

بررسی اثر ایمونومدولاتور مولکول LVA بر شکل مزمن کولیت اولسراتیو تجربی

علی خدادادی^{۱*} (M.D)، سید عباس میرشفیعی^۱ (M.D)، محمدباقر اسلامی^۱ (M.D)، سید علی‌رضا رضوی^۱ (M.D) و خدیجه حکمت^۲ (M.D)

۱- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه پاتوبیولوژی

۲- دانشگاه علوم پزشکی اهواز، دانشکده پرستاری و مامایی، گروه مامایی

چکیده

سابقه و هدف: بیماری‌های التهابی روده (IBD) اصطلاحی است که برای گروهی از بیماری‌های التهابی دستگاه گوارش با اتیولوژی نامشخص به کار می‌رود. کولیت اولسروز (UC) و بیماری کرون (CD) دو نوع اصلی از این بیماری می‌باشند که مشخصه این بیماری‌ها افزایش مدیاتورهای التهابی نظیر IL-1، IL-6، TNF- α ، LTB₄ و PGE₂ می‌باشند. نظر به مطرح شدن نقش ایمونومدولاتور (LVA7220) در تعدیل پروسه‌های التهابی در سال‌های اخیر بر آن شدیم که اثر این ماده را بر شکل مزمن کولیت تجربی در رت مورد کنکاش قرار دهیم. این ماده از مشتقات آلژینات می‌باشد و پلی‌ساکاریدی است که از جلبک‌های قهوه‌ای به دست می‌آید و از دو نوع اسید ارونیک (D- مانورونیک و L- گلورونیک اسید) تشکیل شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با روش TNBS به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از ماده TNBS حل شده در اتانل ۵۰٪ با تلقیح ۰/۲۵ میلی‌لیتر به هر رت، فرم مزمن بیماری ایجاد شد. حیوانات شامل گروه‌های بیمار (P)، درمان شده (T) و پیش‌درمانی (M) جهت هفته اول، دوم، سوم و ششم و نیز گروه کنترل و نرمال به تعداد n = ۵ برای هر گروه منظور گردید که گروه‌های M و T محلول LVA ۵g/lit را به صورت خوراکی دریافت می‌کردند. ارزیابی با استفاده از روش ELISA برای اندازه‌گیری مدیاتورهای التهابی سرم نظیر IL-6، TNF- α ، LTB₄ و PGE₂ و همچنین ارزیابی ماکروسکوپی روده با روش Gerald و ارزیابی میکروسکوپ با استفاده از لام‌های تهیه شده، صورت پذیرفت.

یافته‌ها: نتایج سنجش سایتوکاین‌ها و ارزیابی میکروسکوپی، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های M و T با گروه P می‌باشد. در خصوص پارامترهای IL-6، TNF- α و LTB₄ بین گروه بیمار و درمان شده اختلاف معنی‌دار وجود داشت که مؤید اثر مهاری LVA بر این پارامترهای التهابی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بنابراین LVA می‌تواند به عنوان عامل مهمی در تعدیل پاسخ‌های التهابی که منجر به تخریب بافت روده در بیماری IBD می‌شوند مطرح گردد.

واژگان کلیدی: بیماری التهابی روده، آلژینات، کولیت اولسروز، بیماری کرون.

مقدمه

بیماری التهابی روده (IBD) اصطلاحی است که برای گروهی از بیماری‌های التهابی دستگاه گوارش با اتیولوژی نامعلوم به کار می‌رود. کولیت اولسروز (UC) و بیماری کرون

(CD) دو نوع اصلی از این بیماری می‌باشند، این بیماری‌ها

مزمن و عودکننده‌اند [۱۲].

