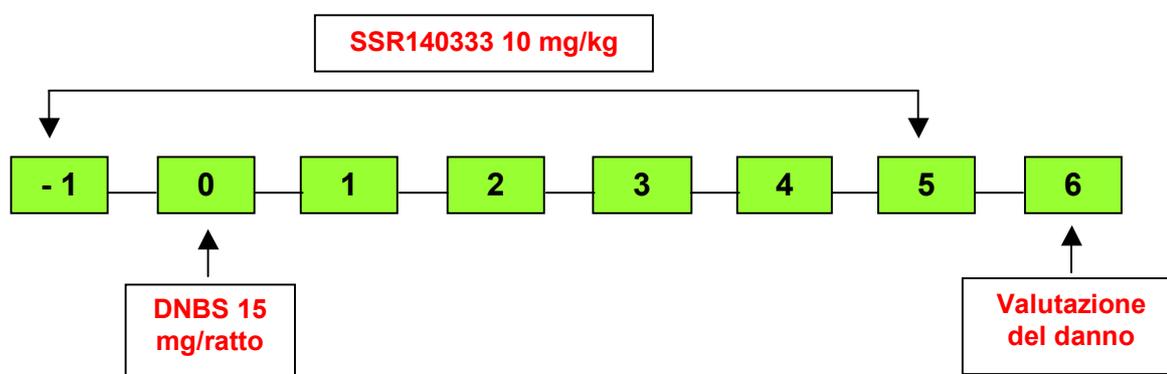
Gruppi sperimentali

Il disegno sperimentale include gruppi di ratti con e senza colite, con un numero di animali per gruppo pari a 8.

L'antagonista al recettore NK₁, SSR140333, è stato disciolto in acqua e somministrato oralmente agli animali, tramite gavage, secondo due differenti schemi di trattamento:

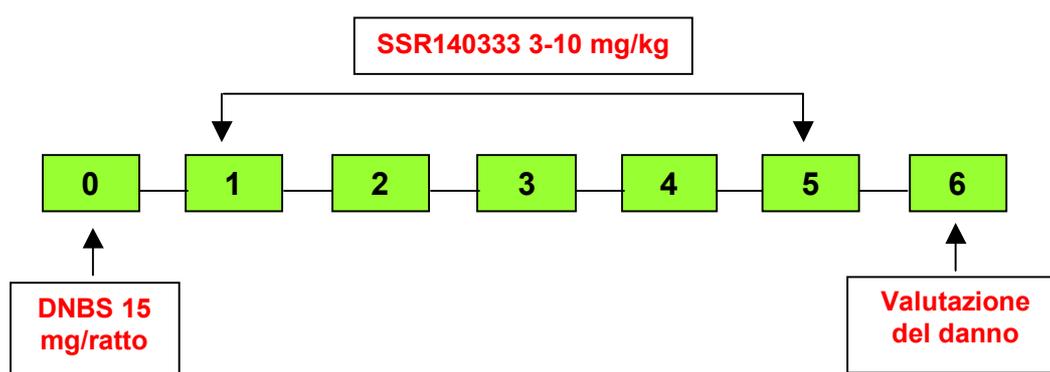
- preventivo: il farmaco, alla dose di 10 mg/kg, è stato somministrato oralmente agli animali, tramite gavage, tutti i giorni alla stessa ora (17:00) per sette giorni a partire dal giorno precedente l'induzione della colite (volume massimo somministrato: 1 ml) (Tabella 4A).

La procedura seguita è riportata nella figura sottostante:



- curativo: il farmaco, alle dosi di 3 e 10 mg/kg, è stato somministrato oralmente agli animali, tramite gavage, tutti i giorni alla stessa ora (17:00) a partire dal giorno 1 successivo l'induzione della colite (volume massimo somministrato: 1 ml) (Tabella 4B).

La procedura seguita è riportata nella figura sottostante:



I ratti sono stati sacrificati il sesto giorno dopo l'induzione della colite; il metodo utilizzato è quello della dislocazione cervicale previa lieve anestesia con etere.

Tabella 4A. Trattamento *preventivo* con SSR140333 nel modello acuto di colite da DNBS

Gruppo	Somministrazione intrarettale	Stato	Trattamento orale (dal giorno -1 al giorno 5)	Sacrificio
A	Salina	Non infiammato	Veicolo (acqua)	Giorno 6
B	DNBS	Infiammato	Veicolo (acqua)	Giorno 6
C	DNBS	Infiammato	SSR140333 10 mg/kg	Giorno 6

Tabella 4B. Trattamento *curativo* con SSR140333 nel modello acuto di colite da DNBS

Gruppo	Somministrazione intrarettale	Stato	Trattamento orale (dal giorno 1 al giorno 5)	Sacrificio
A	Salina	Non infiammato	Veicolo (acqua)	Giorno 6
B	DNBS	Infiammato	Veicolo (acqua)	Giorno 6
C	DNBS	Infiammato	SSR140333 3 mg/kg	Giorno 6
D	DNBS	Infiammato	SSR140333 10 mg/kg	Giorno 6

4.1.2 Modello di colite cronica da DNBS nel ratto

Per quanto riguarda questo modello di colite è stato necessario mettere a punto il metodo e scegliere la dose appropriata di DNBS, tale da determinare la riattivazione del fenomeno infiammatorio.

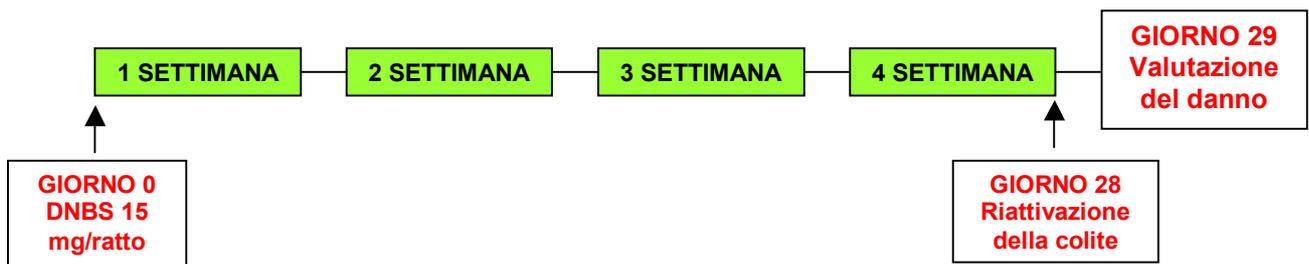
In letteratura è riportata la possibilità di effettuare una prima somministrazione intrarettale di DNBS alla dose di 30 mg/ratto, seguita da una seconda somministrazione i.v. di 5 mg/kg per tre giorni consecutivi, sei settimane dopo la prima induzione della colite (56).

Studi più recenti mostrano la possibilità di ottenere la riattivazione del processo infiammatorio attraverso la somministrazione intrarettale di una stessa dose di DNBS (15 mg/ratto) a distanza di sei settimane (98).

Allo scopo di ottenere un danno infiammatorio paragonabile all'entità del danno indotto da una dose di DNBS pari a 15 mg/ratto, già testata negli esperimenti in acuto, e accompagnata da un tasso di mortalità pari allo 0%, abbiamo utilizzato due diverse dosi di DNBS (7.5 mg/ratto e 10 mg/ratto in una soluzione al 35% di etanolo) per valutare l'effetto dose risposta sui diversi parametri utilizzati nella valutazione dell'infiammazione; una volta valutato quale fosse la dose più adeguata di DNBS, che rispondesse ai requisiti richiesti, abbiamo anche studiato il decorso dell'infiammazione, valutandone il grado a diversi time point (giorno 0, giorno 3, giorno 6 e giorno 10, giorno 21, giorno 28 e giorno 29).

In base ai risultati ottenuti dagli esperimenti dose/risposta e di time course, per ottenere la riattivazione della colite abbiamo deciso di somministrare agli animali una dose di DNBS pari a 7.5 mg per ratto quattro settimane (giorno 28) dopo la prima somministrazione intrarettale di DNBS (giorno 0) (15 mg/ratto) e di sacrificare gli animali al giorno 29, ovvero 24 ore dopo la seconda somministrazione di DNBS.

La procedura seguita è riportata nella figura sottostante:



La fase successiva degli esperimenti ha previsto l'utilizzo del modello precedentemente descritto per lo studio dell'effetto preventivo dell'antagonista del recettore NK₁, SSR140333, sul riacutizzarsi del processo infiammatorio.

Disegno sperimentale

Il disegno sperimentale include gruppi di ratti con e senza colite, con un numero di animali per gruppo compreso tra 4 e 8 (Tabella 5). La colite è stata indotta negli animali attraverso una prima somministrazione di DNBS al giorno 0 (15 mg/ratto) seguita da una seconda somministrazione di DNBS al giorno 28 (7.5 mg/ratto) (9:00). SSR140333, alla dose di 10 mg/kg, è stato disciolto in acqua e somministrato oralmente agli animali, tramite gavage, tutti i giorni alla stessa ora (17:00) per sette giorni, a partire dal giorno 21 (volume massimo somministrato: 1 ml). I ratti sono stati sacrificati al giorno 29 (24 ore dopo la seconda somministrazione di DNBS).

La procedura seguita è riportata nella figura sottostante:

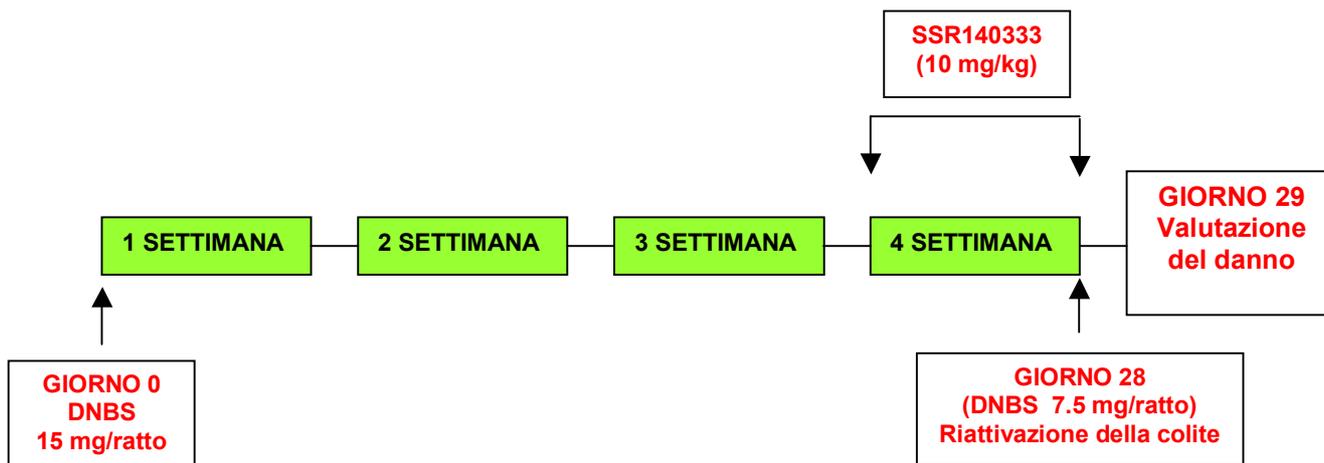


Tabella 5. Schema di trattamento con SSR140333 nel modello di colite cronica indotta da DNBS

Gruppo	Somministrazione intrarettale	Stato	Trattamento orale (dal giorno 21 al giorno 27)	Sacrificio
A	Salina	Non infiammato	Veicolo (acqua)	Giorno 29
B	DNBS (giorno 0 e giorno 28)	Infiammato	Veicolo (acqua)	Giorno 29
C	DNBS (giorno 0 e giorno 28)	Infiammato	SSR140333 10 mg/kg	Giorno 29

In entrambi i modelli sperimentali il grado di infiammazione e l'attività del farmaco sono stati valutati attraverso score macroscopici ed istologici, attività della mieloperossidasi e mediante la determinazione quantitativa dei livelli tissutali di citochine pro-infiammatorie (TNF- α) e neuropeptidi (sostanza P).

Valutazione del peso

Al fine di valutare quantitativamente come l'infiammazione indotta da DNBS possa influenzare tale parametro, i ratti di ciascun gruppo sperimentale sono stati pesati tutti i giorni alla stessa ora (9:00) per tutta la durata dello studio.

Valutazione del danno macroscopico

Una volta sacrificato l'animale, è stato rimosso il colon distale dalla cavità addominale, è stato aperto longitudinalmente e lavato con PBS in modo tale da rimuovere l'eventuale contenuto luminale.

I criteri di valutazione del danno macroscopico sono di seguito riportati; al fine di quantificare l'entità del danno infiammatorio a ciascun parametro è stato assegnato un punteggio, la cui somma è indice del grado di danno macroscopico:

- Presenza di aderenze tra il colon e altri organi intraddominali e l'estensione delle stesse: 0, 1, 2 (nessuna, media, maggiore);
- Consistenza del materiale fecale (metodo indiretto di identificazione della diarrea): 0, 1, 2 (formato, morbido, liquido);
- Spessore della parete del colon (espresso in mm);
- Presenza ed estensione dell'iperemia e del danno mucosale: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 (nessuna, iperemia, ulcera, ulcera più infiammazione, due o più ulcere, danno maggiore, danno maggiore superiore a due cm).

Valutazione del danno microscopico

Al fine di effettuare l'analisi istologica abbiamo prelevato porzioni di tessuto immediatamente adiacenti alla regione infiammata del colon; per

quanto riguarda i ratti non infiammati (trattati con soluzione fisiologica), le biopsie sono state prelevate alla stessa altezza da cui sono state prelevate le biopsie di tessuto infiammato. Alcune porzioni di tessuto sono state quindi fissate in paraformaldeide (PFA) al 4% per 3 ore e successivamente conservate in una soluzione al 25% di saccarosio in PBS fino al momento dell'inclusione e comunque per non meno di due giorni.

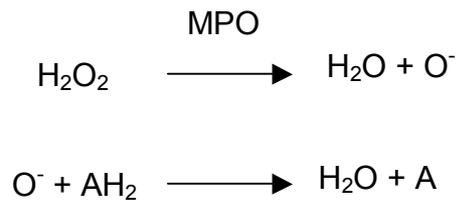
Abbiamo incluso i tessuti in O.C.T. (*Tissue Freezing Medium*), e successivamente proceduto al taglio di sezioni da 10-12 μm attraverso l'utilizzo di un criostato, mantenuto alla temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Abbiamo successivamente fissato le sezioni su vetrini silanati e le abbiamo colorate con ematossilina-eosina (H&E). Le sezioni di colon sono state valutate al microscopio ottico, per quantificare l'entità del danno infiammatorio e le modificazioni patologiche presenti in questi tessuti.

I criteri istologici esaminati includono:

- perdita dell'architettura mucosale: 0, 1, 2 (assente, media, moderata);
- infiltrazione cellulare: 0, 1,2 (assente, media, moderata);
- spessore della muscolatura esterna: 0, 1, 2 (assente, medio, moderato);
- presenza di ascessi criptici: 0, 1 (assente, presente);
- deplezione di cellule mucipare: 0, 1 (assente, presente).

Valutazione dell'attività' della mieloperossidasi (MPO)

La MPO è un enzima associato ai granuli, contenuto primariamente nei neutrofili e in altre cellule di origine mieloide, largamente utilizzato come marker di infiammazione intestinale (99). La sua azione è di seguito descritta:



L'acqua ossigenata viene scissa dalla mieloperossidasi rilasciata dai campioni tissutali a seguito di un'omogenizzazione nel detergente HTAB buffer (bromuro di esadeciltrimetilammonio), preparato sciogliendo 5 g di bromuro di esadeciltrimetilammonio in 1 l di una soluzione tampone a pH= 6,0 di fosfato di potassio.

