

PHD ÉRTEKEZÉS

A MYENTERICUS PLEXUST ELLÁTÓ KAPILLÁRISOK DIABÉTESSZEL ÖSSZEFÜGGŐ STRUKTURÁLIS, MOLEKULÁRIS ÉS FUNKCIONÁLIS VÁLTOZÁSAI STREPTOZOTOCIN-INDUKÁLT DIABÉTESZES PATKÁNYBAN

BÓDI NIKOLETT

TÉMAVEZETŐK:
DR. FEKETE ÉVA
EGYETEMI TANÁR
DR. BAGYÁNSZKI MÁRIA
EGYETEMI ADJUNKTUS

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK



SZEGED

2011

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA	4
I. BEVEZETÉS.....	6
I. 1. A bélidegrendszer általános felépítése és működése	6
I. 2. Nitrerg myentericus neuronok.....	8
I. 3. Diabéteszes nitrerg neuropátia	10
I. 4. Az entericus neuronok mikrokörnyezetének változásai diabéteszben	13
I. 5. Diabéteszes érrendszeri szövődmények	15
I. 5. 1. Az endothelialis bazális membrán változásai diabéteszben.....	17
I. 5. 2. A diabétesz hatása a kapilláris endothelium permeabilitására	18
II. CÉLKITŰZÉSEK	26
III. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	29
III. 1. Krónikus diabéteszes patkánymodell előállítása	29
III. 2. A bélcsatorna előkészítése mikroszkópos és molekuláris vizsgálatokhoz	30
III. 3. Bélminták előkészítése transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz	30
III. 3. 1. Elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok.....	32
III. 3. 1. 1. Bazális membrán vizsgálata	32
III. 3. 1. 2. Vezikula kompartmentek vizsgálata.....	33
III. 3. 1. 3. Szoros sejtkapcsoló struktúrák vizsgálata	34
III. 3. 2. Posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatok.....	35
III. 4. Molekuláris biológiai vizsgálatok	37
III. 4. 1. mRNS preparálás, reverz transzkripció és polimeráz láncreakció	37
III. 4. 2. Cav-1 és eNOS fehérjemennyiség meghatározása – Western blot analízis ..	39
III. 5. Statisztikai analízis	41
IV. EREDMÉNYEK.....	42
IV. 1. A kísérleti állatok testtömege és vércukor-koncentrációja.....	42
IV. 2. Mesenterialis kapillárisok ultrastruktúrája	44
IV. 3. Endothelialis bazális membrán vizsgálata.....	46
IV. 4. Vezikuláris kompartmentek kvantitatív morfológiai vizsgálata	49
IV. 5. Szoros sejtkapcsoló struktúrák morfológiai vizsgálata	52
IV. 6. Az albumin transzportjának vizsgálata a kapilláris endothelium és az interstitium között	55

IV. 7. Caveolin-1 expresszió vizsgálata	58
IV. 8. eNOS expresszió vizsgálata	61
V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	64
V. 1. A mesenterialis kapillárisok diabétesz okozta strukturális változásai	65
V. 2. A mesenterialis kapillárisok diabéteszrel összefüggő funkcionális változásai	67
V. 3. A kapilláris endothelium diabéteszrel összefüggő molekuláris változásai	68
V. 4. Következtetések	70
VI. ÖSSZEFOGLALÁS	72
VI. 1. Magyar nyelvű összefoglalás	72
VI. 2. Summary	76
VII. FELHASZNÁLT IRODALOM	79
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	96
IX. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	97

RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA

AGEs	előrehaladott glikációs végtermékek (advanced glycation end-products)
AGEs-ALB	irreverzibilisen glikált albumin
ANOVA	egyfaktoros varianciaanalízis (variance of analysis)
ATP	adenozin-trifoszfát (adenosine-triphosphate)
BH4	tetrahidrobiopterin
BM	bazális membrán (basement membrane)
BSA	borjú szérum albumin (bovine serum albumin)
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát (cyclic adenosine-monophosphate)
Cav-1	caveolin-1
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát (cyclic guanosine-monophosphate)
CSD	caveolin horgonyzó domén (caveolin-scaffolding domain)
DEPC	dietil-pirokarbonát (diethyl-pirocabonate)
DNS	dezozi-ribonukleinsav
eNOS	endothelialis nitrogén-monoxid-szintáz (endothelial nitric oxide synthase)
ENS	bélidegrendszer (enteric nervous system)
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
GFAP	gliasejt-eredetű neurotrofikus faktor (glial cell-derived neurotrophic factor)
GFAP	gliális fibrilláris savas protein (glial fibrillary acidic protein)
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etán-szulfonsav
HO	hemoxigenáz (hemoxigenase)
Hsp90	hőshok fehérje 90 (heat shock protein 90)
HuC/HuD	humán neuronális fehérje
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz (inducible nitric oxide synthase)
JAMs	sejtkapcsoló adhéziós molekulák (junctional adhesion molecules)
LDL	alacsony-denzitású lipoprotein (low-density lipoprotein)
MMP	mátrix metalloproteináz (matrix metalloproteinase)
MP	myentericus plexus
mRNS	messenger (hírvivő) ribonukleinsav
mtsai.	munkatársai
NADPH	redukált-nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate)

NADPH-d	redukált-nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz (reduced-nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate-diaphorase)
NANC	nem adrenerg, nem kolinerg (non-adrenergic, non-cholinergic)
NGF	idegi növekedési faktor (nerve growth factor)
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz (neuronal nitric oxide synthase)
NO	nitrogén-monoxid (nitric oxide)
NOS	nitrogén-monoxid szintáz (nitric-oxide synthase)
NPY	neuropeptid Y
NT-3	neurotrophin-3
PB	foszfát puffer (phosphate buffer)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PKC	protein kináz C
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén származékok (reactive oxygen species)
RT	reverz transzkripció
SDS	nátrium-dodecyl-szulfát (sodium-dodecyl-sulphate)
SDS-PA	nátrium-dodecyl-szulfát-poliakrilamid (sodium-dodecyl-sulphate-polyacrilamide)
SEM	szórás (standard error of mean)
STZ	streptozotocin
TBS	TRIS-pufferes sóoldat (TRIS buffered saline)
TBST	Tween-20-at tartalmazó TRIS-pufferes sóoldat (TRIS buffered saline with Tween-20)
TJk	szoros sejtkapcsolatok (tight junctions)
TNF- α	tumor nekrosis faktor-alfa
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)-propán-1,3-diol
VEGF	endothelialis növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
VIP	vazoaktív intesztinális polipeptid (vasoactive intestinal polipeptide)

Az idegen kifejezéseket az Orvosi Helyesírási Szótár (Akadémia Kiadó, Bp., 1992) szabályainak megfelelően alkalmaztam, az ún. vagylagos írású címszavak esetén általában a magyaros írásmódnak megfelelően.

I. BEVEZETÉS

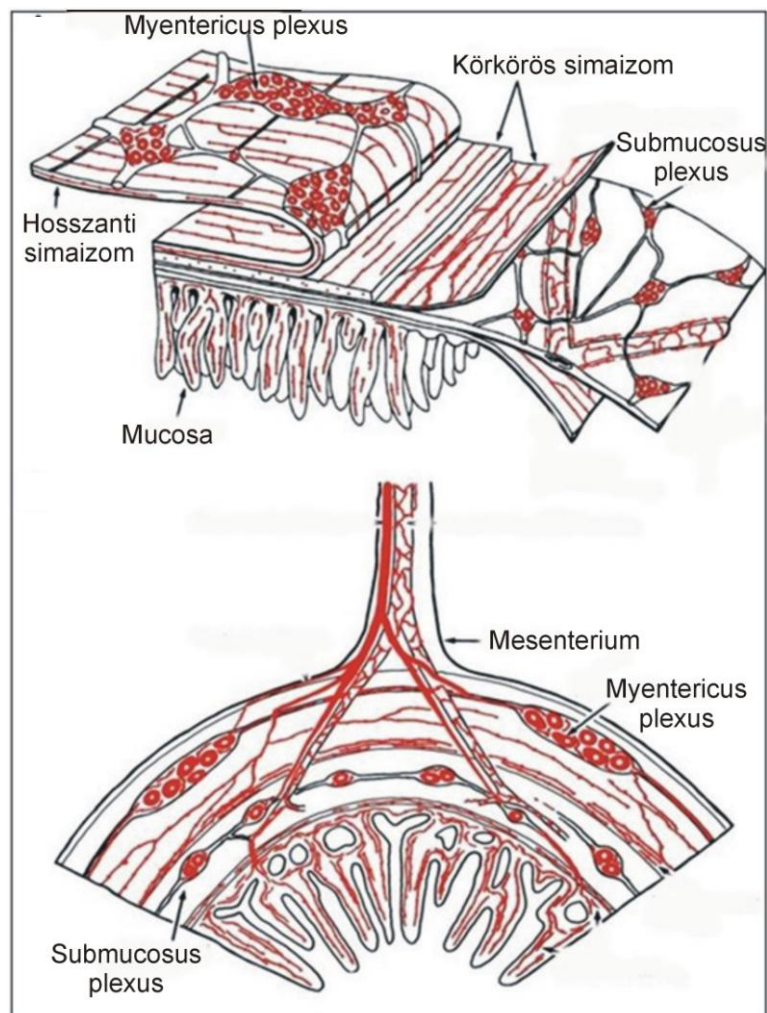
I. 1. A bélidegrendszer általános felépítése és működése

Az emlős bélcsatorna rendkívül sokféle feladatot lát el. Ezek közé tartozik a tápanyagok, az ionok és a víz felszívása, a béltartalom továbbítása, a szekréció, a patogénnel szembeni védelem, valamint a felesleges és káros anyagok eltávolítása is. A bélcsatorna különböző funkcióinak szabályozását, így az abszorpció, a szekréció és a motilitás összehangolását egy komplex idegi hálózat, a bélidegrendszer (ENS; enteric nervous system) végzi (Bush, 2002). Az ENS, melyet entericus neuronok és gliasejtek hálózata épít fel (Furness és Costa, 1987), a bélcsatorna teljes hosszában, a nyelőcsőtől a belső anális záróizomig húzódik a bélfalban, de megtalálható az epehólyag falában és a hasnyálmirigyben is (Furness, 2006; Di Nardo és mtsai., 2008).

Az ENS a szimpatikus és a paraszimpatikus idegrendszer mellett, az autonóm idegrendszer harmadik, s egyben legkomplexebb divíziója (Langley, 1921), neuronjainak száma a gerincvelőt felépítő idegsejtek számához hasonló (Costa és mtsai., 2000). Az ENS-t a központi idegrendszertől nagymértékben független működés jellemzi (Gershon és mtsai., 1994; Gershon, 1999). Az itt megvalósuló önálló szabályozást az ENS-ben található érző-, inter- és motorneuronok együttes előfordulása teszi lehetővé, melyek révén lokális reflexívek alakulnak ki a bél területén (Furness, 2000). Ezek a helyi reflexkörök irányítják a perisztaltikát, a bél nyálkahártyájának váladéktermelését, a víz- és ionszekréciót (Furness és Costa, 1987), a vérellátást (Vanner és Surprenant, 1996), a nyálkahártya hámsejtjeinek növekedését (Santos és Perdue, 2000; Holle és mtsai., 2003), valamint az epehólyag és a hasnyálmirigy működését is (Kirchgessner és Gershon, 1990). Ugyanakkor az ENS szoros strukturális és funkcionális kapcsolatban áll a központi idegrendszerrel és az autonóm ganglionokkal is (Tan és mtsai., 2009; Olsson és Holmgren, 2010; Ratcliffe, 2011). Az ENS-ben a központi idegrendszer klasszikus ingerületátvivő anyagai mellett számos peptid természetű szignálmolekula (NPY; neuropeptid Y, VIP; vazóaktív intesztinális polipeptid) és egyéb neurotranszmitter (NO; nitrogén-monoxid, ATP; adenosin-trifoszfát) is fontos szabályozó szerepet tölt be (Lomax és Furness, 2000; Hens és mtsai., 2001).

Az ENS-t felépítő neuronok és gliasejtek a dúlcéscsejtekből származnak, az egyedfejlődés korai szakaszában vándorolnak az emésztőszervrendszerbe (Newgreen és Young, 2002a,b; Anderson és mtsai., 2006), ahol idegfonatokat, plexusokat alkotnak. A

magasabb rendű gerincesek bélcsatornájában két nagy ganglionált és több kisebb, nem ganglionált plexust figyelhetünk meg (Meissner, 1857; Auerbach, 1864). A ganglionált plexus myentericus (Auerbach-plexus) és plexus submucosus (Meissner-plexus) területén a neuronok szabályos ganglionokba rendeződnek, az egyes ganglionokat pedig internodális szegmentek kötik össze (1. ábra). A myentericus plexus (MP) a bélfal külső hosszanti és belső körkörös izomrétege között helyezkedik el (1. ábra), elsődleges feladata a bélperisztaltika összehangolt működésének biztosítása. A körkörös izomréteg és a submucosa között található submucosus plexust kisebb ganglionok és rostok alkotják (1. ábra). Ez a plexus a bélfal mucosa és submucosa rétegét innerválja, s így a szekretomotoros működések szabályozásában játszik fontos szerepet (Costa és mtsai., 2000).



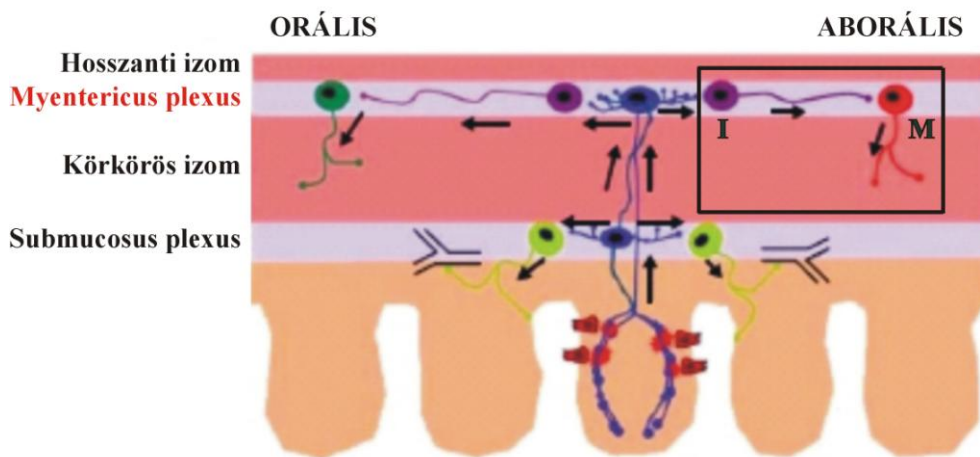
1. ábra A myentericus és a submucosus plexus elhelyezkedése a bélfal szöveti rétegei között (Furness, 2007, nyomán).

A plexusok felépítése, a ganglionok mérete, valamint a neuronok száma jelentős különbségeket mutathat attól függően, hogy milyen fajt, bélszakaszt vagy életkort vizsgálunk (Newgreen és Young, 2002a; Bódi és mtsai., 2009).

Az entericus neuronok funkciójukat, morfológiájukat és neurokémiai sajátságukat tekintve rendkívül sokfélék lehetnek (Costa és mtsai., 2000; Furness, 2000; Lomax és Furness, 2000; Furness, 2006; Qu és mtsai., 2008). Mivel munkánk során a diabétesszel összefüggő nitrerg myentericus neuropátia hátterét vizsgáltuk, ezért a következőkben csak a nitrerg rendszer irodalmáról adok részletesebb áttekintést.

I. 2. Nitrerg myentericus neuronok

Az ENS kontrakciót kiváltó, serkentő neuronjai, hasonlóan más izom-motorneuronokhoz, kolinergek. Azonban a bélben a gátló ingerületátvitel főleg az ún. nem adrenerg, nem kolinerg (NANC; non-adrenergic, non-cholinergic) transzmisszióval valósul meg (Bogers és mtsai., 1991; Bredt és Snyder, 1994; Mashimo és mtsai., 1996). Az ilyen NANC gátló neuronok elsősorban NO-ot és VIP-et szabadítanak fel (Furness, 2000). A nitrerg myentericus neuronok a perisztaltikus reflex leszálló fázisát szabályozzák, relaxálják a simaizmot (Furness, 2000). A nitrerg neuronok többsége Dogiel I-es morfológiát mutat: az ovális sejttestből több rövid, vastag dendrit és egy hosszú axon ered (Van Ginneken és mtsai., 1998; Jarvinen és mtsai., 1999). A nitrerg neuronpopuláció alapvetően kétféle sejtípust tartalmaz: leszálló gátló interneuront és gátló izom-motorneuront (2. ábra) (Furness, 2000; Brehmer és mtsai., 2006).



2. ábra A nitrerg myentericus neuronok szabályozzák a bélmotilitás leszálló gátlását. A nitrerg neuronpopuláció kétféle neuront tartalmaz: leszálló gátló interneuront (I) és gátló izom-motorneuront (M) (keret) (Lomax és mtsai., 2006, nyomán).

Irodalmi adatokból ismert, hogy a NO gátló neurotranszmitterként szabályozza a bél motilitását (Moncada és mtsai., 1991; Lefebvre, 1995). A NO szintézisét L-argininből a NO szintáz (NOS) enzim katalizálja, miközben citrullin is képződik. A NOS-nak három izoformája ismert: neuronális NOS (nNOS/NOS1), endothelialis NOS (eNOS/NOS3) és indukálható NOS (iNOS/NOS2). Ma már tudjuk, hogy az egyes izoformák előfordulása jóval szélesebb körű, mint amelyre a nevük utal. A hagyományosan konstitutívnak tartott nNOS és eNOS expressziójának szintje is befolyásolható bizonyos körülmények között, míg az iNOS is termelődik konstitutív módon bizonyos sejtekben (Michel és Feron, 1997). A nitrerg neuronok magas redukált-nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz (NADPH-d) aktivitással rendelkeznek (Thomas és Pearse, 1961), melynek mennyisége korrelál a nNOS mennyiségével, ezért gyakran NADPH-d enzimhisztokémiát használnak a nitrerg populáció jelölésére.

A NO különbözik a klasszikus transzmitterektől; nem raktározódik vezikulákban, és az idegingerület hatására nem kvantumokban szabadul fel. Gáz halmazállapota révén könnyedén kijut a sejtekből és bediffundál a célsejtekbe (Bredt, 1999), ahol nincs hagyományos értelemben vett receptora, hanem közvetlenül aktiválja a guanilát ciklázt, így elősegíti a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) szint növekedését, mely végül a simaizom relaxációját eredményezi (Bredt és Snyder, 1994). A NO általában nem önmagában, hanem más neuromodulátorokkal együtt fordul elő az idegsejtekben. Gyakran

kolokalizál a VIP-del (Furness, 2000; Brehmer és mtsai., 2004), mellyel kölcsönösen serkentik egymás felszabadulását (Allescher és mtsai., 1996). Mind a két molekula a bélperisztaltika leszálló gátlásának szabályozásában vesz részt (Keränen és mtsai., 1995), de a szabályozást eltérő mechanizmusokkal valósítják meg: míg a NO a cGMP szintet emeli, addig a VIP a ciklikus adenosin-monofoszfátot (cAMP) termelő adenilát ciklázt aktiválja.

A nitrerg rendszer kvantitatív tulajdonságait számos állatmodellben tanulmányozták már a különböző bélszakaszokban (Jarvinen és mtsai., 1999; Román és mtsai., 2004; Bódi és mtsai., 2009), az egyes életkorokban (Phillips és Powley, 2007), az egyedfejlődés (Timmermans és mtsai., 1994; Van Ginneken és mtsai., 1998; Román és mtsai., 2004), valamint a különböző patológiás állapotok (Spångéus és mtsai., 2000; Izbéki és mtsai., 2008) során. A myentericus neuronok nitrerg szubpopulációja különösen érintett a különböző emésztőcsatornát érintő betegségek során kialakuló neuropátiában, így a diabéteszben (Takahashi és mtsai., 1997; Celtek és mtsai., 1999; Celtek és mtsai., 2004; Izbéki és mtsai., 2008), a krónikus alkoholizmusban (Krecsmarik és mtsai., 2006; Bagyánszki és mtsai., 2010; 2011) és a gyulladásos betegségekben is (Lomax és mtsai., 2005).

I. 3. Diabéteszes nitrerg neuropátia

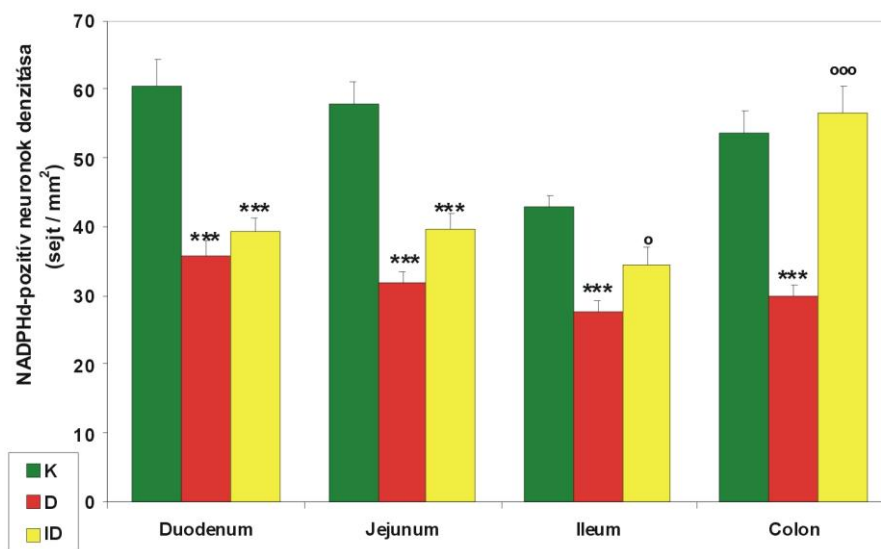
A diabéteszes gasztroenteropátia patomechanizmusa rendkívül összetett folyamat, melyhez nagymértékben hozzájárul az ENS sérülése. A különböző entericus neuronpopulációk különböző mértékben reagálnak a diabéteszes állapotra. Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a myentericus neuronok nitrerg szubpopulációja különösen érintett a diabétesz során kialakuló neuropátiában. A diabéteszes betegek több mint 75%-ánál gyakran jelentkeznek különböző gasztrointesztinális problémák, úgymint a dysphagia, reflux, korai jóllakottság, gastroparesis, vagyis a gyomor ürülésének késése, hányás, hasi fájdalom, székrekedés vagy hasmenés (Verne és Sninsky, 1998; Maleki és mtsai., 2000; Bytzer és mtsai., 2001; Chandrasekharan és Srinivasan, 2007; Tang és Friedenberg, 2011). Ezeknek a gasztrointesztinális tüneteknek a kialakulásához a nitrerg innerváció sérülése is hozzájárul (Watkins és mtsai., 2000; Yu és mtsai., 2000). Diabéteszes állatmodellben a nitrerg innerváció roncsolása szintén motilitási rendellenességekhez vezet (Martinez-Cuesta és mtsai., 1995).

A szakirodalom rendkívül sok ellentmondásos adattal szolgál arra nézve, hogy kísérletesen indukált diabéteszes modellekben milyen nitrerg neuronális változások játszódnak le a gyomor-bél traktus különböző szakaszaiban, illetve különböző fajokban. A gyomor (Takahashi és mtsai., 1997; Watkins és mtsai., 2000), a duodenum (Spångéus és mtsai., 2000), a colon (Yoneda és mtsai., 2001) és a humán jejunum (He és mtsai., 2001) MP-ában csökkent nNOS expressziót figyeltek meg, ezen kívül a NO-függő relaxáció is sérült a diabéteszes modellekben. Diabéteszes humán colonban a nitrerg neuronok fokozott apoptózist és a ganglionok méretének csökkenését figyelték meg (Chandrasekharan és mtsai., 2011). Az ileum területén azonban megnövekedett nNOS expressziót mutattak ki (Zanoni és mtsai., 2003). Más vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy diabéteszes patkány duodenumában (Adeghate és mtsai., 2003) és tengerimalac ileumában (LePard, 2005) a nitrerg neuronok száma nem változott. Zandecki és mtsai. (2008) spontán diabéteszes patkányok jejunumában szelektív nitrerg motoros diszfunkciót és csökkent nNOS fehérje expressziót igazoltak.

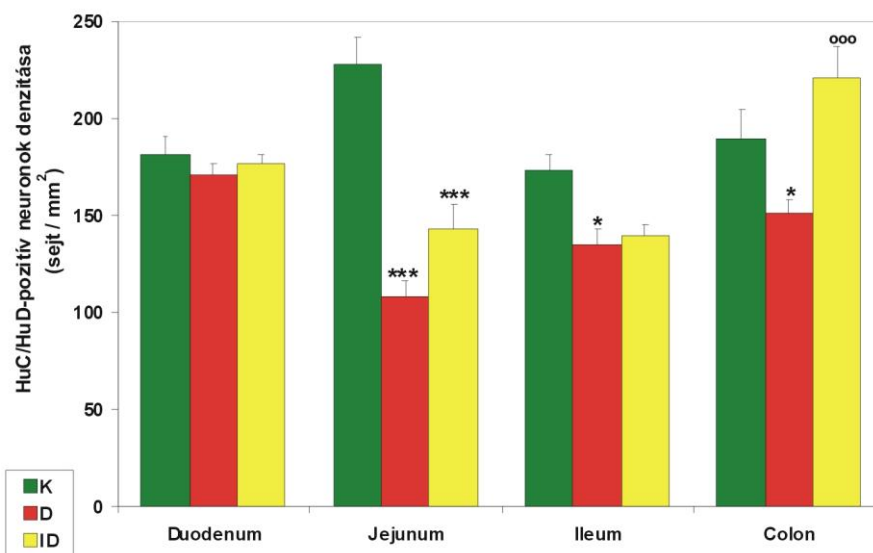
Cellek és mtsai. (2003) a nitrerg neuropátia kialakulását két fázisra bontják. A diabétesz első, korai szakaszában a degeneratív folyamatok hatására, valószínűleg az axonális transzport sérülése miatt a nitrerg neuronok axonjaiban csökken a nNOS expressziója, míg a sejtestekben a nNOS szintje változatlan marad. Ez a folyamat még reverzibilis, inzulin-kezelés hatására visszafordítható. A betegség előrehaladtával a nNOS mennyisége felhalmozódik a sejtestben, így fokozódik a NO termelés. Mindez együtt jár az előrehaladott glikációs végtermékek (AGEs; advanced glycation end-products) felhalmozódásával, ami fokozott oxidatív stresszt, majd a nitrerg neuronok pusztulását idézi elő. Ez a folyamat azonban már irreverzibilis (Cellek, 2004; Cellek és mtsai., 2004).

Kutatócsoportunk nemrégiben streptozotocin (STZ)-indukált diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban tanulmányozta a nitrerg myentericus neuronok kvantitatív tulajdonságait, valamint az azonnali inzulinpótlás hatásait (Izbéki és mtsai., 2008). A nitrerg sejteket NADPH-d hisztokémiai festéssel, míg a myentericus összneuronszámot HuC/HuD pan-neuronális markerrel jelöltük. A diabéteszes állatokban a duodenum volt az egyetlen bélszakasz, ahol az összneuronszám nem változott, miközben a NADPH-d-pozitív sejtek száma csökkent (3-4. ábra). A diabéteszes csoport ileumában, a jejunumban és a colonban mind a nitrerg, mind a myentericus összneuronszám szignifikánsan csökkent (3-4. ábra). Az azonnali inzulin-kezelés a duodenumban és a jejunumban nem akadályozta meg a diabétesz okozta nitrerg neuronszám-csökkenést, az ileumban és a colonban azonban hatásosnak bizonyult (3-4. ábra), ott a nitrerg sejtek száma megegyezett a kontroll

állatokban számoltakkal (Izbéki és mtsai., 2008). Kísérleteinkkel bizonyítottuk, hogy a bélcsatorna különböző szakaszaiban levő nitreg myentericus neuronok diabétesz hatására különböző mértékben sérülnek, illetve az azonnali inzulin-kezelésre adott válaszuk is bélszakasz-specifitást mutat (Izbéki és mtsai., 2008).



3. ábra NADPH-d-pozitív myentericus neuronok denzitása kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. *** $p < 0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), ° $p < 0,05$; °°° $p < 0,001$ (D és ID között) (Izbéki és mtsai., 2008, nyomán)



4. ábra HuC/HuD-immunreaktív myentericus neuronok denzitása kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), °°° $p < 0,001$ (D és ID között) (Izbéki és mtsai., 2008, nyomán)

A diabéteszes nitrerg neuropátia pontos mechanizmusa ma még tisztázatlan, azonban az előbb említett regionális különbségek felhívják a figyelmet a neuronális mikrokörnyezet fontosságára.

I. 4. Az entericus neuronok mikrokörnyezetének változásai diabéteszben

Az emésztőcsatorna falában, a simaizomsejtek és a neuronok között találjuk a Cajal-féle interstitialis sejteket, melyek pacemaker aktivitásuk révén spontán elektromos lassú hullámokat generálnak és szabályozzák az entericus neuronok jelátviteli folyamatait (Sanders, 1996; Thomsen és mtsai., 1998; Sanders és mtsai., 2000; Ward, 2000). A Cajal-féle interstitialis sejtek denzitása a diabéteszes patkányok gyomrában lecsökken, ami nagyban hozzájárul a gyomor ürülésének késéséhez, a diabéteszes gastroparesis kialakulásához (Ordog és mtsai., 2000; Wang és mtsai., 2009).

Az ENS legnagyobb mennyiségben előforduló nem neuronális sejtjei az enterogliasejtek, melyek meghatározó szerepet játszanak a bélcsatorna szöveti integritásának fenntartásában (Liu és mtsai., 2010; Pereira és mtsai., 2011) és a ganglionok közelében futó kapillárisok körüli diffúziós gát kialakításában is (Rühl, 2005; 2006; Nezami és Srinivasan, 2010). Ezek a gliasejtek morfológiailag és funkcionálisan a központi idegrendszer astrocytáival mutatnak hasonlóságokat (Gabella, 1972; 1987; Ibba-Manneschi és mtsai., 1995; Costa és mtsai., 2000). Az enterogliasejtek rendkívül fontosak a neuronok megfelelő mikrokörnyezetének kialakításában és fenntartásában, az általuk termelt neurotrofikus faktorok nélkülözhetetlenek az entericus neuronok életben maradásához (Liu és mtsai., 2010). A gliális fibrilláris savas protein (GFAP) és számos neurotrofikus faktor (GDNF, gliasejt-eredetű neurotrofikus faktor; NT-3, neurotrophin-3; NGF, idegi növekedési faktor) expressziója csökken a diabéteszes patkányok colonjában (Du és mtsai., 2009; Liu és mtsai., 2010) és jejunumában (Honoré és mtsai., 2011), ami hozzájárul az entericus neuropátia kialakulásához. Anitha és mtsai. (2006) megfigyelték, hogy a diabéteszes állatokban GDNF hatására az entericus neuronok apoptózisa csökken.