IBD با آنومالی‌های ایمنولوژیک همراه است. اختلال پاسخ

ایمنی مخاطی، دخالت سایتوکاین‌های التهابی مثل IL-1، IL-6 و

IL-6 و TNF- α و برخی متابولیت‌های اسید آراشیدونیک مثل LTB₄ و PGE₂ در سرم حیوان، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

حیوانات. Rat‌های ماده Sprague-Dawley با میانگین وزن 180 ± 20 gr و سن ۸-۱۰ هفته از انستیتو رازی شهرستان کرج تهیه گردید. حیوانات یک هفته قبل از آزمایش تحت نظر بوده و با شرایط محیط وفق داده شدند. آنها به تعداد ۵-۶ حیوان در هر قفس نگهداری می‌شدند، دسترسی آسان به آب و غذا داشتند و در دمای $25 \pm 2^\circ\text{C}$ و رطوبت ۶۵-۷۰٪ در اطاق حیوانات دانشکده بهداشت تهران نگهداری شدند. در این تحقیق حیوانات به چند گروه که شامل گروه هفته اول، دوم، سوم و ششم بود تقسیم شدند. هر گروه خود شامل سه دسته ۵ تایی Rat و مشتمل بر گروه بیمار (Patient) P، گروه پیش‌درمانی M (Pretreatment) و گروه درمانی T (Treatment) بودند. گروه پیش‌درمانی (M) ۲۴ ساعت قبل از القاء بیماری، LVA را که به مقدار ۵ gr/lit در آب حل شده بود؛ به صورت خوراکی و به میزان $0.77 \text{ g/kg} - 0.65$ (۰) در هر ۲۴ ساعت دریافت نمودند و حیوانات گروه درمان (T) نیز ۲۴ ساعت بعد از القاء بیماری، دارو را به همان میزان از طریق آب آشامیدنی دریافت نمودند و حیوانات گروه P هیچ دارویی دریافت ننمودند.

به منظور تهیه گروه‌های کنترل، سه گروه ۵ تایی همراه با گروه‌های دیگر در قفس نگهداری شدند. گروه اول یا گروه نرمال (N) هیچ‌گونه دارویی دریافت نکردند. دو گروه دیگر E₁ و E₂ (Experimental) که رت‌های سالم دریافت‌کننده دارو بودند، بدون ایجاد بیماری دارو را به مدت یک هفته و شش هفته به ترتیب با همان مقدار ذکر شده دریافت نمودند.

القاء بیماری. با استفاده از TNBS تهیه شده از شرکت Sigma (LOT: 21k5009) به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر الکل اتانل ۵۰٪ تهیه و به هر رت ۰/۲۵ میلی‌لیتر از طریق آنوس و با استفاده از کاتتر با قطر خارجی ۲-۲/۵ میلی‌متر در عمق هشت سانتی‌متری روده بزرگ تلقیح شد [۹].

TNF- α و واسطه‌های التهابی دیگری نظیر متابولیت‌های اسید آراشیدونیک در پاتوژنز التهاب روده گزارش شده است [۵، ۱۳]. در دهه گذشته اثرات درمانی و یا پیش‌درمانی برخی از مواد تعدیل‌کننده یا مهارکننده این مدیاتورها بر جنبه‌های مختلف کولیت تجربی که IBD انسان را تقلید می‌کند، بررسی شده است و چنانچه به‌نحو مناسبی انتخاب شوند، برای شناخت مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک و نیز پایه‌گذاری فرضیات جدید سودمند خواهند بود. بعلاوه این مدل‌های تجربی برای آزمایش ترکیبات درمانی تازه در مرحله Pre-Clinical بسیار مفید می‌باشند [۱۱].

LVA (از مشتقات اسید آلژینیک) که منبع اصلی آن جلبک‌های قهوه‌ای می‌باشد؛ پلی‌ساکاریدی است که از دو نوع اسید ارونیک، (D-مانورونیک اسید و L-گلوکونیک اسید) تشکیل شده است. نسبت این اسیدها در آلژینات‌ها متفاوت است. این کوبیلی‌مر، قابل تجزیه است؛ سمی نیست و سازگاری زیستی دارد [۱۴].