Il radicale ossigeno che ne risulta si combina poi con la diidrocilidro o-dianisidina, donatore di idrogeno (AH₂), che viene convertita in un composto colorato (A) il quale, attraverso una successiva lettura spettrofotometrica, permette di risalire al contenuto tissutale di MPO.

Prima di dare inizio all'esperimento occorre portare i tessuti da -80°C a +4°C immergendo le provette in ghiaccio per 15 minuti circa. Da questo momento in poi i tessuti dovranno essere tenuti costantemente in ghiaccio.

Abbiamo pesato i tessuti e li abbiamo trasferiti dalle eppendorf in provette più grandi. In ogni provetta abbiamo aggiunto 1ml di HTAB per ogni 50 mg di tessuto; abbiamo omogenato il tutto con il polytron a velocità media per circa 20 secondi e centrifugato a 6000 g per 10 minuti a 4°C. Abbiamo prelevato 7 µl del sovrantante ottenuto ed abbiamo caricato ciascun campione, in triplicato, nella piastra, riservando la prima colonna al bianco (200 µl di acqua distillata in ogni cella). Nelle medesime cellette abbiamo poi aggiunto 200 µl della soluzione di o-dianisidina (preparata con 16,7 mg di diidrocilidro o-dianisidina, 90 ml di acqua, 10 ml di potassio fosfato buffer e, aggiungendo, poco prima di caricare la piastra, 50 µl di una soluzione di acqua ossigenata al 30%).

La piastra completa è stata infine inserita nello spettrofotometro alla λ=450 nm, ottenendo 3 letture ad intervalli di 30 secondi.

Attraverso un programma di statistica (GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA), è stato possibile disegnare un grafico dell'assorbanza (A) in funzione del tempo, grazie al quale si risale al valore dello Slope (z), cioè il variare dell'assorbanza nel tempo.

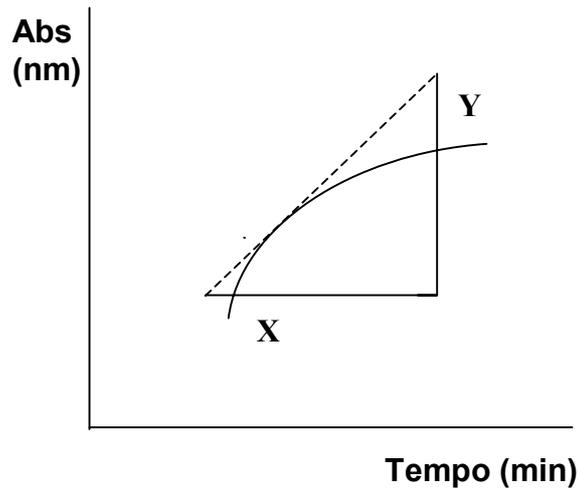


Figura 6. Grafico dell'assorbanza (A) in funzione del tempo; z= pendenza della retta (slope).

$$\text{Cambio in assorbanza in } \text{min}^{-1} = Y \text{ (nm)} / X \text{ (min)} = Z \text{ (nm} \cdot \text{min}^{-1})$$

1 mole di H_2O_2 dà un cambio in assorbanza $= 1.13 \cdot 10^4$, quindi 1 μmole dà un cambio in assorbanza $= 1.13 \cdot 10^{-2}$ e 1 unità di MPO = split 1 μmole $\text{H}_2\text{O}_2 = 1.13 \cdot 10^{-2}$.

$$\text{Unità di MPO nel pozzetto} = Z / 1.13 \cdot 10^{-2}$$

Se il rapporto tessuto / tampone è pari a 50 mg/ml, allora in 7 μl di omogenato (quantità che è stata caricata in ciascun pozzetto), ci sono 0.35 mg di tessuto; di conseguenza per ottenere unità/mg occorre dividere per 0.35.

In definitiva, l'MPO è espressa in unità per mg di tessuto, dove una unità corrisponde all'attività richiesta per degradare una μmol di perossido di idrogeno in un minuto a temperatura ambiente.

Valutazione dei livelli tissutali del tumor necrosis factor- α (TNF- α)

La concentrazione tissutale del TNF- α è stata saggiata su porzioni di colon rimosse dalla zona più prossima al danno, congelate in azoto liquido e conservate a -80° fino al momento dell'utilizzo.

Il TNF- α è una citochina proinfiammatoria sintetizzata da diversi tipi di cellule (es. macrofagi e mastociti), durante le fasi iniziali del processo infiammatorio. L'espressione ed i livelli tissutali della suddetta citochina sono stati valutati attraverso l'utilizzo di un saggio ELISA (Rat TNF- α US ultrasensitive di Biosource International).

Abbiamo introdotto ciascun campione, scongelato tramite immersione in ghiaccio, in una provetta contenente una soluzione di inibitori della proteasi (Pepstatina, Aprotinina e Leupeptina, $1\mu\text{g/ml}$, , Sigma Chemicals, USA).

Abbiamo omogenato i tessuti ad una velocità media per circa 20 secondi e li abbiamo vortexati all'interno di apposite provette. Abbiamo quindi riempito ciascuna eppendorf per circa i $2/3$ e l'abbiamo messa in centrifuga a 4°C a velocità massima (6000 g) per 15 minuti. Abbiamo aggiunto a tutti i pozzetti della piastra, tranne quelli riservati al bianco, $100\ \mu\text{l}$ di Standard Diluent Buffer, quindi $100\ \mu\text{l}$ di soluzione standard a diverse concentrazioni ed il campione in duplicato. Abbiamo coperto la piastra e l'abbiamo lasciata in incubazione per circa tre ore a temperatura ambiente.

Durante la prima incubazione l'antigene rat TNF- α si lega su di un sito specifico presente sull'anticorpo immobilizzato.

Trascorse le tre ore abbiamo lavato la piastra per sei volte con il Washing buffer ed abbiamo aggiunto ad ogni pozzetto $100\ \mu\text{l}$ di anti-TNF- α biotinilato, ad eccezione di quelli riservati al bianco ed abbiamo fatto una seconda incubazione a temperatura ambiente per 45 minuti.

Nel corso della seconda incubazione, l'anticorpo si lega al rat TNF- α immobilizzato, catturato durante la prima incubazione.

Scaduto questo tempo abbiamo nuovamente lavato la piastra per 6 volte con il washing buffer; abbiamo aggiunto ad ogni pozzetto, tranne quello

del bianco, 100 μ l di streptavidina-HRP-working solution ed abbiamo dato inizio alla terza incubazione a temperatura ambiente per 45 minuti.

Terminato questo periodo, abbiamo lavato la piastra come descritto in precedenza, così da rimuovere l'eccesso di enzima non legatosi all'anticorpo biotinilato, ed abbiamo aggiunto ad ogni pozzetto, eccetto il bianco, 100 μ l di cromogeno stabilizzato; abbiamo ricoperto la piastra ed abbiamo proceduto all'ultima incubazione a temperatura ambiente, al buio, per circa 20 minuti.

Al termine di questa incubazione abbiamo addizionato ad ogni pozzetto 100 μ l di Stop Solution, al fine di bloccare la reazione, mentre nei pozzetti del bianco abbiamo introdotto 100 μ l di cromogeno più 100 μ l di Stop Solution.

L'intensità della colorazione prodotta è direttamente proporzionale alla concentrazione di TNF- α presente nel campione in esame. L'assorbanza è letta allo spettrofotometro alla $\lambda=450$ nm ed i dati analizzati tramite un software collegato allo spettrofotometro (Magellan-3). La concentrazione di TNF- α viene espressa in pg su mg di tessuto.

Determinazione quantitativa dei livelli tissutali di sostanza P

La concentrazione tissutale di Sostanza P è stata determinata su porzioni di colon rimosse dalla zona più prossima al danno.

L'espressione ed i livelli tissutali della Sostanza P sono stati valutati attraverso l'utilizzo di un saggio ELISA (Sustance P EIA kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI).

Questo saggio si basa sul legame competitivo tra sostanza P ed il complesso sostanza P-acetilcolinesterasi (SP-AchE Tracer) su dei siti di legame specifici presenti sul SP *rabbit-antiserum*. Dal momento che la concentrazione del tracciante (SP-AchE Tracer) è mantenuta costante, mentre la concentrazione della SP varia, la quantità di SP tracer in grado di legarsi ai siti di legame specifici sarà inversamente proporzionale alla concentrazione di SP nei pozzetti. Il complesso SP-rabbit antiserum si

lega all'anticorpo monoclonale di topo anti-IgG di coniglio precedentemente attaccato alla piastra.

La piastra viene quindi lavata più volte per rimuovere i reagenti non legati e successivamente si procede con l'aggiunta dell'*Ellman's Reagent* (substrato dell'AChE) in tutti i pozzetti. Il prodotto di questa reazione enzimatica produce una colorazione gialla ed assorbe ad una $\lambda=412$ nm.

L'intensità del colore, determinata spettrofotometricamente (Magellan-3), è direttamente proporzionale alla quantità di SP Tracer, che è, a sua volta, inversamente proporzionale alla quantità di SP libera presente nei pozzetti durante l'incubazione.

La concentrazione di SP viene espressa in pg su μg di proteine totali.

La determinazione delle proteine totali è stata effettuata mediante l'utilizzo del Quick Start TM Bradford Protein Assay (catalog No 500-0205, Biorad Laboratories Inc.). Il saggio colorimetrico prevede l'allestimento di una curva di taratura con concentrazioni crescenti di uno standard proteico BSA, incubazione con reattivo di Bradford per il dosaggio proteico di standards e campioni, e lettura delle frazioni a 595 nm.

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media (\pm SEM); *n* si riferisce al numero di animali usati per ciascun esperimento. L'analisi statistica è stata eseguita usando l'analisi della varianza (one-way o two-way), applicando la correzione di Bonferroni per i confronti multipli. Un valore di $p<0.05$ è considerato significativo.

5. Risultati

Il trattamento con DNBS 15 mg (Gruppo B) aumenta significativamente tutti i parametri rispetto al gruppo di controllo trattati con soluzione fisiologica (Gruppo A), (figure 7-14).

5.1 Valutazione del possibile ruolo protettivo dell'antagonista del recettore NK_1 , SSR140333 nel modello acuto da DNBS

I. TRATTAMENTO PREVENTIVO

Peso percentuale

Il peso corporeo all'inizio del trattamento (giorno -1) era simile in tutti i gruppi . Durante il periodo di osservazione di 8 giorni l'aumento di peso corporeo dei controlli non infiammati (gruppo A) è stato del 26.5 ± 1.77 %. In seguito alla somministrazione intrarettale di DNBS 15 mg/ratto l'aumento di peso corporeo è significativamente diminuito rispetto ai controlli non infiammati ($p < 0.001$).

Il trattamento con SSR140333, 10 mg/kg, porta ad un miglioramento statisticamente significativo del peso corporeo ($p < 0.001$; Figura 7).

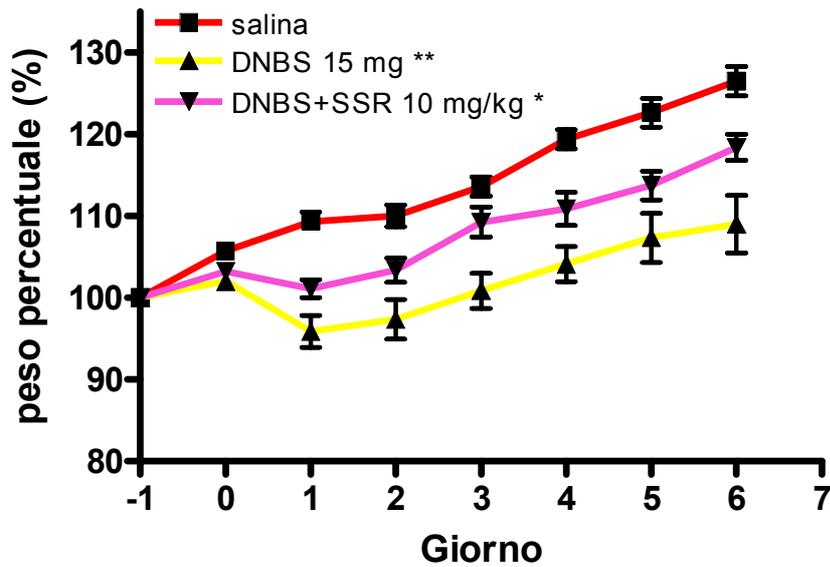


Figura 7. Variazione percentuale del peso corporeo. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs gruppo A; * $p < 0.01$ vs gruppo B

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=8) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

Danno macroscopico

La figura 8 mostra lo score del danno macroscopico in tutti i gruppi; in seguito all'induzione della colite, il danno macroscopico è aumentato in maniera statisticamente significativa ($p < 0.001$).

La somministrazione di SSR140333, alla dose di 10 mg/kg porta ad una riduzione statisticamente significativa dello score del danno macroscopico prodotto dal DNBS ($p < 0.001$, figura 8).

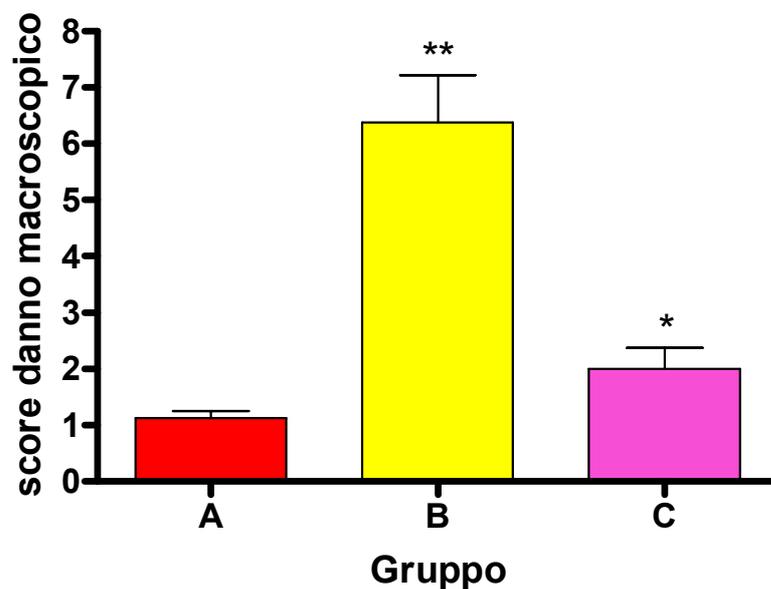


Figura 8. Score del danno macroscopico nel colon, in differenti gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.001$ vs gruppo A; * $p < 0.001$ vs gruppo B.

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=8) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

In figura 9 è raffigurato il colon distale di un ratto trattato con 15 mg di DNBS (A-C) e trattato con SSR140333, 10 mg/kg (B-D); come appare all'analisi macroscopica il danno infiammatorio è molto esteso, caratterizzato da iperemia, ulcerazione (superiore ai 2 cm) ed ispessimento del colon (figura 9). Il trattamento con l'antagonista SSR140333 riduce in maniera significativa i parametri macroscopici.