A neuronok túlélése és működése csak optimális oxidatív körülmények mellett valósulhat meg. A diabéteszes állapotra jellemző magas vércukorszint kritikus az oxidatív stressz kialakulásában. A glükóz auto-oxidációja és az AGEs képződésének fokozódása elősegíti a reaktív oxigén fajták (ROS) és a reaktív nitrogén fajták képződését (Bonfont-Rousselot, 2002), és csökkenti az endogén antioxidánsok (pl. glutation) mennyiségét

(Pereira és mtsai., 2008), így kulcsszerepe van a diabéteszes szövődmények kialakulásában (Figuerola-Romero és mtsai., 2008). Az AGEs felhalmozódása diabéteszes patkány myentericus neuronjaiban a nNOS expressziót (Korenaga és mtsai., 2006), míg endothelsejtekben az eNOS expresszióját csökkenti (Guo és mtsai., 2002; Xu és mtsai., 2003). Ezen kívül az oxidatív stressz olyan mechanizmusokat is aktivál, melyek gliasejtek által közvetített gyulladást váltanak ki, ami tovább növeli a neuronális és vaszkuláris károsodás mértékét. Ezért az endogén antioxidánsok pótlása elengedhetetlen a diabétesz terápiás kezelésében (Shirpoor és mtsai., 2007; Pereira és mtsai., 2008; 2011; da Silva és mtsai., 2011). Az antioxidáns rendszer fontos tagjai a hemoxigenázok (HO) (Kashyap és Farrugia, 2011). Diabéteszes patkányok ileumában azok az entericus nitrerg neuronok, amelyek HO-2-t is tartalmaztak, az oxidatív stressz hatására nem károsodtak (Shotton és Lincoln, 2006). A HO-1 indukciója diabéteszes egerekben csökkentette a ROS mennyiségét, helyreállította a nNOS expresszióját és normalizálta a gyomor ürülését. Ugyanakkor egészséges egerekben a HO-1 aktivitás gátlása gastroparesis kialakulását eredményezte (Choi és mtsai., 2008).

Az enterális ganglionok az autonóm ganglionokkal ellentétben nem tartalmaznak véredényeket, ezért a plexus közelében futó mesenterialis kapillárisok rendkívül fontosak lehetnek az entericus neuronok tápanyag- és oxigénellátásában, így a neuronok mikrokörnyezetének kialakításában. Ezért a ganglionok mellett futó erek endotheliumának működészavara potenciális alapja lehet az entericus neuropátia kialakulásának.

I. 5. Diabéteszes érrendszeri szövődmények

A diabetes mellitus a metabolikus betegségek közé tartozik, tartósan magas vércukorszint jellemzi. A hyperglykaemia eredhet az inzulin szekréció teljes hiányából (1-es típusú diabétesz) és/vagy a szervezet inzulinnal szembeni érzéketlenségéből (2-es típusú diabétesz) (American Diabetes Association, 2008). Kísérletes körülmények között széles körben alkalmazzák a STZ-t a diabétesz kiváltására. A STZ olyan diabetogén ágens, mely citotoxikus hatást fejt ki a hasnyálmirigy inzulint termelő β -sejtjeire. A STZ glükóz transzporterén keresztül képes bejutni ezekbe a sejtekbe, ahol DNS károsodást és ROS generálását idézi elő, ezáltal a β -sejtek pusztulását okozza (Szkudelski, 2001). Így a STZ-nal kezelt patkányok alkalmas modellállatok az inzulinhiányos, 1-es típusú diabetes mellitus tanulmányozásához.

A diabéteszes állapot hosszútávú fennállása következtében olyan krónikus szövődmények alakulnak ki, melyek szinte minden szervet, szervrendszert érintenek. A perifériás neuropátia következtében gyakran észrevétlen sérülések diabéteszes fekélyes láb kialakulását okozhatják. Az autonóm neuropátia számos gasztrointesztinális (Chandrasekharan és Srinivasan, 2007) és kardiovaszkuláris (Pfeifer és Schumer, 1994) tünet megjelenéséért felelős. A retinopátia akár teljes látásvesztéssel, a nephropátia pedig veseelégtelenséggel is járhat. A diabéteszes betegeknél a perifériás artériákat és az agyi ereket érintő megbetegedések fokozottan előfordulnak (American Diabetes Association, 2008).

A diabéteszes makroangiopátia a közepes és a nagy átmérőjű erek, elsősorban a szív koszorúerek, az agyi erek és a végtagok artériáinak patofiziológiás károsodását jelenti (Bortolotto, 2007; Gärtner és Eigentler, 2008); nagyfokú érlemezsedés, atherosclerotikus plakkok lerakódásai jellemzik. Kialakulásának kockázatát a magas vércukorszint mellett a vérzsírok eltérései és a magas vérnyomás is fokozza. A mikroangiopátia a kisebb artériák és kapillárisok strukturális, molekuláris és funkcionális sérülését jelenti, mely érintheti a szemben, a vesékben, a tüdőben vagy a bélfalban futó véredényeket (5. ábra) is (Barnett, 1991; De Las Casas és Finley, 1999; Roy és mtsai., 2003; Fioretto és Mauer, 2007). A vércukorszint szigorú kontrollja ugyan csökkenti a különböző keringési szövődmények kialakulását (Hill és Fischer, 2010), a kardiovaszkuláris események bekövetkezése azonban még mindig a diabéteszes halálozások legfőbb kockázati tényezője (Wong és mtsai., 2010; Onat, 2011; Okamoto és mtsai., 2011; Yamagishi, 2011).

A diabétesz mellett számos más anyagcserebetegség vagy kóros folyamat patomechanizmusában is jól ismert az endothelsejtek strukturális és funkcionális sérülése. Ilyenek például a kóros kövérség, a magas vérnyomás, a magas vér-zsír szint, a dohányzás és az öregedés is (Cai és Harrison, 2000; Gimbrone és mtsai., 2000). Mivel a kardio- és cerebrovaszkuláris homeosztázisban meghatározó szerepet játszó eNOS jelenti a keringési rendszerben a NO elsődleges fiziológiai forrását, ezért az endothelium szabályozó funkciójának sérülése kiindulópontja lehet a különböző érrendszeri betegségeknek. Az endothelsejtek kóros működését már jóval a klinikai tünetek megjelenése előtt jelzi a biológiailag rendelkezésre álló NO mennyiségének csökkenése (Sessa, 2005). A csökkent NO-szint következtében sérül a vazodilatáció és ischaemia alakul ki, ami később a diabéteszes neuropátiák kialakulásához vezet (De Vriese és mtsai., 2000; Rask-Madsen és King, 2007; Simionescu és mtsai., 2009).

A különböző szövetek érzékenysége a diabétesz káros hatásaival szemben eltérő lehet, ami szorosan összefügg a szövetet ellátó erek anatómiai helyzetével (Mompeo és mtsai., 1998). A nagyszámú klinikai előfordulás miatt a kapilláris endothelium diabétesz- okozta változásait sokan vizsgálták már a retinában (Barnett, 1991; Ljubimov és mtsai., 1996; Roy és mtsai., 2003; Lee és mtsai., 2010), a vese glomerulusaiban (Fioretto és Mauer, 2007; Zhu és mtsai., 2009) és a tüdő kapillárisaiban (Pascariu és mtsai., 2004). A diabétesz hatását a bélfal kapillárisainak endotheliumában azonban csak kevesen tanulmányozták (De Las Casas és Finley, 1999; Arshi és mtsai., 2000).



5. ábra A bélfalat ellátó mesenterialis erek reprezentatív makroszkópos képe.

I. 5. 1. Az endothelialis bazális membrán változásai diabétiszben

A bazális membrán (BM) bonyolult és magasan szervezett extracelluláris mátrix, mely sokféle sejttípussal, mint például epithel-, endothel-, izom-, ideg- vagy zsírsejttel egyaránt érintkezik. Az ereket körülvevő BM filtrációs gátként működik, fontos a transzendothelialis transzport és a kapilláris permeabilitás szabályozásában, mechanikai támaszt és stabilitást biztosít. Fő alkotói olyan extracelluláris mátrix komponensek, mint a IV-es típusú kollagén, a glikoproteinek közé tartozó laminin fehérjecsald, a proteoglikánok vagy a nidogének (Paulsson, 1992). Diabétiszben a kapilláris endothelium sérülésének az első morfológiai jele a BM megvastagodása (Williamson és Kilo, 1976; Martinez-Hernandez és Amenta, 1983).

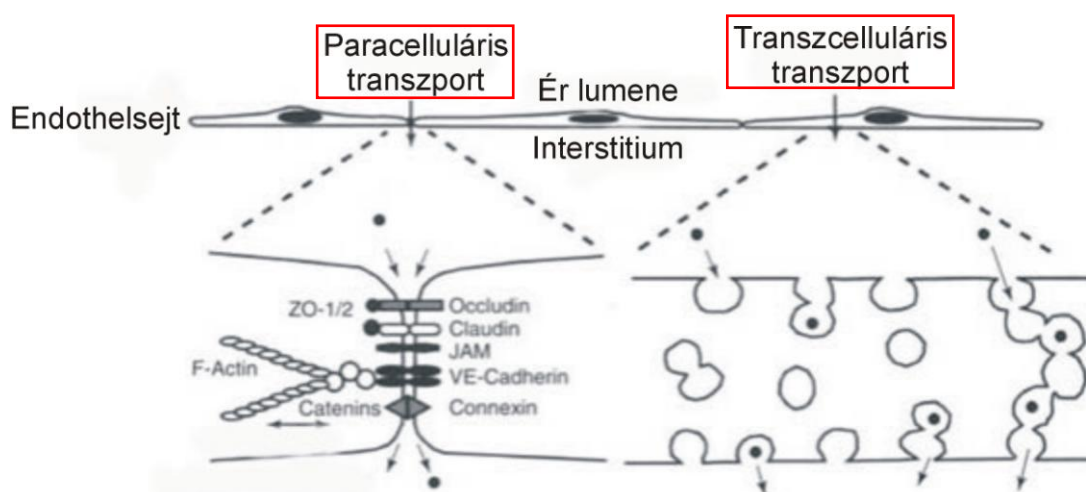
Diabétiszben a tüdő alveoláris epitheliumát és a veseglomerulusok kapilláris endotheliumát körülvevő BM megvastagodott (Weynand és mtsai., 1999). Lee és mtsai. (2010) diabétiszben a sertések retinájában, Pascariu és mtsai. (2004) pedig tüdőben mutatták ki az ereket körülvevő BM vastagodását.

Az endothelialis BM vastagodásának pontos mechanizmusa még nem ismert, azonban a folyamat kiváltásában kulcsszerepet tulajdonítanak a hyperglykaemiának (Williamson és Kilo, 1976). A BM-t felépítő extracelluláris mátrix komponensek fokozott szintézise hozzájárul a BM megvastagodásához (Roy és mtsai., 1994; 1996; Ljubimov és mtsai., 1996), mely a kapillárisok permeabilitására is hatással van (Weynand és mtsai., 1999; Tsai és mtsai., 2002). Több kutatócsoport is megfigyelte, hogy diabétiszben állapotban a mátrix komponenseket összekapcsoló fibronectin szintézise fokozódik (Roy és mtsai., 1996; Ljubimov és mtsai., 1996), ami hozzájárul a kapillárisok permeabilitásának növekedéséhez (Tsai és mtsai., 2002). A fibronectin szintézis gátlása csökkentette az ereket körülvevő BM vastagságát a retinában (Roy és mtsai., 2003). Diabétiszben a patkányok retinájában a fokozott endothelin szintézis (Chakrabarti és Sima, 1997; Chakrabarti és mtsai., 1998) még tovább növelte a mátrix komponensek expresszióját (Nakamura és mtsai., 1995; Evans és mtsai., 2000).

I. 5. 2. A diabétesz hatása a kapilláris endothelium permeabilitására

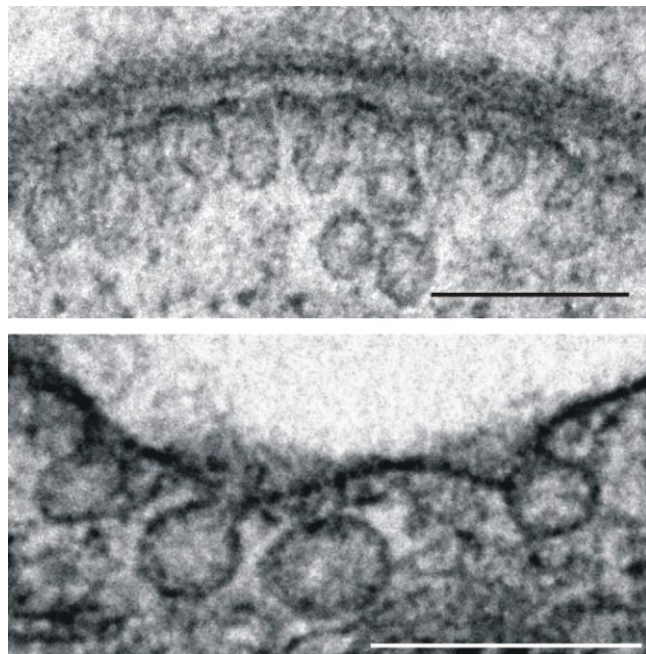
A paracelluláris és a transzendothelialis transzport változásai

A bélfal kapillárisainak endotheliума egy félig áteresztő, folytonos gátként biztosítja a különböző anyagok gyors és kétirányú kicserélődését a vér és a környező szövetek között (Simionescu, 1983), ezáltal nélkülözhetetlen a keringési rendszer homeosztázisának fenntartásához. Az endothelsejtek két különböző mechanizmussal vesznek részt az erek permeabilitásának szabályozásában. A paracelluláris transzport során az ionok és egyéb tápanyagok mozgása az endothelsejtek közötti szoros sejtkapcsolatokon (TJk; tight junctions) keresztül valósul meg (6. ábra) (Majno és Palade, 1961; Simon és mtsai., 1999; Durán és mtsai., 2011). A makromolekulák transzportja pedig elsősorban az endothelsejteken keresztül, transzcitózissal történik (Minshall és mtsai., 2002; Simionescu és mtsai., 2002; Mehta és Malik, 2006; Frank és mtsai., 2009). A transzcitózis során a különböző molekulák caveolákba csomagolódva szállítódnak az endothelsejtek apikális részéről a bazolaterális felszínre, ahol azután exocitózissal felszabadulnak, kiürülnek a sejtből (6. ábra) (Palade és Bruns, 1968; Predescu és Palade, 1993; Tuma és Hubbard, 2003; Durán és mtsai., 2011). A caveolák által közvetített transzcitózis rendkívül gyors, szelektív és szigorúan szabályozott folyamat, mely során a caveolák másodpercek alatt szállítják át a tartalmukat az endothelsejten keresztül még koncentráció-grádiens ellenében is (Oh és mtsai., 2007).



6. ábra A paracelluláris transzport és a caveolák által közvetített transzcitózis folyamata a kapilláris endotheliumban (Durán és mtsai., 2011, nyomán)

A caveolák a plazmamembránról lefüződő 50-100 nm átmérőjű, sima-felszínű vezikulák (Palade, 1953; Yamada, 1955), koleszterinben és glikoszféngolipidekben gazdag membrán mikrodomének, melyek nagy mennyiségben találhatók az endothelsejtekben, a simaizomsejtekben, a zsírsejtekben és a fibroblasztokban is. Az endothelialis caveolák többsége (~65%) a plazmamembrán apikális (luminális) vagy a bazolaterális (abluminális) felszínén lokalizálódik, ahol jellegzetes omega (Ω)-alakjáról könnyedén felismerhető, kisebb mennyiségben (~35%) pedig a citoplazmában találhatók (7. ábra) (Noguchi és mtsai., 1986; Porter és Bankston, 1987). Az endothelialis vezikulák denzitása a különböző szövetekben eltérő lehet (Simionescu, 1983).

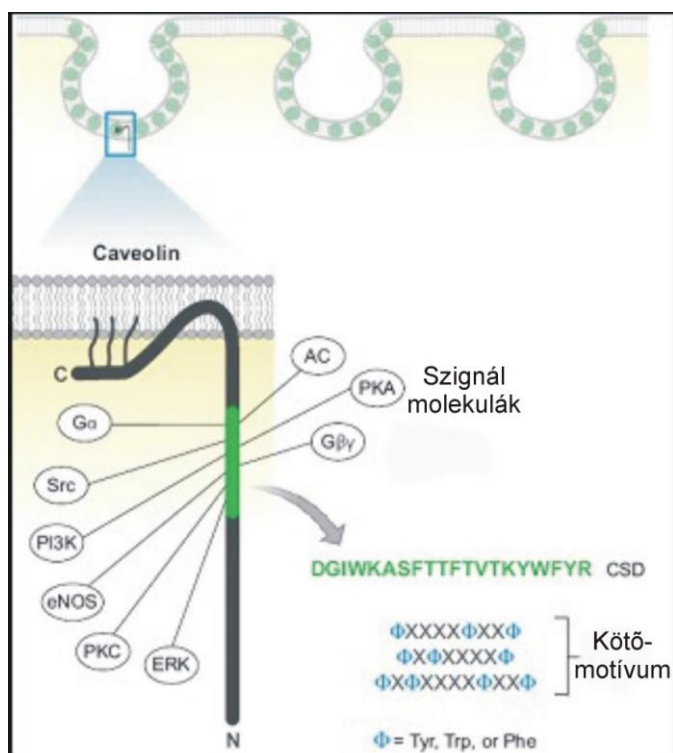


7. ábra Endothelialis caveolák transzmissziós elektronmikroszkópos képe patkány bél mesenterialis kapillárisainak endothelsejtjeiben (saját felvétel). Lépték: 200 nm.

A caveolák nélkülözhetetlen struktúrfehérjéi a caveolinok (20-22 kDa) (Rothberg és mtsai., 1992), melyeknek emlősökben három izoformájuk ismert: a caveolin-1 (Cav-1) és -2 főként az endothelsejtekben (Scherer és mtsai., 1996; Fujimoto és mtsai., 2000), adipocitákban és fibroblasztokban expresszálódik, míg a caveolin-3 az izomra jellemző izoforma.

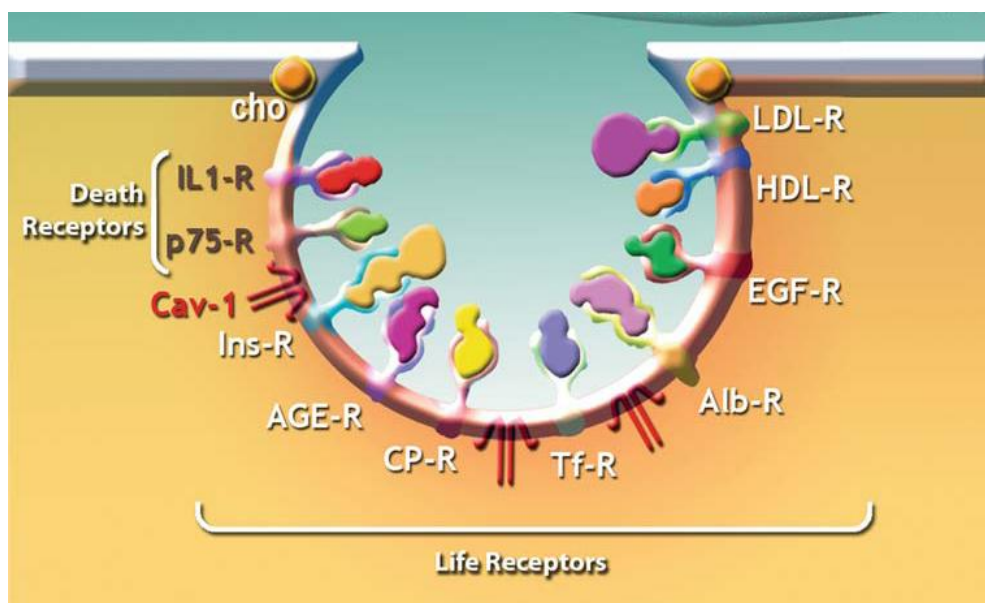
Sejtkultúrákban a Cav-1 túltermelés hatására a caveolák mennyisége is növekedett, vagyis a caveolák száma függ a Cav-1 expresszió mértékétől (Scherer és mtsai., 1994). Pascariu és mtsai. (2004) diabéteszes patkányok tüdő kapillárisaiban is megfigyelték, hogy a Cav-1 túltermelésének hatására megnövekedett a caveolák száma és mérete.

A Cav-1 integráns membránfehérjeként nélkülözhetetlen komponense a caveoláknak (8. ábra) (Frank és mtsai., 2002), azonban kis mennyiségben (~25%) a citoszolban szolubilis formában is előfordul, ahol koleszterinnel alkot komplexet (Smart és mtsai., 1996; Predescu és mtsai., 2001). Mindezek mellett a Cav-1 rendelkezik egy ún. caveolin horgonyzó doménnel (CSD; caveolin-scaffolding domain), mely révén számos fehérjével és szignálmolekulával képes direkt kölcsönhatásba lépni (Gratton és mtsai., 2004; Patel és mtsai., 2008), ezáltal pedig különböző szignáltranszdukciós folyamatokat szabályozni (8. ábra). A Cav-1 többek között fontos az eNOS aktivitásának szabályozásában (Garcia-Cardena és mtsai., 1997; Michel és mtsai., 1997a,b), a Ca^{2+} szignalizáció szabályozásában (Wang és mtsai., 2005; Kwiatek és mtsai., 2006), a sejtproliferációban (Razani és mtsai., 2001), valamint az endothelsejtek migrációjában is (Beardsly és mtsai., 2005).



8. ábra A caveolin-1 lokalizációja és kölcsönható partnerei (Patel és mtsai., 2008, nyomán).

A caveolák sokféle receptort hordoznak a felszínükön (Simionescu és mtsai., 2002), ezáltal fontos szerepet játszanak többek között az albumin (Ghitescu és mtsai., 1986), a vas-transzferrin (Soda és Tavassoli, 1984), az inzulin (King és Johnson, 1985; Sessa, 2005) és az alacsony-denzitású lipoproteinek (LDL; low-density lipoprotein) (Ghitescu és mtsai., 1986) receptor-közvetített transzcitózisában (9. ábra).



9. ábra A caveolák szerepe a receptor-közvetített transzcitózisban. A caveolák a felszínükön hordozzák az alacsony-denzitású lipoprotein (LDL-R), a magas-denzitású lipoprotein (HDL-R), az epidermális növekedési faktor (EGF-R), az albumin (Alb-R), a transferrin (Tf-R), a ceruloplasmin (CP-R), az előrehaladott glikációs végtermékek (AGE-R), az inzulin (Ins-R), valamint az apoptotikus folyamatokban fontos interleukin-1 (IL-1) és p75 (p75-R) receptorait (cho-koleszterin) (Simionescu és mtsai., 2002, nyomán).

Az albumin az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje a vérplazmában, amely segíti a szabad zsírsavak, szteroidok, pajzsmirigy hormonok, ionok és számos gyógyszermolekula szállítását. Az albumin az endothelsejtek apikális felszínén levő gp60 (60 kDa glikoprotein) receptorhoz kötődik, caveolába csomagolódik és közvetlen kölcsönhatásba lép a Cav-1-gyel (Minshall és mtsai., 2000; Vogel és mtsai., 2001; Mehta és Malik, 2006). A folyamat tirozin-kináz-függő; az albumin transzcitózisa az Src protein tirozin-kinázok szigorú szabályozása alatt áll (Tiruppathi és mtsai., 1997; Hu és Minshall, 2009).

Cav-1 (-/-) knock-out egerekben, melyekben nincsenek endothelialis caveolák, az endothelsejtek nem képesek a szérumban albumin felvételére és transzcitózisra (Schubert és mtsai., 2001). Ezeknek az egereknek a tüdő kapillárisaiban az albumin paracelluláris transzportja fokozódott (Schubert és mtsai., 2002). Pascariu és mtsai. (2004) kimutatták, hogy diabéteszes állatokban az alveoláris endothelsejtek által felvett és az interstitiumba transzportált albumin mennyisége megnőtt. Megállapították, hogy a kapillárisok hiperpermeabilitását az endothelsejten átvezető vezikuláris transzport fokozódása, nem pedig az endothelsejtek közti sejtkapcsoló struktúrák sérülése okozta.

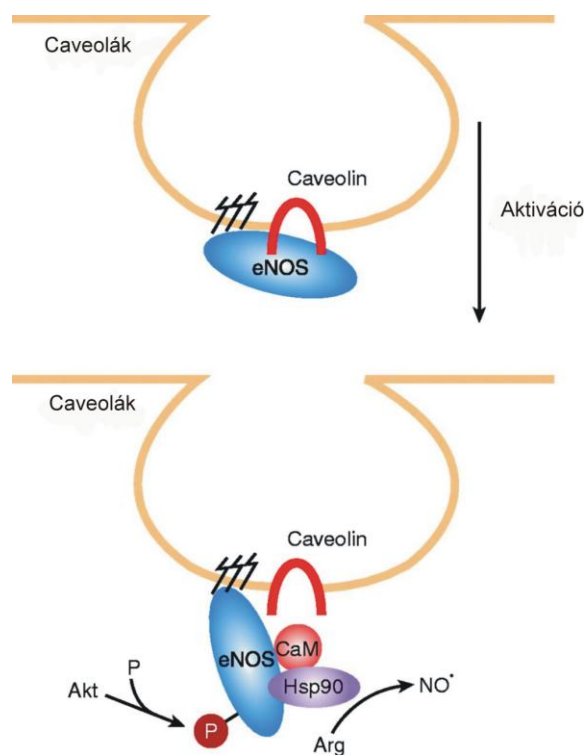
A különböző módosított proteinek, mint az irreverzibilisen glikált albumin (AGEs-ALB) vagy a módosított LDL szállítása szintén caveolákon keresztül valósul meg (Esposito és mtsai., 1989; Kim és mtsai., 1994). Diabéteszes állapotban fokozódik az AGEs-ALB transzcitózisa, az AGEs az extracelluláris mátrix molekulákhoz kapcsolódnak, ami azután az érfal súlyos károsodását okozza (Popov és mtsai., 1997).

A NO kritikus szerepet játszik a vaszkuláris homeosztázis szabályozásában. Az érfal simaizomzatának relaxációja mellett, gátolja a simaizom proliferációját, csökkenti a vérlemezke aggregációt, az adhéziónak molekulák expresszióját és gátolja a lipid peroxidációt (Searles, 2006). Mindezen tulajdonságai meglehetősen fontosak az atherosclerosis elleni védelemben. A NO mennyiségében bekövetkező kis mértékű változás is komoly hatással lehet az értónusra. Ezért a NO szintézise rendkívül összetett és szigorú transzkripciós és poszttranszkripciós szabályozás alatt áll (Searles, 2006).

Az eNOS-függő NO termelés funkcionálisan kapcsolódik a caveola internalizációhoz. Az eNOS aktivitása nagymértékben függ az enzim intracelluláris lokalizációjától (Shaul, 2002). Az eNOS legfontosabb endogén gátló molekulája a Cav-1, amely CSD-jével közvetlenül képes kötődni az enzimhez, így az eNOS katalitikusan inaktív állapotba kerül a caveolán belül (8., 10. ábra) (Feron és mtsai., 1996; Garcia-Cardena és mtsai., 1996; 1997; Ju és mtsai., 1997; Michel és mtsai., 1997a,b; Razani és mtsai., 2001; 2002; Li és mtsai., 2006).

Michel és mtsai. (1997b) szerint a Cav túlermelődés hatására az eNOS aktivitása csökken, ennek eredményeként pedig csökken az eNOS-függő NO termelődése is (Garcia-Cardena és mtsai., 1997; Bucci és mtsai., 2000). Kívülről adott calmodulin hatására a Cav-eNOS komplex szétbomlik, az eNOS ledisszociál a Cav-ról és újra aktív állapotba kerül (10. ábra). Mindez az eNOS aktivitásának reciprok szabályozását feltételezi: a calmodulin aktiváló, míg a Cav gátló hatású regulátorként viselkedik (Michel és mtsai., 1997a). Az eNOS másik fontos molekuláris kölcsönható partnere a Hsp90 hősokk fehérje (10. ábra)

(Richter és Buchner, 2001). Garcia-Cardena és mtsai. (1998) megfigyelték, hogy endothelsejtekben az endothelialis növekedési faktor (VEGF; vascular endothelial growth factor) és a hisztamin hatására a Hsp90 dajkafehérje gyorsan kötődik az eNOS-hoz és fokozza az enzim aktivitását.

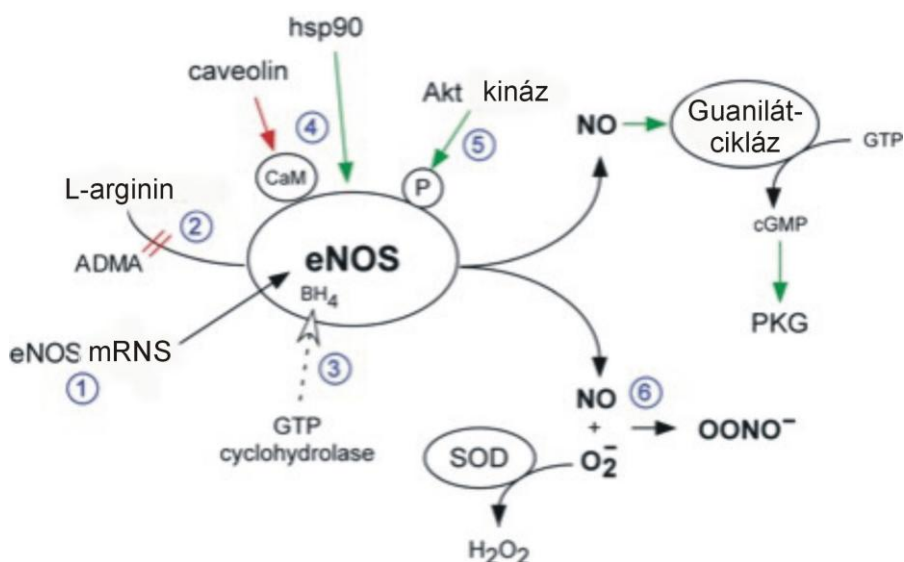


10. ábra Az eNOS aktivitásának reciprok szabályozása. A caveolin kötődése gátolja, a calmodulin (CaM) és a Hsp90 fokozza az eNOS aktivitását (Bredt, 2003, nyomán).

Ahhoz, hogy az eNOS fiziológiásan optimális mennyiségű NO-t termeljen a különböző fehérje-fehérje kölcsönhatások (Kone, 2000) mellett az enzim poszttranszlációs módosításai és számos kofaktor is szükséges (Govers és Rabelink, 2001; Michel és Vanhoutte, 2010). Ilyen poszttranszlációs módosulás az eNOS foszforilációja (Fulton és mtsai., 1999) vagy az enzim homodimerizációja (Hellermann és Solomonson, 1997), melyek nélkülözhetetlenek az enzim aktivitásához. Ha ez a dimerizációs folyamat félbeszakad (Gimbrone, 1989), vagy ha lecsökken a foszforilált eNOS mennyisége, csökken az eNOS aktivitása is. Ez pedig a biológiailag rendelkezésre álló NO mennyiségének csökkenéséhez vezethet (Fulton és mtsai., 2001).

Az endothelium funkcionális zavarához számos más mechanizmus is hozzájárulhat (11. ábra). Csökkenhet az eNOS mRNS vagy protein expressziós szintje (Wang és Marsden, 1995), az L-arginin szöveti szintje (Bode-Boger és mtsai., 1996; Cooke, 2000) vagy az eNOS ko-faktorainak (pl. FAD, NADPH, BH₄) mennyisége is. Ha a tetrahidrobiopterin (BH₄) mennyisége nem elegendő, akkor az eNOS NO helyett szuperoxid-aniont generál (Cosentino és mtsai., 1998). A szuperoxid-anion gyorsan inaktiválja a NO-ot, s így igen erős oxidáns hatású szabadgyök, peroxinitrit (ONOO⁻) képződik, mely károsítja a környező szöveteket (Beckman és Koppenol, 1996). A peroxinitrit egyrészt oxidálhatja a BH₄-t (Cai és Harrison, 2000), másrészt képes szétszakítani az eNOS dimert, így az eNOS oxidáz és reduktáz doménje szétkapcsolódik, és NO helyett egy újabb szabadgyököt, szuperoxidot fog szintetizálni (Laursen és mtsai., 2001; Zou és mtsai., 2004). A BH₄ mennyiségének csökkenése, az eNOS dimerek szétkapcsolódása és a fokozott ROS képződése mind hozzájárul az endothelium sérüléséhez diabéteszben (11. ábra) (Bauersachs és Schäfer, 2005; Moens és Kass, 2006).