بر طبق گزارشات موجود، اسیدهای آلژینیک دارای اثر مهارکنندگی بر روی فعالیت هیالورونیداز و نیز آزاد شدن هیستامین از سلول‌های mast cell می‌باشد، به طوری که ممانعت از آزاد شدن هیستامین باعث کاهش روند التهاب می‌شود [۱]. توانایی آلژینات در مهار مکانیسم‌های دفاعی موضعی میزبان و نیز اثر مهارکنندگی این ماده بر مهاجرت تصادفی، کموتاکسی و فعالیت شانت هگزوز منوفسفات نوتروفیل‌ها و ترانسفورماسیون لئوسیت‌ها که همگی در پروسه التهاب روده نقش دارند گزارش شده است [۸].

در تحقیق حاضر اثر ایمونومدولاتوری مولکول LVA در فرم مزمن کولیت تجربی مورد بررسی قرار گرفت. القاء کولیت التهابی با استفاده از تری‌نیتروبنزن سولفونیک اسید (TNBS) انجام شد که مدل مناسبی برای مطالعه روند پیشرفت التهاب از حالت حاد به مزمن می‌باشد [۹]. در مدل مذکور اثر پیش‌درمانی و درمانی LVA بر تغییرات ماکروسکوپی و میکروسکوپی بافت ملتهب و سایتوکاین‌های التهابی نظیر

کلون توسط ۳ نفر متخصص با استفاده از روش Gerald براساس جدول ۱ برای هر نمونه بین صفر تا ۵ نمره گذاری شد [۴].

الف. ارزیابی ماکروسکوپیک رت‌ها. بعد از پایان هفته اول، دوم، سوم و ششم القاء بیماری، به منظور تهیه لام و روده، حیوان بیهوش و پس از باز کردن شکم و خون‌گیری از قلب، ۱۰ cm انتهایی کولون جدا گردید و بلافاصله بعد از آن نمونه

جدول ۱. کرایتریای نمره‌گذاری آسیب بافتی در نمای ظاهری در بیماران مبتلا به (Gerald method) IBD

Criteria of scoring of IBD morphological damage (Gerald method)	
Score	Gross morphology
0	No damage
1	Localized hyperemia, but no ulcers
2	Linear ulcers with no significant inflammation
3	Linear ulcers with inflammation at one site
4	Two or more sites of ulceration and / or inflammation
5	Two or more major sites of inflammation and ulceration or one major site of inflammation and ulceration extending > 1 cm along the length of the colon

جدول ۲. ارزیابی پاتولوژیک با استفاده از روش اصلاح شده Wallace

Inflammation	Non	Mild	Medium	Severe	
	-	+	++	+++	
Depth of lesion	Non	Laminapropria	Submucos	Muscular	Serosa
	-	+	++	+++	++++
Fibrosis	Non	Mild	Severe		
	-	+	++		

test استفاده گردید و در دو حالت، P value کمتر از ۰/۰۵، معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

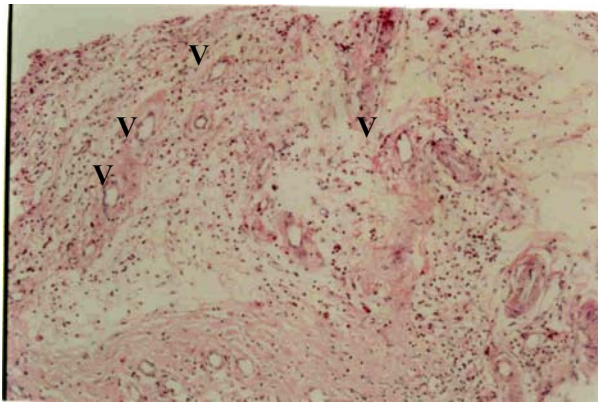
نتایج حاصل از مشاهدات کلینیکی جداول ۳ و ۴، وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های پیش‌درمانی (M) و بیمار (P) در کلیه هفته‌ها را نشان می‌دهد، که مؤید تأثیر دارو در جلوگیری از اثرات القائی TNBS می‌باشد. جدول ۴ نمایان‌گر مقایسه گروه‌های بیمار (P) درمان شده (T) می‌باشد که در گروه درمان در کلیه هفته‌ها کاهش نشان می‌دهد ولی این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