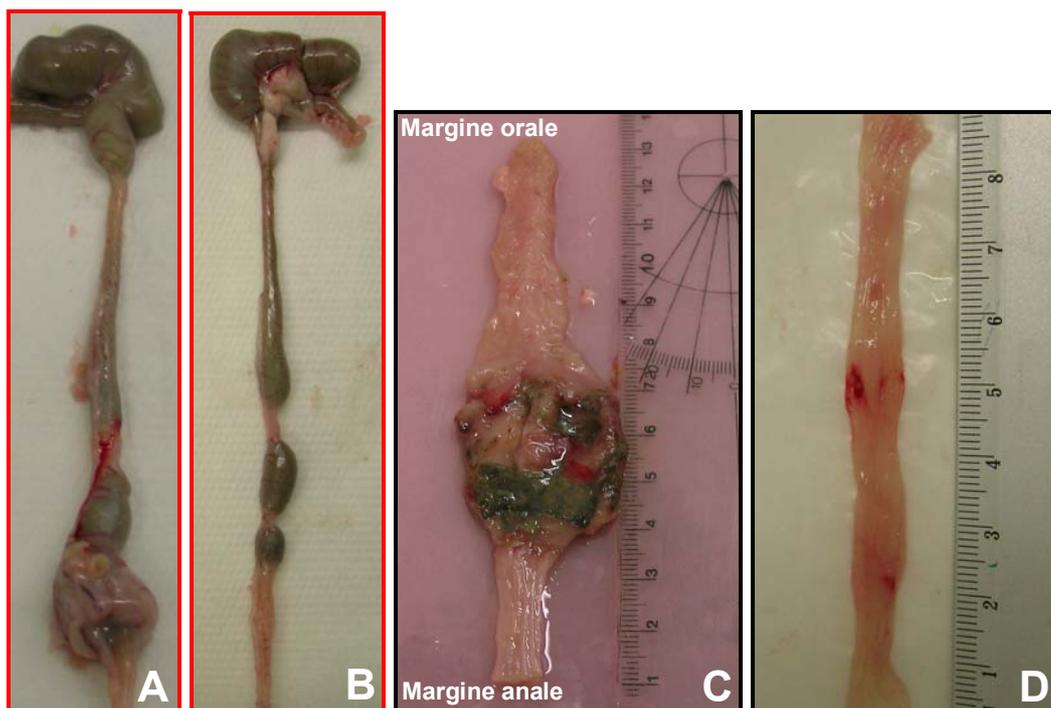


Figura 9. Foto rappresentative di colon distale intero e aperto longitudinalmente lungo il margine mesenterico di un ratto trattato con DNBS 15 mg (A-C) e di un ratto infiammato trattato con SSR140333 (B-D).

Score microscopico

La figura 10 mostra lo score del danno microscopico in tutti i gruppi; il danno microscopico è significativamente aumentato a seguito della somministrazione intrarettale di DNBS ($p < 0.001$).

La somministrazione orale di SSR140333 determina una riduzione statisticamente significativa del danno microscopico ($p < 0.001$ figura 10).

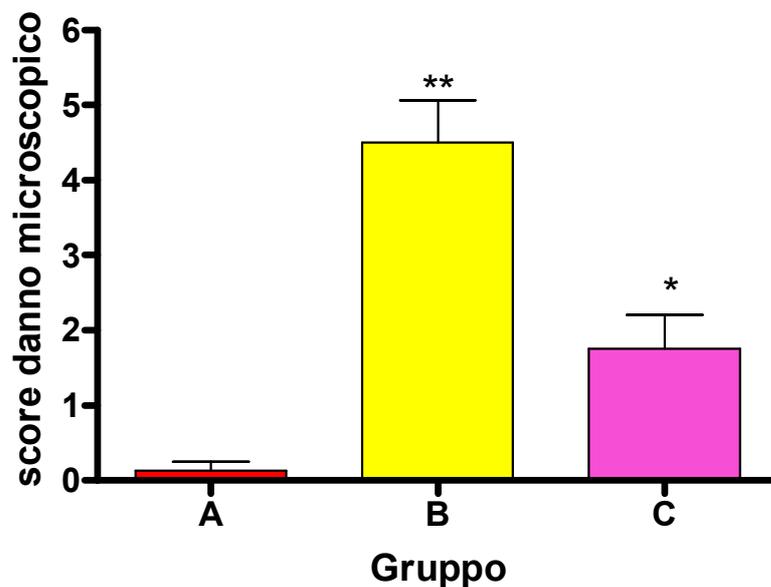


Figura 10. Score del danno microscopico nel colon, in differenti gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.001$ vs. gruppo A; * $p < 0.001$ vs. gruppo B

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=8) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

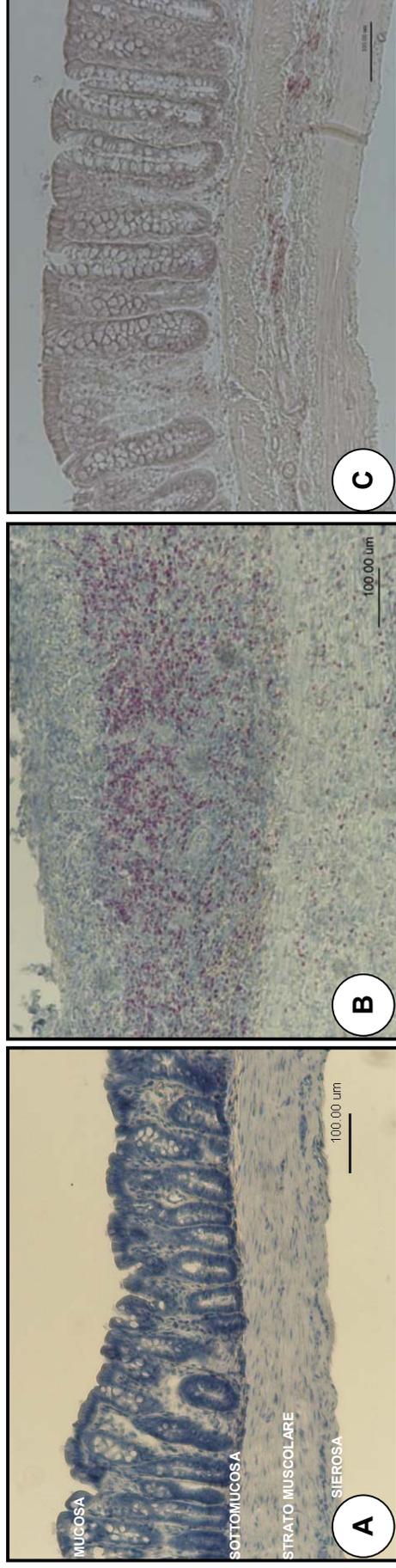


Figura 11. Esempi rappresentativi di sezioni trasversali di colon distale di un ratto di controllo (A) (soluzione fisiologica intrarettale + veicolo per via orale) e di un ratto infiammato (B) (DNBS 15 mg intrarettale + veicolo per via orale) (colorazione H&E, ingrandimento finale 100X). Da notare la severità del danno con perdita di architettura della mucosa, perdita di cellule mucipare ed un massiccio infiltrato granulocitario che si estende attraverso mucosa e sottomucosa, interessando anche la *muscularis propria*, che appare ispessita. Nel pannello C è rappresentata una sezione trasversale di colon distale di un ratto infiammato trattato con SSR140333 10 mg/kg (trattamento preventivo) (colorazione H&E, ingrandimento finale 100X). Da notare il ripristino dell'architettura mucosale, la diminuzione della ulcerazione e dell'ispessimento muscolare e la riduzione dell' infiltrato infiammatorio.

Mieloperossidasi (MPO)

La Figura 12 mostra l'attività della MPO nel colon in tutti i gruppi; l'attività della MPO è significativamente aumentata ($p < 0.001$) a seguito della somministrazione intrarettale di DNBS 15 mg/ratto.

La somministrazione di SSR140333 10 mg/kg, determina una riduzione significativa dell'attività della MPO, ($p < 0.01$).

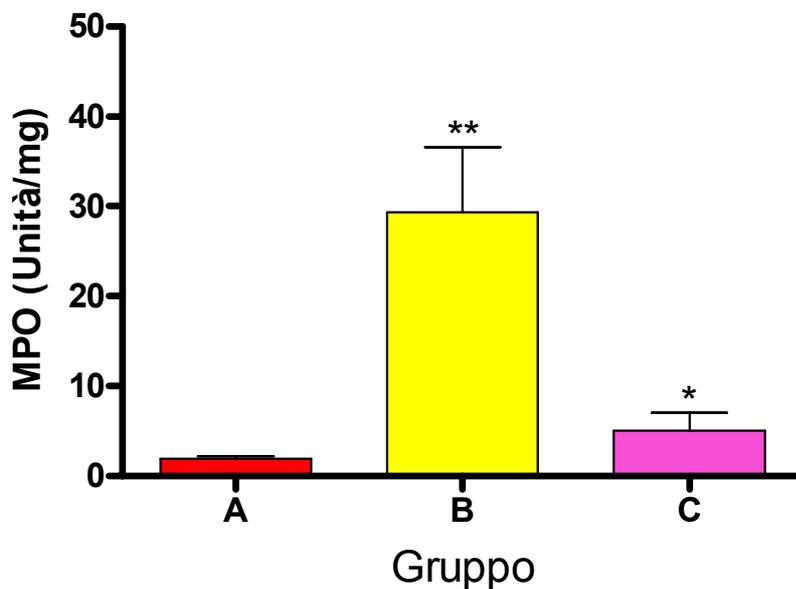


Figura 12. Attività della mieloperossidasi nel colon. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs gruppo A; * $p < 0.01$ vs gruppo B

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=8) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

Livelli tissutali di tumor necrosis factor- α (TNF- α)

La Figura 13 mostra i livelli tissutali di TNF- α nel colon; i livelli di TNF- α sono aumentati in maniera significativa a seguito della somministrazione intrarettale di DNBS ($p < 0.001$). La somministrazione di SSR140333, alla dose di 10 mg/kg, determina una riduzione dei livelli tissutali di TNF- α , sebbene il risultato non sia statisticamente significativo ($p = 0.05$).

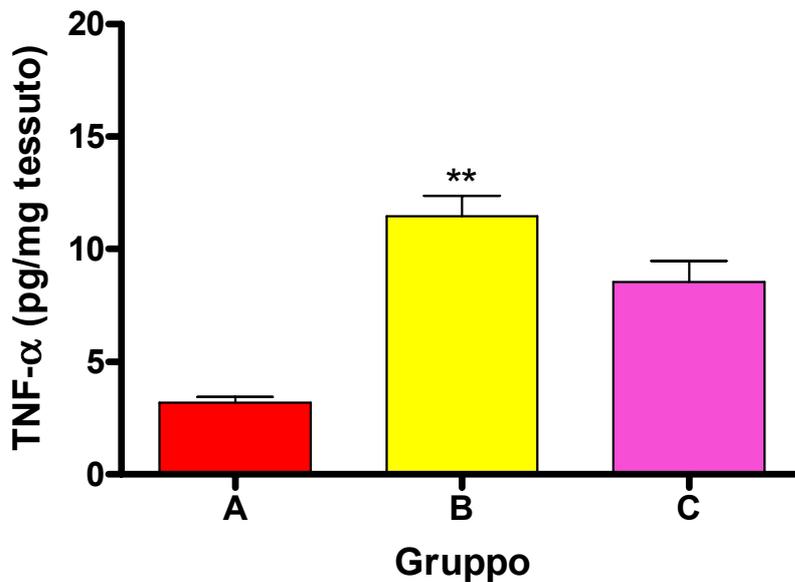


Figura 13. Livelli tissutali di TNF-alfa nei diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.001$ vs gruppo A

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=3) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=11): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=7): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

Determinazione quantitativa dei livelli tissutali di sostanza P

La Figura 14 mostra i livelli tissutali di sostanza P (SP) nel colon; i livelli di SP sono aumentati a seguito della somministrazione intrarettale di DNBS. La somministrazione di SSR140333, alla dose di 10 mg/kg, determina una riduzione dei livelli tissutali di SP, riportando i livelli del neuropeptide a quelli del gruppo A (controllo sano).

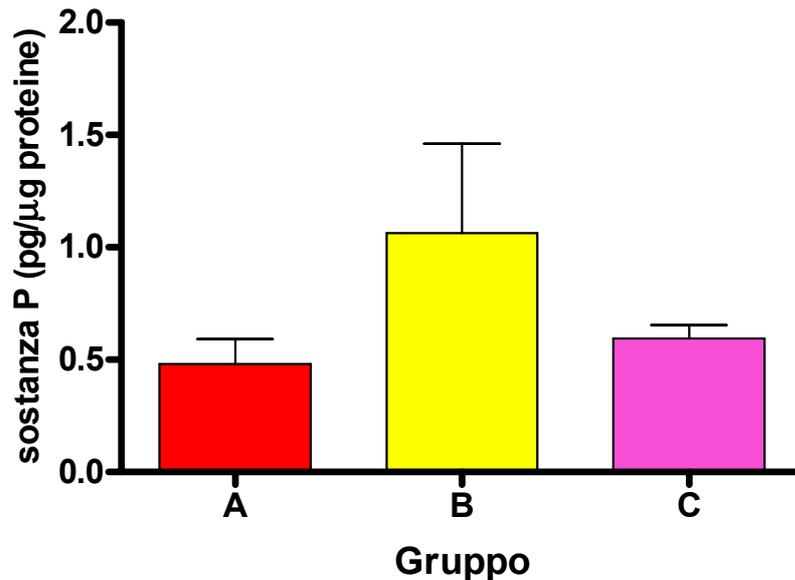


Figura 14. Livelli tissutali di SP nei diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM.

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=4) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=7): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=7): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale.

II. TRATTAMENTO CURATIVO

Peso percentuale

Il peso corporeo all'inizio del trattamento (Giorno -1) era simile in tutti i gruppi. Durante il periodo di osservazione di 8 giorni l'aumento di peso corporeo dei controlli non infiammati (gruppo A) è stato del $26.5 \pm 1.77\%$. In seguito alla somministrazione intrarettale di DNBS 15 mg/ratto l'aumento di peso corporeo è significativamente diminuito rispetto ai controlli non infiammati ($p < 0.001$). Il trattamento con SSR140333, 3 e 10 mg/kg, porta ad un miglioramento del peso corporeo, sebbene risultati statisticamente significativi sia stati raggiunti solo con la dose di 10 mg/kg ($p < 0.01$).

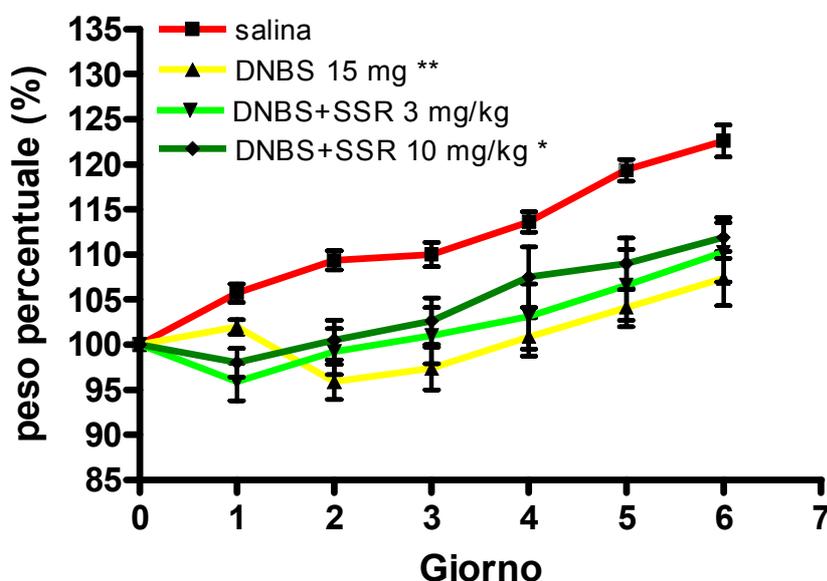


Figura 15. Variazione percentuale del peso corporeo. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.001$ vs gruppo A; * $p < 0.01$ vs gruppo B

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=8) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 3 mg/kg per via orale

Gruppo D (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

Danno macroscopico

La figura 16 mostra lo score del danno macroscopico in tutti i gruppi; in seguito all'induzione della colite, il danno macroscopico è aumentato in maniera statisticamente significativa ($p < 0.001$).