Vagyis az eNOS által termelt NO mellett, hogy a kardiovaszkuláris homeosztázis fontos eleme, forrása lehet a különböző ROS képződésének is (Rask-Madsen és King, 2007).



11. ábra Az eNOS aktivitásának szabályozása és az endothelialis diszfunkció hátterében álló lehetséges mechanizmusok. Az eNOS mRNS expressziójának változása, a szubsztát és a kofaktorok mennyiségének csökkenése, a helytelen szubcelluláris lokalizáció, az abnormális foszforiláció és a ROS fokozott képződése mind hozzájárulhat az endothelium sérüléséhez (Liu és Huang, 2008, nyomán).

Több kutatócsoport is megfigyelte, hogy Cav-1 (-/-) knock-out egerekben az eNOS expresszió és az eNOS-eredetű NO termelése fokozódott; a caveola-mediált transzcitózis hiányát pedig a paracelluláris transzport növekedése kompenzálta (Razani és mtsai., 2001; Schubert és mtsai., 2002; Predescu és mtsai., 2004).

Az endothelsejtek közötti TJk méret- és ion-szelektív gátként szabályozzák az endothelium permeabilitását, fontosak a sejtek polaritásának és a szövet integritásának fenntartásában (Cereijido, 1992). A TJk az epithelsejtek laterális felszínének legapikálisabb részén helyezkednek el. A TJk legfontosabb strukturális és funkcionális komponensei az occludinok (Furuse és mtsai., 1993), a claudinok (Furuse és mtsai., 1998) és a sejtkapcsoló adhézis molekulák (JAMs; junctional adhesion molecules) (Palmeri és mtsai., 2000). Ezekhez az integráns membránproteinekhez pedig további perifériás fehérjék (ZO-1, -2, -3, cingulin) kötődnek.

Diabéteszes állatmodellekben a vér-szövet gát sérülése és az endothelium áteresztőképességének növekedése a fokozott paracelluláris szivárgásból is adódhat. A különböző gyulladásos mediátorok, mint a hisztamin, a trombin, az VEGF vagy az aktivált neutrofilok az endothelsejtek közötti sejtkapcsolatok disszociációját okozhatják, ezáltal nő a szomszédos endothelsejtek közti rés szélessége és nő a permeabilitás is (Kumar és mtsai., 2009). A paracelluláris permeabilitás gyulladás által kiváltott fokozódása a sejtkapcsoló struktúrák fehérjéinek foszforilációján, internalizációján vagy degradációján keresztül valósul meg (Esser és mtsai., 1998; Mehta és Malik, 2006; Guo és mtsai., 2008). Számos kutatócsoport megfigyelte, hogy diabéteszes állatok retinájában az endothelsejtek közti TJk fehérjéinek celluláris lokalizációja megváltozott és expressziójuk is lecsökkent (Antonetti és mtsai., 1999; Avelaira és mtsai., 2010; Leal és mtsai., 2010). Az eNOS-eredetű NO fokozott felszabadulása (Bucci és mtsai., 2005; Predescu és mtsai., 2005), az intracelluláris Ca^{2+} -stressz és a ROS felhalmozódása (Gilmont és mtsai., 1998) szintén károsítja a sejtek közötti junkciókat és növeli a paracelluláris áteresztőképességet.

A szakirodalom rendkívül széles körben foglalkozik a diabéteszt kísérő vaszkuláris szövődmények kialakulásával, melyeknek hátterében az endothelsejtek működészavara áll. Az endothelium sérülésének gyakori velejárói az endothelialis BM-t érintő abnormalitások és a kapillárisok permeabilitásának fokozódása. Azonban az irodalmi adatok alapján a különböző szervek érintettsége a diabétesszel összefüggő változásokban eltérő lehet, valamint az endothelium strukturális és molekuláris változásainak hátterében álló mechanizmusok sem teljesen tisztázottak.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt két évtizedben nagyon sok eredmény született a diabétesszel összefüggő nitrerg myentericus neuropátia vizsgálata során, a folyamat hátterében álló mechanizmusok azonban ma sem teljesen tisztázottak. Nemrégiben bizonyítottuk, hogy diabétesz hatására a bélcsatorna különböző szakaszaiban levő nitrerg neuronok különböző mértékben sérülnek, valamint az azonnali inzulin-kezelésre adott válaszuk is bélszakasz-specifitást mutat (Izbéki és mtsai., 2008). Feltételezésünk szerint ezek a regionális különbségek a különböző bélszakaszokban levő neuronok eltérő mikrokörnyezetéből adódhatnak. Mivel a myentericus ganglionok nem vaszkularizáltak, ezért feltételezésünk szerint a plexus közelében futó mesenterialis kapillárisok meghatározó szerepet játszhatnak az entericus neuronok tápanyag- és oxigénellátásában, ezáltal pedig a neuronok mikrokörnyezetének kialakításában. Ezért a ganglionok közelében futó erek endotheliumának sérülése kiindulópontja lehet a nitrerg neuropátia kialakulásának.

Figyelembe véve, hogy a különböző szervek hyperglykaemiára való érzékenysége az erek anatómiai helyzetétől függően eltérő lehet (Mompeo és mtsai., 1998), kíváncsiak voltunk arra, milyen hatással van a diabétesz a myentericus ganglionokat ellátó kapillárisokra. Az jól ismert, hogy a nagy mesenterialis erek permeabilitása jelentősen változik diabéteszes állapotban (Fortes és mtsai., 1983; Lee és mtsai., 2011), a bélfalban futó kapillárisok endotheliumának diabétesszel összefüggő sérülését azonban szinte egyáltalán nem vizsgálták (De Las Casas és Finley, 1999).

Munkánk során a myentericus ganglionok közelében futó mesenterialis kapillárisok endothelsejtjeinek strukturális, funkcionális és molekuláris változásait vizsgáltuk kontroll, STZ-nal indukált kezeletlen és inzulin-kezelt diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban. A 10 hetes kísérleti periódus végén elektronmikroszkópos morfológiai, posztembedding immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel a következő kérdésekre kerestük a választ:

I. Az endothelialis bazális membrán elektronmikroszkópos morfometriai vizsgálata

- I. 1. Van-e különbség a kapilláris endotheliumot körülvevő BM vastagságában az egyes kísérleti csoportok között?
- I. 2. Változik-e a BM távolsága az endotheliumtól a kísérleti csoportok között?
- I. 3. Megfigyelhetünk-e bélszakasz-specifikus változásokat a BM vastagságában és az endotheliumtól való távolságában?

II. Az endothelsejtek közötti paracelluláris transzport elektronmikroszkópos morfometriai vizsgálata

- II. 1. Változik-e az endothelsejtek közti TJk szélessége, vagyis a szoros kapcsolatot kialakító szomszédos endothelsejtek távolsága a különböző kísérleti csoportokban?
- II. 2. A TJk szélességének változása mutat-e régió-specifikus különbségeket a bélcsatorna hossz tengelye mentén?
- II. 3. Hogyan változik a zárt és a nyitott TJk aránya a kísérleti csoportok között?

III. A transzendothelialis vezikuláris transzport elektronmikroszkópos morfometriai, posztembedding immunhisztokémiai és molekuláris vizsgálata

- III. 1. Változik-e az endothelialis caveolák mennyisége a kísérleti csoportok között?
- III. 2. A caveolák mutatnak-e méretbeli különbségeket az egyes csoportok között?
- III. 3. Hogyan változik az endothelsejtek szérum albumin felvétele és az albumin interstitiumba történő transzportja a hyperglykaemia és az inzulin-kezelés hatására?
- III. 4. Van-e különbség az endothelium és az interstitium közötti endogén albumin eloszlásában?
- III. 5. Hatással van-e a hyperglykaemia és az inzulin-kezelés a Cav-1 fehérje expressziójára az endothelsejtekben?
- III. 6. Hogyan változik a Cav-1 mRNS és protein expressziója a különböző bélszakaszokból és csoportokból készített szövethomogenizátumokban?
- III. 7. Milyen hatással van a hyperglykaemia és az inzulin-kezelés az eNOS enzim expressziójára az endothelsejtekben?

III. 8. Hogyan változik az eNOS mRNS és protein expressziós szintje a különböző bélszakaszokból és csoportokból készített szövethomogenizátumokban?

III. 9. Milyen bélszakasz-függő változásokat figyelhetünk meg a caveoláris kompartmentek, az endogén albumin transzport, a Cav-1 és az eNOS expressziójának vizsgálata során?

IV. A vizsgált paraméterek közötti összefüggések vizsgálata

IV. 1. Mutatnak-e korrelációt az endothelsejtek strukturális, funkcionális és molekuláris változásai?

IV. 2. Látható-e összefüggés a myentericus ganglionokat ellátó kapillárisok endotheliumának sérülése és a bélszakasz-függő nitreg myentericus neuropátia között diabéteszben?

III. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

A kísérleteink során felhasznált állatok tartása és felhasználása az Európai Unió etikai előírásoknak (86/609/EEC) és a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998 és 243/1998) megfelelően, a Szegedi Tudományegyetem intézményi etikai bizottságának engedélyével történt.

III. 1. Krónikus diabéteszes patkánymodell előállítása

Munkánk során 300-400 g tömegű, fiatal felnőtt (8 hetes), hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat random módon kontroll (n=6), STZ-indukált kezeletlen diabéteszes (n=14) és inzulin-kezelt diabéteszes (n=12) csoportra osztottuk. A hyperglykaemiát egyszeri, intraperitonealis STZ-injekcióval (Sigma, USA) indukáltuk. A STZ-t fiziológiás sóoldatban feloldva, 60 mg/testtömeg kg-os dózisban alkalmaztuk (Izbéki és mtsai. 2008). 48 óra elteltével a farokvénából vért vettünk, melyből vércukor-koncentrációt mértünk (Accu-Chek[®] Active vércukormérő). A kísérleti állatokat akkor tekintettük cukorbetegnek, mikor a vércukor-koncentrációjuk 18 mmol/l fölé emelkedett. Ekkor a hyperglykaemiás patkányok egy csoportjánál azonnali inzulin-kezelést kezdtünk el. Az állatok az inzulint (Humulin M3, Eli Lilly Nederland) szubkután injekció formájában naponta két dózisban (4 IU délelőtt és 2 IU délután) kapták.

A kezelésekhez használt inzulin mennyiségének beállítása a vércukor-koncentráció rendszeres ellenőrzése mellett, az állatok aktivitásának figyelembevételével történt. A kezeletlen diabéteszes és a kontroll állatcsoportok azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kaptak szintén szubkután formában. A patkányok vércukorszintjét és tömegét a 10 hetes kísérleti periódus során hetente mértük és ellenőriztük. Az állatok a tápot és a vizet a kísérletek teljes ideje alatt tetszés szerinti mennyiségben fogyaszthatták.

III. 2. A bélcsatorna előkészítése mikroszkópos és molekuláris vizsgálatokhoz

Tíz héttel a diabétesz kiváltása után cervicalis diszlokációt követően az állatok hasüregét U-alakban feltártuk, a bélcsatornát teljes hosszában kiboncoltuk, majd foszfát pufferrel (PB; phosphate buffer; 0,05 M; pH 7,4) átmostuk. Ezt követően a vékonybél proximális (duodenum; a pylorustól 1 cm-re disztálisan) és disztális részéből (ileum; az ileo-coecalis junctiótól 1 cm-re proximálisan), valamint a vastagbél középső területéről vettünk mintákat, melyeket elektronmikroszkópos és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz készítettünk elő.

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz 2-3 mm széles béldarabokat (keresztmetszet) 2%-os paraformaldehid és 2%-os glutáraldehid oldatában (0,05 M PB-rel készült az oldat) fixáltunk 4 °C-on egy éjszakán keresztül. Ezt követően a mintákat PB-ben (0,05 M; pH 7,4) mostuk.

A molekuláris vizsgálatokhoz a bélmintákat a mesenterium mentén felvágtuk, kiterítettük, majd sztereomikroszkóp alatt jégen dolgozva, RNáz-gátlóval tisztított eszközök segítségével eltávolítottuk a nyálkahártyát és az alatta levő submucosa réteget. A mintákat ezután folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és a felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

III. 3. Bélminták előkészítése transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz

A különböző bélszakaszokból származó mintákat fixálás és mosás után 1%-os ozmium-tetroxid (OsO_4) oldatban (0,1 M PB-rel készült az oldat) egy óráig utófixáltuk. A mintákat PB-ben mostuk (0,1 M; pH 7,4), majd felszálló alkoholsorozatban víztelenítettük. Az 50, majd 70%-os alkohol oldattal való kezelés után a mintákat 5 percre uranil-acetáttal telített 70%-os etanolba tettük, majd a 96%-os etanolban, abszolút alkoholban és acetonban folytattuk a víztelenítést. Ezt követően a mintákat aceton intermédiumon át Epon gyantába ágyasztuk, majd a gyantát 60 °C-on polimerizáltattuk.

Minden bélszakaszból és kísérleti csoportból négy mintát ágyasztunk be, majd a blokkokból először félvékony metszeteket (0,7 μm vastag) készítettünk. Vizsgálatainkhoz olyan MP közelében futó jól-orientált, hossz tengelyükre merőlegesen el metszett kapillárisokat választottunk, amelyeket a toluidinkékkel megfestett félvékony metszeteken

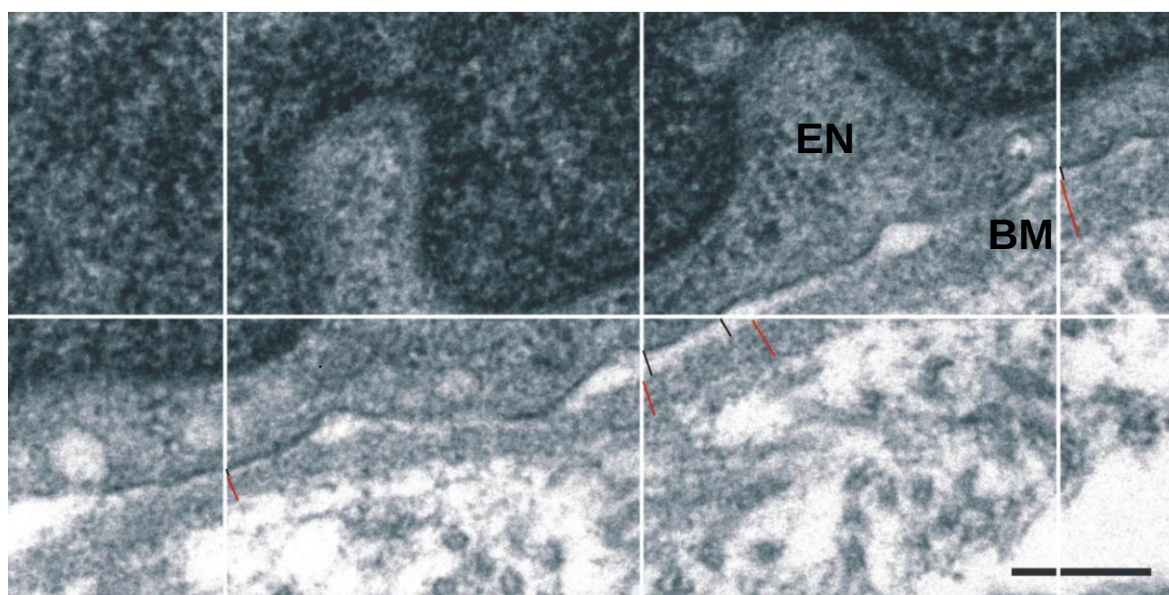
is megfigyeltünk, és amelyek 5800x-os nagyításon belefértek az elektronmikroszkóp látóterébe.

A kiválasztott blokkokból Reichert típusú ultramikrotómmal 70 nm-es ultravékony metszeteket készítettünk, melyeket Formvar-kezelt hártyás nikkel-rostélyokra tettünk (3 rostély/blokk). A kontrasztfestés Reynolds-féle módszerrel (1963) történt. A mintákat 20 percre uranil-acetát (Merck, Germany) oldatcseppre helyeztük, majd desztillált vízzel mostuk, ezután 3 percre ólom-citrát (Merck, Germany) oldatba tettük és ismét mostuk. Az ultravékony metszeteket MEGAVIEW II kamerával felszerelt Philips CM 10 típusú elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

III. 3. 1. Elektronmikroszkópos morfometriai vizsgálatok

III. 3. 1. 1. Bazális membrán vizsgálata

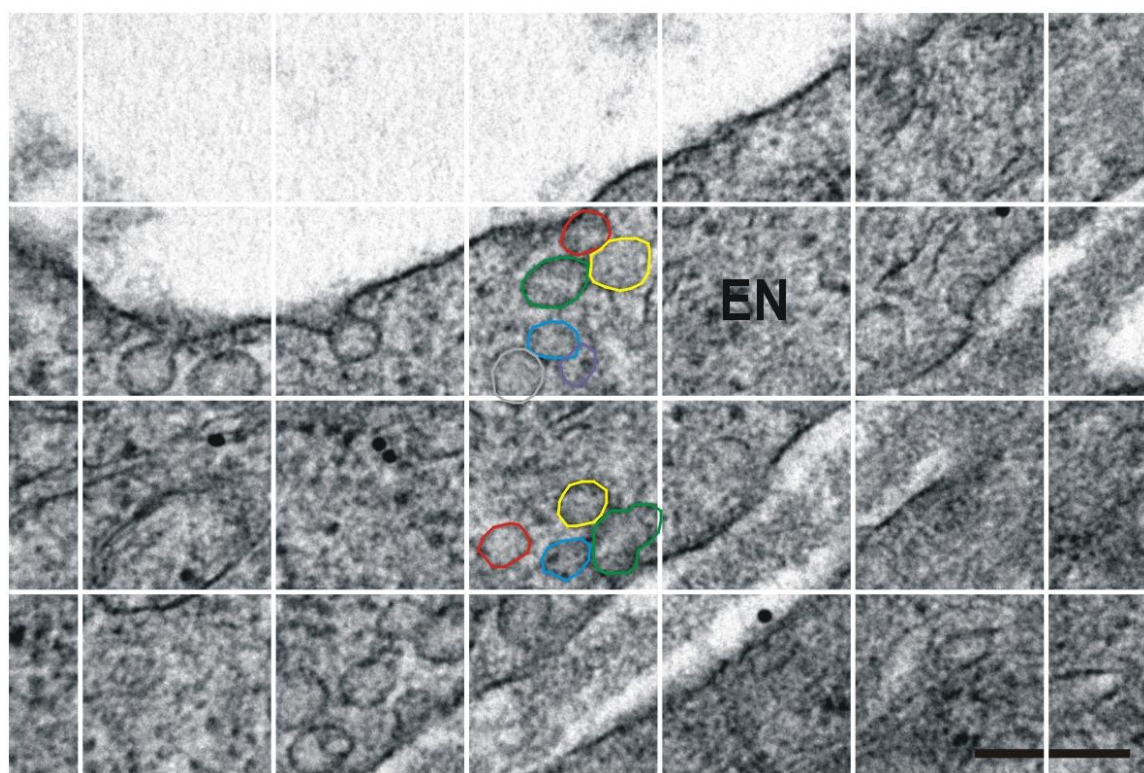
Az ereket körülvevő BM vizsgálatához 25000x-es nagyításon olyan montázs képeket készítettünk, melyek segítségével a kapilláris könnyedén körüljárható. Mindhárom vizsgált bélszakaszban és kísérleti csoportban 8-8 mesenterialis eret választottunk ki. Az endothelialis BM vastagságát, valamint a BM elkülönülését az endotheliumtól a képekre helyezett adott méretű rácsozat (600x600 nm) segítségével random pontokon, a rácsvonalak metszéspontjaiban, az érfalra merőlegesen mértük (12. ábra). A méréseket az AnalySIS 3.2 programmal végeztük.



12. ábra Endothelialis bazális membrán vastagságának (piros), valamint a bazális membrán endotheliumtól való távolságának (fekete) mérése 600x600 nm-es rácsozat segítségével. Lépték: 200 nm. EN-endothelsejt, BM-bazális membrán

III. 3. 1. 2. Vezikula kompartmentek vizsgálata

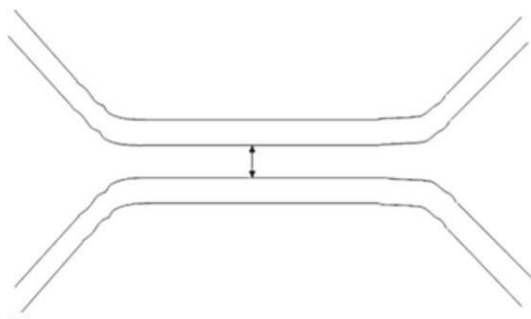
A vezikuláris kompartmentek különböző paramétereinek vizsgálatához 46000x-es nagyításon minden bélszakaszban és kísérleti csoportban 8-8 kapillárisról készítettünk digitális képeket, melyeken meghatároztuk az egyes caveolák méretét (nm^2) és a caveolák számát. A méréseket a képekre helyezett 250x250 nm méretű rácsháló segítségével, képenként két, random kiválasztott rácsnégyszetben végeztük (13. ábra), majd ennek területéből kalkuláltuk az $1 \mu\text{m}^2$ -re eső vezikulák számát (AnalySIS 3.2 program).



13. ábra A caveolák denzitásának és méretének meghatározása 250x250 nm-es rácsháló segítségével. Lépték: 200 nm. EN-endothelsejt

III. 3. 1. 3. Szoros sejtkapcsoló struktúrák vizsgálata

Az endothelsejtek közti TJk állapotának felméréséhez 46000x-es nagyításon készített digitális képeken mértük a TJk szélességét, vagyis a szoros kapcsolatot kialakító szomszédos endothelsejtek távolságát (14. ábra). Az irodalmi adatokat figyelembe véve, ha ez a távolság 3 nm-nél kisebb volt, akkor a kapcsolatot zártnak, ha a 3 nm-t meghaladta, akkor nyitottnak tekintettük. A sejtkapcsolatok morfometriai méréseit szintén az AnalySIS 3.2 program segítségével végeztük, minden bélszakaszban és kísérleti csoportban 15-15 TJk-t vizsgáltunk.



14. ábra Szoros sejtkapcsoló struktúrák szélességének, vagyis a sejtkapcsolatot kialakító szomszédos endothelsejtek távolságának mérése.

III. 3. 2. Posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatok

Ahhoz, hogy meghatározzuk az endogén albumin transzendothelialis transzportját, valamint a Cav-1 és az eNOS expresszió kvantitatív tulajdonságait, az ultravékony metszeteken posztembedding immunhisztokémiai festéseket végeztünk mindhárom bélszakaszban és kísérleti csoportban. Az immunreakció egyes lépéseit humid légkörű Petri-csészében, parafilmre helyezett cseppeken végeztük.

A nikkel-rostélyokra helyezett metszeteket először 1%-os perjódsvaban (9 perc), majd desztillált vízzel történő mosás után 2%-os Na-perjódátban (10 perc) inkubáltuk. Ismételt alapos mosást követően a metszeteket TRIS-pufferes sóoldat (TBS)-cseppekre (pH 7,4) helyeztük (3x2 perc), majd 30 percet inkubáltuk 1%-os borjú szérumban albuminban (BSA) [0,05 g BSA, 5 ml TBS (pH 7,4)]. Desztillált vizes mosás, majd újbóli TBS-kezelés után (2x3 perc) a rostélyokat az elsődleges szérumban (1. táblázat) inkubáltuk szobahőmérsékleten egy éjszakán át. Az elsődleges antitestet minden esetben 1%-os BSA-nal hígítottuk ki. Ezután a metszeteket ismét TBS-cseppekre (2x10 perc) helyeztük, majd BSA-TRIS puffer oldatában inkubáltuk tovább [0,05 g BSA, 25 µl Tween-20, 5 ml TRIS (pH 7,6); 2x5 perc]. Ezt követően a rostélyokat a másodlagos szérumban (2. táblázat) inkubáltuk (3 óra, szobahőmérséklet). A másodlagos antitesteket BSA-TRIS puffer oldatával hígítottuk ki. Az immunfestés végén a rostélyokat desztillált vízben alaposan mostuk, majd szűrőpapírral óvatosan leitatattuk.

Az immunreakció specifikálását minden esetben ellenőriztük. Ehhez a metszeteket az elsődleges antitest elhagyásával, csak az aranykolloidot tartalmazó másodlagos antitestben inkubáltuk.

A folyamat során az elsődleges és a másodlagos szérumban kívül minden felhasznált oldatot átszűrtünk (0,22 µm-es pórusméretű Millex GP filter, Sigma-Aldrich, USA), hogy kivédjük az esetleges mikroszennyezéseket. A mintákat a III. 3. pontban leírtaknak megfelelően kontrasztoltuk, majd elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Bélszakaszonként és kísérleti csoportonként 8-8 kapillárisról 46000x-es nagyításon digitális képeket készítettünk. A festődés intenzitását, vagyis a kapilláris endothelium egységnyi területére eső arany szemcsék mennyiségét mindhárom vizsgált fehérje esetében az AnalySIS 3.2 program segítségével számoltuk. Az endogén albumin esetében nemcsak az endothelsejtekben, hanem az extracelluláris térben levő albumint jelölő arany szemcsék számát is nyomon követtük. Ahhoz, hogy e két kompartment között megbecsüljük az albumint jelölő arany szemcsék eloszlásának arányát, az interstitiumban levő

arany szemcsék számát elosztottuk az endotheliumban és az interstitiumban levő összes arany szemcse számával.

Elsődleges antitest	Gazda	Hígítás	Inkubáció ideje, hőmérséklete	Gyártó
anti-human albumin	nyúl	1:1000	éjszakán át, szobahőmérséklet	Sigma, USA
anti-caveolin-1 (N-20): sc-894	nyúl	1:100	éjszakán át, szobahőmérséklet	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
anti-eNOS (NOS III)	egér	1:250	éjszakán át, szobahőmérséklet	Transduction Laboratories, USA

1. táblázat Posztembedding immunhisztokémia során használt elsődleges szérumok és jellemzőik

Másodlagos antitest	Gazda	Hígítás	Inkubáció ideje, hőmérséklete	Gyártó
anti-nyúl 10 nm arany-konjugált IgG	kecske	1:50	3 óra, szobahőmérséklet	Sigma, USA
anti-egér 18 nm arany-konjugált IgG	kecske	1:30	3 óra, szobahőmérséklet	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA

2. táblázat Posztembedding immunhisztokémia során használt másodlagos szérumok és jellemzőik

III. 4. Molekuláris biológiai vizsgálatok

A nyálkahártyától és az alatta levő submucosa rétegtől megfosztott, folyékony nitrogénben fagyasztva tárolt mintákon mRNS preparálást követően reverz transzkripciót (RT), majd polimeráz láncreakciót (PCR) végeztünk. A mRNS-ről átíródó fehérje mennyiségét pedig Western blot analízissel mutattuk ki mindhárom vizsgált bélszakaszban, minden kísérleti csoportban.

III. 4. 1. mRNS preparálás, reverz transzkripció és polimeráz láncreakció

A különböző bélszakaszokból származó fagyasztott mintákat részletekben hozzáadott RNA-Bee reagensben homogenizáltuk (Tel-Test, Inc., Texas, USA) és a gyártó által ajánlott protokollt követve össz-RNS-t preparáltunk. A homogenizátumokat kétszer ismételve kloroformmal extraháltuk és centrifugáltuk (20 perc, 13500 rpm, 4 °C). Ezután a felső, vizes fázishoz 0,75 térfogatnyi hideg izo-propanolt adtunk, ezáltal kicsaptuk az RNS-t. A csapadékot centrifugálással összegyűjtöttük (10 perc, 13500 rpm, 4 °C) és leöntöttük róla az izo-propanolt. A kicsapódott RNS-t egy éjszakán át 75%-os etanolban mostuk (-20 °C), majd 50 µl RNáz-mentes dietil-pirokarbonáttal (DEPC) (Sigma, USA) kezelt desztillált vízben feloldottuk. A tisztított RNS mintákat rutinszerűen 100 U RNáz-mentes DNáz I-gyel (Fermentas) kezeltük, hogy elkerüljük a DNS kontaminációt. Az RNS koncentráció meghatározásához az $OD_{A260} = 40 \mu\text{g/ml}$ RNS összefüggést alkalmaztuk (Nanodrop készülék). Ha az $A260/A280$ arány 1,8-nál nagyobb volt, akkor a mintát megfelelő tisztaságúnak tekintettük.

Ahhoz, hogy detektáljuk a patkány Cav-1 és eNOS specifikus mRNS-eket, szemi-kvantitatív RT-PCR-t készítettünk, belső kontrollként β -aktint használtunk (Hracskó és mtsai., 2009).

Ehhez első lépésben az RNS-ről RT-val egyszálú cDNS-t szintetizáltunk, templátként 5 µg össz-RNS-t használtunk. Az RNS-t 90 °C-on denaturáltuk, összekevertük 200 pmol dNTP-tal (Fermentas), 200 U RevertAid Premium reverz transzkriptáz enzimmel (Fermentas) és 500 pmol random hexamer primerrel (Fermentas) 20 µl végtérfogatban. Ezután az oldatot 10 percig 37 °C-on, majd 45 percet 42 °C-on inkubáltuk. A reakció leállításához az elegyet 65 °C-on 5 percig inkubáltuk. A PCR amplifikálásokhoz a RT

termékekből reakciónként 1 µl-t használtunk fel templátként, melyet 25 µl 2 x Dream Taq Green PCR Master Mix-hez (Fermentas) adtunk hozzá.

Az amplifikációs ciklusok számát, vagyis amíg a szintetizált termék mennyisége a ciklusok számával arányosan növekedett, korábbi előkísérletek során határoztuk meg. β -aktin esetén 25, Cav-1 esetén 30, az eNOS esetén pedig 40 ciklust futtattunk végig 95 °C-on 30 másodpercig (denaturálás), 60 °C-on 30 másodpercig (*annealing* vagy kapcsolódási lépés) és 72 °C-on 50 másodpercig (szintetizálás). Az amplifikációt PTC 200 Peltier Thermal Cycler készülékkel (MJ Research, MA, USA) végeztük. A primer szekvenciákat (3. táblázat) a GenBank adatbázisában található szekvenciák alapján terveztük. A ciklusokon belül az *annealing* (primerek kapcsolódása a DNS-szálakhoz) hőmérséklet és az egyes ciklusok száma az adott primer pár függvénye volt, a szintézis lépésének idejét pedig az amplifikált termék várható hossza határozta meg. Minden csoport esetében három független párhuzamos mintát használtunk. Az RT-PCR reakciót minden minta esetén háromszor ismételtük, hogy növeljük a mérések megbízhatóságát.

Vizsgált fehérje	GenBank kód	Forward primer szekvencia	Reverz primer szekvencia
eNOS	AY695391	5'cacagagcctgtggccgtgg3'	5'ggcaggcagtgccacggatg3'
Cav-1	NM_133651	5'acgacgcgcacaccaaggag3'	5'agatgccccagatgagcgcc3'
β -actin	NM_031144	5'gcaagagaggtatcctgacc3'	5'ccctcgtagatgggcacagt3'

3. táblázat Polimeráz láncreakció során alkalmazott primer szekvenciák

Az amplifikált PCR termékeket 2%-os agaróz gélen (Sigma, USA) futtattuk meg. Az ethidium-bromiddal festett géleket GDS 7500 típusú gél dokumentációs rendszerrel digitalizáltuk és a GelBase/GelBlotTM Pro Gel Analysis szoftver (Ultra Violet Products Ltd., CA) segítségével kiértékeljük. A Cav-1 és az eNOS mRNS relatív szintjét a belső kontrollként használt β -aktinra vonatkoztatott arányszámként fejeztük ki: Cav-1 vagy eNOS / β -aktin.