نتایج ارزیابی پاتولوژیک لام‌های تهیه شده، اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های بیمار (P) در مقایسه با گروه‌های درمان شده (T) و پیش‌درمانی (M) نشان می‌دهد. فتومیکروگراف‌های ۱، ۲، ۳ و ۴، منحنی‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ و نتیجه سنجش مدیاتورهای مختلف در هفته‌های اول تا ششم،

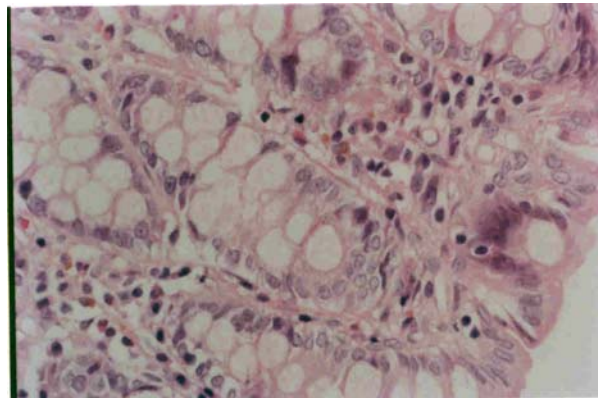
ب. ارزیابی میکروسکوپیک. تهیه لام به منظور ارزیابی پاتولوژیک با استفاده از روش اصلاح شده Wallace و براساس جدول ۲ مطالعات هیستوپاتولوژیک صورت گرفت [۱۸].

اندازه‌گیری مدیاتورهای التهابی در سرم. نمونه‌های سرم به دست آمده از هفته‌های اول، دوم، سوم و ششم با استفاده از کیت‌های مخصوص الیزا، تهیه شده از شرکت Assay Designs، از نظر میزان مدیاتورهای IL-6، TNF-α و PGE₂ و LTB₄ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آنالیز آماری. شاخص‌های اندازه‌گیری شده (سایتوکاین‌ها و ایکوزانوئیدها) به صورت Mean±SD بیان گردید. به‌منظور مقایسه گروه‌های بیمار (P)، پیش‌درمانی (M) و درمانی (T) از روش ANOVA یک طرفه استفاده شد. برای ارزیابی شاخص‌های غیرپارامتریک، از روش Mann Whitney U

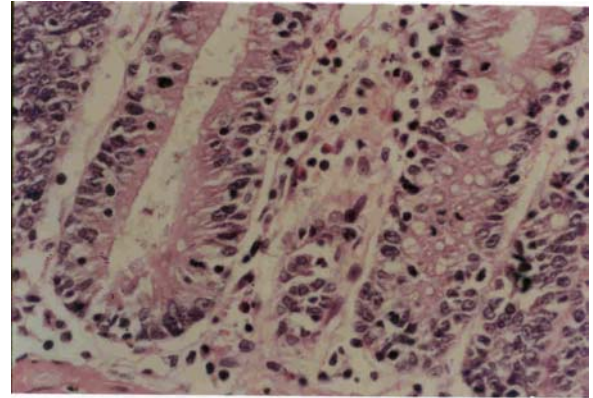


فتومیکروگراف ۳. ساختمان بافت شناسی دیواره کولون گروه بیمار (P) در کولیت القاء شده با TNBS در هفته ششم، هموراژی و حضور گسترده عروق خونی (V) در تمام ساختار مشاهده می‌شود. (رنگ آمیزی H + E, X40)