La somministrazione di SSR140333, alle dosi di 3 e 10 mg/kg porta ad una riduzione statisticamente significativa dello score del danno macroscopico prodotto dal DNBS ($p < 0.01$ e $p < 0.05$, rispettivamente; Figura 16).

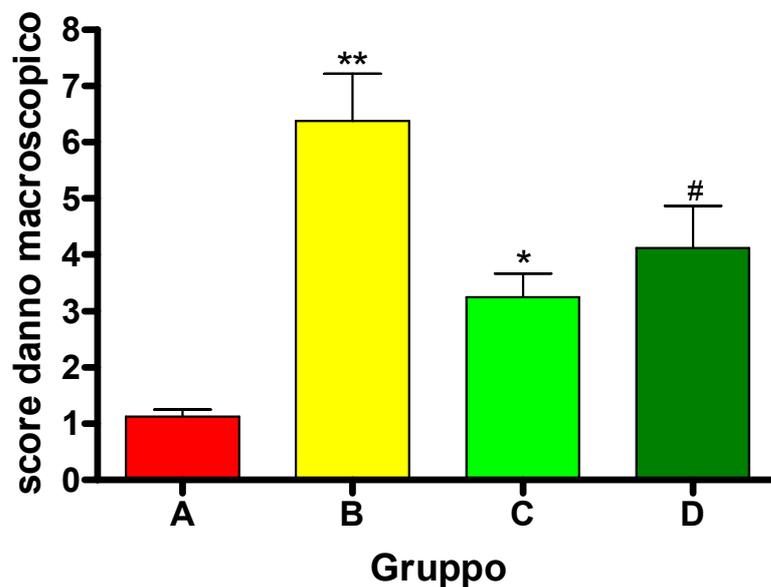


Figura 16. Score del danno macroscopico nel colon, in differenti gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.001$ vs gruppo A; * $p < 0.01$ vs gruppo B; # $p < 0.05$ vs gruppo B.

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=8) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 3 mg/kg per via orale

Gruppo D (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

Analisi microscopica

La figura 17 mostra lo score del danno microscopico in tutti i gruppi; il danno microscopico è significativamente aumentato a seguito della somministrazione intrarettale di DNBS ($p < 0.001$).

La somministrazione orale di SSR140333, alle dosi di 3 e 10 mg/kg, determina una riduzione statisticamente significativa del danno microscopico ($p < 0.01$ e $p < 0.05$, rispettivamente; figura 17).

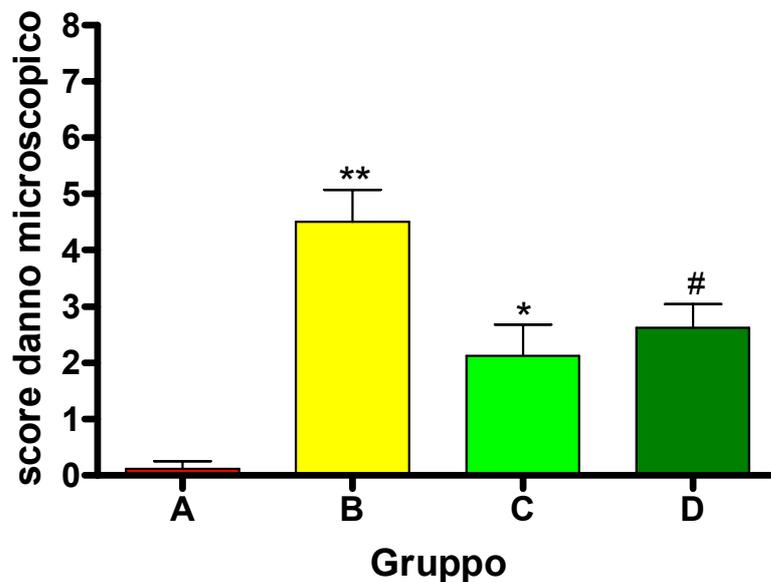


Figura 17. Score del danno microscopico nel colon, in differenti gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.001$ vs gruppo A; * $p < 0.01$ vs gruppo B; # $p < 0.05$ vs gruppo B.

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=8) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 3 mg/kg per via orale

Gruppo D (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

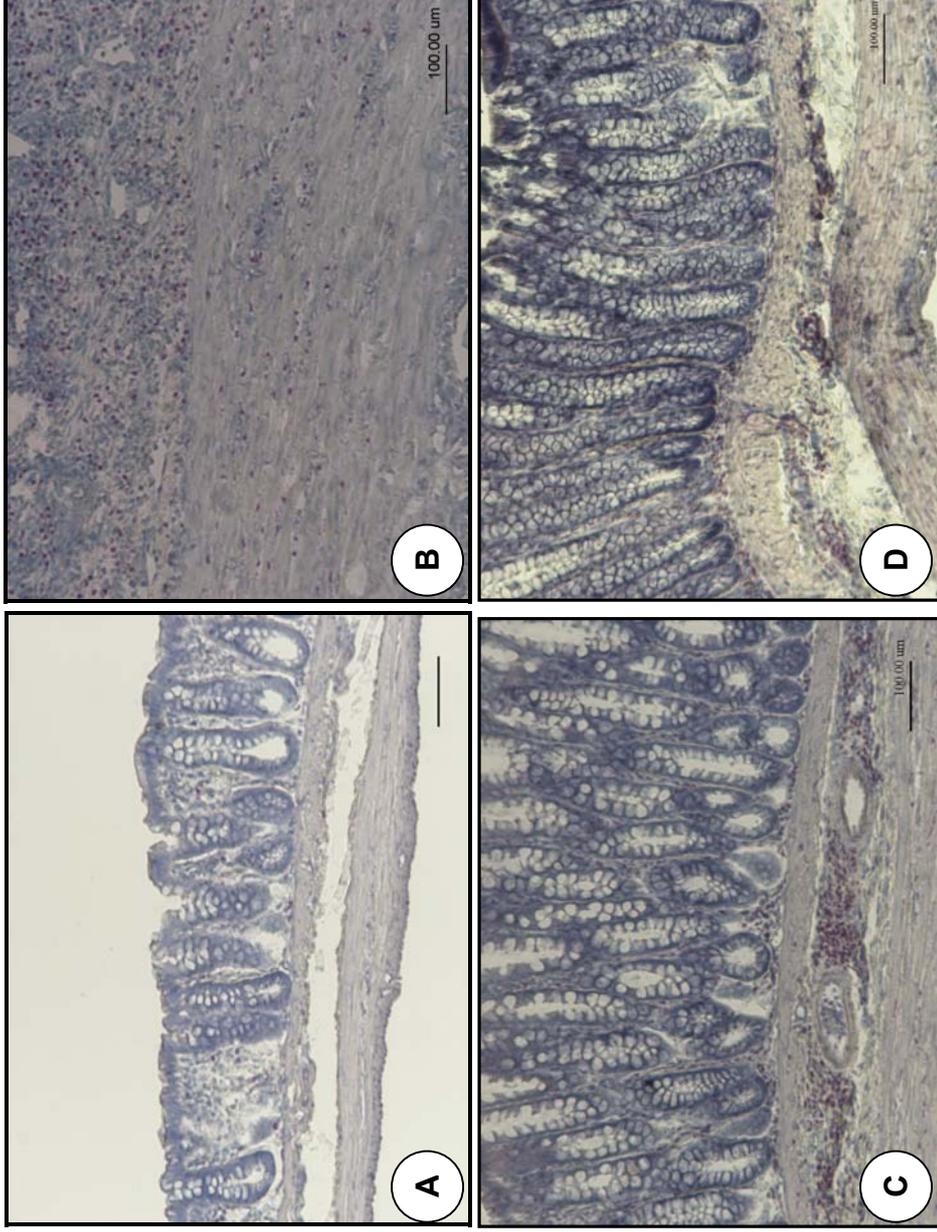


Figura 18. Immagini rappresentative di sezioni trasversali di colon distale di un ratto di controllo (A) (soluzione fisiologica intrarettale + veicolo per via orale) e di un ratto infiammato (B) (DNBS 15 mg intrarettale + veicolo per via orale) (colorazione H&E, ingrandimento finale 100X). Da notare la severità del danno con perdita di architettura della mucosa, perdita di cellule mucipare ed un massiccio infiltrato granulocitario che si estende attraverso mucosa e sottomucosa, interessando anche la *muscularis propria*, che appare ispessita. Nei pannelli C e D sono rappresentate sezioni trasversali di colon distale di un ratto infiammato trattato con SSR140333, 3 e 10 mg/kg (trattamento curativo) (colorazione H&E, ingrandimento finale 100X). Da notare il ripristino dell' architettura mucosale, la diminuzione della ulcerazione e dell'ispessimento muscolare e la riduzione dell' infiltrato infiammatorio.

Attività della Mieloperossidasi (MPO)

La Figura 19 mostra l'attività della MPO nel colon in tutti i gruppi; l'attività della MPO è significativamente aumentata ($p < 0.001$) a seguito della somministrazione intrarettale di DNBS 15 mg/ratto.

La somministrazione di SSR140333, alle dosi di 3 e 10 mg/kg, determina una riduzione dell'attività della MPO.

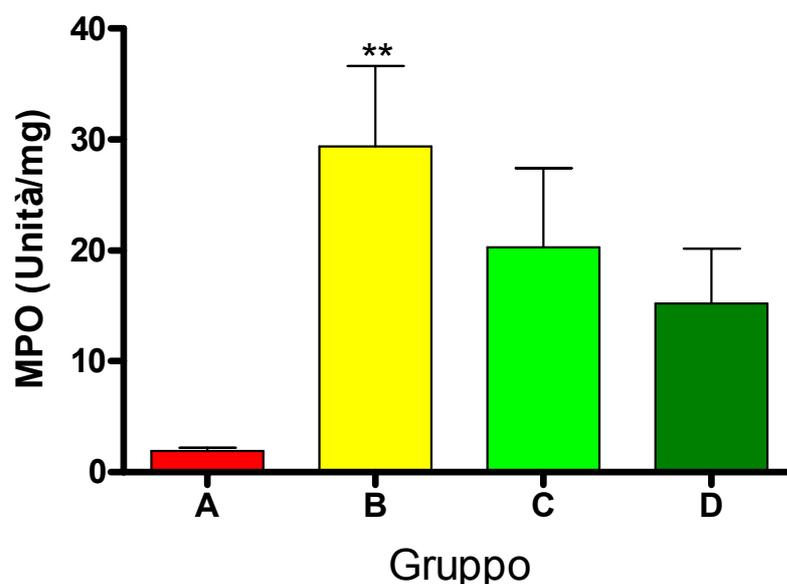


Figura 19. Attività della mieloperossidasi nel colon. I dati sono espressi come media \pm SEM.

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=8) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 3 mg/kg per via orale

Gruppo D (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

Livelli tissutali di tumor necrosis factor- α (TNF- α)

La Figura 20 mostra i livelli tissutali di TNF- α nel colon; i livelli di TNF- α sono aumentati in maniera significativa a seguito della somministrazione intrarettale di DNBS ($p < 0.05$). La somministrazione di SSR140333 non determina una riduzione dei livelli tissutali di TNF- α a nessuna delle due dosi testate.

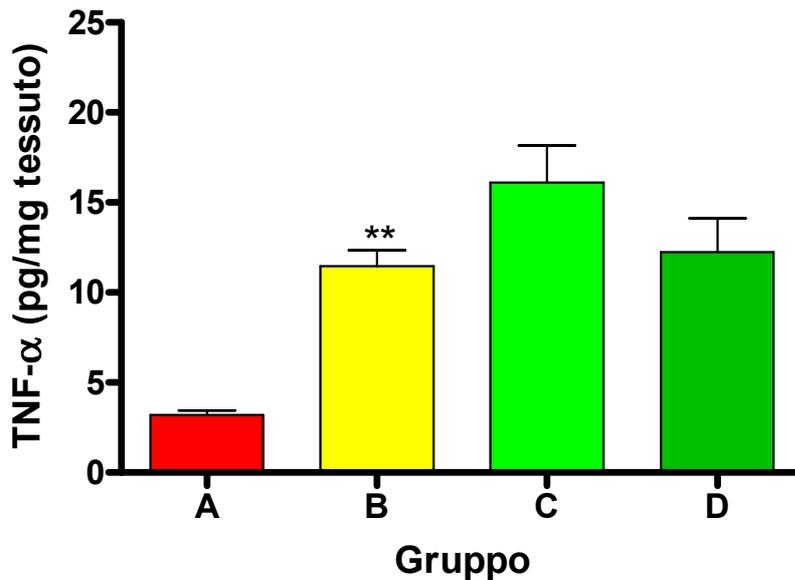


Figura 20. Livelli tissutali di TNF-alfa nei diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.001$ vs gruppo A

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=3) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=11): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 3 mg/kg per via orale

Gruppo D (n=8): DNBS 15 mg/ratto intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale

Determinazione quantitativa dei livelli tissutali di sostanza P

La Figura 21 mostra i livelli tissutali di sostanza P (SP) nel colon; i livelli di SP sono aumentati a seguito della somministrazione intrarettale di DNBS. La somministrazione di SSR140333, alla dose di 10 mg/kg, determina una riduzione dei livelli tissutali di SP, riportando i livelli del neuropeptide a quelli del gruppo A (controllo sano).

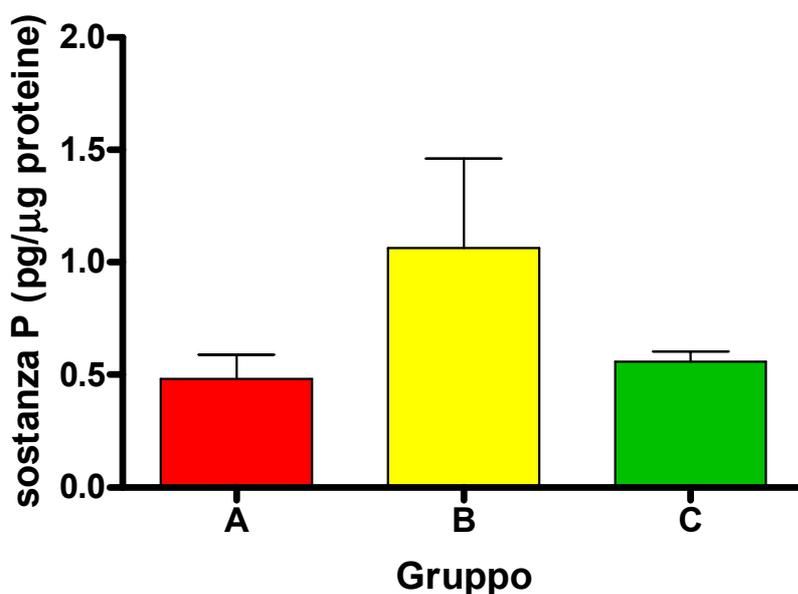


Figura 21. Livelli tissutali di SP nei diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM.

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=4) : soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=7): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e veicolo per via orale

Gruppo C (n=7): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale e SSR140333 10 mg/kg per via orale.

In Tabella 6 sono riportati i dati numerici relativi ai diversi parametri analizzati per valutare il grado di infiammazione e l'effetto protettivo dell'antagonista del recettore NK₁ sulla colite da DNBS.