III. 4. 2. Cav-1 és eNOS fehérjemennyiség meghatározása – Western blot analízis

A különböző bélszakaszokból származó fagyasztott mintákat folyékony nitrogén folyamatos hozzáadása mellett dörzsmozsárban finom porrá törtük, majd jéghideg homogenizáló pufferben [20 mM 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-etán-szulfonsav (HEPES, pH 7,4), 1% Triton X-100, 4% nátrium-dodecyl-szulfát (SDS) és proteáz inhibitorok (Complete proteáz inhibitor koktél, Roche Applied Sciences, USA); 1 g minta/10 ml puffer; Reber és mtsai., 2002] homogénre kevertük. Ezt követően a mintákat homogenizátor segítségével még 30 másodpercig homogenizáltuk. Miután a minták fehérjekoncentrációját meghatároztuk (BioRad, CA, USA), felforraltuk őket (5 perc, 95 °C), majd minden esetben adott fehérjemennyiséget vittünk fel SDS-poliakrilamid (SDS-PA) gélre (Mini-Protean II készülék, Bio-Rad) (4. táblázat).

Vizsgált fehérje	Molekulatömeg (kDa)	Gélre felvitt fehérjemennyiség (µg / zseb)	Gél típusa
Cav-1	22	7	10% SDS-PA gél
eNOS	140	20	7,5% SDS-PA gél

4. táblázat Vizsgált fehérjék molekulatömege és a gélelektroforézis paraméterei

A futtatás után a géleket 0,2 µm pórusméretű nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell, Németország) blottoltuk (Cav-1 esetén 1 h 80 V, eNOS esetén 1 h 100 V). A membránokat szárítás után Tween-20-at tartalmazó TBS-ban (TBST) rehidratáltuk, majd 1% BSA-TBST-ban [10 mM TRIS-Cl (pH 7,5), 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20; Sigma, USA] 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután a membránokat az elsődleges szérumokban (5. táblázat) rázatva inkubáltuk, 3x10 percig TBST-ban mostuk, alkalikus foszfatáz-konjugált másodlagos ellenanyagokban (6. táblázat) inkubáltuk, majd ismét TBST-ban mostuk (3x10 perc).

Az előhívás 0,1 M alkalikus foszfatáz pufferben [1 M TRIS (pH 9,5), 5 M NaCl, 1 M MgCl₂] feloldott nitroblue tetrazolium (50 mg/ml, Sigma, USA) és 5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfát *p*-toluidin só (50 mg/ml, Sigma, USA) oldatában történt. Minden esetben

három független membránt értékeltünk, belső kontrollként β -aktint használtunk. A blotok kiértékelése Quantity One 4. 6. 3. szoftverrel (Bio-Rad) történt, az értékeket mm^2 area x intenzitás formában tüntettük fel.

Elsődleges antitest	Gazda	Hígítás	Inkubáció ideje, hőmérséklete	Gyártó
anti-caveolin-1 (N-20):sc-894	nyúl	1:1000	1 óra, szobahőmérséklet	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
anti-eNOS (NOS III)	egér	1:1000	éjszakán át, 4 °C	Transduction Laboratories, USA
anti- β -actin	egér	1:15000	30 perc, szobahőmérséklet	Sigma, USA

5. táblázat Western blot analízis során alkalmazott elsődleges szérumok és jellemzőik

Másodlagos antitest	Hígítás	Inkubáció ideje, hőmérséklete	Gyártó
anti-nyúl	1:5000	1 óra, szobahőmérséklet	Promega Corporation, Madison, WI, USA
anti-egér (eNOS festéshez)	1:5000	1 óra, szobahőmérséklet	Promega Corporation, Madison, WI, USA
anti-egér (β -actin festéshez)	1:10000	30 perc, szobahőmérséklet	Promega Corporation, Madison, WI, USA

6. táblázat Western blot analízis során alkalmazott másodlagos szérumok és jellemzőik

III. 5. Statisztikai analízis

Ahhoz, hogy felmérjük, milyen hatással van a hyperglykaemia és az inzulin-kezelés a bélfal mikrokeringésére, nevezetesen az ereket körülvevő BM vastagságára, illetve az endotheliumtól való elkülönülésére, a caveolák mennyiségére és méretére, a TJK állapotára, valamint az albumin, a Cav-1 és az eNOS expressziójára, az elektronmikroszkópos morfometria és immunhisztokémia, valamint a molekuláris biológiai vizsgálatok során nyert adatokat statisztikai analízisnek vetettük alá. Egyfaktoros varianciaanalízist (ANOVA) és Newman-Keuls tesztet végeztünk (GraphPad Prism 4.0 és MedCalc Statistical Software 9.4.2.0). A varianciaanalízis feltételei - a random mintavétel, a függetlenség és a varianciák homogenitása - teljesültek. A kapott eredményeket oszlopdiagramokon ábrázoltuk, az értékeket átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$ valószínűségi értékben határoztuk meg.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. A kísérleti állatok testtömege és vércukor-koncentrációja

A munkánk során felhasznált állatok testtömegét és vércukor-koncentrációját a kísérleti periódus alatt végig nyomon követtük. A STZ-nal kezelt patkányok mindegyike hyperglykaemiás lett, vércukorszintjük szignifikánsan növekedett. A diabéteszes csoportban több mint négyszer magasabb vércukorszintet mértünk a kontroll állatokhoz képest ($32,086 \pm 1,043$ mM vs. $7,233 \pm 0,498$ mM; $p < 0,001$). Az azonnali inzulin-kezelés a hyperglykaemiát hatékonyan csökkentette, a naponta két dózisban adott inzulin a kontroll értékekhez közeli szinten tartotta a patkányok vércukor-koncentrációját.

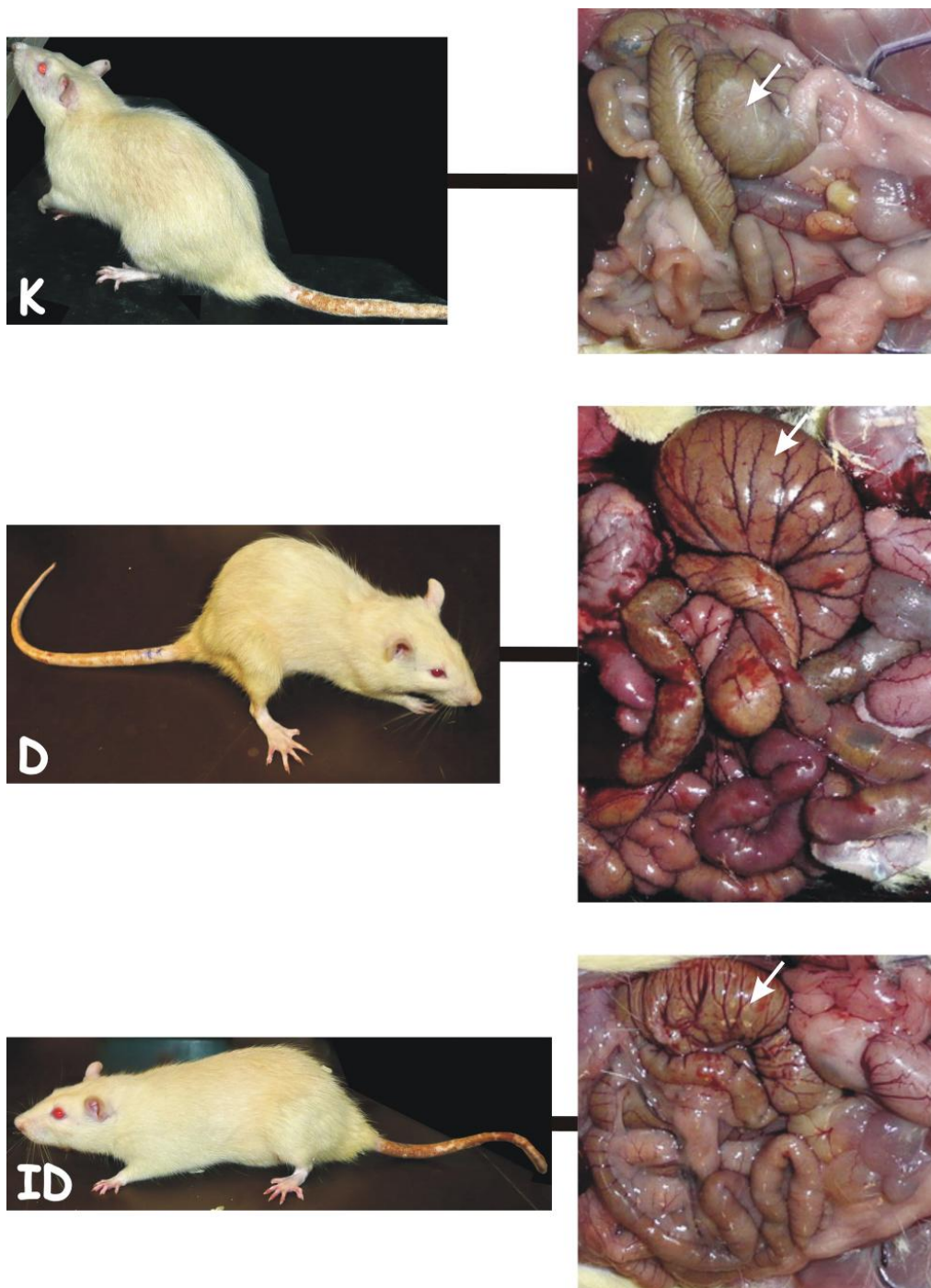
A 10 hetes kísérlet során a kezeletlen diabéteszes állatok testtömege szignifikánsan lecsökkent ($p < 0,001$), míg a másik két állatcsoporté tovább gyarapodott (7. táblázat).

	Testtömeg (g) $\pm$ SEM		Vércukor-koncentráció (mM) $\pm$ SEM	
	kezdeti	végső	kezdeti	végső
Kontroll (n=6)	$268,33 \pm 4,41$	$461,33 \pm 27,61$ ***	$8,1 \pm 1,617$	$7,233 \pm 0,498$
Diabéteszes (n=14)	$387 \pm 10,68$	$279,71 \pm 17,8$ ***	$7,286 \pm 0,449$	$32,086 \pm 1,043$ ***
Inzulin-kezelt diabéteszes (n=12)	$352,5 \pm 20,93$	$423,67 \pm 21,35$ *	$6,767 \pm 0,285$	$9,9 \pm 2,387$

7. táblázat A kísérlet során felhasznált kontroll, STZ-indukált diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes patkányok testtömeg- és vércukor-értékei (kezdeti vs. végső: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

A diabéteszes állatokat a nagymértékű fogyás mellett fokozott folyadékfelvétel, vizeletürítés és csökkent aktivitás is jellemezte. Miután a patkányokat feláldoztuk, az egyes csoportok között szabad szemmel is jól látható különbségeket figyeltünk meg: a diabéteszes állatok coecumja megnagyobbodott; a bélcsatorna pedig kékes-lila színezetű

volt. Bár az inzulin-kezelt patkányok bélcsatornáján is látszottak ischaemiára utaló jelek, a coecum mérete megegyezett a kontroll állatokéval (15. ábra).

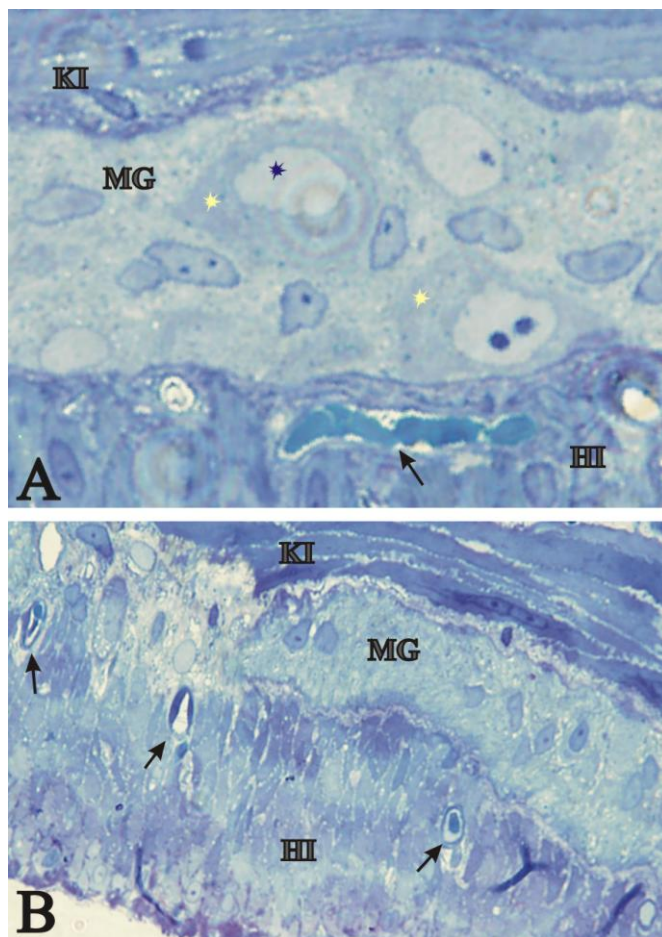


15. ábra Kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányokról, valamint a még hasüregben elhelyezkedő bélcsatornáról készült reprezentatív képek. nyíl-coecum

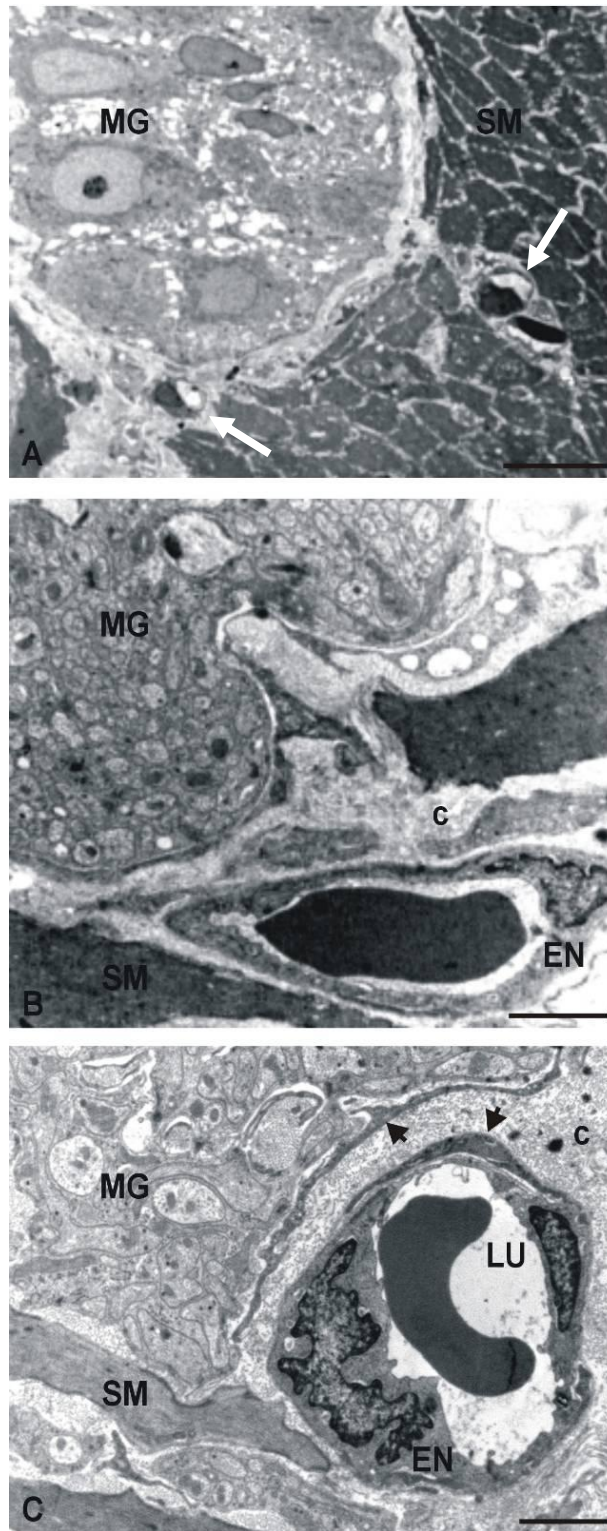
IV. 2. Mesenterialis kapillárisok ultrastruktúrája

Mivel a myentericus ganglionok nem vaszkularizáltak, a MP közelében futó erek (16-17. ábra) fontos szerepet játszanak a ganglionok oxigén- és tápanyagellátásában; struktúrájuk meghatározó a fiziológias vér-szövet gát kialakításában és fenntartásában.

A kapilláris endotheliumot alkotó szomszédos endothelsejtek TJk-kal kapcsolódnak egymáshoz, így folytonos réteget alakítanak ki az ér lumene körül. Az endotheliumot egy vékony BM veszi körül, az erek körüli extracelluláris térben pedig nagy mennyiségű kollagén található. A mesenterialis kapillárisokat gyakran különböző méretű és megjelenésű periciták és interstitialis sejtek nyúlványai is körülölelik (17. C ábra).



16. ábra Reprezentatív fénymikroszkópos felvétel myentericus ganglion közelében futó kapillárisokról duodenumból (A) és colonból (B) készített félvékony metszeteken toluidinkék festés után (1000x). MG-myentericus ganglion, KI-körkörös izom, HI-hosszanti izom, nyíl-kapilláris, sárga csillag-neuron sejttestje, kék csillag-neuron sejtmagja



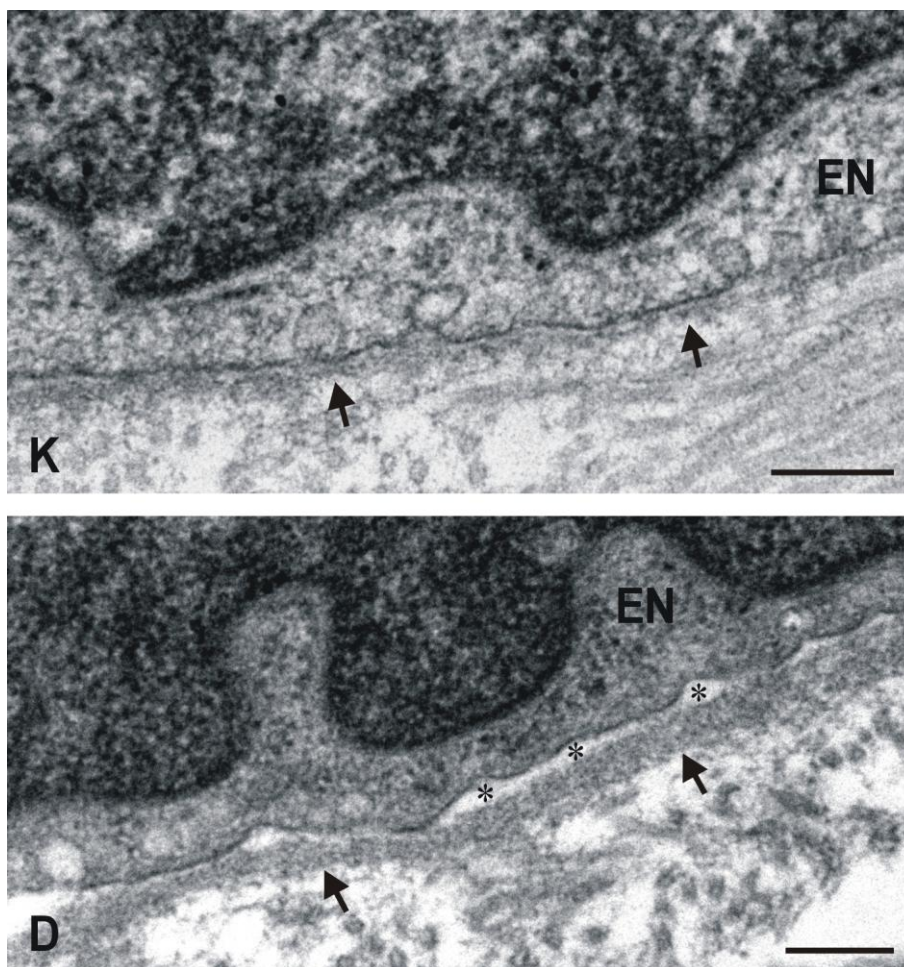
17. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek myentericus plexus közelében futó mesenterialis kapillárisokról duodenumból (A) és colonból (B, C) készített ultravékony metszeteken. Lépték: 10 μ m (A) és 2 μ m (B, C). fehér nyíl-kapilláris, MG-myentericus ganglion, SM-simaizom, EN-endothelsejt, LU-kapilláris lumene, C-kollagén, fekete nyíl-sejtnyúlványok

IV. 3. Endothelialis bazális membrán vizsgálata

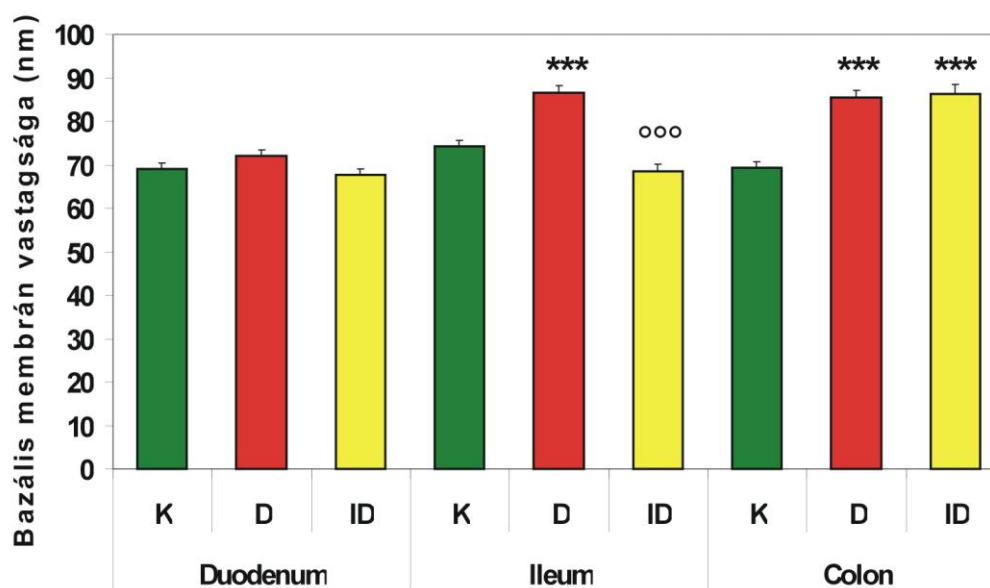
A kapilláris endotheliumot körülvevő BM vastagsága régió-specifikus különbségeket mutatott a bélcsatorna hossz tengelye mentén az egyes kísérleti csoportok között. Az endothelialis BM a diabéteszes patkányok ileumában és colonjában erőteljesen megvastagodott ($p < 0,001$), míg a duodenumban a BM vastagsága nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll csoporthoz képest. A diabéteszes állatok ileumában és colonjában az ereket körülvevő BM vastagsága közel 90 nm volt, a duodenumban viszont sohasem haladta meg a kontroll értéket (~70 nm) (18-19. ábra).

A diabéteszes patkányok ileumában és colonjában a BM elvált a kapilláris endotheliumtól ($p < 0,001$); az endothelium és a BM közötti távolság átlagosan kétszeresre növekedett a kontroll csoporthoz viszonyítva (18., 20. ábra). A diabéteszes állatok duodenumában levő kapillárisoknál nemcsak a BM vastagsága, hanem a BM és az endothelium távolsága sem változott (19-20. ábra).

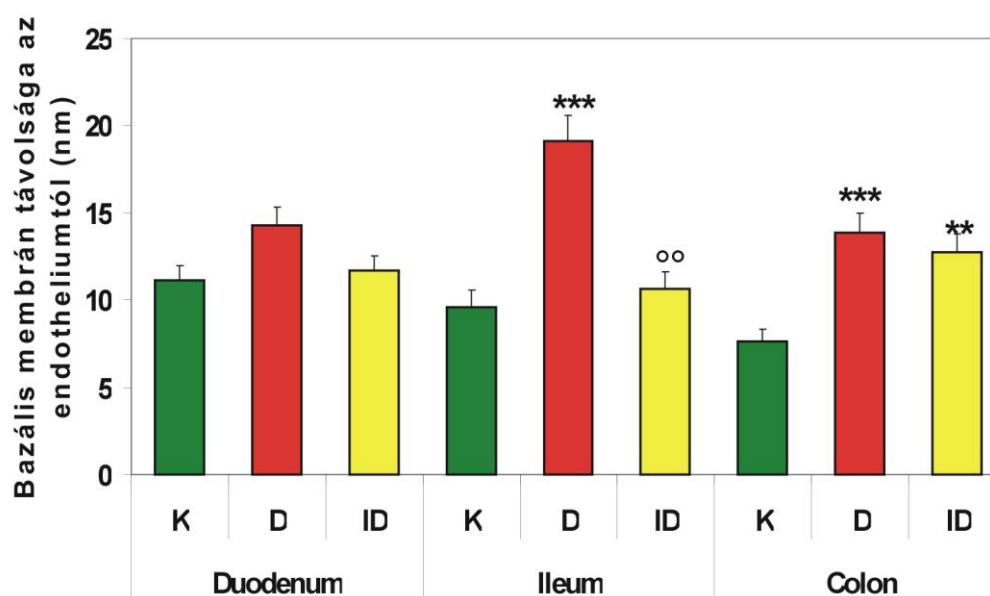
A BM diabétesz hatására bekövetkező megvastagodását, illetve az endotheliumtól való eltávolodását az azonnali inzulin-kezelés az ileumban megakadályozta, a colonban azonban az inzulin-kezelés nem bizonyult hatásosnak (18-20. ábra).



18. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek myentericus plexus közelében futó mesenterialis kapillárisokról kontroll (K) és diabéteszes (D) patkányok colonjából készített ultravékony metszeteken. A kapillárist körülvevő bazális membrán (nyíl) a diabéteszes patkányokban nagymértékben megvastagodott és elvált az endotheliumtól (csillag). Lépték: 200 nm. EN-endothelsejt



19. ábra A bazális membrán vastagsága kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. *** $p < 0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), ^{ooo} $p < 0,001$ (D és ID között)

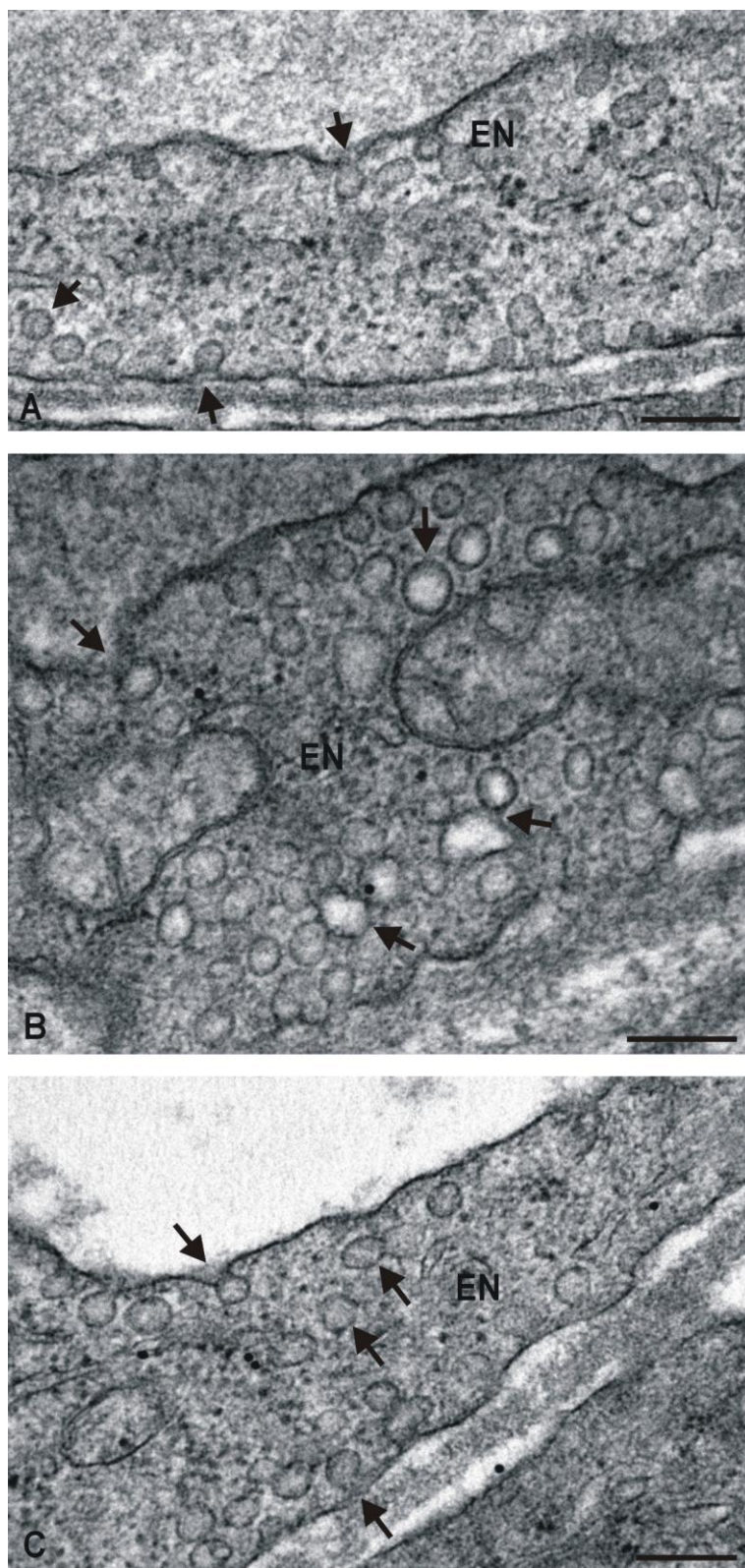


20. ábra A bazális membrán távolsága az endotheliiumtól kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), ^{oo} $p < 0,01$ (D és ID között)

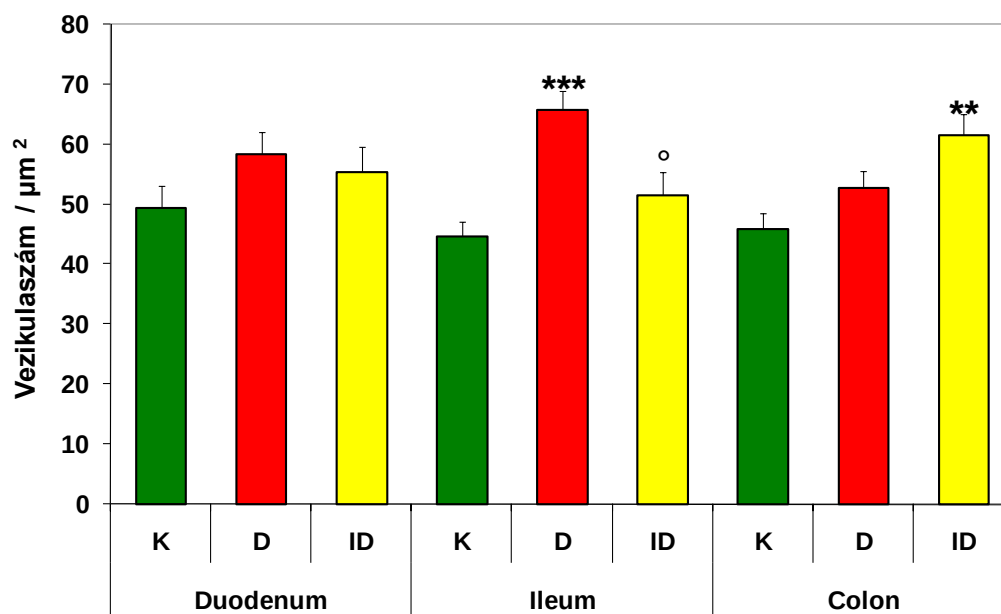
IV. 4. Vezikuláris kompartmentek kvantitatív morfometriai vizsgálata

A kapilláris endotheliumban található caveoláris kompartmentek (21. ábra) kvantitatív vizsgálata során szintén bélszakasz-függő változásokat figyeltünk meg a különböző kísérleti csoportok között. A diabéteszes állatok ileumában mind a caveolák denzitása (22. ábra), mind az egyes caveolák mérete (23. ábra) szignifikánsan megnőtt a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,001$). A vezikula denzitás növekedése ugyanakkor sem a duodenumban, sem a colonban nem volt szignifikáns a diabéteszes állatokban (22. ábra). Az egyes vezikulák mérete a diabéteszes állatok duodenumában megegyezett a kontroll állatokban mért értékekkel, míg a colonban ez az érték szignifikánsan megnőtt (23. ábra).