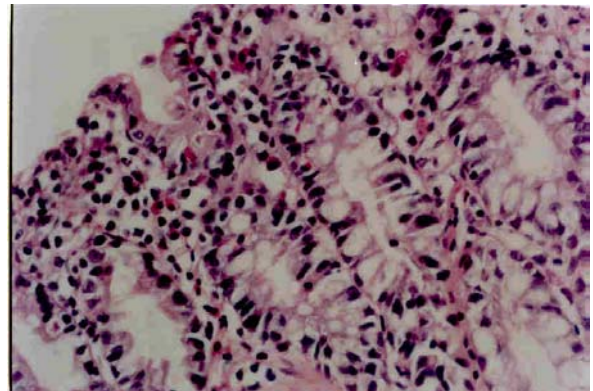


فتومیکروگراف ۴. ساختمان بافت شناسی دیواره کولون رت گروه درمان شده (T) در کولیت القاء شده با TNBS در هفته ششم. همان‌گونه که مشاهده می‌شود ساختار عمومی بافت در مقایسه با گروه بیمار هفته ششم کولیت القاء شده با TNBS از نظر ارتشاح سلولهای لنفوسیتی دارای حالتی نزدیک به نرمال می‌باشد. (رنگ آمیزی H + E, X40)

مؤید وجود اختلاف معنی‌دار در خصوص پارامترهای IL-6, TNF- α و LTB₄ بین گروه بیمار (P) با گروه‌های درمان (T) و پیش‌درمانی (M) می‌باشد. از طرفی ارقام مربوط به پارامتر PGE₂ اگرچه کاهش نشان می‌دهند ولی این اختلاف معنی‌دار نبود.



فتومیکروگراف ۱. ساختمان بافت شناسی دیواره کولون رت در حالت طبیعی (رنگ آمیزی H + E, X40)



فتومیکروگراف ۲. ساختمان بافت شناسی دیواره کولون گروه بیمار (P) در کولیت القاء شده با TNBS در هفته ششم. ارتشاح سلولهای لنفوی، درهم ریختگی بافتی قابل مشاهده است (رنگ آمیزی H + E, X40)

جدول ۳. نتایج حاصل از مشاهدات کلینیکی نمونه‌های روده بین گروه بیمار (P) و گروه پیش‌درمانی (M) در کولیت القاء شده با

TNBS در هفته های اول، دوم، سوم و ششم با استفاده از روش (Man-whitney U test)

گروه هفته	Pre treatment		Patient		P.V*
	تعداد	Mean Rank	تعداد	Mean Rank	
اول	۵	۳/۵۰	۵	۷/۵۰	۰/۰۳۲
دوم	۵	۳/۱۰	۵	۷/۹۰	۰/۰۱۱
سوم	۵	۳/۱۰	۵	۷/۹۰	۰/۰۱۰
ششم	۵	۳/۵۰	۵	۷/۵۰	۰/۰۳۶

*نتایج آزمون آماری در خصوص کلیه مشاهدات کلینیکی بین گروه P و M تفاوت معنی‌داری را نشان داد.

جدول ۴. نتایج حاصل از مشاهدات کلینیکی نمونه‌های روده بین گروه بیمار (P) و گروه درمانی (T) در کولیت القاء شده با

TNBS در هفته‌های اول، دوم، سوم و ششم با استفاده از روش (Man-whitney U test)

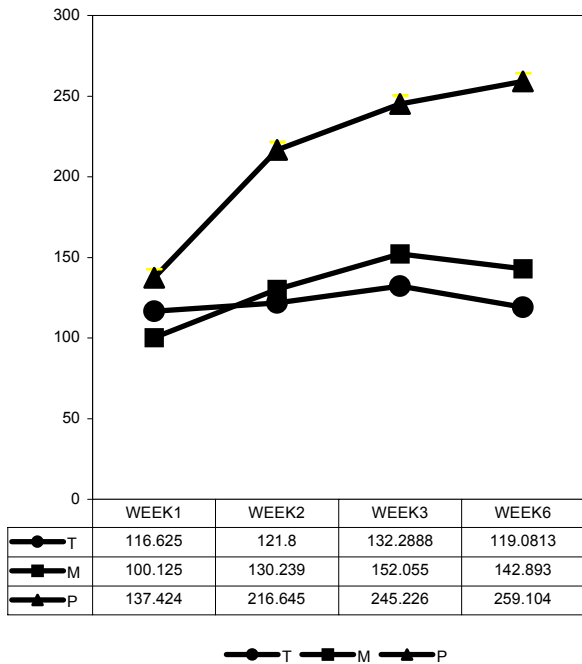
گروه هفته	Treatment		Patient		P.V*
	تعداد	Mean Rank	تعداد	Mean Rank	
اول	۵	۴/۳۰	۵	۶/۷۰	۰/۲۰۲
دوم	۵	۴/۲۰	۵	۶/۸۰	۰/۱۶۰
سوم	۵	۴/۷۰	۵	۶/۳۰	۰/۳۸۹
ششم	۵	۳/۷۰	۵	۷/۳۰	۰/۰۵۶