	<i>Non infiammati (salina)</i>		<i>Infiammati (DNBS)</i>		
	veicolo	veicolo	SSR140333 (10mg/kg) (dal giorno -1 al giorno 5)	SSR140333 (3mg/kg) (dal giorno 1 al giorno 5)	SSR140333 (10mg/kg) (dal giorno 1 al giorno 5)
Peso (%)	26.50±1.77	9.00±3.51*	18.37±1.61#	10.25±3.29	11.87±2.27‡
Score macroscopico	1.12±0.12	6.37±0.84*	2.00±0.37#	3.25±0.41‡	4.12±0.74†
Score microscopico	0.12±0.12	4.50±0.56*	1.75±0.45#	2.12±0.54‡	2.62±0.42†
MPO	1.92±0.28	29.36±7.24*	5.07±1.93	20.28±7.12	15.22±4.95
TNF-α	3.19±0.25	11.45±0.92*	9.41±1.19	16.08±2.08	12.23±1.89
Sostanza P	0.48±0.11	1.06±0.39	0.59±0.06	-	0.56±0.05

Tabella 6. In tabella sono riassunti i risultati ottenuti nella colite da DNBS nei diversi gruppi sperimentali. * p<0.001 vs. Gruppo A; # p<0.001 vs. Gruppo B; ‡ p<0.01 vs. Gruppo B; † p<0.05 vs. Gruppo B.

5.2 Modello cronico da DNBS: messa a punto

Negli esperimenti dose/risposta, per scegliere la dose appropriata di DNBS necessaria a determinare la riattivazione del fenomeno infiammatorio, abbiamo valutato l'effetto di due diverse dosi di DNBS (7.5 e 10 mg/ratto) sui diversi parametri utilizzati nella valutazione dell'infiammazione, e confrontato le stesse dosi con la somministrazione di DNBS 15 mg/ratto al giorno 6; abbiamo inoltre valutato se la sola somministrazione di etanolo al 35% potesse avere di per se un effetto sull'entità del danno; nelle figure 22-24 sono riportati i risultati degli esperimenti.

Danno macroscopico

La figura 22 mostra lo score del danno macroscopico in tutti i gruppi; la somministrazione di DNBS 15 mg/ratto ha avuto effetti significativi sullo score macroscopico rispetto ai ratti di controllo (soluzione fisiologica, $p < 0.01$). La seconda somministrazione di DNBS 7.5 e 10 mg/ratto, ha determinato un aumento statisticamente significativo dello score del danno macroscopico rispetto al gruppo di controllo ($p < 0.05$ e $p < 0.01$ rispettivamente).

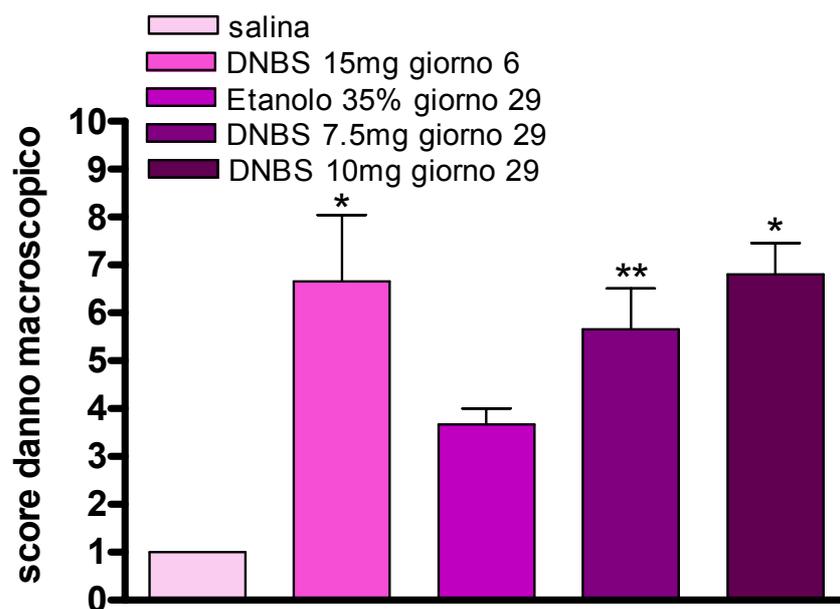


Figura 22. Score macroscopico nei diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. n= 4-6; * p<0.01 vs. Gruppo salina, ** p<0.05 vs. Gruppo salina

Analisi microscopica

La figura 23 mostra lo score del danno microscopico in tutti i gruppi; la somministrazione di DNBS 15 mg/ratto ha un effetto significativo sullo score del danno microscopico ($p < 0.01$, figura 23) rispetto ai ratti non infiammati (salina).

Lo score del danno microscopico è significativamente aumentato a seguito della seconda somministrazione intrarettale di DNBS alla dose di 7.5 e 10 mg/ratto ($p < 0.001$).

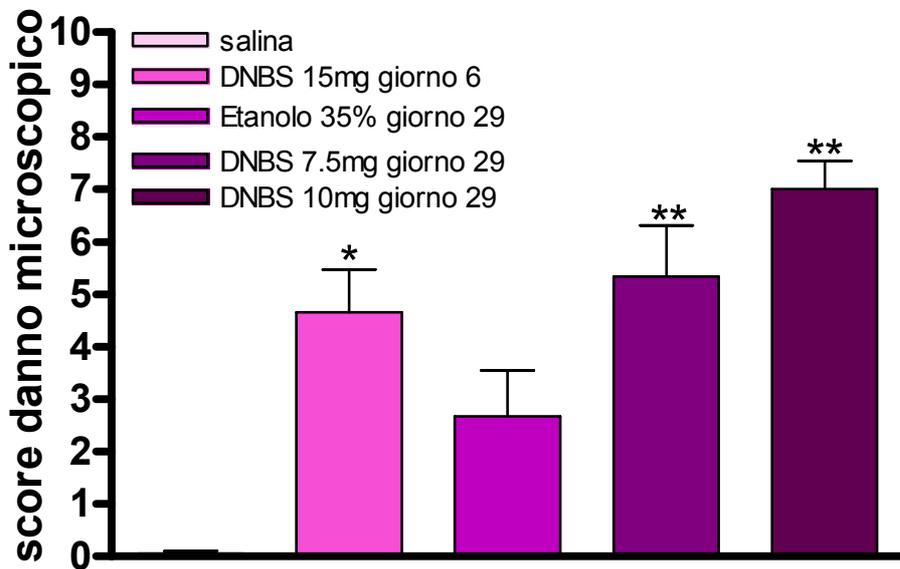


Figura 23. Score microscopico nei diversi gruppi sperimentali.

I dati sono espressi come media \pm SEM. $n = 4-6$; * $p < 0.01$ vs. Gruppo salina;

** $p < 0.001$ vs. Gruppo salina.

Attività della mieloperossidasi

In figura 24 è mostrato il grafico dell'attività della mieloperossidasi del colon in tutti i gruppi sperimentali. La somministrazione di DNBS alla dose di 15 mg/ratto determina un aumento dell'attività della MPO. La riattivazione del processo infiammatorio ottenuta alle dosi di 7.5 e 10 mg/ratto determina un aumento dell'attività della mieloperossidasi sebbene questo aumento non sia statisticamente significativo a nessuna delle tre dosi di DNBS.

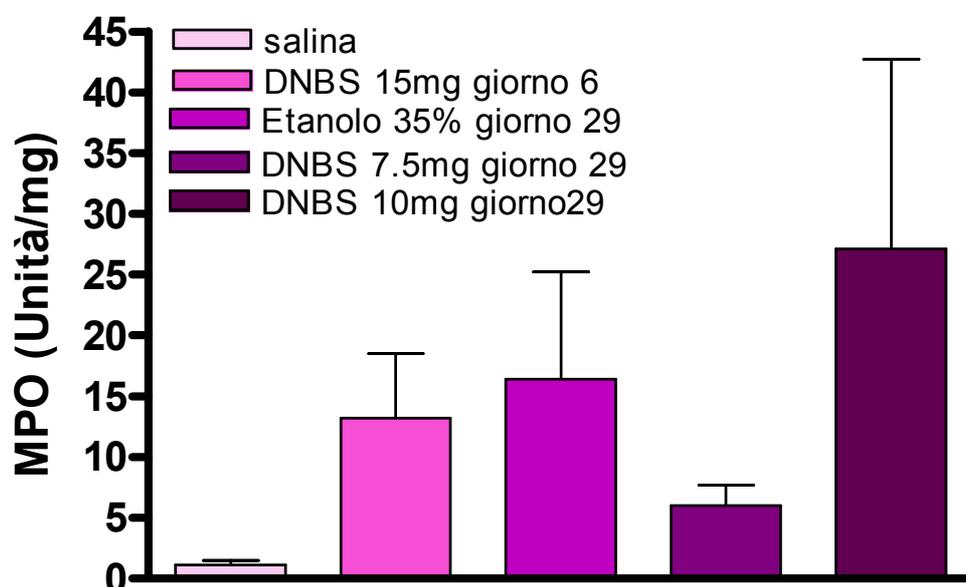


Figura 24. Attività della mieloperossidasi (MPO) nei diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. n= 4-6

Sulla base dei risultati ottenuti abbiamo concluso che la somministrazione di DNBS a distanza di quattro settimane dalla prima somministrazione, alla dose di 7.5 mg/ratto, consente di ottenere la riattivazione del processo infiammatorio producendo un danno paragonabile a quello indotto con una dose di 15 mg/ratto e con un tasso di mortalità pari allo 0%. La dose scelta ci ha permesso, negli esperimenti successivi, di valutare l'eventuale effetto protettivo dell'antagonista SSR140333 sul riprodursi del processo infiammatorio.

Per studiare il decorso dell'infiammazione nelle quattro settimane di durata dell'esperimento e valutare l'effetto di una seconda somministrazione di DNBS sulla riattivazione del processo infiammatorio abbiamo eseguito degli esperimenti di *time-course*. Nelle figure 25-27 sono riportati i risultati degli esperimenti.

Analisi macroscopica

La figura 25 mostra lo score del danno macroscopico nei giorni successivi l'induzione della colite; il giorno 0 rappresenta il giorno di induzione della colite. Ai ratti di controllo è stata somministrata soluzione fisiologica per via intrarettale e sono stati sacrificati il giorno stesso. Il danno macroscopico, in seguito alla somministrazione di 15 mg/ratto di DNBS, raggiunge il suo picco massimo al giorno 6 per poi diminuire col passare del tempo (giorno 10-21-28). La seconda somministrazione di DNBS (7.5 mg/ratto, giorno 29) determina una riattivazione del processo infiammatorio paragonabile all'entità del danno ottenuto al giorno 6.

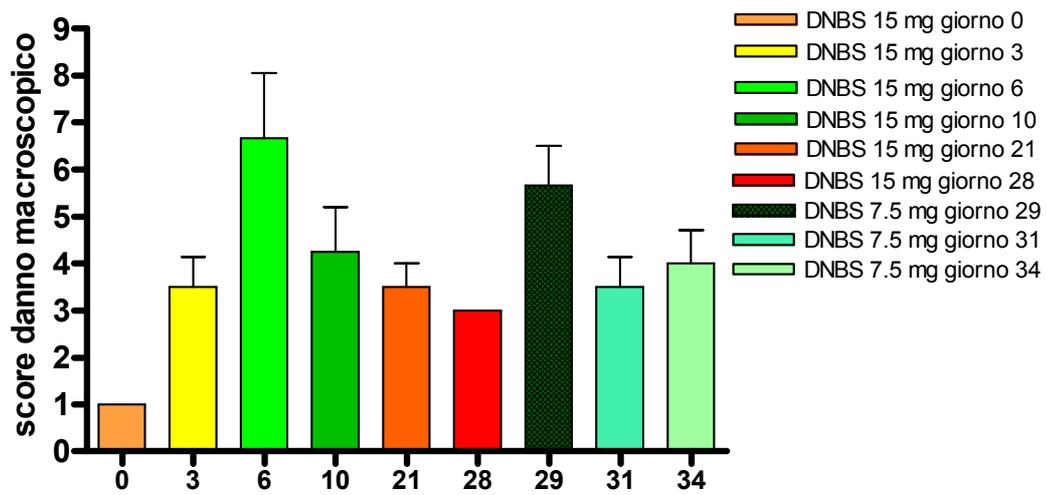


Figura 25. Score macroscopico nei diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. n=2-6

Analisi microscopica

La figura 26 mostra lo score del danno microscopico nei diversi giorni successivi all'induzione della colite; il danno microscopico, in seguito alla somministrazione di 15 mg/ratto di DNBS, raggiunge il suo picco massimo al giorno 6 per poi diminuire col passare del tempo (giorno 10-21-28). La seconda somministrazione di DNBS alla dose di 7.5 mg/ratto (giorno 29) determina nuovamente un aumento dello score del danno microscopico.

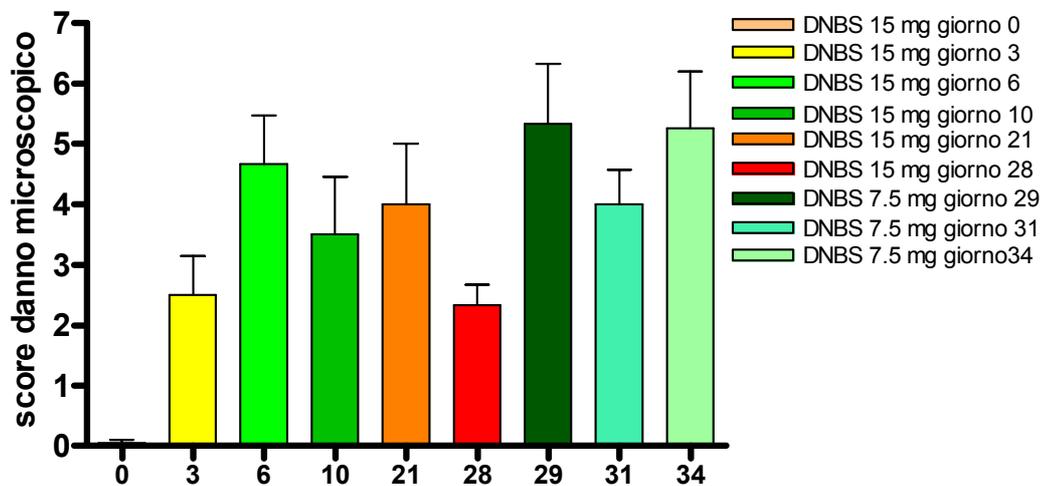


Figura 26. Score microscopico nei diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. n=2-6

Attività della mieloperossidasi

La figura 27 mostra l'attività della mieloperossidasi (MPO) nei giorni successivi all'induzione della colite; l'attività della MPO, in seguito alla somministrazione di 15 mg/ratto di DNBS, aumenta sin dal terzo giorno dopo l'induzione della colite e rimane alta fino al giorno 6 per poi diminuire col passare dei giorni (giorno 10-21-28). La seconda somministrazione di DNBS alla dose di 7.5 mg/ratto (giorno 29) determina un aumento dell'attività della mieloperossidasi.