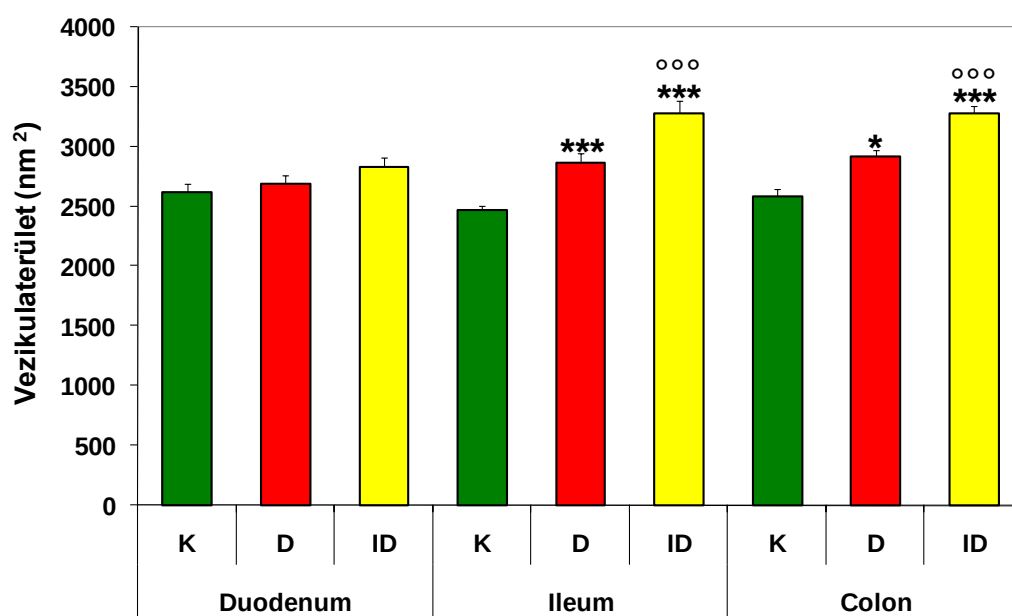
Az azonnali inzulin-kezelés mind az ileumban, mind a colonban tovább fokozta a vezikulák hipertrofizációját (22-23. ábra).



21. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek mesenterialis kapillárisok endotheliumában található vezikuláris kompartmentekről diabéteszes patkány duodenumából (A), ileumából (B), valamint inzulin-kezelt diabéteszes patkány ileumából (C) készített ultravékony metszeteken. Lépték: 200 nm. EN-endothelsejt, nyíl-caveolák



22. ábra Az endothelsejtek egységnyi területére eső vezikulák száma kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), ° $p < 0,05$ (D és ID között)



23. ábra A kapilláris endotheliumban levő vezikulák mérete kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), °°° $p < 0,001$ (D és ID között)

IV. 5. Szoros sejtkapcsoló struktúrák morfológiai vizsgálata

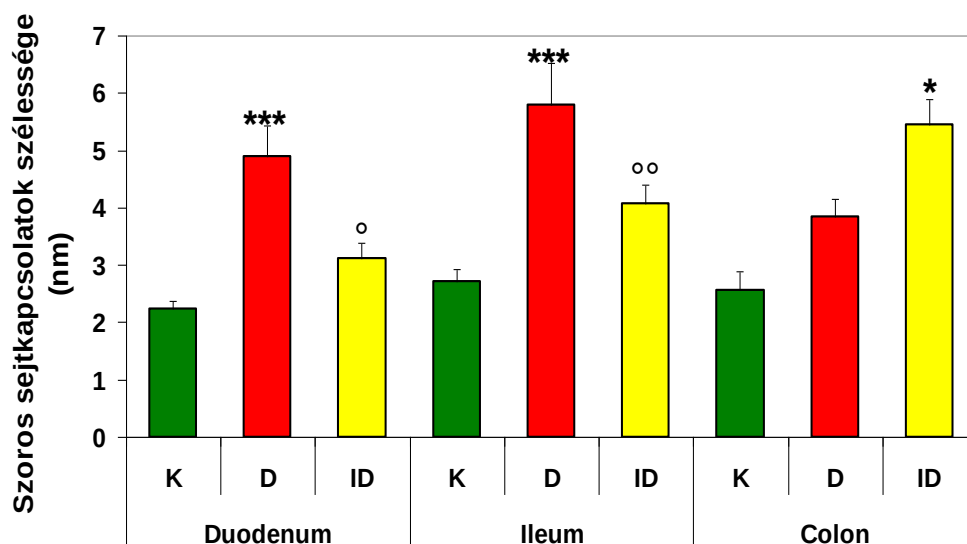
Az endothelium integritásának fenntartásában kulcsfontosságú a TJk zárt vagy nyitott állapota, amit a sejtek közötti távolság, azaz a TJk szélessége határoz meg. A MP közelében futó kapillárisok endothelsejtjei közötti távolság a diabéteszes állatok minden bélszakaszában nagyobb volt, mint a kontroll csoportokban (24-25. ábra). A diabéteszes patkányok duodenumának és ileumának kapillárisaiban a szomszédos endothelsejtek közti távolság több mint kétszeresre nőtt ($4,893 \pm 0,530$ nm és $5,787 \pm 0,743$ nm; $p < 0,001$) a kontroll csoportokhoz képest, ahol ez a távolság mindenhol 3 nm alatt maradt (25. ábra).

Az azonnali inzulin-kezelés a duodenumban szignifikánsan csökkentette az endothelsejtek közötti távolságot ($p < 0,05$), mely így megközelítette az irodalmi adatok alapján meghatározott 3 nm-es határértéket ($3,118 \pm 0,267$ nm). Az inzulin-kezelt diabéteszes állatok ileumában is szignifikánsan csökkent a TJk szélessége ($4,070 \pm 0,326$ nm; $p < 0,01$) a diabéteszes állatokéhoz képest, azonban még mindig jóval meghaladta a kontroll értéket. Az inzulin-kezelt diabéteszes patkányok colonjában azonban a diabéteszes csoporthoz képest is tovább nőtt a távolság a kapilláris béllelő endothelsejtek között ($5,443 \pm 0,455$ nm) (24-25. ábra).

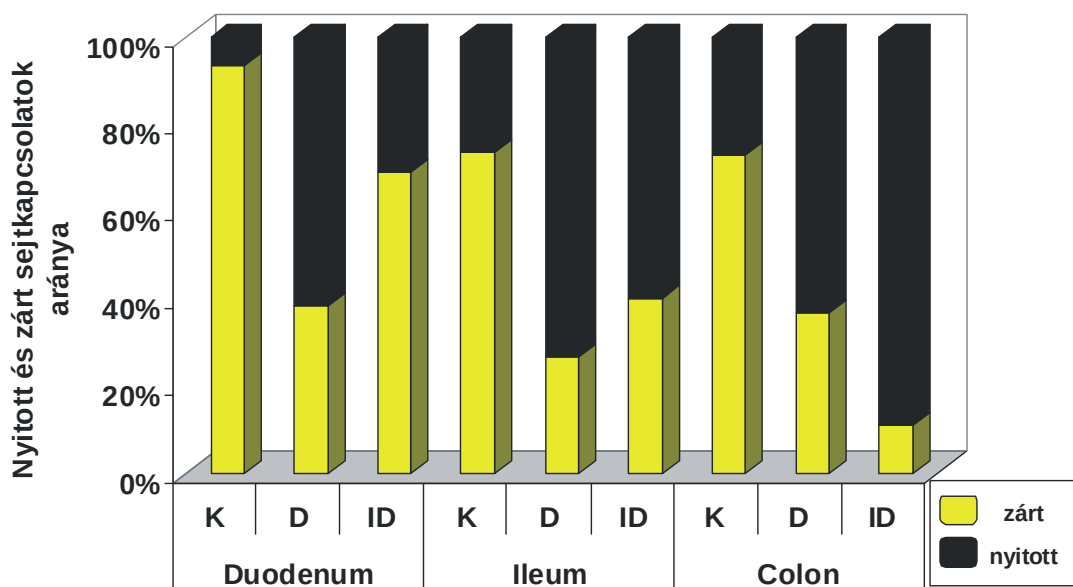
A mért adatok alapján megbecsültük a zárt, illetve a nyitott sejtkapcsolatok arányát a különböző kísérleti csoportokban. A kontroll állatokban az endothelsejtek közötti TJk több mint 70%-a zárt állapotú, vagyis a szomszédos endothelsejtek közti rés 3 nm-nél kisebb volt. A diabéteszes patkányok MP-hoz közeli kapillárisainak endothelsejtjei között a TJk nagyrésze nyitott volt, az ileumban ennek aránya a 70%-ot is meghaladta. Az inzulin-kezelés hatására a duodenum kapillárisaiban a TJk többsége zárt (~70%) maradt, míg az ileumban 60%-uk, a colonban mintegy 90%-uk nyitott állapotban volt (26. ábra).



24. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek a mesenterialis kapillárisok endothelsejtjei közötti szoros sejtkapcsolatokról kontroll (K) patkányok duodenumából, valamint diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok ileumából készített ultravékony metszeteken. Lépték: 200 nm. EN-endothelsejt, nyíl-tight junction



25. ábra Endothelsejtek közötti szoros sejtkapcsoló struktúrák szélessége kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. **p<0,01; ***p<0,001 (kontrollhoz viszonyítva), °p<0,05; °°p<0,01 (D és ID között)



26. ábra Endothelsejtek közötti nyitott és zárt sejtkapcsoló struktúrák aránya kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban.

IV. 6. Az albumin transzportjának vizsgálata a kapilláris endothelium és az interstitium között

Az endogén albumint jelölő 10 nm-es arany szemcséket a MP közelében futó kapillárisok endotheliumában, az extracelluláris térben és a kapillárisok lumenében is detektáltuk. A kapilláris endothelium területén a legtöbb arany szemcse a vezikulák membránjához kötődött (27. ábra).

Bár az albumint jelölő arany szemcsék száma és megoszlása az endothelsejtek és az interstitium között bélszakasztól függően jelentős eltérést mutatott, a diabéteszes állatokban ezek száma mindkét kompartmentben fokozódott a kontroll csoporthoz képest (28-29. ábra).

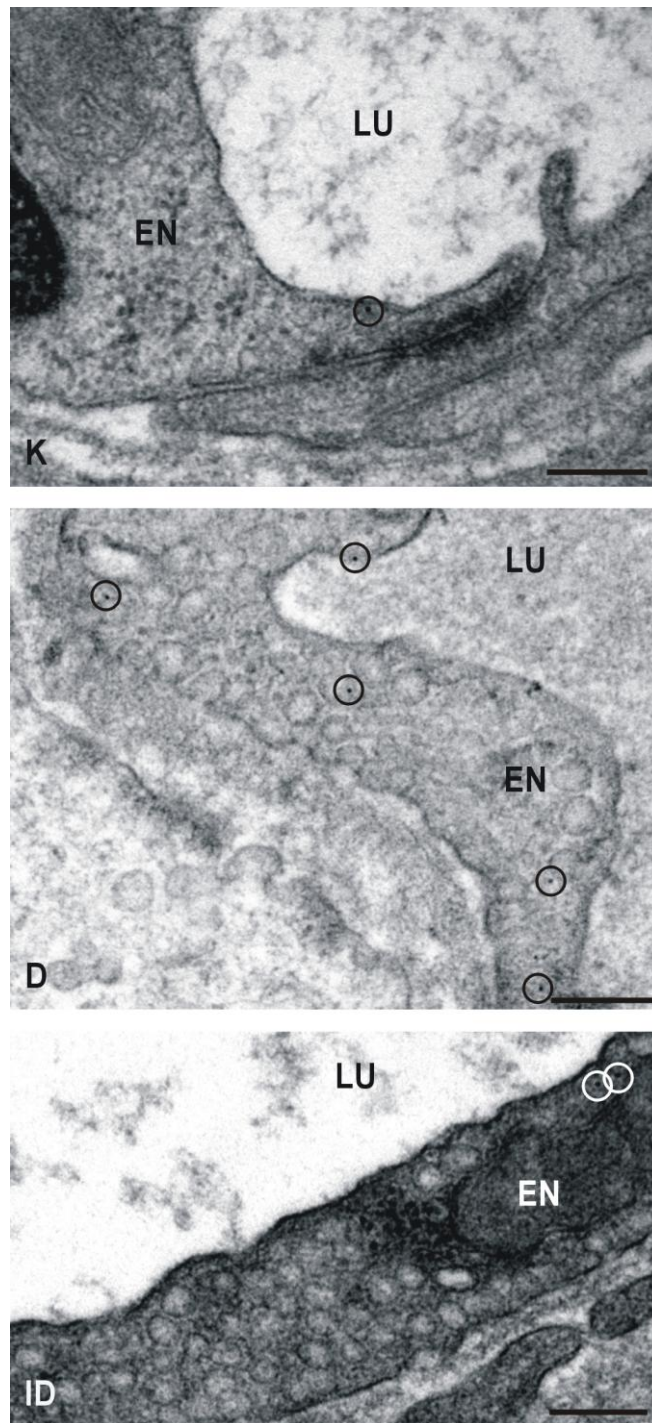
Az endothelsejtek egységnyi területére eső arany szemcsék száma a diabéteszes patkányok ileumában több mint négyszeresre, míg a duodenumban és a colonban csak körülbelül kétszeresre növekedett (28. ábra). A mesenterialis kapillárisok körüli extracelluláris térben levő arany szemcsék száma a diabéteszes csoport ileumában mintegy tízszeresre, a duodenumban csak közel 2,5-szeresre emelkedett, míg a colonban számuk a kontroll értéken maradt (29. ábra).

A diabéteszes állatok duodenumában az arany szemcsék száma az interstitiumban is megduplázódott, ezért az arany szemcsék megoszlása a két kompartment között nem változott a kontroll csoporthoz viszonyítva (30. ábra).

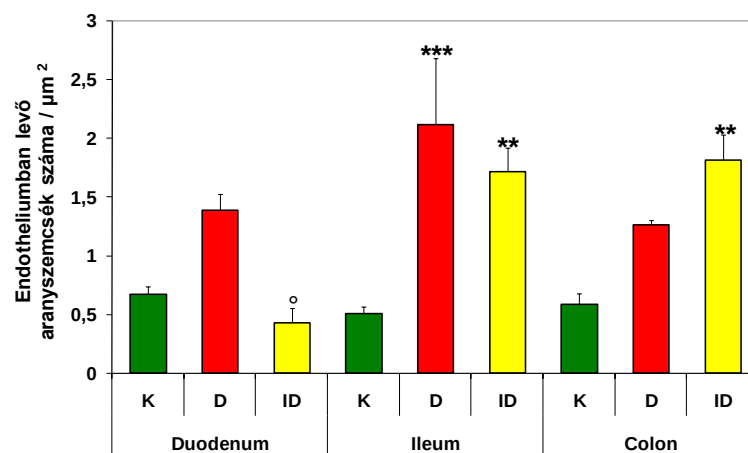
A diabéteszes patkányok ileumában azonban az arany szemcsék száma egyenlőtlenül növekedett a két kompartmentben. Míg az interstitiumban tízszeresre, az endotheliumban csak négyszeresre nőtt az arany szemcsék száma, ami a kontroll csoport interstitiumában számolt értékhez képest 30%-os növekedést eredményezett (30. ábra). A diabéteszes állatok colonjában, a kapillárisok endotheliumában az arany szemcsék száma a duplájára növekedett, az interstitiumban azonban a szemcsék száma a kontrollhoz képest nem változott. Az arany szemcsék eloszlását tekintve mindez körülbelül 30%-kal kevesebb jelet eredményezett az interstitiumban a kontroll állatokhoz képest (30. ábra).

Az azonnali inzulin-kezelés a duodenum kapillárisainak endotheliumában és az interstitiumban is megakadályozta az arany szemcsék számának növekedését, így az arany szemcsék megoszlása a két kompartment között inzulin-kezelés mellett sem változott. Az inzulin-kezelés az ileum kapillárisainak interstitiumában is megakadályozta az arany szemcsék számának növekedését. A colon kapillárisainak endotheliumában azonban

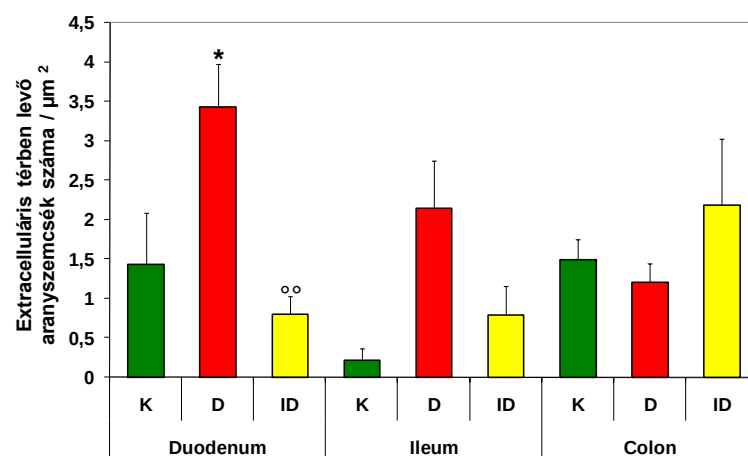
az albumint jelölő aranyzemcsék száma az endothelsejtekben az inzulin-kezelés mellett is tovább növekedett (30. ábra).



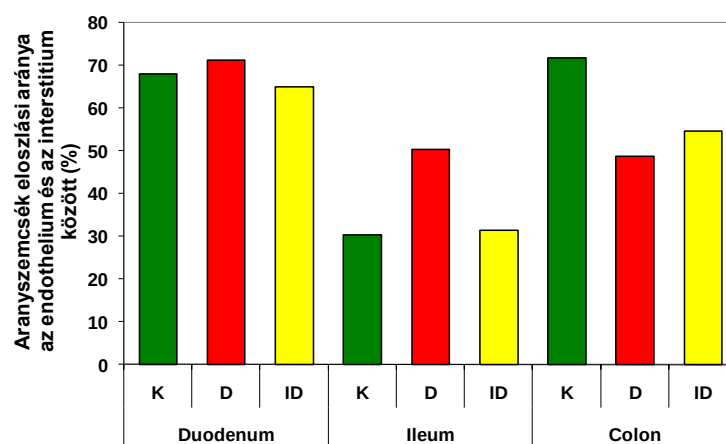
27. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek myentericus plexus közelében futó kapillárisokról kontroll (K) patkányok duodenumából, valamint diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok ileumából készített ultravékony metszeteken albumin postembedding immunhisztokémia után. Lépték: 200 nm. kör-albumint jelölő 10 nm-es aranyzemcse, EN-endothelsejt, LU-kapilláris lumen



28. ábra Albumint jelölő aranyszemcsék száma a kapillárisok endotheliumában kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), ° $p < 0,05$ (D és ID között)



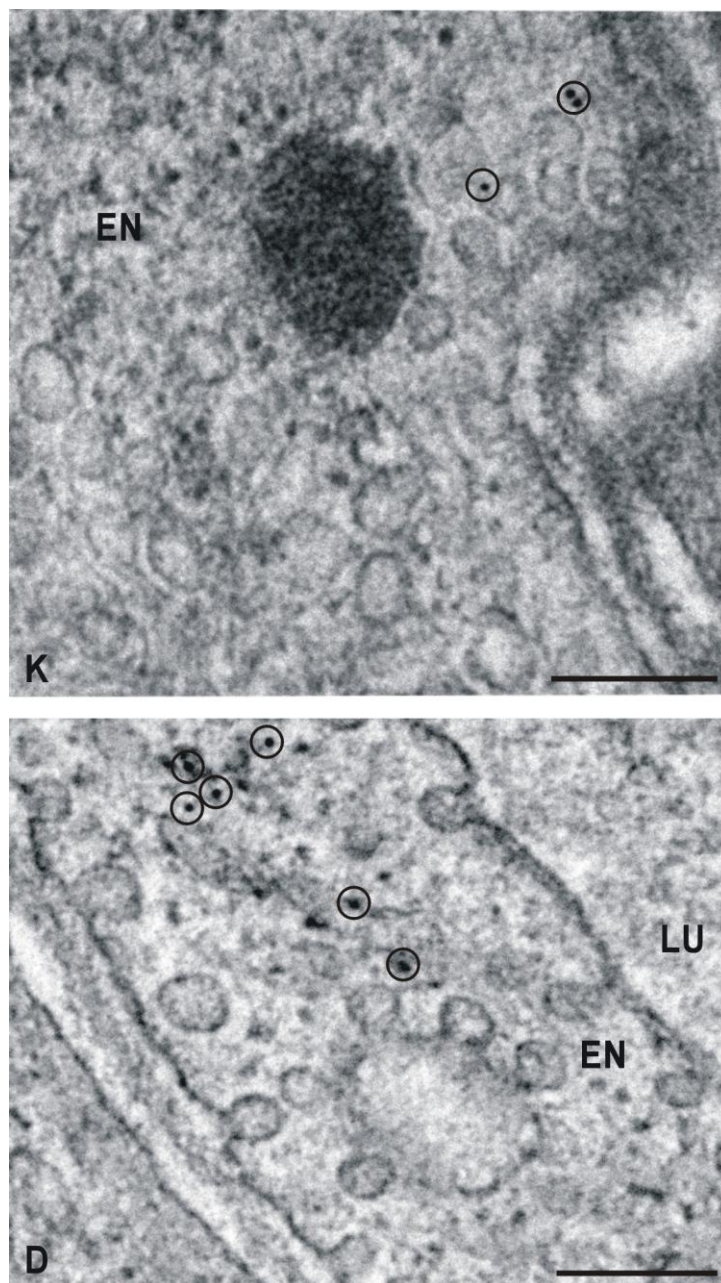
29. ábra Albumint jelölő aranyszemcsék száma a kapillárisok körüli interstitiumban kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. * $p < 0,05$ (kontrollhoz viszonyítva), °° $p < 0,01$ (D és ID között)



30. ábra Albumint jelölő aranyszemcsék megoszlása a kapilláris endothelium és az interstitium között kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban.

IV. 7. Caveolin-1 expresszió vizsgálata

A kapilláris endotheliumban a Cav-1-et jelölő 10 nm-es aranszemcsék többsége a vezikulák membránjához kötődött (31. ábra).

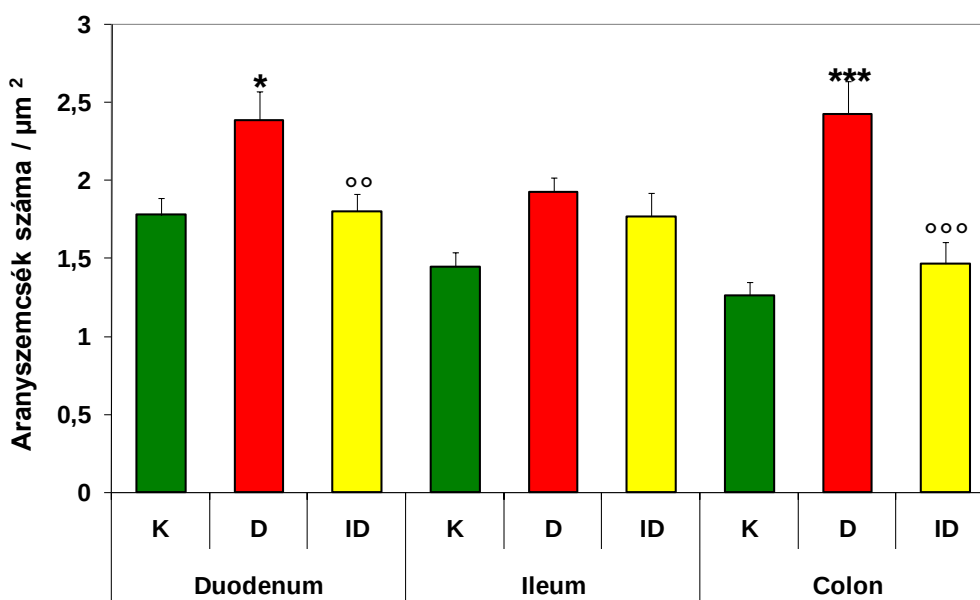


31. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel myentericus plexus közelében futó kapillárisról kontroll patkány ileumából és diabéteszes patkány duodenumából készített ultravékony metszeten Cav-1 postembedding immunhisztokémia után. Lépték: 200 nm. kör-Cav-1-et jelölő 10 nm-es aranszemcsé, EN-endothelsejt, LU-kapilláris lumen

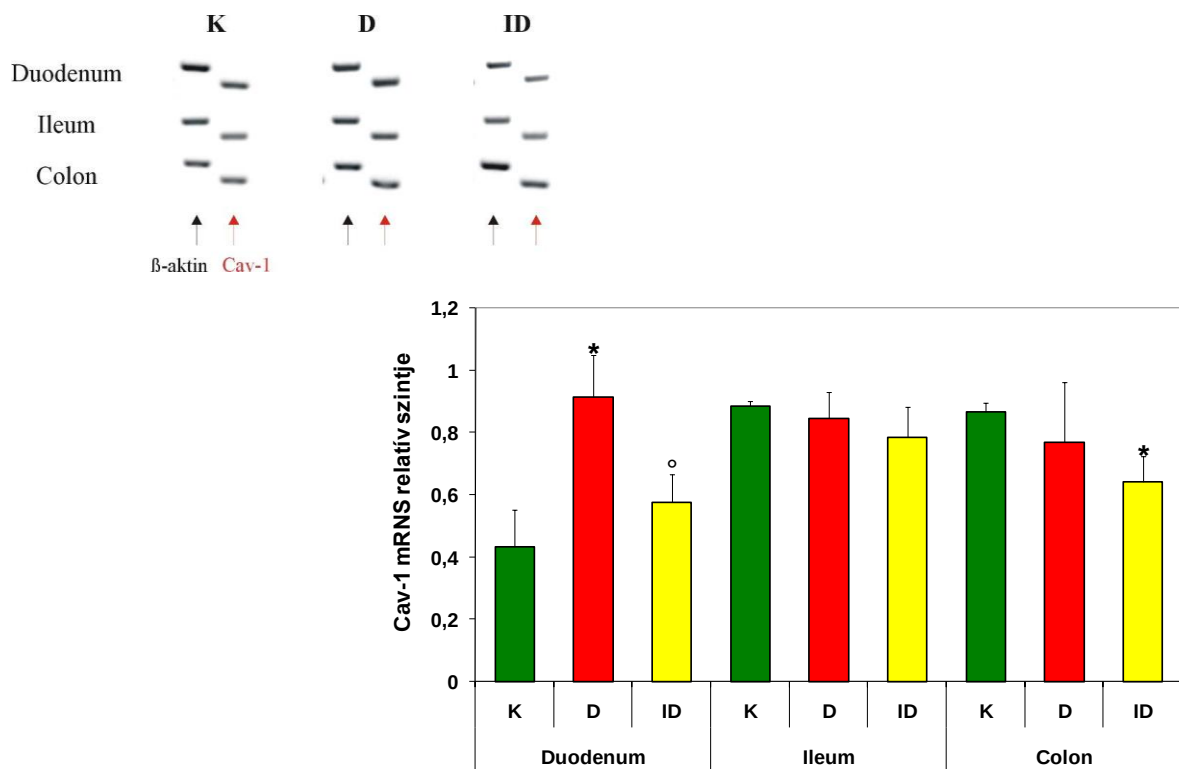
A diabéteszes patkányok duodenumában és colonjában levő mesenterialis erek endothelsejtjeiben a Cav-1-et jelölő arany szemcsék száma szignifikánsan növekedett a kontroll állatcsoportokhoz képest, az ileumban azonban nem volt szignifikáns eltérés (32. ábra). Az azonnali inzulin-kezelés hatására az arany szemcsék száma egyik vizsgált bélszakaszban sem emelkedett a kontroll csoportban számolt értékekhez képest (32. ábra).

A kvantitatív posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatokkal megfigyelt Cav-1 expresszió fokozódást a diabéteszes állatok duodenumában RT-PCR és Western blot vizsgálatokkal is megerősítettük. A Cav-1 mRNS relatív szintje a diabéteszes patkányok duodenumában több mint kétszeresre, a Cav-1 fehérje mennyisége pedig körülbelül 1,5-szeresre emelkedett. A colonban posztembedding immunhisztokémiai módszerrel tapasztalt Cav-1 expresszió növekedést azonban a szövethomogenizátumokban nem sikerült igazolnunk (33-34. ábra). A colonban és az ileumban sem a mRNS, sem a protein mennyisége nem változott a kontroll csoporthoz viszonyítva (33-34. ábra).

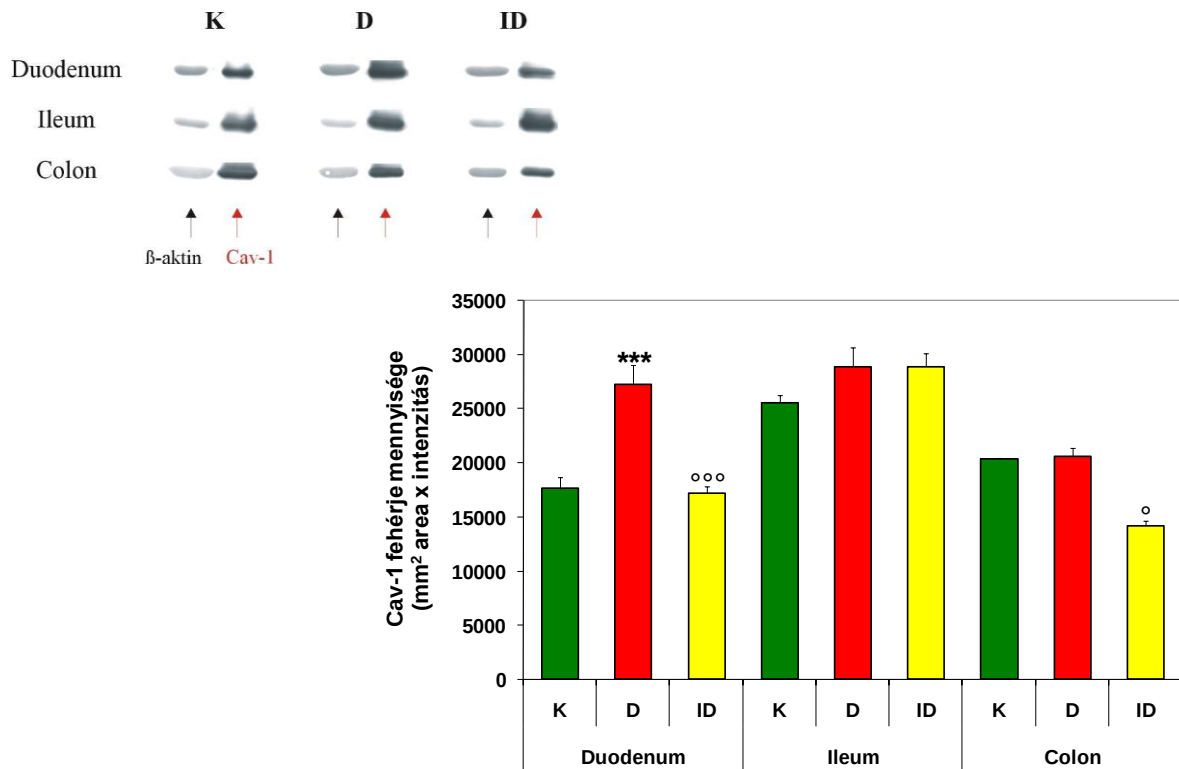
Az inzulin-kezelt diabéteszes patkányok duodenumában a Cav-1 mRNS és fehérje expressziója is a kontroll szintjén volt. A colonból készített szövethomogenizátumokban inzulin-kezelés után a Cav-1 mRNS relatív szintje és a Cav-1 fehérje mennyisége is szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$) (33-34. ábra).