*مقایسه آماری نتایج کلیه مشاهدات کلینیکی بین دو گروه T و P در هفته‌های اول، دوم، سوم و ششم تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

تنظیم‌کننده ایمنی، نقش اساسی در پاتوژنز IBD دارد، افزایش این سایتوکاین در سرم و نیز در مایع رویی نمونه لامینا پروپریا در بیماران مبتلا به IBD [۲] و نیز افزایش قابل توجه mRNA این سایتوکاین تا دو هفته بعد از القاء کولیت با استفاده از TNBS در رت گزارش شده است [۱۵].

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از ارزیابی میکروسکوپی و ماکروسکوپی، جدول ۳ و ۴ که وجود اختلاف معنی‌دار را بین گروه M و P در ارزیابی کلینیکی و درجه‌بندی ضایعات ماکروسکوپی نشان می‌دهد و همچنین با توجه به اختلاف معنی‌دار بین گروه بیمار (P) و گروه‌های درمانی (T) و پیش‌درمانی (M) که در ارزیابی پاتولوژی مشاهده گردید، فتومیکروگراف‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ تأییدکننده کاهش کلیه شاخص‌های التهابی اندازه‌گیری شده در اثر استفاده از LVA می‌باشد، از جمله کاهش اینفیلتراسیون سلول‌های التهابی به ویژه سلول‌های نوتروفیل که از مشخصه‌های مهم بیماری کولیت اولسروز می‌باشند [۳] و نقش اساسی در کولیت فعال دارند [۷] مؤید اثر مهار LVA بر روند التهاب ایجاد شده در اثر TNBS می‌باشد که احتمالاً ناشی از اثر مهار LVA بر مهاجرت و فعالیت نوتروفیل‌ها و جلوگیری از ترانس‌فورماسیون لنفوسیت‌ها [۸] و یا اثر مهارکننده LVA در آزاد شدن مدیاتورها و آنزیم‌های تشدیدکننده روند التهاب نظیر هیستامین و هیالورونیداز از سلول‌های Mast و سلول‌های دیگر باشد [۱].

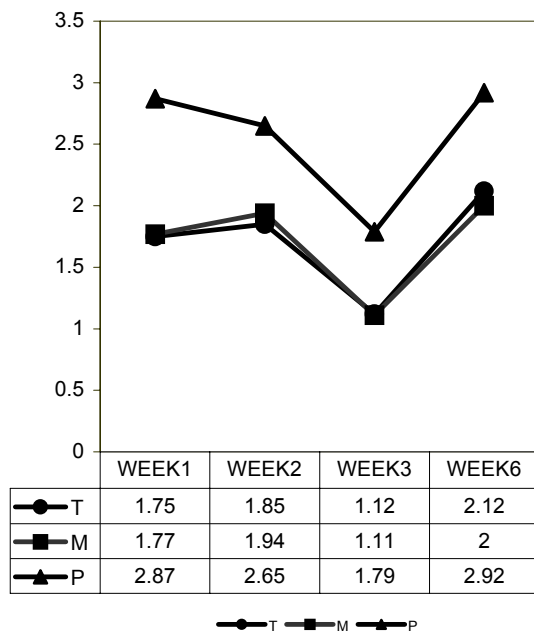


نمودار ۱. مقایسه سطح سرمی IL-6 در هفته‌های اول، دوم، سوم و ششم در کولیت القاء شده با TNBS

این سایتوکاین در ترشح مدیاتورهای التهابی دیگر، تمایز سلول‌های B و T، فعال کردن سلول‌های روده، موجبات آسیب آنرا فراهم می‌کند [۶]، که در بررسی حاضر میزان این