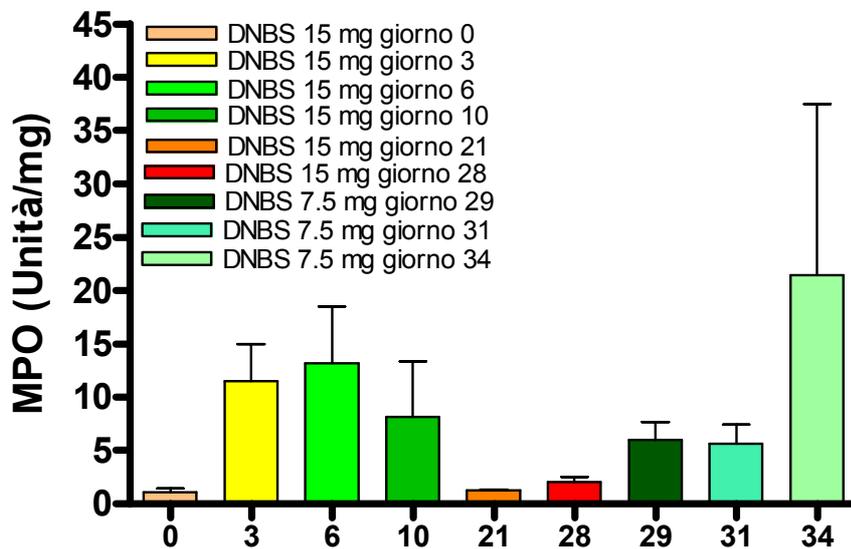


Figura 27. Attività della mieloperossidasi nei diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. n=2-6

5.3 Valutazione del possibile ruolo protettivo dell'antagonista del recettore NK_1 , SSR140333 nel modello cronico da DNBS

Danno macroscopico

La figura 28 mostra lo score del danno macroscopico in tutti i gruppi; in seguito all'induzione della colite, lo score del danno macroscopico è significativamente aumentato ($p < 0.01$; Figura 28).

La somministrazione di SSR140333 per via orale, alla dose di 10mg/kg, per 7 giorni precedenti la seconda somministrazione di DNBS porta ad una riduzione statisticamente significativa dello score del danno macroscopico ($p < 0.05$).

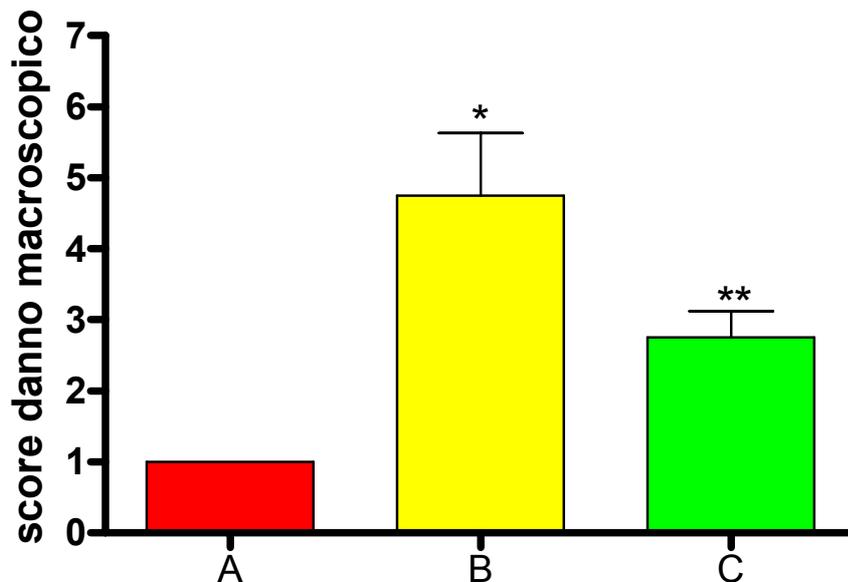


Figura 28. Score del danno macroscopico nel colon, in differenti gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. * $p < 0.01$ vs. Gruppo A; ** $p < 0.05$ vs. Gruppo B.

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=4): soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale (giorno 0) e DNBS 7.5 mg/ratto intrarettale (giorno 28)

Gruppo C (n=8) DNBS (15 mg/ratto) intrarettale (giorno 0) e DNBS 7.5 mg/ratto intrarettale (giorno 28) e SSR140333 10 mg/kg (giorni 21-28)

Analisi istologica

La figura 29 mostra lo score del danno macroscopico in tutti i gruppi; lo score del danno microscopico (Figura 29) è significativamente aumentato ($p < 0.01$), a seguito della somministrazione intrarettale di DNBS.

La somministrazione di SSR140333 alla dose di 10 mg/kg porta ad una riduzione statisticamente significativa dello score del danno microscopico ($p < 0.05$).

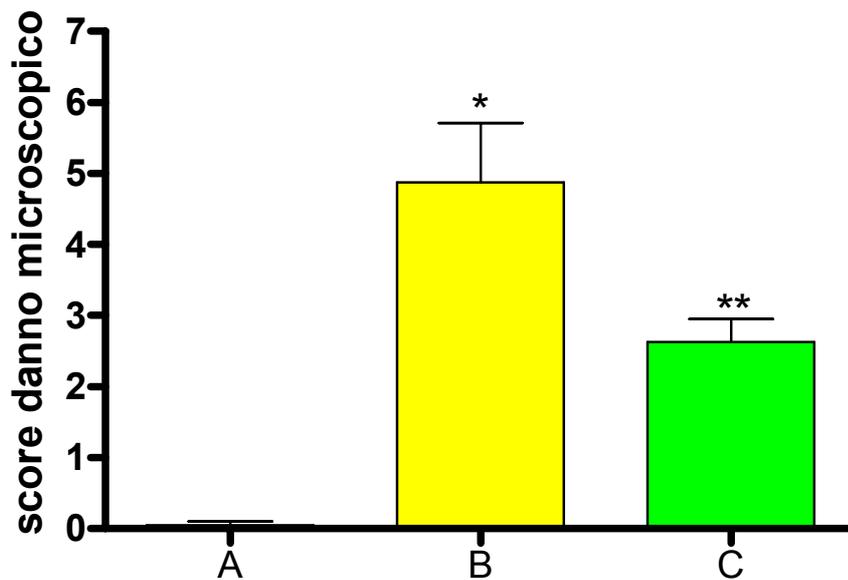


Figura 29. Score del danno microscopico nel colon, in differenti gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. * $p < 0.01$ vs. Gruppo A; ** $p < 0.05$ vs. Gruppo B.

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=4): soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale (giorno 0) e DNBS 7.5 mg/ratto intrarettale (giorno 28)

Gruppo C (n=8) DNBS (15 mg/ratto) intrarettale (giorno 0) e DNBS 7.5 mg/ratto intrarettale (giorno 28) e SSR140333 10 mg/kg (giorni 21-28)

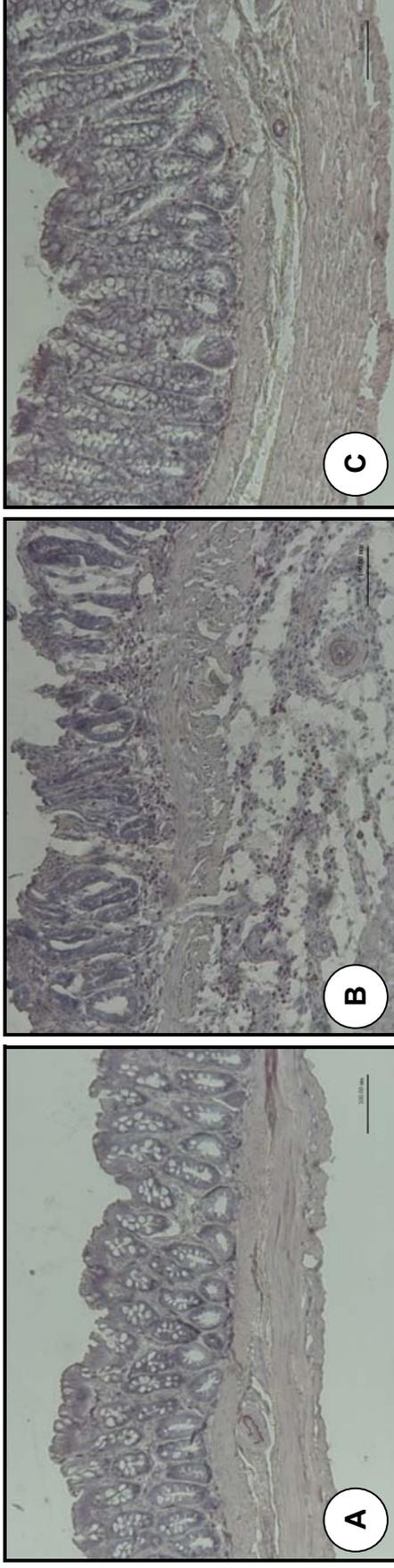


Figura 30. Sezione trasversale del colon distale da un ratto di controllo (A) (soluzione fisiologica intrarettale + veicolo per via orale), (B) da un ratto infiammato, soluzione intrarettale di DNBS 15 mg/ratto in 50% di etanolo (giorno 0) e soluzione intrarettale di DNBS 7.5 mg/ratto in 35% di etanolo (giorno 28), e (C) da un ratto infiammato, DNBS 15 mg/ratto in 50% di etanolo (giorno 0), soluzione intrarettale di DNBS 7.5 mg/ratto in 35% di etanolo (giorno 28) e trattato con SSR140333 alla dose di 10 mg/kg (giorni 21-28), (colorazione con H & E, ingrandimento finale 100x). Da notare in (B) perdita dell'architettura mucosale, con deplezione delle cellule caliciformi ed un notevole infiltrato infiammatorio, che si estende attraverso la mucosa e la sottomucosa, coinvolgendo anche lo strato muscolare, che appare ispessito. In (C) si nota riduzione del danno a livello della struttura architettoneca della mucosa, la riduzione di ulcerazioni ed il minore ispessimento degli strati muscolari.

Attività della mieloperossidasi

La Figura 31 mostra l'attività della mieloperossidasi nel colon, in tutti i gruppi sperimentali. L'attività della MPO è aumentata ($p < 0.01$) a seguito della somministrazione seconda somministrazione intrarettale di DNBS al giorno 28.

Il trattamento preventivo con SSR140333, alla dose di 10 mg/kg, non determina una riduzione dell'attività della MPO.

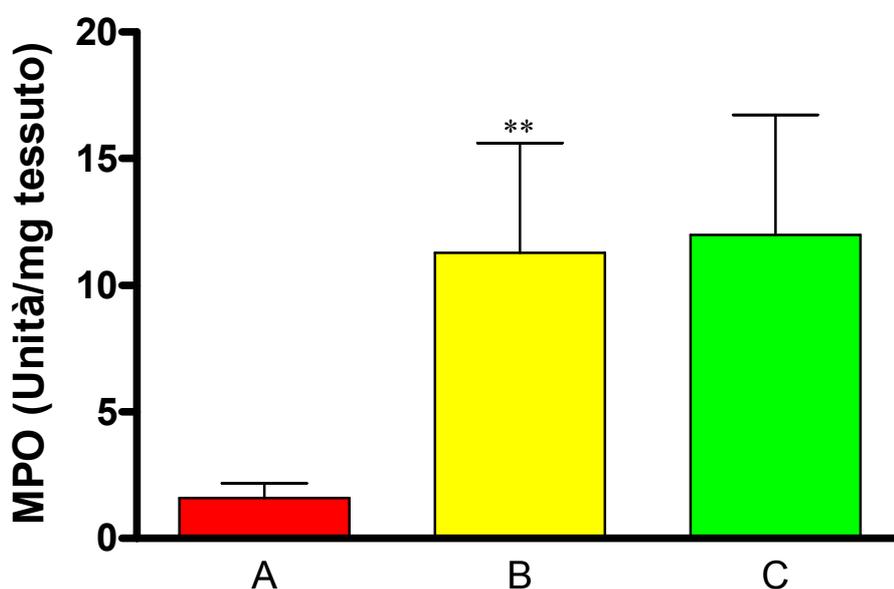


Figura 31. Attività della mieloperossidasi nel colon. I dati sono espressi come media \pm SEM. ** $p < 0.01$ vs. Gruppo A.

Gruppi non infiammati

Gruppo A (n=4): soluzione fisiologica intrarettale e veicolo per via orale

Gruppi infiammati

Gruppo B (n=8): DNBS (15 mg/ratto) intrarettale (giorno 0) e DNBS 7.5 mg/ratto intrarettale (giorno 28)

Gruppo C (n=8) DNBS (15 mg/ratto) intrarettale (giorno 0) e DNBS 7.5 mg/ratto intrarettale (giorno 28) e SSR140333 10 mg/kg (giorni 21-28)

In Tabella 7 sono riportati i dati numerici relativi ai diversi parametri analizzati per valutare il grado di infiammazione e l'effetto protettivo dell'antagonista del recettore NK₁ sulla colite da DNBS.

	Non infiammati (salina)	Infiammati (DNBS 15mg/ratto giorno 0; 7.5mg/ratto giorno 28)	
	Veicolo	Veicolo	SSR140333 (10mg/kg) (dal giorno 21 al giorno 28)
Score macroscopico	1.00±0.00	4.75±0.88*	2.75±0.37**
Score microscopico	0.05±0.05	4.88±0.83*	2.63±0.32**
MPO	1.60±0.58	11.29±4.33*	11.98±4.73

Tabella 7. In tabella sono riassunti i risultati ottenuti nella colite cronica da DNBS nei diversi gruppi sperimentali. * p<0.01 vs. Gruppo A; ** p<0.05 vs. Gruppo B.

6. Discussione

Il primo obiettivo della nostra ricerca era quello di valutare il possibile effetto protettivo dell'antagonista selettivo non-peptidico al recettore NK₁, SSR140333, nel modello di infiammazione intestinale da DNBS nel ratto; il modello sperimentale utilizzato, precedentemente messo a punto nel nostro laboratorio, è un modello animale ben validato, semplice, riproducibile, ed adattabile ad animali di piccola taglia. Nel corso degli anni, lo sviluppo del modello di colite da DNBS (così come lo sviluppo di altri modelli sperimentali di infiammazione intestinale) ha permesso uno studio molto approfondito degli eventi precoci, l'analisi delle interazioni tra le diverse componenti e l'identificazione dei processi immunologici e dei geni che determinano suscettibilità, in una maniera che non sarebbe stata altrimenti possibile nell'uomo (38). Questo modello ha fornito importanti informazioni per una maggiore comprensione dei meccanismi alla base dell'infiammazione e della patogenesi così come del trattamento delle patologie infiammatorie intestinali.

L'attività del farmaco è stata valutata seguendo due diversi schemi di trattamento (preventivo e curativo).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che il trattamento preventivo, alla dose di 10 mg/kg per sette giorni, esercita un effetto protettivo significativo sulla colite da DNBS, contrastando la diminuzione di peso corporeo indotta dall'infiammazione, l'aumento dello score macroscopico e microscopico, dell'attività della mieloperossidasi e dei livelli tissutali di TNF- α e sostanza P.

Il trattamento curativo con SSR140333, alle dosi di 3 e 10 mg/kg per cinque giorni, esercita un effetto protettivo sul danno indotto da DNBS per quanto riguarda l'aumento di peso corporeo, lo score macroscopico e microscopico, l'attività della mieloperossidasi ed i livelli tissutali di sostanza P, mentre non sembra contrastare i livelli di TNF- α a nessuna delle due dosi utilizzate.

Il secondo obiettivo del nostro studio era quello di sviluppare e mettere a punto un modello cronico di colite da DNBS nel ratto che

riproducesse il decorso clinico delle malattie infiammatorie croniche intestinali umane, caratterizzate da periodi di attività del processo infiammatorio intervallati da fasi più o meno lunghe di remissione della sintomatologia, e successivamente, valutare l'effetto protettivo dell'antagonista SSR140333 sulla riattivazione della colite.

Per mettere a punto il modello cronico da DNBS abbiamo studiato l'effetto di due diverse dosi dell'aptene (7.5 e 10 mg/ratto) sulla riattivazione del processo infiammatorio ed il decorso dell'infiammazione durante le quattro settimane di durata dell'esperimento.