32. ábra Caveolin-1-et jelölő arany szemcsék száma a kapilláris endotheliumban kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (kontrollhoz viszonyítva), °° $p < 0,01$; °°° $p < 0,001$ (D és ID között)



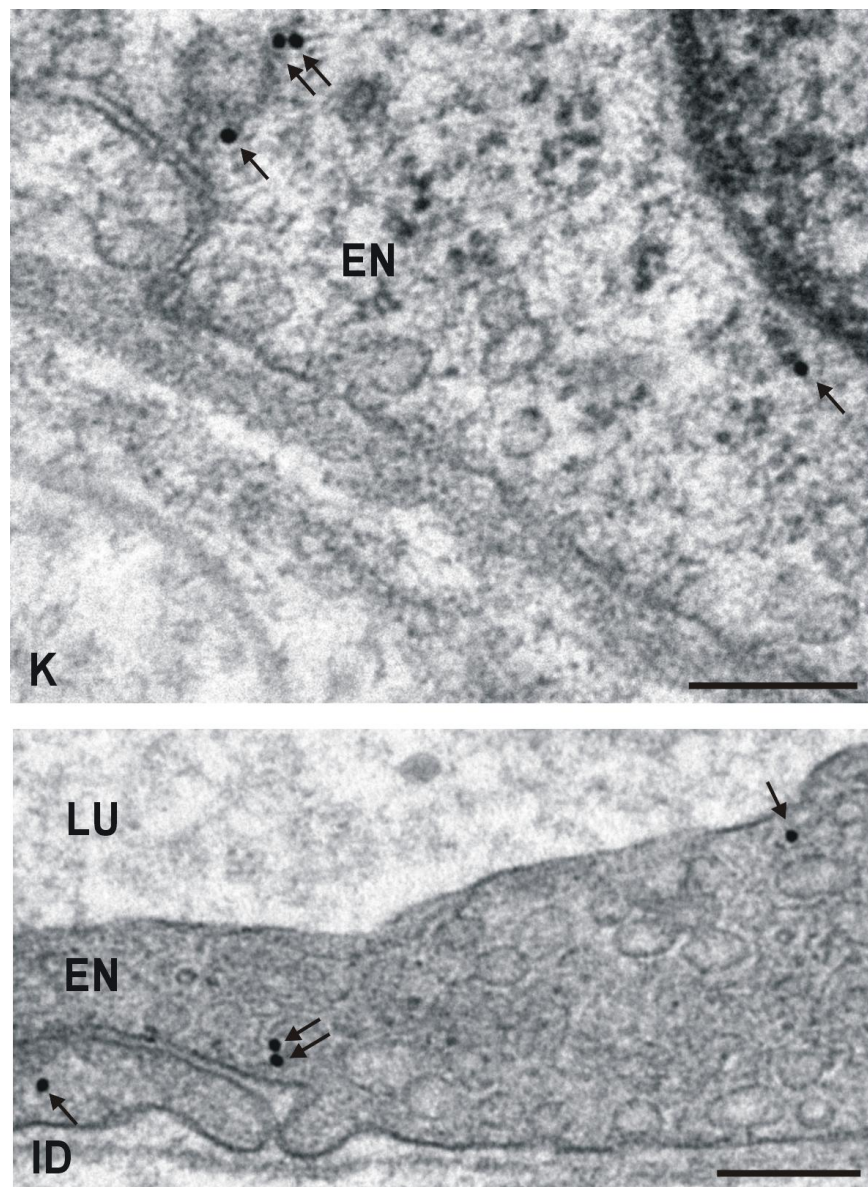
33. ábra Caveolin-1 mRNA relatív szintje kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. *p<0,05 (kontrollhoz viszonyítva), °p<0,05 (D és ID között)



34. ábra Caveolin-1 fehérje mennyisége kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. ***p<0,001 (kontrollhoz viszonyítva), °p<0,05; °°°p<0,001 (D és ID között)

IV. 8. eNOS expresszió vizsgálata

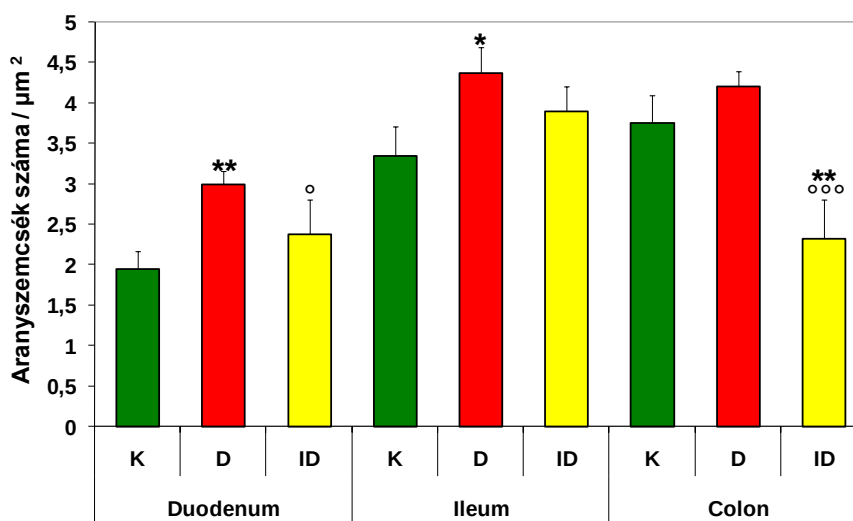
A kapilláris endotheliumban az eNOS-t jelölő 18 nm-es arany szemcsék többsége is a vezikulák membránjához kötődött (35. ábra).



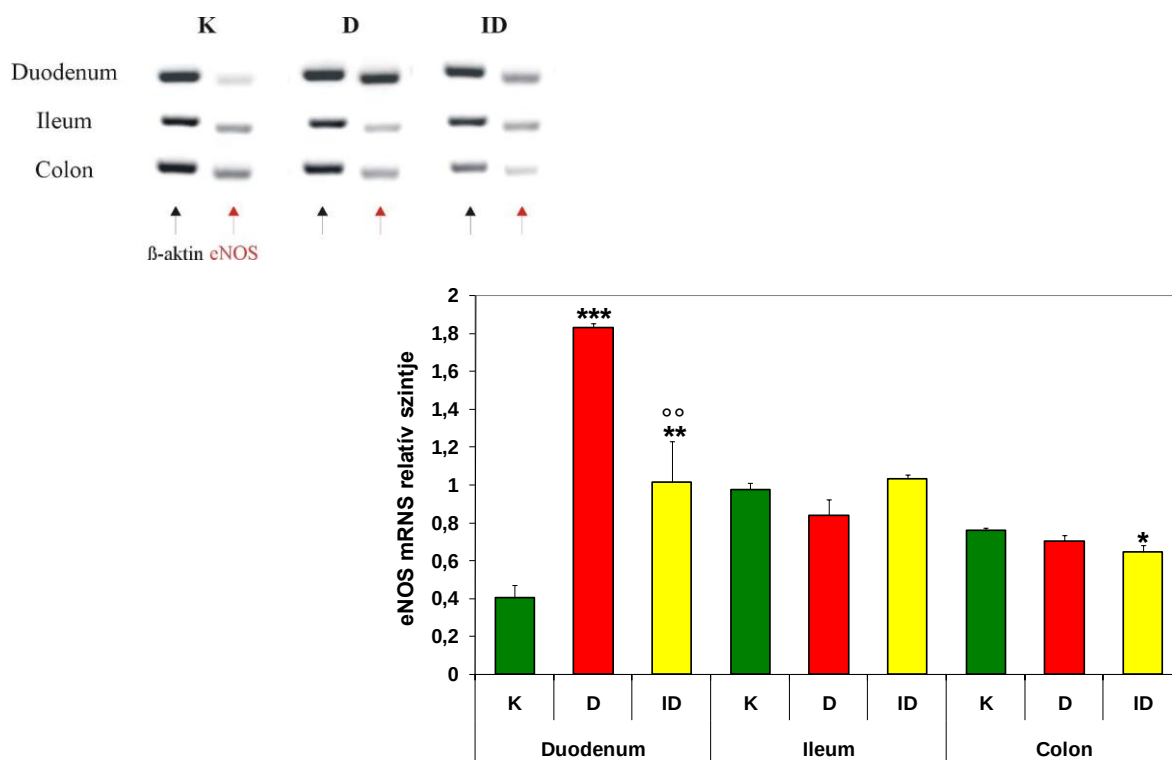
35. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek myentericus plexus közelében futó kapillárisokról kontroll patkány colonjából (K) és inzulin-kezelt diabéteszes állat ileumából (ID) készített ultravékony metszeteken eNOS postembedding immunhisztokémia után. Lépték: 200 nm. nyíl-eNOS-t jelölő 18 nm-es arany szemcse, EN-endothelsejt, LU-kapilláris lumen

A diabéteszes patkányok duodenumában és ileumában a kapilláris endothelium egységnyi területére eső eNOS-t jelölő arany szemcsék száma szignifikánsan megemelkedett a kontroll csoporthoz viszonyítva, míg a colonban ez a növekedés nem volt szignifikáns (36. ábra). Az inzulin-kezelt diabéteszes állatok duodenumában az arany szemcsék száma alacsonyabb volt a kezeletlen diabéteszes állatokéhoz képest ($p < 0,05$), azonban még mindig meghaladta a kontroll szintet. A colon kapillárisainak endotheliumában az inzulin-kezelés hatására szignifikánsan csökkent az arany szemcsék száma ($p < 0,01$) (36. ábra).

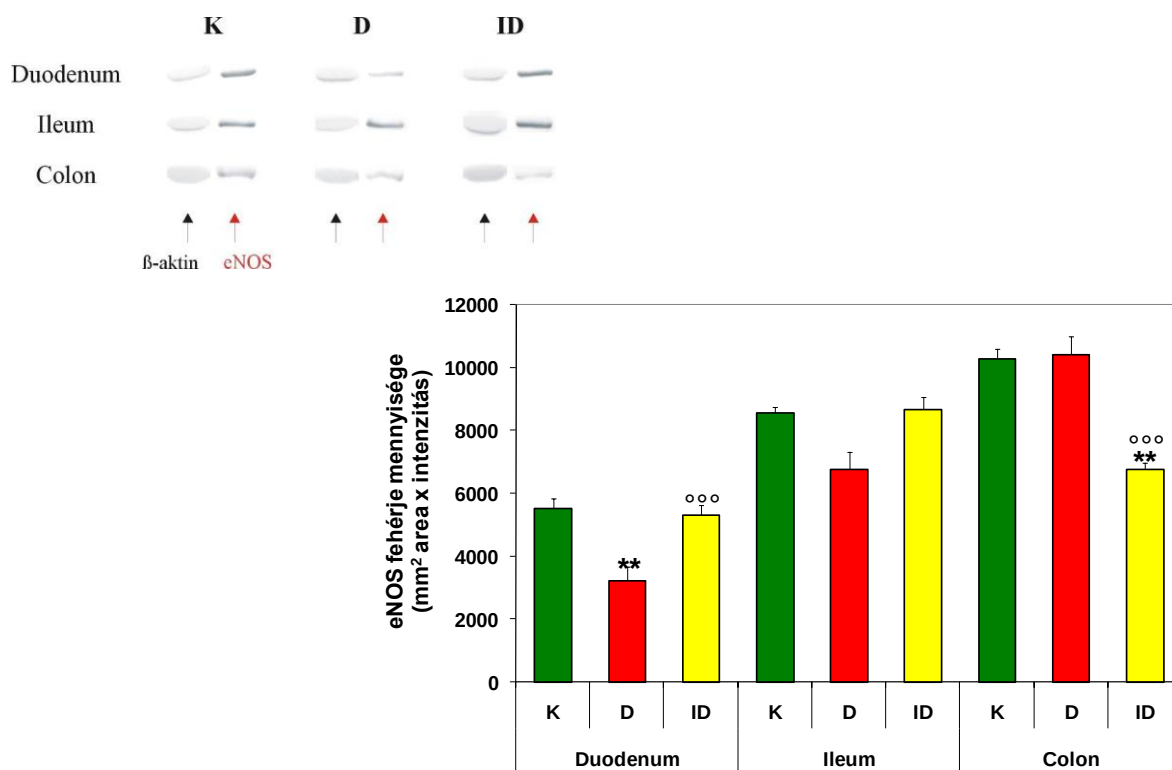
A diabéteszes állatok duodenumából készített szövethomogenizátumokban RT-PCR technikával az eNOS mRNS szintjének fokozódását detektáltuk ($p < 0,001$), azonban Western blot analízissel szignifikánsan alacsonyabb fehérje expressziót igazoltunk ($p < 0,01$). Az eNOS mRNS relatív szintje mintegy 4,5-szeresre emelkedett (37. ábra), ugyanakkor az eNOS fehérje mennyisége körülbelül 40%-kal csökkent a diabéteszes patkányok duodenumában (38. ábra). A diabéteszes állatok ileumában és colonjában a molekuláris vizsgálati módszerekkel nem igazoltunk szignifikáns eltérést a kontroll csoportokhoz képest. Az azonnali inzulin-kezelés a duodenumban megakadályozta a diabétesz okozta mRNS- és fehérje expressziós változásokat, a colonban pedig szignifikánsan csökkentette a mRNS és a protein szintet is (37-38. ábra).



36. ábra eNOS-t jelölő arany szemcsék száma az endotheliumban kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (kontrollhoz viszonyítva), ° $p < 0,05$; °°° $p < 0,001$ (D és ID között)



37. ábra eNOS mRNS relatív szintje kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (kontrollhoz viszonyítva), °°p<0,01 (D és ID között)



38. ábra eNOS fehérje mennyisége kontroll (K), diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. **p<0,01 (kontrollhoz viszonyítva), °°°p<0,001 (D és ID között)

V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Korábbi vizsgálataink során elsőként bizonyítottuk, hogy STZ-nal indukált diabéteszben a bélcsatorna különböző szakaszaiban levő nitrerg myentericus neuronok különböző mértékben sérülnek, s az inzulin-kezelésre is eltérően reagálnak (Izbéki és mtsai., 2008). A diabéteszes nitrerg neuropátia bélszakasz-specifitásának okait keresve feltételeztük, hogy a jelenség hátterében a myentericus ganglionok közelében futó mesenterialis kapillárisok diabéteszszel összefüggő patológiás változása állhat. Ezért munkánk során STZ-nal indukált krónikus diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban megvizsgáltuk a mesenterialis kapillárisok falának strukturális, funkcionális és molekuláris változásait, valamint azt, hogy az azonnali inzulin-kezelés megakadályozza-e a kapillárisfal patológiás elváltozásainak kialakulását. Mivel a szöveti mikrokörnyezet változása (Kumar és mtsai., 2009) szoros kapcsolatban áll a kapillárisok permeabilitásának megváltozásával, munkánk során olyan diabéteszhez köthető strukturális és molekuláris változásokat vizsgáltunk, amelyek akár a transzcitózisban, akár a paracelluláris transzportban változást okozhatnak.

A diabéteszes állatokra jellemző fokozott folyadékfelvételt és vizeletürítést, valamint a coecum hipertrófiáját a laboratóriumunkban előállított kísérleti állatokon is megfigyeltük (Zanoni és mtsai., 2011). Zanoni és mtsai. (1997; 2011) a coecum növekedését 2-, 4- és 8 hónappal a STZ beadása után is leírták. Mivel a coecum fontos szerepet játszik a bél fiziológiás mikroflórájának fenntartásában (Syed és mtsai., 1970), a coecum diabéteszes állatokban tapasztalt hipertrófiája bizonyítja, hogy a diabéteszszel kapcsolatos patológiás elváltozásokhoz különböző gyulladásos folyamatok is hozzájárulnak.

Kísérleteinkben a STZ-indukált diabéteszes patkányokat hyperglykaemia és a testtömeg csökkenése jellemezte. A diabéteszes patkányok vércukor-koncentrációja több mint négyszerese volt a kontroll állatokénak, míg az inzulin-kezelt állatok vércukorszintje a kontroll értékekhez közelített. Az irodalmi adatok egyértelműen azt bizonyítják, hogy a diabétesz során kialakuló endothelialis működészavar elsődleges kiváltó tényezője a hyperglykaemia (Sessa, 2005; Roy és mtsai., 2010b), melynek hatása az erek méretétől és anatómiai helyzetétől függően különbözhet (Mompeo és mtsai., 1998; Vogel, 2006; Roy és mtsai., 2010b). Amíg a nagy erek esetében főleg az atherosclerotikus folyamatok fokozódását figyelték meg, addig a diabéteszes mikroangiopátia sokkal változatosabb képet mutat (Stolar, 2010).

A véredényeket érintő szövődmények közül a legnagyobb klinikai előfordulást a diabéteszes retinopátia és nephropátia mutatja, mely a diabéteszes betegek 35-40%-ánál jelentkezik (Raptis és Viberti, 2001; Henricsson és mtsai., 2003). A hyperglykaemia hatására a retinában és a veseglomerulusokban is megvastagodik az ereket körülvevő BM, fokozódik az extracelluláris mátrix komponensek mennyisége (Lee és mtsai., 2010; Roy és mtsai., 2010a,b), valamint a kapillárisok permeabilitása is (Oshitari és mtsai., 2006). A vesében csökken a podocyták, valamint azok nyúlványainak száma is, ami hiperfiltrációt, fokozott albumin szekréciót okoz (Bjørn és mtsai., 1995; White és mtsai., 2002; Fioretto és Mauer, 2007). A magas vércukorszint ugyanakkor fokozza a ROS képződését, ami különböző útvonalakon keresztül aktiválja többek között a PKC-t, fokozza az AGEs képződését, így az endothelium súlyos működészavarát eredményezi (Nishikawa és mtsai., 2000). Mindemellett a hypoxia hatására diabéteszben magas szinten expresszáldó VEGF (Hammes és mtsai., 1998) ugyancsak fokozza a kapillárisok átteresztőképességét (de Vriese és mtsai., 2001). A retina és a vese glomerulusok kapillárisainak már jól ismert diabéteszes sérülése mellett a diabéteszes patkányok bélcsatornájának kékeslila színezete egyértelműen arra utal, hogy a hyperglykaemia hatására a bélfal mikrokeringésében is komoly változások következnek be.

V. 1. A mesenterialis kapillárisok diabétesz okozta strukturális változásai

Már régóta ismert, hogy a diabéteszt kísérő endothelialis sérülés első morfológiai jele a kapilláris endotheliumot körülvevő BM megvastagodása. A BM sérülése indíthatja el azokat a kaszkádokat, amelyek az endothelium károsodásához és a kapillárisok permeabilitásának fokozódásához vezetnek (Williamson és Kilo, 1976; Oshitari és mtsai., 2006). Az első kísérletes bizonyítékokat arra, hogy a BM vastagodása fokozza a transzendothelialis permeabilitást, azonban csak egy idén megjelent közleményben írták le először (Chronopoulos és mtsai., 2011). A mesenterialis kapillárisokban ezért elsőként mi is a BM morfometriai vizsgálatát végeztük el, s a diabéteszhez kapcsolódó morfológiai változások kvantitatív sajátágaiban a colon-duodenum tengely mentén figyelemre méltó különbségeket találtunk. Míg a diabéteszes állatok colonjában és ileumában az ereket körülvevő BM megvastagodott és eltávolodott az endotheliemtől, addig a duodenum kapillárisaiban a BM morfológiai paraméterei nem tértek el a kontroll állatok duodenumában mért értékektől. A colonban a BM az inzulin-kezelés mellett is

megvastagodott, s elvált az endotheliumtól. Az ileumban azonban inzulin-kezelés után a kontrollhoz hasonló értékeket mértünk.

A BM megvastagodását az extracelluláris mátrix fehérjék kóros felhalmozódása eredményezi, mely egyrészt a BM komponenseit kódoló gének fokozott expressziójából, másrészt a fehérjék degradációjának csökkenéséből származik (Roy és mtsai., 1996; Phillips és mtsai., 1999; Oshitari és mtsai., 2006; Cherian és mtsai., 2009; Roy és mtsai., 2010a,b). A BM-t felépítő fehérjék lebontását a mátrix metalloproteinázok (MMP; matrix metalloproteinase) végzik, és így ezek az enzimek meghatározó szerepet játszanak a BM dinamikus megújulásában (Visse és Nagase, 2003). Hyperglykaemia hatására a veseglomerulusok kapilláris endotheliumában a MMP-2 aktivitása szignifikánsan lecsökkent (Kitsiou és mtsai., 2003), ami a mátrix fehérjék lebontásának csökkenéséhez és a BM megvastagodásához vezetett. A BM elválását az endotheliumtól patológiás körülmények között több szerző is megfigyelte. Schubert és mtsai. (2002) Cav-1 (-/-) knock-out egerek tüdejében, míg Hatanaka és mtsai. (2006) a diabéteszt kísérő fokozott neutrofil aktiváció mellett figyelték meg a BM endotheliumtól való eltávolodását.

A továbbiakban a transzendothelialis transzportban fontos caveolák kvantitatív paramétereit vizsgáltuk. Nagyon hasonlóan a BM diabétesszel összefüggő morfológiai változásaihoz, a colonban az endothelialis vezikuláris kompartmentek irreverzibilis, inzulinnal nem javítható, míg az ileumban annak reverzibilis, inzulinnal megakadályozható hipertrófiáját figyeltük meg. A duodenumban a caveoláris kompartmentek morфомetriai paramétere nem változtak. Mivel a caveolák meghatározóak a makromolekulák transzcitózisában, feltételeztük, hogy a diabéteszes állatok colonjában és ileumában fokozódott a transzendothelialis transzport, s így megváltozott a myentericus ganglionok mikrokörnyezete.

A paracelluláris transzport szabályozásában az endothelsejtek közötti TJk játszanak meghatározó szerepet. A MP közelében futó kapillárisok endothelsejtei között a TJk szélessége a diabéteszes állatok minden bélszakaszában nagyobb volt a kontroll csoportokhoz képest. A colonban az inzulin-kezelés ellenére még tovább növekedett, míg az ileumban és a duodenumban csökkent a nyitott TJk száma. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy diabéteszben a kapilláris endothelsejtek közötti kapcsolatok meggyengültek, a paracelluláris transzport szabályozása felborult. Az irodalmi adatok számos magyarázatot szolgáltatnak a sejtek közötti kapcsolatok diabétesszel összefüggő sérülésére. Diabéteszes állatokban a megnövekedett VEGF termelődés (Murata és mtsai., 1996; Gilbert és mtsai., 1998; Hammes és mtsai., 1998) aktiválja a protein kináz C-t (PKC) (Aiello és mtsai.,

1997), emiatt a TJk fehérjéi hiperfoszforilálódnak, áthelyeződnek a plazmamembránból a citoszolba, degradációjuk felgyorsul (Antonetti és mtsai., 1999), s a paracelluláris transzport fokozódik. Diabéteszes betegekben a magas tumor nekrosis faktor-alfa (TNF- α)-szint a PKC aktivációján keresztül csökkenti a TJk fehérjéinek expresszióját (Aveleira és mtsai., 2010). Antoine és mtsai. (1998) kimutatták, hogy az inzulin idő- és koncentráció-függő módon szintén fokozza a PKC expresszióját. Szteroidok és PKC-gátlók alkalmazása után a TJk fehérjéi gyorsan defoszforilálódnak, visszakerülnek a plazmamembránba és így csökken a kapillárisok átteresztőképessége (Aiello és mtsai., 1997; Antonetti és mtsai., 2002).

V. 2. A mesenterialis kapillárisok diabétesszel összefüggő funkcionális változásai

A továbbiakban kíváncsiak voltunk arra, hogy a kapilláris permeabilitás szabályozásában meghatározó szerepet játszó strukturális elemek, mint a BM, a caveoláris kompartmentek vagy a TJk diabétesszel összefüggő patológiás változásainak vannak-e funkcionális következményei. Diabéteszes patkányok alveoláris kapillárisaiban (Pascariu és mtsai., 2004) és mesenterialis nagy ereiben (Arshi és mtsai., 2000) már korábban leírták az albumin permeabilitás fokozódását. Ezért a MP-t ellátó mesenterialis kapillárisokban mi is vizsgáltuk ezt a paramétert mindhárom kísérleti állatcsoportban. Kvantitatív posztembedding immunhisztokémiai módszerrel követtük nyomon az albumin permeabilitás változását a különböző bélszakaszokon. A diabéteszes állatok minden bélszakaszában, mind a kapillárisok endothelsejtjeiben, mind az interstitiumban növekedett az albumint jelölő arany szemcsék száma.

A számadatok statisztikai analízise azt mutatta, hogy a különböző bélszakaszokban a megnövekedett számú arany szemcse nem egyenletesen oszlott el a két vizsgált kompartmentben. A diabéteszes állatok colonjában a kapillárisok endotheliumában, az ileumban pedig az interstitiumban volt szignifikánsan több albumint jelölő arany szemcse, mint a kontroll állatok azonos kompartmentjeiben. Az arany szemcsék egyenlőtlen megoszlása a két kompartment között azt jelzi, hogy a makromolekuláris transzport egyensúlya felborult, a kapilláris permeabilitás szabályozása sérült. A diabéteszes patkányok duodenumában az arany szemcsék száma a kapillárisok endotheliumában és az interstitiumban is egyformán növekedett. Ez fokozott makromolekuláris transzportra utal

ugyan, de az endothelsejtek szérumban albumin felvétele és annak interstitiumba történő transzportja egyensúlyban van, a transzport jól szabályozott.

Mivel a nitrogén neuronok pusztulását korábban csak a colonban és az ileumban írtuk le, a duodenumban viszont nem (Izbéki és mtsai., 2008), úgy gondoljuk, hogy a patológias mikrokörnyezet nem pusztán a makromolekulák transzportjának fokozódása, hanem azoknak a különböző kompartmentek közötti egyenlőtlen megoszlása miatt alakul ki. Mivel az inzulin a colonban sem a kapillárisok szerkezetes változásait, sem azok funkcionális következményeit nem akadályozta meg, feltételezzük, hogy a diabéteszes állatok bélcsatornájában és különösen a colonban a hyperglykaemia mellett más faktorok is befolyásolják a kapillárisok permeabilitásának megváltozását.

V. 3. A kapilláris endothelium diabéteszsel összefüggő molekuláris változásai

A kapillárisok transzcelluláris és paracelluláris transzportját sokféle bonyolult szignalizációs folyamat szabályozza (Mehta és Malik, 2006; Hu és mtsai., 2008; Simionescu és mtsai., 2009). Ezek közül mi ebben a munkában a Cav-1/eNOS szignalizációs útvonal diabéteszt kísérő változásait tanulmányoztuk. Amellett, hogy a caveolák közvetlenül szükségesek a transzcitózishoz, integráns membránfehérjék révén indirekt szerepet is játszanak a kapilláris permeabilitás szabályozásában. A Cav-1 az eNOS-zal kölcsönhatva a NO termelést is szabályozza (Bucci és mtsai., 2000; Li és mtsai., 2001; 2002; Fish és mtsai., 2005; Sbaa és mtsai., 2005; Komers és mtsai., 2006).

A diabéteszes patkányok colonjában és duodenumában vizsgált kapillárisok endotheliumában posztembedding immunhisztokémia után megnőtt a Cav-1-et jelölő arany szemcsék száma. Ennek alapján feltételeztük, hogy ezeken a bélszakaszokon az endothelsejtekben fokozódott a Cav-1 expressziója. Bár morfológiai vizsgálatokkal a duodenum kapillárisaiban nem igazoltuk a caveolák kvantitatív változásait, a Cav-1 fehérje mennyiségének növekedése önmagában is utalhat a fokozott transzendothelialis transzportra. Bauer és mtsai. (2005) *in vivo* körülmények között is azt tapasztalták, hogy a Cav-1 expresszió fokozódása nem növelte a caveoláris kompartmentek számát. Molekuláris vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a diabéteszes állatok duodenumában a Cav-1 mRNS- és fehérjeszint is növekedett, ami arra utal, hogy a Cav-1 expressziója transzkripcionális szinten szabályozódik. A colonból nyert szövethomogenizátumokban

azonban sem a Cav-1 mRNS fokozódást, sem fehérjeszintű változásokat nem tudunk kimutatni.

A diabéteszes állatok duodenumából készült szövethomogenizátumokban a Cav-1 expresszió fokozódása mellett az eNOS mRNS transzkripciója is fokozódott, a fehérje expressziója azonban csökkent. Ehhez hasonlóan, diabéteszes patkányok vázizmában is az eNOS mRNS és fehérje expressziójának eltérő változását figyelték meg (Perreault és mtsai., 2000; Searles, 2006). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az eNOS szintézis transzkripciósan és poszttranszkripciósan is szabályozott. Ezt a feltételezésünket irodalmi adatok is megerősítik (Tai és mtsai., 2004; Searles, 2006). Számos faktor, köztük a diabéteszes betegekben fokozott mennyiségben jelenlevő TNF- α (Demircan és mtsai., 2006) is hatással van az eNOS expressziójára. Fiziológias állapotban az eNOS mRNS rendkívül stabil, 24-48 órás féléletidővel rendelkezik, ami TNF- α hatására mindössze 3 órára csökken (Li és mtsai., 2002; Tai és mtsai., 2004). Az eNOS mRNS diabéteszben kialakuló instabilitása magyarázatot adhat az eNOS fehérje expresszió csökkenésére és a fokozott transzkripcióra is.

Irodalmi adatok alapján a Cav-1 túltermelődés hatására az eNOS aktivitása csökken (Michel és mtsai., 1997b), ezáltal csökken az eNOS-függő NO termelődése is (Garcia-Cardena és mtsai., 1997; Bucci és mtsai., 2000). Ez feltételezésünk szerint olyan feed-back mechanizmusokat aktiválhat, melyek eredményeként az eNOS transzkripciója fokozódik. Azonban mivel az eNOS dimerek szétkapcsolódása vagy a foszforiláció hiánya miatt az eNOS nemcsak NO-ot, hanem O_2^- -gyököket is generál, így egyáltalán nem garantált az endothelium működésének javulása (Shaul, 2002). Az endothelium szabályozó funkciójának zavara azután beindítja azokat a kaskádokat, amelyek ischaemiát, hypoxiát, majd végül neuropátiát okozhatnak (De Vriese és mtsai., 2000; Rask-Madsen és King, 2005; Simionescu és Antohe, 2006).

V. 4. Következtetések

Eredményeink választ adtak a célkitűzésekben megfogalmazott kérdéseinkre. Diabéteszes állatokban:

I. A kapilláris endotheliumot körülvevő BM bélszakasztól függően megvastagodott és eltávolodott az endotheliumtól.

II. Az endothelsejtek közötti TJk többsége nyitott volt.

III. Az endothelialis caveolák száma és mérete, s ezzel együtt az albumint jelölő arany szemcsék száma is bélszakasztól függően növekedett, a szemcsék endothelium és interstitium közötti megoszlása pedig régió-specifikusan változott. A duodenumból készült szövethomogenizátumokban a Cav-1 mRNS- és fehérjeszint növekedése mellett, az eNOS transzkripció fokozódott, míg a fehérje expressziója csökkent.