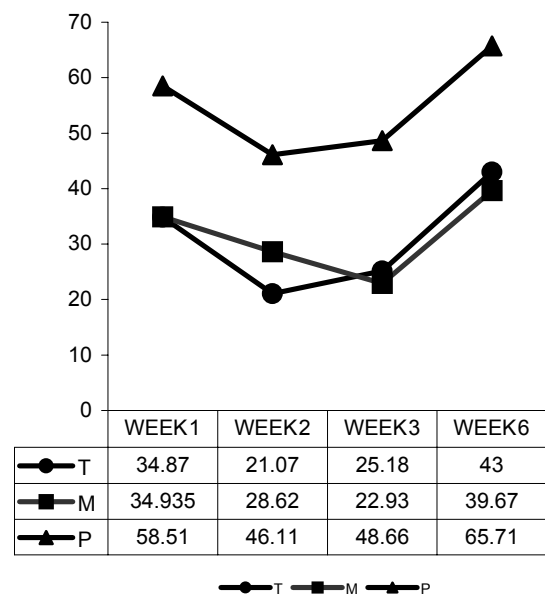
امروزه به دلیل مشارکت سایتوکاین‌ها در التهاب روده و در پاسخ‌های ایمنی به این گروه از مولکول‌ها توجه خاصی معطوف شده است. IL-6 به عنوان یک فاکتور مهم التهابی و

با در نظر گرفتن کاهش سطح سرمی سایتوکاین‌های Pro-inflammatory مانند IL-6 و TNF- α و همچنین LTB₄ و نیز تخفیف علائم التهاب روده در گروه‌های تحت مطالعه بررسی حاضر و افزایش این سایتوکاین‌ها در بسیاری از شرایط پاتولوژیک و بیماری‌های التهابی به خصوص بیماری التهاب روده (IBD)، می‌توان با تنظیم مقدار LVA مورد نیاز در جهت تعدیل سایتوکاین‌های Pro-inflammatory، نسبت به تجویز دوز مناسب LVA و تصحیح شرایط به منظور مهار التهاب، اقدام لازم در راستای تعدیل پاسخ‌هایی که منجر به تخریب بافت‌های روده در بیماری التهاب روده (IBD) می‌شوند به عمل آورد.



نمودار ۳. مقایسه سطح سرمی LTB₄ در هفته‌های اول، دوم، سوم و ششم در کولیت القا شده با TNBS

سایتوکاین در گروه‌های دریافت کننده LVA (گروه M و T) به طور معنی‌دار کاهش یافته بود (نمودار ۱). TNF- α یک سایتوکاین Proinflammatory قوی است و به نظر می‌رسد در پاتوژنز بیماری IBD نقش کلیدی دارد [۱۰]. اثرات مفید کلینیکی متعاقب ایمونوتراپی که منجر به کاهش و یا مهار تولید TNF- α می‌شود در IBD گزارش شده است [۱۶] که در بررسی حاضر LVA باعث کاهش قابل ملاحظه و معنی‌دار سطح عمومی TNF- α در کولیت ناشی از TNBS در کلیه هفته‌ها شده است (نمودار ۲).



نمودار ۲. مقایسه سطح سرمی TNF- α در هفته‌های اول، دوم، سوم و ششم در کولیت القا شده با TNBS

LTB₄ خاصیت کمو تاکتیک قوی داشته و یک مدیاتور مهم التهابی محسوب می‌شود و گزارش شده است که مخاط روده بیماران مبتلا به IBD بسیار بیشتر از مخاط روده افراد سالم، اسید آراشیدونیک را به LTB₄ تبدیل می‌کند [۱۳]. همچنین گزارش شده است که مهار سنتز لوکوترین‌ها منجر به بهبودی سریع زخم‌های کولون و بهبود التهاب کولون در مدل حیوانی می‌شود [۱۹]. در بررسی حاضر برای LTB₄ در گروه‌های T و M در مقایسه با گروه P کاهش معنی‌دار نشان داد که مبین اثر تعدیلی LVA بر این مدیاتور التهابی می‌باشد (نمودار ۳).