I risultati ottenuti mostrano che la dose di DNBS pari a 7.5 mg/ratto somministrata a distanza di quattro settimane dalla prima somministrazione (DNBS 15 mg/ratto) induce il riacutizzarsi del fenomeno infiammatorio, con comparsa di ulcere a livello del colon, infiltrazione di granulociti a livello della mucosa e della sottomucosa e diarrea.

La dose di 7.5 mg/ratto, rispetto la seconda dose testata (10 mg/ratto) ci consentiva di ottenere la riattivazione del processo infiammatorio con un danno paragonabile a quello indotto con una dose di 15 mg/ratto e con un tasso di mortalità pari allo 0%.

Lo studio del *time-course* dell'infiammazione ha evidenziato, per tutti i parametri studiati, un picco massimo d'infiammazione al giorno 6, che decresce gradualmente passando dal giorno 10, 21, 28 per poi aumentare al giorno 29 in seguito alla seconda somministrazione di DNBS.

Il trattamento preventivo con l'antagonista SSR140333, alla dose di 10 mg/kg, per sette giorni precedenti la seconda somministrazione di DNBS, è risultato protettivo sulla riattivazione del processo infiammatorio, contrastando la diminuzione di peso corporeo e l'aumento dello score macroscopico e microscopico, senza però interferire sull'aumento dell'attività della mieloperossidasi nel colon; la scarsa attività dell'antagonista su questo parametro può trovare spiegazione nel fatto che 24 ore dopo l'induzione della colite si ha un picco massimo di infiammazione (64) che il farmaco non riesce a contrastare. L'effetto

antinfiammatorio esercitato da SSR140333 potrebbe manifestarsi solo dopo diversi giorni dalla somministrazione.

I risultati descritti trovano il loro razionale in numerose evidenze scientifiche che mirano a dimostrare come l'infiammazione intestinale possa essere associata a cambiamenti nell'espressione delle tachichinine (sostanza P, NKA, NKB) sia nell'uomo che in modelli animali. Il pool neuronale di sostanza P e l'espressione del recettore NK₁ risultano notevolmente aumentati in pazienti con malattie infiammatorie intestinali.

Recenti studi hanno evidenziato up-regulation del recettore NK₁ nel morbo di Crohn e nella colite ulcerosa, con prevalente localizzazione a livello di cellule coinvolte nella risposta infiammatoria così come neuroni enterici, cellule endoteliali e cellule epiteliali, suggerendo un'importante ruolo delle tachichinine nella fisiopatologia delle IBD (66).

L'ipotesi che una perturbazione nel sistema tachichinergico possa essere alla base del fenomeno infiammatorio a livello intestinale è stata supportata da numerose evidenze scientifiche che hanno messo in luce gli effetti benefici di antagonisti ai recettori delle tachichinine nei modelli sperimentali di infiammazione. Il trattamento con antagonisti al recettore NK₁ esercita un effetto protettivo sull'infiammazione e sullo stress ossidativo indotti dal DSS (100) e riduce la severità del danno e le alterazioni della contrattilità causate dalla somministrazione intrarettale di TNBS (101). La sostanza P riveste un ruolo importante nell'enterocolite da *Clostridium difficile*: la somministrazione di antagonisti quali CP 96,345 (102) o CP 99,994 (87), inibisce la secrezione di fluidi e l'infiammazione intestinale mediate dalla tossina A.

È stato dimostrato che la SP aumenta la secrezione di citochine proinfiammatorie (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α) attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B nelle cellule bersaglio e che, secondo un meccanismo bidirezionale, le stesse citochine inducono un'aumentata espressione del recettore NK₁ a livello delle cellule epiteliali del colon, esacerbando ulteriormente l'attività infiammatoria e proliferativa della sostanza P a livello del colon (103); è stato inoltre osservata una marcata

espressione dell'mRNA del recettore NK₁ nelle biopsie di mucosa colica prelevate da pazienti con IBD e comparate con campioni ottenuti da pazienti sani (68).

I nostri risultati sono coerenti con queste osservazioni: la somministrazione di DNBS nel modello in acuto determina un incremento dei livelli tissutali di TNF- α . Il trattamento con SSR140333 induce una marcata riduzione di questa citochina, suggerendo che antagonisti ai recettori delle tachichinine possono rappresentare un utile strumento per ridurre la risposta infiammatoria SP-mediata, così come contrastare la secrezione e le alterazioni della motilità che frequentemente si osservano nei pazienti con IBD.

Il trattamento, preventivo e curativo con SSR140333, determina, inoltre, una marcata diminuzione dei livelli tissutali di SP. Numerosi studi hanno fornito evidenze di un'alterata espressione della SP in modelli sperimentali di colite. Nella cavia, la concentrazione di SP è inizialmente bassa dopo 24 ore dalla somministrazione di TNBS, ma tende ad aumentare nei giorni successivi (104); Miampamba et al. hanno ottenuto simili risultati nel modello di colite da TNBS nel ratto, con una elevata immunoreattività alla SP nelle fibre nervose dopo una settimana dall'induzione dell'infiammazione (105).

L'infiammazione da DNBS è solitamente caratterizzata da un marcato aumento dell'attività della mieloperossidasi, e di conseguenza dalla presenza di un notevole infiltrato infiammatorio (99), come dimostrato dall'analisi istologica. I nostri risultati sono coerenti con queste osservazioni. L'aumento dei livelli tissutali di MPO osservati in corso di infiammazione da DNBS sono significativamente diminuiti in seguito al trattamento con SSR140333. L'abbassamento dei livelli di SP nel colon osservati in seguito al trattamento con l'antagonista al recettore NK₁ potrebbero essere direttamente correlati ad una ridotta attività della MPO, dal momento che il neuropeptide SP può essere sintetizzato e rilasciato da diverse tipologie di cellule infiammatorie.

L'utilizzo di antagonisti ai recettori delle tachichinine consente quindi di bloccare il legame della sostanza P al recettore NK₁ interrompendo la cascata infiammatoria che scatena e mantiene il processo infiammatorio in presenza di IBD. L'antagonista è in grado di diminuire l'attivazione ed il rilascio SP-mediato di cellule immunitarie ed infiammatorie di vario tipo, così come ridurre alcuni fenomeni quali la secrezione, la permeabilità intestinale e l'alterata motilità del colon che caratterizzano il decorso clinico delle IBD (106).

7. Conclusioni

Questo studio mostra che il trattamento con l'antagonista selettivo del recettore NK₁ SSR140333 protegge dall'infiammazione indotta dal DNBS nel ratto. In particolare, il trattamento preventivo (dal giorno -1 al giorno 5) per via orale, alla dose di 10 mg/kg, consente di ottenere un più alto grado di inibizione di tutti i parametri dell'infiammazione oggetto dello studio.

Sulla base dei risultati ottenuti abbiamo concluso che la dose più adeguata di DNBS per ottenere una riattivazione del processo infiammatorio a distanza di quattro settimane dalla prima somministrazione è pari a 7.5 mg/ratto. La dose scelta produce un danno infiammatorio paragonabile a quello indotto con una dose di 15 mg/ratto e con un tasso di mortalità pari allo 0%.

In esperimenti preliminari, l'antagonista al recettore NK₁, somministrato alla dose di 10 mg/kg, per una settimana precedente la seconda somministrazione di DNBS, a livello macroscopico e microscopico, riesce a contrastare la riattivazione del fenomeno infiammatorio.

I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che la sostanza P sia attivamente coinvolta nell'infiammazione intestinale. Gli antagonisti ai recettori delle tachichinine potrebbero rappresentare un potenziale target terapeutico nelle malattie infiammatorie intestinali.

8. Pubblicazioni e presentazioni a congressi

PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

- De Giorgio R., Vasina V., Ursino M.G., Barbara G., Stanghellini V., De Ponti F., Corinaldesi R. **Neuroplasticity of the Enteric Nervous System induced by inflammatory conditions of the gut.** J Pediatr Gastroentero Nutrition, 43 (Suppl.2): S7-8; 2006
- Ursino M.G., Vasina V, Croci T, De Ponti F. **Protection from DNBS-induced colitis by the NK1 receptor antagonist SSR140333.** Manuscript in preparation, 2007
- Ursino M.G., Vasina V., Raschi E., De Ponti F. **The β_3 -adrenoceptor as a therapeutic target: current perspectives.** Manuscript in preparation, 2008

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

- Vasina V., Ursino M.G., Alessandri M., Colucci R., Blandizzi C., Barbara G., De Giorgio R., Del Tacca M., De Ponti F. **β_3 -adrenoceptors in the gut: evidence for a possible role in enteric neuroimmunomodulation.** 32° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Napoli 2-4 giugno 2005
- Ursino M.G. **β_3 -adrenoceptors in the gut: evidence for a possible role in enteric neuroimmunomodulation.** IX Seminario nazionale per Dottorandi in farmacologia e scienze affini, Siena, Certosa di Pontignano, 20-23 Settembre 2005.
- Vasina V., Ursino M.G., Alessandri M., Colucci R., Blandizzi C., De Giorgio R., De Ponti F. **β_3 -adrenoceptors in the gut: evidence for a possible role in enteric neuroimmunomodulation.** Brain-gut interactions, Oxford 8-11 Luglio 2006

- Ursino M.G., Vasina V., Croci T., De Ponti F. **The NK₁ receptor antagonist SSR140333 ameliorates experimental colitis in rats.** 33° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Cagliari 6-9 giugno 2007

- Vasina V., Broccoli M., Ursino M.G., Soleti A., Paolini M., De Ponti F. **Effects of the non-peptidyl low molecular weight radical scavenger IAC in DNBS-induced colitis in rats.** 33° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia, Cagliari 6-9 giugno 2007

- Ursino M.G. **The NK₁ receptor antagonist SSR140333 ameliorates experimental colitis in rats.** XI Seminario nazionale per Dottorandi in farmacologia e scienze affini, Siena, Certosa di Pontignano, 24-27 Settembre 2007.

9. Bibliografia

1. Geboes, K. and Collins, S. Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol.Motil.* 1998;10: 189-202
2. Barbara G. and De Giorgio R., Interazioni neuro-immuni. Possibili implicazioni per le malattie funzionali gastrointestinali. 2000;
3. Benarroch, E. E. Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 2007;69: 1953-7
4. Hansen, M. B. The enteric nervous system I: organisation and classification. *Pharmacol Toxicol.* 2003;92: 105-13
5. Cornet, A., Savidge, T. C., Cabarrocas, J., Deng, W. L., Colombel, J. F., Lassmann, H., Desreumaux, P., and Liblau, R. S. Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: a possible mechanism in Crohn's disease? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001;98: 13306-11
6. Geboes, K., Rutgeerts, P., Ectors, N., Mebis, J., Penninckx, F., Vantrappen, G., and Desmet, V. J. Major histocompatibility class II expression on the small intestinal nervous system in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992;103: 439-47
7. Genton, L. and Kudsk, K. A. Interactions between the enteric nervous system and the immune system: role of neuropeptides and nutrition. *Am J Surg.* 2003;186: 253-8
8. Barbara, G., De, Giorgio R., Stanghellini, V., Gionchetti, P., Campieri, M., and Corinaldesi, R. Relapsing ulcerative colitis after spinal cord stimulation: a case of intestinal neurogenic inflammation? *Gastroenterology* 1999;117: 1256-7
9. Lomax, A. E., Fernandez, E., and Sharkey, K. A. Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol.Motil.* 2005;17: 4-15
10. O'Morain, C., Bishop, A. E., McGregor, G. P., Levi, A. J., Bloom, S. R., Polak, J. M., and Peters, T. J. Vasoactive intestinal peptide concentrations and immunocytochemical studies in rectal biopsies from patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1984;25: 57-61
11. Kubota, Y., Petras, R. E., Ottaway, C. A., Tubbs, R. R., Farmer, R. G., and Fiocchi, C. Colonic vasoactive intestinal peptide nerves in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992;102: 1242-51

12. Mantyh, P. W., Catton, M. D., Boehmer, C. G., Welton, M. L., Passaro, E. P., Jr., Maggio, J. E., and Vigna, S. R. Receptors for sensory neuropeptides in human inflammatory diseases: implications for the effector role of sensory neurons. *Peptides* 1989;10: 627-45
13. Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Okon, E., and Bursztyn, M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. *Gut* 1995;37: 247-55
14. Middleton, S. J., Shorthouse, M., and Hunter, J. O. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993;341: 465-6
15. Graham, M. F., Diegelmann, R. F., Elson, C. O., Lindblad, W. J., Gotschalk, N., Gay, S., and Gay, R. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1988;94: 257-65
16. Linden, D. R., Sharkey, K. A., and Mawe, G. M. Enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea-pig distal colon. *J Physiol* 2003;547: 589-601
17. Linden, D. R., Sharkey, K. A., Ho, W., and Mawe, G. M. Cyclooxygenase-2 contributes to dysmotility and enhanced excitability of myenteric AH neurones in the inflamed guinea pig distal colon. *J Physiol* 2004;557: 191-205
18. von Boyen, G. B., Reinshagen, M., Steinkamp, M., Adler, G., and Kirsch, J. Enteric nervous plasticity and development: dependence on neurotrophic factors. *J Gastroenterol.* 2002;37: 583-8
19. Lim, W. C. and Hanauer, S. B. Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol.Disord.* 2004;4: 66-85
20. Rizzello F. and Venturi A., Malattie infiammatorie croniche intestinali. 1999; 107
21. Cashman, K. D. and Shanahan, F. Is nutrition an aetiological factor for inflammatory bowel disease? *Eur.J Gastroenterol.Hepatol.* 2003;15: 607-13
22. Baumgart, D. C. and Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007;369: 1627-40
23. Podolsky, D. K. Inflammatory bowel disease. *N.Engl.J Med* 2002;347: 417-29
24. McGovern, D. and Powrie, F. The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut* 2007;56: 1333-6

25. Kolls, J. K. and Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. 2004;21: 467-76
26. Bebb, J. R. and Scott, B. B. How effective are the usual treatments for Crohn's disease? *Aliment.Pharmacol Ther* 2004;20: 151-9
27. Egan, L. J. and Sandborn, W. J. Advances in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;126: 1574-81
28. Bebb, J. R. and Scott, B. B. How effective are the usual treatments for ulcerative colitis? *Aliment.Pharmacol Ther* 2004;20: 143-9
29. Hanauer, S. B. Review article: aminosalicylates in inflammatory bowel disease. *Aliment.Pharmacol Ther* 2004;20 Suppl 4: 60-5
30. Baumgart, D. C. and Sandborn, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369: 1641-57
31. ten, Hove T., van, Montfrans C., Peppelenbosch, M. P., and van Deventer, S. J. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 2002;50: 206-11
32. Van den Brande, J. M., Braat, H., van den Brink, G. R., Versteeg, H. H., Bauer, C. A., Hoedemaeker, I., van, Montfrans C., Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P., and van Deventer, S. J. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124: 1774-85
33. Rutgeerts, P., Van, Assche G., and Vermeire, S. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004;126: 1593-610
34. Hanauer, S. B. Medical therapy for ulcerative colitis 2004. *Gastroenterology* 2004;126: 1582-92
35. Banner, K. H. and Trevethick, M. A. PDE4 inhibition: a novel approach for the treatment of inflammatory bowel disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25: 430-6
36. Marteau, P., Seksik, P., and Shanahan, F. Manipulation of the bacterial flora in inflammatory bowel disease. *Best.Pract.Res Clin Gastroenterol*. 2003;17: 47-61
37. Sartor, R. B. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004;126: 1620-33

38. Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S., and Riddell, R. H. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;109: 1344-67
39. Jurjus, A. R., Khoury, N. N., and Reimund, J. M. Animal models of inflammatory bowel disease. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 2004;50: 81-92
40. Linden, D. R., Couvrette, J. M., Ciolino, A., McQuoid, C., Blaszyk, H., Sharkey, K. A., and Mawe, G. M. Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. *Neurogastroenterol.Motil.* 2005;17: 751-60
41. Martinolle, J. P., More, J., Dubech, N., and Garcia-Villar, R. Inverse regulation of alpha- and beta-adrenoceptors during trinitrobenzenesulfonic acid (TNB)-induced inflammation in guinea-pig small intestine. *Life Sci.* 1993;52: 1499-508
42. Blandizzi, C., Fornai, M., Colucci, R., Baschiera, F., Barbara, G., De, Giorgio R., De, Ponti F., Breschi, M. C., and Del, Tacca M. Altered prejunctional modulation of intestinal cholinergic and noradrenergic pathways by alpha2-adrenoceptors in the presence of experimental colitis. *Br.J.Pharmacol.* 2003;139: 309-20
43. Braegger, C. P., Nicholls, S., Murch, S. H., Stephens, S., and MacDonald, T. T. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992;339: 89-91
44. Dieleman, L. A., Elson, C. O., Tennyson, G. S., and Beagley, K. W. Kinetics of cytokine expression during healing of acute colitis in mice. *Am.J.Physiol* 1996;271: G130-G136
45. Carty, E., MacEy, M., and Rampton, D. S. Inhibition of platelet activation by 5-aminosalicylic acid in inflammatory bowel disease. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 2000;14: 1169-79
46. Hurst, S. M. and Collins, S. M. Mechanism underlying tumor necrosis factor-alpha suppression of norepinephrine release from rat myenteric plexus. *Am.J.Physiol* 1994;266: G1123-G1129
47. Ruhl, A., Hurst, S., and Collins, S. M. Synergism between interleukins 1 beta and 6 on noradrenergic nerves in rat myenteric plexus. *Gastroenterology* 1994;107: 993-1001
48. Morteau, O., More, J., Pons, L., and Bueno, L. Platelet-activating factor and interleukin 1 are involved in colonic dysmotility in experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1993;104: 47-56
49. Valentine, J. F., Tannahill, C. L., Stevenot, S. A., Sallustio, J. E., Nick, H. S., and Eaker, E. Y. Colitis and interleukin 1beta up-

regulate inducible nitric oxide synthase and superoxide dismutase in rat myenteric neurons. *Gastroenterology* 1996;111: 56-64

50. Strobach, R. S., Ross, A. H., Markin, R. S., Zetterman, R. K., and Linder, J. Neural patterns in inflammatory bowel disease: an immunohistochemical survey. *Mod.Pathol.* 1990;3: 488-93
51. Miller, M. J., Zhang, X. J., Sadowska-Krowicka, H., Chotinaruemol, S., McIntyre, J. A., Clark, D. A., and Bustamante, S. A. Nitric oxide release in response to gut injury. *Scand.J.Gastroenterol.* 1993;28: 149-54
52. Hoffmann, J. C., Pawlowski, N. N., Kuhl, A. A., Hohne, W., and Zeitz, M. Animal models of inflammatory bowel disease: an overview. *Pathobiology* 2002;70: 121-30
53. Yamada, Y., Marshall, S., Specian, R. D., and Grisham, M. B. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology* 1992;102: 1524-34
54. Higa, A., McKnight, G. W., and Wallace, J. L. Attenuation of epithelial injury in acute experimental colitis by immunomodulators. *Eur.J.Pharmacol.* 1993;239: 171-6
55. Kankuri, E., Vaali, K., Korpela, R., Paakkari, I., Vapaatalo, H., and Moilanen, E. Effects of a COX-2 preferential agent nimesulide on TNBS-induced acute inflammation in the gut. *Inflammation* 2001;25: 301-10
56. Appleyard, C. B. and Wallace, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am.J.Physiol* 1995;269: G119-G125
57. Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., and Delgado, M. Therapeutic action of ghrelin in a mouse model of colitis. *Gastroenterology* 2006;130: 1707-20
58. Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R., and Wallace, J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989;96: 795-803
59. Holzer, P. and Holzer-Petsche, U. Tachykinin receptors in the gut: physiological and pathological implications. *Curr.Opin.Pharmacol.* 2001;1: 583-90
60. O'Connor, T. M., O'Connell, J., O'Brien, D. I., Goode, T., Bredin, C. P., and Shanahan, F. The role of substance P in inflammatory disease. *J.Cell Physiol* 2004;201: 167-80

61. Dery, O., Defea, K. A., and Bunnett, N. W. Protein kinase C-mediated desensitization of the neurokinin 1 receptor. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2001;280: C1097-C1106
62. Bellucci, F., Meini, S., Catalioto, R. M., Catalani, C., Giuliani, S., Quartara, L., Giolitti, A., Faiella, A., Rotondaro, L., Candenias, M. L., Pinto, F. M., and Maggi, C. A. Pharmacological evaluation of alpha and beta human tachykinin NK(2) receptor splice variants expressed in CHO cells. *Eur.J.Pharmacol.* 2004;499: 229-38
63. Lecci, A., Capriati, A., Altamura, M., and Maggi, C. A. Tachykinins and tachykinin receptors in the gut, with special reference to NK2 receptors in human. *Auton.Neurosci.* 2006;126-127: 232-49
64. Evangelista, S. Involvement of tachykinins in intestinal inflammation. *Curr.Pharm.Des* 2001;7: 19-30
65. Boutaghou-Cherid, H., Porcher, C., Liberge, M., Jule, Y., Bunnett, N. W., and Christen, M. O. Expression of the neurokinin type 1 receptor in the human colon. *Auton.Neurosci.* 2006;124: 9-17
66. Renzi, D., Pellegrini, B., Tonelli, F., Surrenti, C., and Calabro, A. Substance P (neurokinin-1) and neurokinin A (neurokinin-2) receptor gene and protein expression in the healthy and inflamed human intestine. *Am.J.Pathol.* 2000;157: 1511-22
67. Southwell, B. R. and Furness, J. B. Immunohistochemical demonstration of the NK(1) tachykinin receptor on muscle and epithelia in guinea pig intestine. *Gastroenterology* 2001;120: 1140-51
68. Goode, T., O'Connell, J., Anton, P., Wong, H., Reeve, J., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., and Shanahan, F. Neurokinin-1 receptor expression in inflammatory bowel disease: molecular quantitation and localisation. *Gut* 2000;47: 387-96
69. Smith, V. C., Sagot, M. A., Wong, H., and Buchan, A. M. Cellular expression of the neurokinin 1 receptor in the human antrum. *J.Auton.Nerv.Syst.* 2000;79: 165-72
70. Lecci, A., Capriati, A., and Maggi, C. A. Tachykinin NK2 receptor antagonists for the treatment of irritable bowel syndrome. *Br.J.Pharmacol.* 2004;141: 1249-63
71. Jenkinson, K. M., Southwell, B. R., and Furness, J. B. Two affinities for a single antagonist at the neuronal NK1 tachykinin receptor: evidence from quantitation of receptor endocytosis. *Br.J.Pharmacol.* 1999;126: 131-6

72. Vannucchi, M. G. and Fausone-Pellegrini, M. S. NK1, NK2 and NK3 tachykinin receptor localization and tachykinin distribution in the ileum of the mouse. *Anat.Embryol.(Berl)* 2000;202: 247-55
73. Holzer, P. and Holzer-Petsche, U. Tachykinins in the gut. Part I. Expression, release and motor function. *Pharmacol.Ther.* 1997;73: 173-217
74. Hokfelt, T., Pernow, B., and Wahren, J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J.Intern.Med.* 2001;249: 27-40
75. Frieling, T., Dobрева, G., Weber, E., Becker, K., Rupprecht, C., Neunlist, M., and Schemann, M. Different tachykinin receptors mediate chloride secretion in the distal colon through activation of submucosal neurones. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 1999;359: 71-9
76. Goldhill, J., Porquet, M. F., and Selve, N. Antisecretory and relaxatory effects of tachykinin antagonists in the guinea-pig intestinal tract. *J.Pharm.Pharmacol.* 1999;51: 1041-8
77. Moriarty, D., Selve, N., Baird, A. W., and Goldhill, J. Potent NK1 antagonism by SR-140333 reduces rat colonic secretory response to immunocyte activation. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 2001;280: C852-C858
78. Patacchini, R., Cox, H. M., Stahl, S., Tough, I. R., and Maggi, C. A. Tachykinin NK(2) receptor mediates contraction and ion transport in rat colon by different mechanisms. *Eur.J.Pharmacol.* 2001;415: 277-83
79. Riegler, M., Castagliuolo, I., So, P. T., Lotz, M., Wang, C., Wik, M., Sogukoglu, T., Cosentini, E., Bischof, G., Hamilton, G., Teleky, B., Wenzl, E., Matthews, J. B., and Pothoulakis, C. Effects of substance P on human colonic mucosa in vitro. *Am.J.Physiol* 1999;276: G1473-G1483
80. Schmidt, P. T., Rasmussen, T. N., and Holst, J. J. Tachykinins stimulate acid and pepsinogen secretion in the isolated porcine stomach. *Acta Physiol Scand.* 1999;166: 335-40
81. Schmidt, P. T., Tornoe, K., Poulsen, S. S., Rasmussen, T. N., and Holst, J. J. Tachykinins in the porcine pancreas: potent exocrine and endocrine effects via NK-1 receptors. *Pancreas* 2000;20: 241-7
82. Sturiale, S., Barbara, G., Qiu, B., Figini, M., Geppetti, P., Gerard, N., Gerard, C., Grady, E. F., Bunnett, N. W., and Collins, S. M. Neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) terminates colitis by

- degrading substance P. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96: 11653-8
83. Watanabe, T., Kubota, Y., and Muto, T. Substance P containing nerve fibers in rectal mucosa of ulcerative colitis. *Dis.Colon Rectum* 1997;40: 718-25
 84. Kimura, M., Masuda, T., Hiwatashi, N., Toyota, T., and Nagura, H. Changes in neuropeptide-containing nerves in human colonic mucosa with inflammatory bowel disease. *Pathol.Int.* 1994;44: 624-34
 85. Bernstein, C. N., Robert, M. E., and Eysselein, V. E. Rectal substance P concentrations are increased in ulcerative colitis but not in Crohn's disease. *Am.J.Gastroenterol.* 1993;88: 908-13
 86. Mazumdar, S. and Das, K. M. Immunocytochemical localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in the colon from normal subjects and patients with inflammatory bowel disease. *Am.J.Gastroenterol.* 1992;87: 176-81
 87. Mantyh, C. R., Vigna, S. R., Bollinger, R. R., Mantyh, P. W., Maggio, J. E., and Pappas, T. N. Differential expression of substance P receptors in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1995;109: 850-60
 88. Mantyh, C. R., Gates, T. S., Zimmerman, R. P., Welton, M. L., Passaro, E. P., Jr., Vigna, S. R., Maggio, J. E., Kruger, L., and Mantyh, P. W. Receptor binding sites for substance P, but not substance K or neuromedin K, are expressed in high concentrations by arterioles, venules, and lymph nodules in surgical specimens obtained from patients with ulcerative colitis and Crohn disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1988;85: 3235-9
 89. Simeonidis, S., Castagliuolo, I., Pan, A., Liu, J., Wang, C. C., Mykoniatis, A., Pasha, A., Valenick, L., Sougioultzis, S., Zhao, D., and Pothoulakis, C. Regulation of the NK-1 receptor gene expression in human macrophage cells via an NF-kappa B site on its promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2003;100: 2957-62
 90. Weinstock, J. V., Blum, A., Metwali, A., Elliott, D., and Arsenescu, R. IL-18 and IL-12 signal through the NF-kappa B pathway to induce NK-1R expression on T cells. *J.Immunol.* 2003;170: 5003-7
 91. Taylor, C. and Jobin, C. Ubiquitin protein modification and signal transduction: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2005;11: 1097-107

92. Raithel, M., Schneider, H. T., and Hahn, E. G. Effect of substance P on histamine secretion from gut mucosa in inflammatory bowel disease. *Scand.J.Gastroenterol.* 1999;34: 496-503
93. Castagliuolo, I., Riegler, M., Pasha, A., Nikulasson, S., Lu, B., Gerard, C., Gerard, N. P., and Pothoulakis, C. Neurokinin-1 (NK-1) receptor is required in *Clostridium difficile*- induced enteritis. *J.Clin.Invest* 1998;101: 1547-50
94. Madsen, J. L. and Fuglsang, S. A randomized, placebo-controlled, crossover, double-blind trial of the NK1 receptor antagonist aprepitant on gastrointestinal motor function in healthy humans. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 2008;27: 609-15
95. Hill, R. NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol.Sci.* 2000;21: 244-6
96. Kamp, E. H., Beck, D. R., and Gebhart, G. F. Combinations of neurokinin receptor antagonists reduce visceral hyperalgesia. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001;299: 105-13
97. Tonini, M., Spelta, V., De, Ponti F., De, Giorgio R., D'Agostino, G., Stanghellini, V., Corinaldesi, R., Sternini, C., and Crema, F. Tachykinin-dependent and -independent components of peristalsis in the guinea pig isolated distal colon. *Gastroenterology* 2001;120: 938-45
98. Saunders, P. R., Miceli, P., Vallance, B. A., Wang, L., Pinto, S., Tougas, G., Kamath, M., and Jacobson, K. Noradrenergic and cholinergic neural pathways mediate stress-induced reactivation of colitis in the rat. *Auton.Neurosci.* 2006;124: 56-68
99. Boughton-Smith, N. K., Wallace, J. L., and Whittle, B. J. Relationship between arachidonic acid metabolism, myeloperoxidase activity and leukocyte infiltration in a rat model of inflammatory bowel disease. *Agents Actions* 1988;25: 115-23
100. Stucchi, A. F., Shofer, S., Leeman, S., Materne, O., Beer, E., McClung, J., Shebani, K., Moore, F., O'Brien, M., and Becker, J. M. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2000;279: G1298-G1306
101. Di, Sebastiano P., Grossi, L., Di Mola, F. F., Angelucci, D., Friess, H., Marzio, L., Innocenti, P., and Buchler, M. W. SR140333, a substance P receptor antagonist, influences morphological and motor changes in rat experimental colitis. *Dig.Dis.Sci.* 1999;44: 439-44

102. Pothoulakis, C., Castagliuolo, I., LaMont, J. T., Jaffer, A., O'Keane, J. C., Snider, R. M., and Leeman, S. E. CP-96,345, a substance P antagonist, inhibits rat intestinal responses to *Clostridium difficile* toxin A but not cholera toxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91: 947-51
103. Goode, T., O'Connor, T., Hopkins, A., Moriarty, D., O'Sullivan, G. C., Collins, J. K., O'Donoghue, D., Baird, A. W., O'Connell, J., and Shanahan, F. Neurokinin-1 receptor (NK-1R) expression is induced in human colonic epithelial cells by proinflammatory cytokines and mediates proliferation in response to substance P. *J.Cell Physiol* 2003;197: 30-41
104. Miller, M. J., Sadowska-Krowicka, H., Jeng, A. Y., Chotinaruemol, S., Wong, M., Clark, D. A., Ho, W., and Sharkey, K. A. Substance P levels in experimental ileitis in guinea pigs: effects of misoprostol. *Am.J.Physiol* 1993;265: G321-G330
105. Miampamba, M. and Sharkey, K. A. Distribution of calcitonin gene-related peptide, somatostatin, substance P and vasoactive intestinal polypeptide in experimental colitis in rats. *Neurogastroenterol.Motil.* 1998;10: 315-29
106. Gross, K. J. and Pothoulakis, C. Role of neuropeptides in inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* 2007;13: 918-32