IV. Morfológiailag, funkcionálisan és molekuláris szinten is bizonyítottuk, hogy a MP-t ellátó kapillárisok közvetlen célpontjai a diabétesszel együtt járó patológias folyamatoknak. Diabétesz során az egyes bélszakaszokban levő mesenterialis kapillárisok különböző mértékben sérülnek, és így szigorúan régió-specifikus módon szabályozzák a neuronok mikrokörnyezetét, amely azután vagy megengedi, vagy megakadályozza a neuronok életben maradását.

Az általunk megfigyelt patológias változások a colon-ileum-duodenum tengely mentén fokozatosan, grádiens-szerűen alakulnak ki. A colon kapillárisainak endothelsejtjeiben már az első hyperglykaemiás sokk irreverzibilis, azonnali inzulin-kezeléssel sem kivédhető, morfometriai módszerekkel jól mérhető strukturális változásokat okozott. Ugyanezek a változások az ileumban inzulin-kezelés mellett már nem alakultak ki. A diabéteszes állatok duodenális kapillárisainak endotheliumában ugyanakkor a vizsgált morfometriai paraméterek közül csak a TJk nyitódását, s ennek funkcionális következményeként az endogén albumin transzportjának fokozódását tudtuk mérni. A transzport fokozódása azonban, szemben a colonban és az ileumban mért értékekkel, nem változtatta meg az albumin eredeti molekulamegoszlását az endothelium és az interstitium között. Ebből arra következtettünk, hogy a duodenum kapillárisai közelében a myentericus neuronok továbbra is egy „megengedő” környezetben maradtak, ezért számuk, mint ahogy azt a korábbi munkánkban kimutattuk (Izbéki és mtsai., 2008) a colonban és az ileumban számoltakkal ellentétben ezen a bélszakaszon nem csökkent.

Eddigi molekuláris vizsgálataink nem szolgáltatnak elég adatot ahhoz, hogy megnevezhessük azokat a régió-specifikus szabályozási mechanizmusokat, amelyek a megfigyelt, bélszakasztól függő patológiás változásokért felelősek. Saját adatainkat a néhány elérhető korábbi irodalmi adattal összevetve azonban azt feltételezzük, hogy a duodenum „kitüntetett” helyzete, a diabétesz következményeként fellépő patológiás elváltozások késése, vagy akár teljes elmaradása a duodenumban lévő inzulin receptorok nagyobb koncentrációjára, s egyben nagyobb kötő-kapacitására vezethető vissza (Fernandez-Moreno és mtsai., 1987; Gallo-Payet és Hugon, 1984). Úgy gondoljuk, hogy éppen a hatékonyabb inzulinkötés miatt a duodenum kapillárisainak endothelsejtjei jobban és hosszabb ideig képesek tolerálni a STZ-indukált inzulinhiányt. Ezért a STZ-kezelést követő első hyperglykaemiás sokkot a duodenum kapillárisainak endotheliuma morfológiai módszerekkel látható sérülések nélkül éli túl, a BM nem vastagszik meg, a vastagodást kiváltó szignalizációs kaszkádok nem aktiválódnak, s nem indítják el azokat a molekuláris eseményeket, amelyek az endothelium sérüléséhez, szabályozó funkciójának elvesztéséhez, s a neuronális mikrokörnyezet megváltozásához vezetnek. Ezért történhet meg az, hogy amikor a colonban és az ileumban a mikrokörnyezet megváltozása már nem biztosítja a neuronok túlélését, akkor a duodenum kapillárisaiban még aktívak lehetnek azok a molekuláris mechanizmusok, melyek többek között a Cav1/eNOS szignalizációs úton keresztül szabályozzák a biológiai folyamatokhoz szükséges NO optimális mennyiségét, biztosítják az endothelium integritását, a környezetükben lévő neuronok túlélését, s a vaszkuláris homeosztázis fenntartását.

Feltételezéseinket a molekuláris szabályozó mechanizmusok további vizsgálata során nyert adatokkal tervezzük megerősíteni, illetve bizonyítani. Távolabbi célunk az, hogy az entericus ganglionok közelében futó kapillárisok endothelialis funkcióinak megismerésével új diagnosztikai és terápiás eljárások kidolgozásához nyújtsunk elméleti alapokat.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

VI. 1. Magyar nyelvű összefoglalás

A bélcsatorna különböző feladatainak szabályozását egy komplex idegi hálózat, a bélidegrendszer végzi. A bélidegrendszert felépítő neuronok és gliasejtek ganglionált plexusokat hoznak létre, így biztosítják a felszívás, a szekréció és a bélperisztaltika összehangolt működését. A nitrerg myentericus neuronok, melyek a perisztaltikus reflex leszálló gátlását szabályozzák, különösen érintettek a diabétesz során kialakuló neuropátiában. A nitrerg innerváció sérülése meghatározó a különböző gasztrointesztinális motilitási rendellenességek kialakulásában.

Kutatócsoportunk nemrégiben bizonyította, hogy a bélcsatorna különböző szakaszaiban levő nitrerg myentericus neuronok diabétesz hatására különböző mértékben sérülnek, és az azonnali inzulin-kezelésre is eltérően reagálnak. Feltételezésünk szerint a bélszakasz-függő diabéteszes nitrerg neuropátia hátterében a különböző bélszakaszokban levő neuronok eltérő mikrokörnyezete állhat. Ezért munkánk célja az volt, hogy streptozotocin-indukált krónikus diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban tanulmányozzuk a myentericus ganglionok közelében futó mesenterialis kapillárisok diabéteszrel összefüggő patológiás változásait. Az elmúlt években sok adat gyűlt össze a retina, a vese glomerulusok és a tüdő kapillárisok endotheliumának diabéteszt kísérő sérüléséről, azonban a diabétesz hatását a bélfal kapillárisainak endotheliumában alig tanulmányozták.

Munkánk során a myentericus plexus közelében futó kapillárisok endothelsejtjeinek diabéteszt kísérő változásait kontroll, streptozotocinnal indukált diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban vizsgáltuk.

A kapilláris endothelium diabéteszrel összefüggő strukturális változásait elektronmikroszkópos morfometriai módszerekkel vizsgáltuk. Mértük az ereket körülvevő bazális membrán (BM) vastagságát és az endotheliumtól való elválását, meghatároztuk a transzcitózisban kulcsfontosságú vezikulák számát és az egyes caveolák méretét, valamint mértük a paracelluláris transzport szabályozásában fontos, endothelsejtek közötti szoros sejtkapcsolatok (TJk) szélességét.

Diabéteszes állatokban a kapillárisok endothelsejtjeinek strukturális változásai regionális különbségeket mutattak a bélcsatorna hossztengelye mentén. A diabéteszes

állatok colonjában és ileumában a kapillárisok körüli BM megvastagodott és elvált az endotheliумtól, a caveoláris kompartmentek hipertrofizáltak, az endothelsejtek közötti nyitott TJk száma pedig nagymértékben növekedett. Ezek a strukturális változások arra utalnak, hogy mind az endothelsejteken keresztüli, mind az endothelsejtek közötti transzport fokozódik, a transzcitózis és a paracelluláris transzport szabályozása egyaránt felborul. A diabéteszes patkányok duodenumában azonban sem a BM morfológiai paraméterei, sem a caveolák kvantitatív tulajdonságai nem mutattak szignifikáns változást a kontroll állatok duodenumában mért értékekhez képest. A colon kapillárisaiban az endothelsejtek strukturális változásai irreverzibilisek voltak, az endothelium sérülése az inzulin-kezelés mellett is tovább fokozódott. Az ileum kapillárisaiban azonban az endothelsejtek strukturális változásai inzulin-kezelés hatására visszafordíthatóak voltak.

A különböző bélszakaszokban levő kapillárisok strukturális károsodásának funkcionális következményeit kvantitatív elektronmikroszkópos módszerrel vizsgáltuk. Az ultravékony metszeteken albumin ellen termeltetett elsődleges, majd arany-konjugált másodlagos antitest segítségével posztembedding immunhisztokémiai festést végeztünk, majd megszámoltuk a kapilláris endothelsejtjeiben és az interstitiumban levő endogén albumint jelölő aranszemcsék számát.

A diabéteszes állatok minden bélszakaszában, mindkét vizsgált kompartmentben növekedett az albumint jelölő aranszemcsék száma, vagyis a szérum albumin felvétele az endothelsejtekbe, és annak interstitialis térbe történő transzportja egyaránt fokozódott. A diabéteszes állatok colonjában a kapilláris endotheliumban, míg az ileum kapillárisai esetében az interstitiumban volt kifejezettebb az aranszemcsék számának növekedése. Ez arra utal, hogy a makromolekuláris transzport egyensúlya ezekben a bélszakaszokban felborult. A diabéteszes patkányok duodenumában az aranszemcsék mennyisége a kapillárisok endotheliumában és az interstitiumban is ugyanolyan mértékben növekedett, így a kapillárisok albumin permeabilitása ugyan fokozódott, de a két kompartment között a makromolekulák megoszlása egyensúlyban maradt. Az endothelium diabétesszel összefüggő strukturális változásaihoz hasonlóan a colon kapillárisaiban az inzulin-kezelés ellenére sem változott az aranszemcsék egyenlőtlen eloszlása a két kompartment között. Az ileum kapillárisaiban azonban az inzulin-kezelés után helyreállt a makromolekulák transzportjának egyensúlya.

A kapillárisok permeabilitását szabályozó bonyolult szignalizációs folyamatok közül mi a caveolák struktúrfehérjéjének, a Caveolin-1-nek (Cav-1) és a nitrogén-monoxid (NO) termelésben fontos endothelialis nitrogén-monoxid szintáznak (eNOS) a

kölcsönhatását vizsgáltuk. Ehhez kvantitatív elektronmikroszkópos és molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk. Cav-1 és eNOS ellen készített antitestekkel a különböző bélszakaszokból származó ultravékony metszeteken posztembedding immunhisztokémiát végeztünk, majd a kapillárisok endothelsejtjeiben megszámláltuk a Cav-1-et, valamint az eNOS-t jelölő arany szemcséket. Ezt követően a különböző bélszakaszokból származó szövethomogenizátumokban PCR és Western blot technikákkal meghatároztuk a Cav-1 és az eNOS mRNS relatív szintjét, valamint a fehérje mennyiségét.

A diabéteszes patkányok duodenumában posztembedding immunhisztokémia után a Cav-1-et és az eNOS-t jelölő arany szemcsék száma is megnőtt az endothelsejtekben. Molekuláris vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a diabéteszes állatok duodenumában a Cav-1 mRNS és fehérje szint is növekedett, amit az eNOS transzkripciójának fokozódása és a fehérje-expresszió csökkenése kísért. Mindez arra utal, hogy a Cav-1 expressziója transzkripcionális, míg az eNOS expressziója poszttranszkripcionális szinten is szabályozódik. A diabéteszes patkányok colonjából és ileumból nyert szövethomogenizátumokban azonban sem a Cav-1, sem az eNOS esetében nem tudtunk kimutatni molekuláris szintű változásokat. Az inzulin-kezelés megakadályozta a duodenumban tapasztalt expressziós változásokat, valamint szignifikánsan csökkentette a Cav-1 és az eNOS expressziót a colonból készült szövethomogenizátumokban.

Eredményeink választ adnak a célkitűzéseinkben megfogalmazott kérdésekre. Morfológiailag, funkcionálisan és molekuláris szinten is bizonyítottuk, hogy a myentericus ganglionokat ellátó kapillárisok közvetlen célpontjai a diabéteszes károsodásnak. Diabétesz során a különböző bélszakaszokban levő mesenterialis erek különböző mértékben sérülnek, és szigorúan régió-specifikus módon biztosítják a neuronok mikrokörnyezetét.

Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a mesenterialis kapillárisok endotheliumának diabétesszel összefüggő patológiás változásai a colon-ileum-duodenum tengely mentén fokozatosan, több lépésben alakulnak ki. A colon kapillárisaiban a hyperglykaemia kiváltását követő azonnali inzulin-kezelés mellett is irreverzibilis, morfometriai módszerekkel jól mérhető változások alakultak ki. Az ileum kapillárisainak diabéteszes károsodása azonban az inzulin-kezelés hatására visszafordítható volt. A tengely legtávolabbi pontján, a diabéteszes állatok duodenumában a kapillárisok körüli BM és a caveolák morfometriai paraméterei nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll értékektől. A molekuláris vizsgálatok eredményei alapján feltételezzük, hogy ennek hátterében az áll, hogy a duodenumban még működnek azok a molekuláris

mechanizmusok, amelyek szabályozzák az eNOS expresszióját és így a biológiai folyamatokhoz rendelkezésre álló NO mennyiségét. Az endothelsejt eredetű NO optimális szintje ugyanakkor nélkülözhetetlen az endothelium működéséhez, a vaszkuláris homeosztázis és a szöveti mikrokörnyezet fenntartásához.

VI. 2. Summary

The enteric nervous system is considered to be the most complex division of the peripheral nervous system. It regulates all the functions of the gastrointestinal tract. The enteric neurons and glial cells create ganglionic plexuses and direct the processes of absorption, secretion and peristalsis. The nitrergic myenteric neurons, which are responsible for the descendent inhibition of peristaltic reflex, are especially susceptible for developing diabetic neuropathy. Impairment of the nitrergic innervation has a key role in the development of different gastrointestinal motility disorders.

We have recently demonstrated that nitrergic myenteric neurons located in different intestinal segments display different susceptibilities to diabetic damage. They also exhibit different levels of responsiveness to insulin treatment, which indicates the importance of the molecular difference in the neuronal microenvironment in the pathogenesis of diabetic nitrergic neuropathy. Because of their dominant clinical incidence, the diabetes-induced alterations in the microvasculature of the retina, lung and renal glomerulus have been at the focus of a vast number of studies and the permeability of the large mesenteric vessels is known to be modified considerably in diabetic conditions. However, the impact of diabetes on the capillaries within the intestinal wall appears to have been almost completely overlooked to date.

The myenteric ganglia are not vascularized, and it is the role of the capillaries adjacent to the myenteric plexus to supply them with oxygen and nutrients. We therefore presumed that the diabetes-related pathological alterations which influence the permeability of these capillaries coincide with the enteric neuropathy demonstrated in streptozotocin-induced diabetic rats. Therefore, the aim of our work was to investigate the diabetes-related structural, functional and molecular changes in the capillary endothelium in the vicinity of the myenteric ganglia in different intestinal segments.

Electron microscopic morphometry was used to investigate the diabetes-related structural alterations in the capillary endothelium in control, streptozotocin-induced diabetic and insulin-treated diabetic rats. We measured the thickness and the separation of the basement membrane (BM) surrounding the blood vessels, the size of the endothelial caveolar compartments mediating the transcytosis of molecules across the endothelium, and the width of endothelial tight junctions (TJs) which determine paracellular transport processes.

In diabetic animals, the capillary BM was significantly thickened, the distance between the endothelium and the BM was widened and the enlargement of caveolar compartments was demonstrated in the microvessels of the colon and the ileum, but not in the capillary walls in the duodenum. The number of opened TJs was higher in all intestinal segments of diabetic rats. These structural alterations refer to increased transcytosis and paracellular transport in diabetes. Insulin replacement prevented the development of the structural alterations in the capillary walls in the ileum, but not in the colon. In the capillaries of the colon the diabetes-related structural changes increased further as a response to immediate insulin replacement. However, in ileal capillaries all of these structural alterations could be reversed by insulin treatment.

The functional implications of the recorded morphometric data were further tested in relation to the endothelial permeability of the most abundant plasma protein, albumin, by using quantitative post-embedding immunohistochemistry. After using anti-albumin primary antibody and gold-conjugated secondary antibody, the gold particles labelling endogenous albumin were counted in the entire profile of the capillary endothelium and also in the extracellular space and the distribution of gold particles within the two compartments was calculated.

A net increase in the number of gold particles labelling the endogenous albumin was revealed in all three intestinal segments in diabetic rats, so the amount of serum albumin taken up by plasmalemmal vesicles and the transport of it to the interstitium increased in the diabetics as compared to the controls. However, the distribution of the gold particles between the endothelial and interstitial compartments differed significantly in the different gut segments. While in the colon of diabetics more gold particles were counted in the capillary endothelium, in the ileal capillaries the increase in the number of gold particles was most pronounced in the interstitium. These results indicate an impaired regulation of vascular permeability resulting in the breakdown of the balance of macromolecular distribution between the endothelium and the interstitium, and leading to a pathological microenvironment in these intestinal segments. The density of gold particles in the duodenum of the diabetic rats was double both in the endothelium and the interstitium, indicating an accelerated yet rather well-balanced transport of albumin between the two compartments. While the imbalance of albumin transport in the colon capillaries lasted also after insulin replacement, it was restored completely in the capillaries of the ileum.

Investigations are currently in progress in our laboratory to explain the molecular background of the observed regional differences. Vascular permeability is regulated by many complex signalling pathways within endothelial cells. Here, we have initiated an investigation of the diabetes-related changes in pathways which involve the regulation of endothelial cell-derived nitric oxide (NO) production by caveolin-1 (Cav-1). Quantitative post-embedding immunohistochemistry and immunoblot assays were used under different experimental conditions to elucidate the quantitative features of Cav-1 and endothelial NO synthase (eNOS) expression in the capillary beds around the myenteric plexus of different gut segments.

In the duodenum of diabetics the number of gold particles labelled Cav-1 or eNOS increased significantly in the capillary endothelium. At the same time, the diabetes-related up-regulation of Cav-1 mRNA and the Cav-1 protein, the up-regulation of eNOS mRNA and the down-regulation of eNOS protein expression were demonstrated in the duodenal tissue homogenates. These results suggest that the regulation of Cav-1 expression is transcriptional, but that of eNOS is both transcriptional and post-transcriptional. Significant changes in Cav-1 or eNOS expression were not detected in either the ileum or the colon of the diabetic animals. Insulin treatment prevented the molecular alterations in the duodenum and significantly reduced the Cav-1 and eNOS expression in the colon.

Our data provide morphological, functional and molecular evidence indicating that the endothelial cells in capillaries adjacent to the myenteric plexus are direct targets of diabetic damage. These results are in accordance with our hypothesis that the microvessels in particular gut segments are affected differentially by the pathophysiological conditions, and provide the microenvironment for the enteric neurons in a strictly regional manner allowing neurons in one intestinal region to survive while causing them to die in another.

According to our results, the diabetes-related pathological changes in the endothelium of the mesenteric capillaries appear gradually along the colon-ileum-duodenum axis. When the quantitative features of BM and caveolar morphology changed irreversibly in colon-, but reversibly in ileal capillaries, structural alterations in duodenal microvessels were not seen. At the same time the molecular mechanisms associated with the regulation of the amount of bioavailable NO were still active in the duodenal but not in ileal or colonic tissue samples. Therefore, we suggest that capillary endothelium in the duodenum but not in the ileum and colon was able to maintain the vascular homeostasis and accordingly the proper neuronal microenvironment even under the diabetic condition within the period of ten weeks of investigation in the present work.

VII. FELHASZNÁLT IRODALOM

Adeghate E, al-Ramadi B, Saleh AM, Vijayarathay C, Ponery AS, Arafat K, Howarth FC, El-Sharkawy T (2003) Increase in neuronal nitric oxide synthase content of the gastroduodenal tract of diabetic rats. *Cell Mol Life Sci* 60(6):1172-1179.

Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C, Mori F, Ciulla TA, Wachs K, Jirousek M, Smith LE, King GL (1997) Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* 46(9):1473-1480.

Allescher HD, Kurjak M, Huber A, Trudrung P, Schusdziarra V (1996) Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals: evidence for a stimulatory effect of NO. *Am J Physiol* 271(4 Pt 1):G568-574.

American Diabetes Association (2008) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 31 (Suppl 1):S55-60.

Anderson RB, Newgreen DF, Young HM (2006) Neural crest and the development of the enteric nervous system. *Adv Exp Med Biol* 589:181-196.

Anitha M, Gondha C, Sutliff R, Parsadanian A, Mwangi S, Sitaraman SV, Srinivasan S (2006) GDNF rescues hyperglycemia-induced diabetic enteric neuropathy through activation of the PI3K/Akt pathway. *J Clin Invest* 116(2):344-356.

Antoine PJ, Bertrand F, Auclair M, Magré J, Capeau J, Cherqui G (1998) Insulin induction of protein kinase C α expression is independent of insulin receptor Tyr1162/1163 residues and involves mitogen-activated protein kinase kinase 1 and sustained activation of nuclear p44MAPK. *Endocrinology* 139(7):3133-3142.

Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW (1999) Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem* 274(33):23463-23467.

Antonetti DA, Wolpert EB, DeMaio L, Harhaj NS, Scaduto RC Jr (2002) Hydrocortisone decreases retinal endothelial cell water and solute flux coincident with increased content and decreased phosphorylation of occludin. *J Neurochem* 80(4):667-677.

Arshi K, Bendayan M, Ghitescu LD (2000) Alterations of the rat mesentery vasculature in experimental diabetes. *Lab Invest* 80(8):1171-1184.

Auerbach L (1864) Fernere vorläufige Mitteilung über den Nervenapparat des Darmes. *Arch Patol Anat Physiol* 30:457-460.

Aveleira CA, Lin CM, Abcouwer SF, Ambrósio AF, Antonetti DA (2010) TNF- α signals through PKC ζ /NF- κ B to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes* 59(11):2872-2882.

Bagyánszki M, Krecsmarik M, De Winter BY, De Man JG, Fekete E, Pelckmans PA, Adriaensen D, Kroese AB, Van Nassauw L, Timmermans JP (2010) Chronic alcohol consumption affects gastrointestinal motility and reduces the proportion of neuronal NOS-immunoreactive myenteric neurons in the murine jejunum. *Anat Rec (Hoboken)* 293(9):1536-1542.

Bagyánszki M, Torfs P, Krecsmarik M, Fekete E, Adriaensen D, Van Nassauw L, Timmermans JP, Kroese AB (2011) Chronic alcohol consumption induces an

overproduction of NO by nNOS- and iNOS-expressing myenteric neurons in the murine small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 23(6):e237-248.

Barnett AH (1991) Pathogenesis of diabetic microangiopathy: an overview. *Am J Med* 90(6A):67S-73S.

Bauer PM, Yu J, Chen Y, Hickey R, Bernatchez PN, Looft-Wilson R, Huang Y, Giordano F, Stan RV, Sessa WC (2005) Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(1):204-209.

Bauersachs J, Schäfer A (2005) Tetrahydrobiopterin and eNOS dimer/monomer ratio-a clue to eNOS uncoupling in diabetes? *Cardiovasc Res* 65(4):768-769.

Beardsley A, Fang K, Mertz H, Castranova V, Friend S, Liu J (2005) Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement. *J Biol Chem* 280(5):3541-3547.

Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-C1437.

Bjørn SF, Bangstad HJ, Hanssen KF, Nyberg G, Walker JD, Viberti GC, Osterby R (1995) Glomerular epithelial foot processes and filtration slits in IDDM patients. *Diabetologia* 38(10):1197-1204.

Bode-Boger SM, Boger RH, Kienke S, Junker W, Frolich JC (1996) Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginin in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 219:598-603.

Bódi N, Battonyai I, Talapka P, Fekete E, Bagyánszki M (2009) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the myenteric plexus of the duodenum of different mammalian species. *Acta Biol Hung* 60(4):347-358.

Bogers JJ, Pelckmans PA, Boeckxstaens GE, De Man JG, Herman AG, Van Maercke YM (1991) The role of nitric oxide in serotonin-induced relaxations in the canine terminal ileum and ileocolonic junction. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 344(6):716-719.

Bonnefont-Rousselot D (2002) Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5(5):561-568.

Bortolotto LA (2007) Modifications of structural and functional properties of large arteries in diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51(2):176-184.

Bredt DS (1999) Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res* 31(6):577-596.

Bredt DS (2003) Nitric oxide signaling specificity-the heart of the problem. *J Cell Sci* 116 (Pt 1):9-15.

Bredt DS, Snyder SH (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 63:175-195.

Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W (2006) Morphology of VIP/nNOS-immunoreactive myenteric neurons in the human gut. *Histochem Cell Biol* 125(5):557-565.

Brehmer A, Schrödl F, Neuhuber W, Tooyama I, Kimura H (2004) Co-expression pattern of neuronal nitric oxide synthase and two variants of choline acetyltransferase in myenteric neurons of porcine ileum. *J Chem Neuroanat* 27(1):33-41.

Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, Acevedo L, Roviezzo F, Cirino G, Sessa WC (2000) In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med* 6(12):1362-1367.

Bucci M, Roviezzo F, Posadas I, Yu J, Parente L, Sessa WC, Ignarro LJ, Cirino G (2005) Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3):904-908.

Bush TG (2002) Enteric glial cells. An upstream target for induction of necrotizing enterocolitis and Crohn's disease? *Bioessays* 24:130-140.

Bytzer P, Talley NJ, Leemon M, Young LJ, Jones MP, Horowitz M (2001) Prevalence of gastrointestinal symptoms associated with diabetes mellitus: a population-based survey of 15,000 adults. *Arch Intern Med* 161(16):1989-1996.

Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844.

Cellek S (2004) Point of NO return for nitrergic nerves in diabetes: a new insight into diabetic complications. *Curr Pharm Des* 10(29):3683-3695.

Cellek S, Foxwell NA, Moncada S (2003) Two phases of nitrergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 52(9):2353-2362.

Cellek S, Qu W, Schmidt AM, Moncada S (2004) Synergistic action of advanced glycation end products and endogenous nitric oxide leads to neuronal apoptosis in vitro: a new insight into selective nitrergic neuropathy in diabetes. *Diabetologia* 47(2):331-339.

Cellek S, Rodrigo J, Lobos E, Fernández P, Serrano J, Moncada S (1999) Selective nitrergic neurodegeneration in diabetes mellitus - a nitric oxide-dependent phenomenon. *Br J Pharmacol* 128(8):1804-1812.

Cereijido M (1992) Tight junctions. In: Cereijido M, editor. *Evolution of ideas on the tight junction*. Boca Raton, FL: CRC Press; p. 1-3.

Chakrabarti S, Gan XT, Merry A, Karmazyn M, Sima AA (1998) Augmented retinal endothelin-1, endothelin-3, endothelinA and endothelinB gene expression in chronic diabetes. *Curr Eye Res* 17(3):301-307.

Chakrabarti S, Sima AA (1997) Endothelin-1 and endothelin-3-like immunoreactivity in the eyes of diabetic and non-diabetic BB/W rats. *Diabetes Res Clin Pract* 37(2):109-120.

Chandrasekharan B, Anitha M, Blatt R, Shahnavaz N, Kooby D, Staley C, Mwangi S, Jones DP, Sitaraman SV, Srinivasan S (2011) Colonic motor dysfunction in human diabetes is associated with enteric neuronal loss and increased oxidative stress. *Neurogastroenterol Motil* 23(2):131-138, e26.

Chandrasekharan B, Srinivasan S (2007) Diabetes and the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 19:951-960.

Cherian S, Roy S, Pinheiro A, Roy S (2009) Tight glycemic control regulates fibronectin expression and basement membrane thickening in retinal and glomerular capillaries of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(2):943-949.

Choi KM, Gibbons SJ, Nguyen TV, Stoltz GJ, Lurken MS, Ordog T, Szurszewski JH, Farrugia G (2008) Heme oxygenase-1 protects interstitial cells of Cajal from oxidative stress and reverses diabetic gastroparesis. *Gastroenterology* 135(6):2055-2064, 2064.e1-2.

Chronopoulos A, Trudeau K, Roy S, Huang H, Viores SA, Roy S (2011) High glucose-induced altered basement membrane composition and structure increases trans-endothelial permeability: implications for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 36(8):747-753.

Cooke JP (2000) Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:2032-2037.

Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Luscher TF (1998) Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* 101:1530-1537.

Costa M, Brookes SJ, Hennig GW (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 (Suppl 4):iv15-19; discussion iv26.

da Silva GG, Zandoni JN, Buttow NC (2011) Neuroprotective action of Ginkgo biloba on the enteric nervous system of diabetic rats. *World J Gastroenterol* 17(7):898-905.

De Las Casas LE, Finley JL (1999) Diabetic microangiopathy in the small bowel. *Histopathology* 35(3):267-270.

Demircan N, Safran BG, Soylu M, Ozcan AA, Sizmaz S (2006) Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* 20(12):1366-1369.

de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH (2001) Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol* 12(5):993-1000.

De Vriese AS, Verbeuren TJ, Van de Voorde J, Lameire NH, Vanhoutte PM (2000) Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol* 130(5):963-974.

Di Nardo G, Blandizzi C, Volta U, Colucci R, Stanghellini V, Barbara G, Del Tacca M, Tonini M, Corinaldesi R, De Giorgio R (2008) Review article: molecular, pathological and therapeutic features of human enteric neuropathies. *Aliment Pharmacol Ther* 28(1):25-42.

Du F, Wang L, Qian W, Liu S (2009) Loss of enteric neurons accompanied by decreased expression of GDNF and PI3K/Akt pathway in diabetic rats. *Neurogastroenterol Motil* 21(11):1229-e114.

Durán WN, Sánchez FA, Breslin JW (2011) Microcirculatory Exchange Function. *Compr Physiol Supplement 9: Handbook of Physiology, The Cardiovascular System, Microcirculation*: 81-124. First published in print 2008.

Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H (1989) Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 170(4):1387-1407.

Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W (1998) Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 111 (Pt 13):1853-1865.

Evans T, Deng DX, Chen S, Chakrabarti S (2000) Endothelin receptor blockade prevents augmented extracellular matrix component mRNA expression and capillary basement membrane thickening in the retina of diabetic and galactose-fed rats. *Diabetes* 49(4):662-666.

Fernandez-Moreno MD, Serrano-Rios M, Prieto JC (1987) Identification of insulin receptors in epithelial cells from duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon and rectum in the rat. *Diabete Metab* 13(2):135-139.

Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* 271:22810-22814.

Figuerola-Romero C, Sadidi M, Feldman EL (2008) Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 9(4):301-314.

Fioretto P, Mauer M (2007) Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 27(2):195-207.

Fish JE, Matouk CC, Rachlis A, Lin S, Tai SC, D'Abreo C, Marsden PA (2005) The expression of endothelial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J Biol Chem* 280(26):24824-24838.

Fortes ZB, Garcia Leme J, Scivoletto R (1983) Vascular reactivity in diabetes mellitus: role of the endothelial cell. *Br J Pharmacol* 79(3):771-781.

Frank PG, Marcel YL, Connelly MA, Lublin DM, Franklin V, Williams DL, Lisanti MP (2002) Stabilization of caveolin-1 by cellular cholesterol and scavenger receptor class B type I. *Biochemistry* 41(39):11931-11940.

Frank PG, Pavlides S, Lisanti MP (2009) Caveolae and transcytosis in endothelial cells: role in atherosclerosis. *Cell Tissue Res* 335(1):41-47.

Fujimoto T, Kogo H, Nomura R, Une T (2000) Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci* 113 (Pt 19):3509-3517.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399(6736):597-601.

Fulton D, Gratton JP, Sessa WC (2001) Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? *J Pharmacol Exp Ther* 299:818-824.

Furness JB (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 81(1-3): 87-96.

Furness JB (2006) The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Auton Neurosci* 130(1-2):1-5.

Furness JB (2007) Enteric nervous system. *Scholarpedia*, 2(10):4064.

Furness JB, Costa M (1987) The enteric nervous system. Edinburgh, Churchill Livingstone.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141(7):1539-1550.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123(6 Pt 2):1777-1788.

Gabella G (1972) Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat* 111 (Pt 1):69-97.