منابع

- [1] Asada, M., Sugie, M., Inoue, M., Nakagomi, K., Hongo, S., Murata, K., Irie, S., Takeuchi, T., Tomizuka, N. and Oka, S., Inhibitory effect of alginic acids on hyaluronidase and on histamine release from mast cells, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61 (1997) 1030-1032.
- [2] Brown, K.A., Back, S.J., Ruchelli, E.D., Markowitz, J. and Mascarenhas, M., Lamina propria and circulating IL-6 in newly diagnosey pediatric inflammatory bowel disease patient, *Am. J. Gastroentrol.*, 97 (2002) 2603-8.

- [11] QIU, B.S., Protection by recombinant human IL-11 against experimental TNB-induced colitis in rats, *Dig. Dis. Sci.*, 41(1996) 1625-30.
- [12] Sartor, R.B., Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases, *Am. J. Gastroenterol.*, 92 (1997) 5S-11S.
- [13] Sharon, P. and Stenson, W.F., Enhanced synthesis of leukotrien B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 84 (1984) 453-60.
- [14] Smidsrod, D. and Draget, K.I., Chemistry and Physical properties of alginat, *Carbohydrates in Europe*, 14 (1996) 6-13.
- [15] Sun, F.F., Lai, P.S., Yue, G., Yin, K. and Naglele, R.G., Patern of cytokine and adhesion molecule mRNA in hapten induced relapsing colon inflammation in the rat, *Gastroenterology*, 121(2001) 1261-2.
- [16] Van-Deventer, S.J., New biological therapies in inflammatory bowel disease, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 17(2003) 119-30.
- [17] Vane, J.R., Inhibition of prostaglandin biosynthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, *Nature New Biol.*, 231 (1997) 232-235.
- [18] Wallace, J.L., MacNaughton, W.K., Morris, G.P. and Beck, P.L., Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 96 (1989) 29-36.
- [19] Wallace, J.L., Keenan, C.M., Gale, D. and Shoupe, T.S., Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis, *Gastroenterology*, 102 (1992) 18-27.
- [3] Eugenio, G., Gennaro, T. and Antonella, V., Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats. Clinical, structural and ultrastructural aspects, *Dig. Dis. Sci.*, 44 (1999) 1458-1475.
- [4] Gerald, P., Morris, G.P., Paul, L., Beck, P.L., Margaret, S. and Myron, R., Hapten-induced model of chronic infammation and ulceration in the Rat colon, *Gastroenterology*, 96 (1989) 795-803.
- [5] Gross, V., Andus, T., Caesar, I. and Foth, M., Evidance for stimulation of interleukine-6 in Crohn's disease, *Gastroenterol.*, 102 (1992) 512-19.
- [6] Kumagai, K., Ohno, I., Okada, S., Ohkawara, Y., Suzuki, K., Shinya, T., Nagase, H., Iwato, K. and Shirato, K., Inhibition of matrix metaloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma, *J. Immunol.*, 162 (1999) 4212-4219.
- [7] Koizumi, M., King, N., Lobb, R., Benjamin, C. and Podolsky, D.K., Expression of vascular adhesion molecules in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology*, 103 (1992) 840-847.
- [8] Mai, G.T., Seow, W.K. and Pier, G.B., Suppression of lymphocyte and neutrophile function by pseudomonas aeruginosa mucoideo polysacharide (alginate), *Infect. Immun.*, 61(1993) 559-64.
- [9] Morris, G.P., Beck, P.L., Herridge, M.S., Depew, W.T., Szewczuk, M.R. and Waklce, J.L., Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon, *Gastroenterology*, 96 (1989) 795-803.
- [10] Natio, Y., Takagi, T., Handa, O. and Ishikawa, T., Inhanced intestinal inflammation induced by DSS in TNF- α deficient mice, *Eu. J. Gastroentrol. Hepatol.*, 18 (2003) 560-9.