Gabella G (1987) Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract. In: Physiology of the gastrointestinal tract. 2nd ed. Ed: Johnson LR, Raven Press, New York. pp. 335-381.

Gallo-Payet N, Hugon JS (1984) Insulin receptors in isolated adult mouse intestinal cells: studies in vivo and in organ culture. *Endocrinology* 114(5):1885-1892.

García-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392(6678):821-824.

Garcia-Cardena G, Fan R, Stern DF, Liu J, Sessa WC (1996) Endothelial nitric oxide is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J Biol Chem* 271:27237-27240.

Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters BS, Skidd PM, Couet J, Li S, Lisanti MP, Sessa WC (1997) Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo. *J Biol Chem* 272:25437-25440.

Gärtner V, Eigentler TK (2008) Pathogenesis of diabetic macro- and microangiopathy. *Clin Nephrol* 70(1):1-9.

Gershon MD (1999) The enteric nervous system: a second brain. *Hosp Pract (Minneap)* 34(7):31-32, 35-38, 41-42 passim.

Gershon MD, Kirchgessner AL, Wade PR (1994) Physiology of the Gastrointestinal Tract (Vol. 1). New York, Raven Press, pp 381-422.

Ghitescu L, Fixman A, Simionescu M, Simionescu N (1986) Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J Cell Biol* 102(4):1304-1311.

Gilbert RE, Vranes D, Berka JL, Kelly DJ, Cox A, Wu LL, Stacker SA, Cooper ME (1998) Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rat eyes. *Lab Invest* 78(8):1017-1027.

Gilmont RR, Dardano A, Young M, Engle JS, Adamson BS, Smith DJ Jr, Rees RS (1998) Effects of glutathione depletion on oxidant-induced endothelial cell injury. *J Surg Res* 80(1):62-68.

Gimbrone MA Jr (1989) Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *J Card Surg* 4:180-183.

Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G (2000) Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 902:230-239; discussion 239-240.

Govers R, Rabelink TJ (2001) Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 280(2):F193-206.

Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC (2004) Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res* 94(11):1408-1417.

Guo M, Breslin JW, Wu MH, Gottardi CJ, Yuan SY (2008) VE-cadherin and beta-catenin binding dynamics during histamine-induced endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol Cell Physiol* 294(4):C977-984.

Guo Z, Hou F, Zhang X, Liu Z, Wang L (2002) Advanced glycation endproducts inhibit production of nitric oxide by human endothelial cells through activation of the p38 signal pathway. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 82:1328-1331.

Hammes HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G (1998) Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes* 47(3):401-406.

Hatanaka E, Monteagudo PT, Marrocos MS, Campa A (2006) Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Clin Exp Immunol* 146(3):443-447.

He CL, Soffer EE, Ferris CD, Walsh RM, Szurszewski JH, Farrugia G (2001) Loss of interstitial cells of Cajal and inhibitory innervation in insulin-dependent diabetes. *Gastroenterology* 121:427-434.

Hellermann GR, Solomonson LP (1997) Calmodulin promotes dimerization of the oxygenase domain of human endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 272(18):12030-12034.

Henricsson M, Nyström L, Blohmé G, Ostman J, Kullberg C, Svensson M, Schölin A, Arnqvist HJ, Björk E, Bolinder J, Eriksson JW, Sundkvist G (2003) The incidence of retinopathy 10 years after diagnosis in young adult people with diabetes: results from the nationwide population-based Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS). *Diabetes Care* 26(2):349-354.

Hens J, Vanderwinden JM, De Laet MH, Scheuermann DW, Timmermans JP (2001) Morphological and neurochemical identification of enteric neurones with mucosal projections in the human small intestine. *J Neurochem* 76(2):464-471.

Hill D, Fisher M (2010) The effect of intensive glycaemic control on cardiovascular outcomes. *Diabetes Obes Metab* 12(8):641-647.

Holle GE, Dietl J, Demir I (2003) Influence of the intramural innervation on the morphogenesis of the enteroendocrine cells and the genetic construct involved (review). *Int J Mol Med* 11(3):275-285.

Honoré SM, Zelarayan LC, Genta SB, Sánchez SS (2011 Jul 5) Neuronal loss and abnormal BMP/Smad signaling in the myenteric plexus of diabetic rats. *Auton Neurosci* [Epub ahead of print].

Hracsko Z, Hermes E, Ferencz A, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS (2009) Endothelial nitric oxide synthase is up-regulated in the umbilical cord in pregnancies complicated with intrauterine growth retardation. *In Vivo* 23(5):727-732.

Hu G, Minshall RD (2009) Regulation of transendothelial permeability by Src kinase. *Microvasc Res* 77(1):21-25.

Hu G, Vogel SM, Schwartz DE, Malik AB, Minshall RD (2008) Intercellular adhesion molecule-1-dependent neutrophil adhesion to endothelial cells induces caveolae-mediated pulmonary vascular hyperpermeability. *Circ Res* 102(12):e120-131.

Ibba-Manneschi L, Martini M, Zecchi-Orlandini S, Faussone-Pellegrini MS (1995) Structural organization of enteric nervous system in human colon. *Histol Histopathol* 10(1):17-25.

Izbéki F, Wittman T, Rosztóczy A, Linke N, Bódi N, Fekete E, Bagyánszki M (2008) Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic

neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 80(2):192-198.

Jarvinen MK, Wollmann WJ, Powrozek TA, Schultz JA, Powley TL (1999) Nitric oxide synthase-containing neurons in the myenteric plexus of the rat gastrointestinal tract: distribution and regional density. *Anat Embryol (Berl)* 199(2):99–112.

Ju H, Zou R, Venema VJ, Venema RC (1997) Direct interaction of endothelial nitric-oxide synthase and caveolin-1 inhibits synthase activity. *J Biol Chem* 272(30):18522-18525.

Kashyap P, Farrugia G (2011) Oxidative stress: key player in gastrointestinal complications of diabetes. *Neurogastroenterol Motil* 23(2):111–114.

Keränen U, Vanhatalo S, Kiviluoto T, Kivilaakso E, Soinila S (1995) Co-localization of NADPH diaphorase reactivity and vasoactive intestinal polypeptide in human colon. *J Auton Nerv Syst* 54(3):177-183.

Kim MJ, Dawes J, Jessup W (1994) Transendothelial transport of modified low-density lipoproteins. *Atherosclerosis* 108(1):5-17.

King GL, Johnson SM (1985) Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science* 227(4694):1583-1586.

Kirchgessner AL, Gershon MD (1990) Innervation of the pancreas by neurons in the gut. *J Neurosci* 10(5):1626-1642.

Kitsiou PV, Tzinia AK, Stetler-Stevenson WG, Michael AF, Fan WW, Zhou B, Tsilibary EC (2003) Glucose-induced changes in integrins and matrix-related functions in cultured human glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(4):F671-679.

Komers R, Schutzer WE, Reed JF, Lindsley JN, Oyama TT, Buck DC, Mader SL, Anderson S (2006) Altered endothelial nitric oxide synthase targeting and conformation and caveolin-1 expression in the diabetic kidney. *Diabetes* 55(6):1651-1659.

Kone BC (2000) Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiol Scand* 168(1):27-31.

Korenaga K, Micci MA, Taglialatela G, Pasricha PJ (2006) Suppression of nNOS expression in rat enteric neurones by the receptor for advanced glycation end-products. *Neurogastroenterol Motil* 18(5):392–400.

Krecsmarik M, Izbéki F, Bagyánszki M, Linke N, Bódi N, Kaszaki J, Katarova Z, Szabó A, Fekete E, Wittmann T (2006) Chronic ethanol exposure impairs neuronal nitric oxide synthase in the rat intestine. *Alcohol Clin Exp Res* 30(6):967-973.

Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY (2009) Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med* 11:e19.

Kwiatek AM, Minshall RD, Cool DR, Skidgel RA, Malik AB, Tiruppathi C (2006) Caveolin-1 regulates store-operated Ca²⁺ influx by binding of its scaffolding domain to transient receptor potential channel-1 in endothelial cells. *Mol Pharmacol* 70(4):1174-1183.

Langley JN (1921) *The autonomic nervous system-part 1*. Heffer, Cambridge.

Laursen JB, Somers M, Kurz S, McCann L, Warnholtz A, Freeman BA, Tarpey M, Fukai T, Harrison DG (2001) Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient

mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103:1282-1288.

Leal EC, Martins J, Voabil P, Liberal J, Chiavaroli C, Bauer J, Cunha-Vaz J, Ambrósio AF (2010) Calcium dobesilate inhibits the alterations in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes. *Diabetes* 59(10):2637-2645.

Lee JH, Bahk JH, Park SH, Huh J (2011) The diabetes-induced functional and distributional changes of the alpha 1-adrenoceptor of the abdominal aorta and distal mesenteric artery from streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Anesthesiol* 60(4):272-281.

Lee SE, Ma W, Rattigan EM, Aleshin A, Chen L, Johnson LL, D'Agati VD, Schmidt AM, Barile GR (2010) Ultrastructural features of retinal capillary basement membrane thickening in diabetic swine. *Ultrastruct Pathol* 34(1):35-41.

Lefebvre RA (1995) Nitric oxide in the peripheral nervous system. *Ann Med* 27:379-388.

LePard KJ (2005) Choline acetyltransferase and inducible nitric oxide synthase are increased in myenteric plexus of diabetic guinea pig. *Auton Neurosci* 118:12-24.

Li H, Brodsky S, Basco M, Romanov V, De Angelis DA, Goligorsky MS (2001) Nitric oxide attenuates signal transduction: possible role in dissociating caveolin-1 scaffold. *Circ Res* 88(2):229-236.

Li H, Wallerath T, Förstermann U (2002) Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide* 7(2):132-147.

Li XA, Everson W, Smart EJ (2006) Nitric oxide, caveolae, and vascular pathology. *Cardiovasc Toxicol* 6(1):1-13.

Liu VW, Huang PL (2008) Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 77(1):19-29.

Liu W, Yue W, Wu R (2010) Effects of diabetes on expression of glial fibrillary acidic protein and neurotrophins in rat colon. *Auton Neurosci* 154(1-2):79-83.

Ljubimov AV, Burgeson RE, Butkowski RJ, Couchman JR, Zardi L, Ninomiya Y, Sado Y, Huang ZS, Nesburn AB, Kenney MC (1996) Basement membrane abnormalities in human eyes with diabetic retinopathy. *J Histochem Cytochem* 44(12):1469-1479.

Lomax AE, Furness JB (2000) Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res* 302(1):59-72.

Lomax AE, Linden DR, Mawe GM, Sharkey KA (2006) Effects of gastrointestinal inflammation on enteroendocrine cells and enteric neural reflex circuits. *Auton Neurosci-Basic* 126-127:250-257.

Lomax AE, Mawe GM, Sharkey KA (2005) Synaptic facilitation and enhanced neuronal excitability in the submucosal plexus during experimental colitis in guinea-pig. *J Physiol* 564(Pt 3):863-875.

Majno G, Palade GE (1961) Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* 11:571-605.

Maleki D, Locke GR, 3rd, Camilleri M, Zinsmeister AR, Yawn BP, Leibson C, Melton LJ 3rd (2000) Gastrointestinal tract symptoms among persons with diabetes mellitus in the community. *Arch Intern Med* 160(18):2808-2816.

Martinez-Cuesta MA, Massuda H, Whittle BJ, Moncada S (1995) Impairment of nitrenergic-mediated relaxation of rat isolated duodenum by experimental diabetes. *Br J Pharmacol* 114:919-924.

Martinez-Hernandez A, Amenta PS (1983) The basement membrane in pathology. *Lab Invest* 48(6):656-677.

Mashimo H, He XD, Huang PL, Fishman MC, Goyal RK (1996) Neuronal constitutive nitric oxide synthase is involved in murine enteric inhibitory neurotransmission. *J Clin Invest* 98(1):8-13.

Mehta D, Malik AB (2006) Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 86(1):279-367.

Meissner G (1857) Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med N F* 8:364-366.

Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997a) Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272:15583-15586.

Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T (1997b) Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272:25907-25912.

Michel T, Feron O (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100(9):2146-2152.

Michel T, Vanhoutte PM (2010) Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch* 459(6):807-816.

Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Malik AB (2002) Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem Cell Biol* 117(2):105-112.

Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Niles WD, Gilchrist A, Hamm HE, Malik AB (2000) Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J Cell Biol* 150(5):1057-1070.

Moens AL, Kass DA (2006) Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(11):2439-2444.

Mompeo B, Popov D, Sima A, Constantinescu E, Simionescu M (1998) Diabetes-induced structural changes of venous and arterial endothelium and smooth muscle cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 30(4):475-484.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-141.

Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K (1996) The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest* 74(4):819-825.

Nakamura T, Ebihara I, Fukui M, Tomino Y, Koide H (1995) Effect of a specific endothelin receptor A antagonist on mRNA levels for extracellular matrix components and growth factors in diabetic glomeruli. *Diabetes* 44(8):895-899.

Newgreen D, Young HM (2002a) Enteric nervous system: development and developmental disturbances-part 1. *Pediatr Dev Pathol* 5(3):224-247.

Newgreen D, Young HM (2002b) Enteric nervous system: development and developmental disturbances-part 2. *Pediatr Dev Pathol* 5(4):329-349.

Nezami BG, Srinivasan S (2010) Enteric nervous system in the small intestine: pathophysiology and clinical implications. *Curr Gastroenterol Rep* 12(5):358-365.

Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M (2000) The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl* 77:S26-30.

Noguchi Y, Yamamoto T, Shibata Y (1986) Distribution of endothelial vesicles in the microvasculature of skeletal muscle and brain cortex of the rat, as demonstrated by tannic acid tracer analysis. *Cell Tissue Res* 246(3):487-494.

Oh P, Borgström P, Witkiewicz H, Li Y, Borgström BJ, Chrastina A, Iwata K, Zinn KR, Baldwin R, Testa JE, Schnitzer JE (2007) Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nat Biotechnol* 25(3):327-337.

Okamoto MM, Anhê GF, Silva RS, Ferreira Marques MF, Freitas HS, Mori RC, Melo KF, Machado UF (2011 Jul 11) Intensive insulin treatment induces insulin resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. *J Endocrinol* [Epub ahead of print].

Olsson C, Holmgren S (2010 Aug 17) Autonomic control of gut motility: A comparative view. *Auton Neurosci* [Epub ahead of print].

Onat A (2011 Jul 15) Metabolic syndrome: nature, therapeutic solutions and options. *Expert Opin Pharmacother* [Epub ahead of print].

Ordog T, Takayama I, Cheung WK, Ward SM, Sanders KM (2000) Remodeling of networks of interstitial cells of Cajal in a murine model of diabetic gastroparesis. *Diabetes* 49(10):1731-1739.

Orvosi Helyesírási Szótár (1992) Akadémiai Kiadó, Bp., Főszerk: Fábián P, Magasi P.

Oshitari T, Polewski P, Chadda M, Li AF, Sato T, Roy S (2006) Effect of combined antisense oligonucleotides against high-glucose- and diabetes-induced overexpression of extracellular matrix components and increased vascular permeability. *Diabetes* 55(1):86-92.

Palade GE (1953) Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys* 24:1424.

Palade GE, Bruns RR (1968) Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J Cell Biol* 37(3):633-649.

Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD (2000) Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275(25):19139-19145.

Pascariu M, Bendayan M, Ghitescu L (2004) Correlated endothelial caveolin overexpression and increased transcytosis in experimental diabetes. *J Histochem Cytochem* 52(1):65-76.

Patel HH, Murray F, Insel PA (2008) Caveolae as Organizers of Pharmacologically Relevant Signal Transduction Molecules. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:359-391.

Paulsson M (1992) Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27(1-2):93-127.

Pereira RV, de Miranda-Neto MH, da Silva Souza ID, Zanoni JN (2008) Vitamin E supplementation in rats with experimental diabetes mellitus: analysis of myosin-V and nNOS immunoreactive myenteric neurons from terminal ileum. *J Mol Histol* 39(6):595-603.

Pereira RV, Tronchini EA, Tashima CM, Alves EP, Lima MM, Zanoni JN (2011 Jun 28) L-Glutamine Supplementation Prevents Myenteric Neuron Loss and Has Gliatrophic Effects in the Ileum of Diabetic Rats. *Dig Dis Sci* [Epub ahead of print].

Perreault M, Dombrowski L, Marette A (2000) Mechanism of impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 43(4):427-437.

Pfeifer MA, Schumer MP (1994) Cardiovascular autonomic neuropathy. Where have we been and where are we going? *Diabetes Care* 17(12):1545-1546.

Phillips AO, Morrissey K, Steadman R, Williams JD (1999) Decreased degradation of collagen and fibronectin following exposure of proximal cells to glucose. *Exp Nephrol* 7(5-6):449-462.

Phillips RJ, Powley TL (2007) Innervation of the gastrointestinal tract: patterns of aging. *Auton Neurosci* 136(1-2):1-19.

Popov D, Hasu M, Costache G, Stern D, Simionescu M (1997) Capillary and aortic endothelia interact in situ with nonenzymatically glycated albumin and develop specific alterations in early experimental diabetes. *Acta Diabetol* 34(4):285-293.

Porter GA, Bankston PW (1987) Maturation of myocardial capillaries in the fetal and neonatal rat: an ultrastructural study with a morphometric analysis of the vesicle populations. *Am J Anat* 178(2):116-125.

Predescu D, Palade GE (1993) Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium. *Am J Physiol* 265(2 Pt 2):H725-733.

Predescu D, Predescu S, Shimizu J, Miyawaki-Shimizu K, Malik AB (2005) Constitutive eNOS-derived nitric oxide is a determinant of endothelial junctional integrity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(3):L371-381.

Predescu D, Vogel SM, Malik AB (2004) Functional and morphological studies of protein transcytosis in continuous endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(5):L895-901.

Predescu SA, Predescu DN, Palade GE (2001) Endothelial transcytotic machinery involves supramolecular protein-lipid complexes. *Mol Biol Cell* 12(4):1019-1033.

Qu ZD, Thacker M, Castelucci P, Bagyánszki M, Epstein ML, Furness JB (2008) Immunohistochemical analysis of neuron types in the mouse small intestine. *Cell Tissue Res* 334(2):147-161.

Raptis AE, Viberti G (2001) Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109(Suppl 2):S424-437.

Rask-Madsen C, King GL (2005) Proatherosclerotic mechanisms involving protein kinase C in diabetes and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(3):487-496.

Rask-Madsen C, King GL (2007) Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 3(1):46-56.

Ratcliffe EM (2011) Molecular development of the extrinsic sensory innervation of the gastrointestinal tract. *Auton Neurosci* 161(1-2):1-5.

Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, Macaluso F, Russell RG, Li M, Pestell RG, Di Vizio D, Hou H Jr, Kneitz B, Lagaud G, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP (2001) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 276(41):38121-38138.

Razani B, Woodman SE, Lisanti MP (2002) Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54(3):431-467.

Reber KM, Su BY, Clark KR, Pohlman DL, Miller CE, Nowicki PT (2002) Developmental expression of eNOS in postnatal swine mesenteric artery. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(6):G1328-1335.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate as an electron dense stain in electronmicroscopy. *J Cell Biol* 17:208-212.

Richter K, Buchner J (2001) Hsp90: chaperoning signal transduction. *J Cell Physiol* 188(3):281-290.

Román V, Bagyánszki M, Krecsmarik M, Horváth A, Resch BA, Fekete E (2004) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the developing myenteric plexus of the human fetal intestine. *Cytometry A* 57(2):108-112.

Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68(4):673-682.

Roy S, Cagliero E, Lorenzi M (1996) Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(2):258-266.

Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E (2010a) Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 35(12):1045-1056.

Roy S, Maiello M, Lorenzi M (1994) Increased expression of basement membrane collagen in human diabetic retinopathy. *J Clin Invest* 93(1):438-442.

Roy S, Sato T, Paryani G, Kao R (2003) Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes* 52(5):1229-1234.

Roy S, Trudeau K, Roy S, Behl Y, Dhar S, Chronopoulos A (2010b) New insights into hyperglycemia-induced molecular changes in microvascular cells. *J Dent Res* 89(2):116-127.

Rühl A (2005) Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 17(6):777-790.

Rühl A (2006) Glial regulation of neuronal plasticity in the gut: implications for clinicians. *Gut* 55(5):600-602.

Sanders KM (1996) A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 111(2):492-515.

Sanders KM, Ördög T, Koh SD, Ward SM (2000) A Novel Pacemaker Mechanism Drives Gastrointestinal Rhythmicity. *News Physiol Sci* 15:291-298.

Santos J, Perdue MH (2000) Stress and neuroimmune regulation of gut mucosal function. *Gut* 47 (Suppl 4):iv49-51; discussion iv52.

Sbaa E, Frérart F, Feron O (2005) The double regulation of endothelial nitric oxide synthase by caveolae and caveolin: a paradox solved through the study of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 15(5):157-162.

Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF (1994) Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J Cell Biol* 127(5):1233-1243.

Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP (1996) Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1):131-135.

Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisanti MP (2001) Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem* 276(52):48619-48622.

Schubert W, Frank PG, Woodman SE, Hyogo H, Cohen DE, Chow CW, Lisanti MP (2002) Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J Biol Chem* 277(42):40091-40098.

Searles CD (2006) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(5):C803-816.

Sessa WC (2005) Regulation of endothelial derived nitric oxide in health and disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:15-18.

Shaul PW (2002) Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 64:749-774.

Shirpoor A, Ansari MH, Salami S, Pakdel FG, Rasmi Y (2007) Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. *World J Gastroenterol* 13(32):4340-4344.

Shotton HR, Lincoln J (2006) Diabetes only affects nitric oxide synthase-containing myenteric neurons that do not contain heme oxygenase 2. *Brain Res* 1068(1):248-256.

Simionescu M, Antohe F (2006) Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies. *Handb Exp Pharmacol* 176(Pt 1):41-69.

Simionescu M, Gafencu A, Antohe F (2002) Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. *Microsc Res Tech* 57(5):269-288.

Simionescu M, Popov D, Sima A (2009) Endothelial transcytosis in health and disease. *Cell Tissue Res* 335(1):27-40.

Simionescu N (1983) Cellular aspects of transcapillary exchange. *Physiol Rev* 63(4):1536-1579.

Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285(5424):103-106.

Smart EJ, Ying Y, Donzell WC, Anderson RG (1996) A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J Biol Chem* 271(46):29427-29435.

Soda R, Tavassoli M (1984) Transendothelial transport (transcytosis) of iron-transferrin complex in the bone marrow. *J Ultrastruct Res* 88(1):18-29.

Spångeus A, Suhr O, El-Salhy M (2000) Diabetic state affects the innervation of gut in an animal model of human type 1 diabetes. *Histol Histopathol* 15:739-744.

Stolar MW (2010) Defining and achieving treatment success in patients with type 2 diabetes mellitus. *Mayo Clin Proc* 85(12 Suppl):S50-59.

Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:536-546.

Syed SA, Abrams GD, Freter R (1970) Efficiency of various intestinal bacteria in assuming normal functions of enteric flora after association with germ-free mice. *Infect Immun* 2(4):376-386.

Tai SC, Robb GB, Marsden PA (2004) Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(3):405-412.

Takahashi T, Nakamura K, Itoh H, Sima AA, Owyang C (1997) Impaired expression of nitric oxide synthase in the gastric myenteric plexus of spontaneously diabetic rats. *Gastroenterology* 113(5):1535-1544.

Tan LL, Bornstein JC, Anderson CR (2009) Neurochemical and morphological phenotypes of vagal afferent neurons innervating the adult mouse jejunum. *Neurogastroenterol Motil* 21(9):994-1001.

Tang DM, Friedenberg FK (2011) Gastroparesis: approach, diagnostic evaluation, and management. *Dis Mon* 57(2):74-101.

Thomas E, Pearse AGE (1961) The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Histochemie* 2:266-282.

Thomsen L, Robinson TL, Lee JC, Faraway LA, Hughes MJ, Andrews DW, Huizinga JD (1998) Interstitial cells of Cajal generate a rhythmic pacemaker current. *Nat Med* 4(7):848-851.

Timmermans JP, Barbiers M, Scheuermann DW, Bogers JJ, Adriaensen D, Fekete E, Mayer B, Van Marck EA, De Groodt-Lasseel MH (1994) Nitric oxide synthase immunoreactivity in the enteric nervous system of the developing human digestive tract. *Cell Tissue Res* 275(2):235-245.

Tiruppathi C, Song W, Bergenfeldt M, Sass P, Malik AB (1997) Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 272(41):25968-25975.

Tsai AT, Hassan SW, Haimvici R, Sato T, Li A, Roy S (2002) Antisense fibronectin oligonucleotide reduce high glucose-induced endothelial cell monolayer permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1319-B329.

Tuma PL, Hubbard AL (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 83(3):871-932.

Van Ginneken C, Van Meir F, Sommereyns G, Sys S, Weyns A (1998) Nitric oxide synthase expression in enteric neurons during development in the pig duodenum. *Anat Embryol (Berl)* 198(5):399-408.

Vanner S, Surprenant A (1996) Neural reflexes controlling intestinal microcirculation. *Am J Physiol* 271(2 Pt 1):G223-230.

Verne GN, Sninsky CA (1998) Diabetes and the gastrointestinal tract. *Gastroenterol. Clin North Am* 27(4):861-874, vi-vii.

Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92(8):827-839.

Vogel RA (2006) Diabetes and metabolic syndrome. *Tex Heart Inst J* 33(2):184-186.

Vogel SM, Minshall RD, Pilipović M, Tiruppathi C, Malik AB (2001) Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281(6):L1512-1522.

Wang XL, Ye D, Peterson TE, Cao S, Shah VH, Katusic ZS, Sieck GC, Lee HC (2005) Caveolae targeting and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 280(12):11656-11664.

Wang XY, Huizinga JD, Diamond J, Liu LW (2009) Loss of intramuscular and submuscular interstitial cells of Cajal and associated enteric nerves is related to decreased gastric emptying in streptozotocin-induced diabetes. *Neurogastroenterol Motil* 21(10):1095-e92.

Wang Y, Marsden PA (1995) Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol* 34:71-90.

Ward SM (2000) Interstitial cells of Cajal in enteric neurotransmission. *Gut* 47 (Suppl 4):iv40-43; discussion iv52.

Watkins CC, Sawa A, Jaffrey S, Blackshaw S, Barrow RK, Snyder SH, Ferris CD (2000) Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression and function that is lost in diabetic gastropathy. *J Clin Invest* 106(3):373-384.

Weynand B, Jonckheere A, Frans A, Rahier J (1999) Diabetes mellitus induces a thickening of the pulmonary basal lamina. *Respiration* 66:14-19.

White KE, Bilous RW, Marshall SM, El Nahas M, Remuzzi G, Piras G, De Cosmo S, Viberti G (2002) Podocyte number in normotensive type 1 diabetic patients with albuminuria. *Diabetes* 51(10):3083-3089.

Williamson JR, Kilo C (1976) Basement-membrane thickening and diabetic microangiopathy. *Diabetes* 25(2 SUPPL):925-927.

Wong WT, Wong SL, Tian XY, Huang Y (2010) Endothelial dysfunction: the common consequence in diabetes and hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 55(4):300-307.

Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A (2003) Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J* 17(10):1289-1291.

Yamada E (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1:445-457.

Yamagishi S (2011) Cardiovascular disease in recent onset diabetes mellitus. *J Cardiol* 57(3):257-262.

Yoneda S, Kadowaki M, Kuramoto H, Fukui H, Takaki M (2001) Enhanced colonic peristalsis by impairment of nitrergic enteric neurons in spontaneously diabetic rats. *Auton Neurosci* 92:65-71.

Yu WJ, Juang SW, Chin WT, Chi TC, Chang CJ, Cheng JT (2000) Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 68:625–634.

Zandecki M, Vanden Berghe P, Depoortere I, Geboes K, Peeters T, Janssens J, Tack J (2008) Characterization of myenteric neuropathy in the jejunum of spontaneously diabetic BB-rats. *Neurogastroenterol Motil* 20(7):818-828.

Zanoni JN, Buttow NC, Bazotte RB, Miranda Neto MH (2003) Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. *Auton Neurosci* 104:32–38.

Zanoni JN, de Miranda-Neto MH, Bazotte RB, de Souza RR (1997) Morphological and quantitative analysis of the neurons of the myenteric plexus of the cecum of streptozotocin diabetic rats. *Arq Neuropsiquiatr* 55:696-702.

Zanoni JN, Tronchini EA, Moure SA, Souza ID (2011) Effects of L-glutamine supplementation on the myenteric neurons from the duodenum and cecum of diabetic rats. *Arq Gastroenterol* 48(1):66-71.

Zhu WW, Chen HP, Ge YC, Xie HL, Zeng CH, Li LS, Liu ZH (2009) Ultrastructural changes in the glomerular filtration barrier and occurrence of proteinuria in Chinese patients with type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 86(3):199-207.

Zou MH, Cohen R, Ullrich V (2004) Peroxynitrite and vascular endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Endothelium* 11:89-97.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Fekete Éva egyetemi tanárnak és Dr. Bagyánszki Mária egyetemi adjunktusnak, hogy biztosították számomra a kutatás feltételeit, útmutatásaikkal és figyelmükkel szakmailag és emberileg is támogattak.

Köszönöm Dr. Toldi József tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetővé tette PhD értekezésem elkészítését az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszéken.

Köszönöm egykori és jelenlegi munkatársaimnak, Battonyai Izabella és Talapka Petra PhD hallgatóknak a kísérletekben nyújtott segítségüket és a sok vidámságot, ami a mindennapjainkat kísérte.

Köszönöm Dr. Wittmann Tibornak, Dr. Izbéki Ferencnek, Dr. Rázga Zsoltnak, Dr. Zoja Katarovának, Dr. Hermes Editnek és Jancsó Zsanettnek az elektronmikroszkópos és molekuláris vizsgálatok során nyújtott segítséget.

Köszönöm a szakdolgozóink és az asszisztensek hasznos segítségét.

Köszönöm a szüleimnek és páromnak, hogy mindig érdeklődéssel figyeltek a munkámra, hálás vagyok a sok szeretetért és biztatásért, amellyel támogattak a tanulmányaim során.

IX. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Teljes közlemények

1. M. Krecsmarik, F. Izbéki, M. Bagyánszki, N. Linke, **N. Bódi**, J. Kaszaki, Z. Katarova, Á. Szabó, É. Fekete, T. Wittmann (2006) Chronic ethanol exposure impairs neuronal nitric oxide synthase in the rat intestine. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 30(6): 967-973. **IF: 3.468**
2. F. Izbéki, T. Wittmann, A. Rosztóczy, N. Linke, **N. Bódi**, É. Fekete, M. Bagyánszki (2008) Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Research Clinical Practise* 80(2):192-198. **IF: 2.134**
3. N. Linke, **N. Bódi**, B.A. Resch, É. Fekete, M. Bagyánszki (2008) Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the myenteric plexus of the human fetal small intestine. *Histology and Histopathology* 23(8):979-986. **IF: 2.502**
4. M. Bagyánszki, Z. Novák, **N. Bódi**, H. Orvos, A. Pál, É. Fekete (2009) Structural differences in the umbilical vein wall after full-term and preterm delivery. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 38:387–391. **IF: 0.646**
5. **N. Bódi**, I. Battonyai, P. Talapka, É. Fekete, M. Bagyánszki (2009) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the myenteric plexus of the duodenum of different mammalian species. *Acta Biologica Hungarica* 60(4), pp. 347-358. **IF: 0.793**
6. P. Talapka, **N. Bódi**, I. Battonyai, É. Fekete, M. Bagyánszki (2011) Subcellular distribution of nitric oxide synthase isoforms in the rat duodenum. *World Journal of Gastroenterology* 17(8):1026-1029. **IF: 2.240**
7. **N. Bódi**, P. Talapka, M. Poles, E. Hermes, Zs. Jancsó, Z. Katarova, F. Izbéki, T. Wittmann, É. Fekete, M. Bagyánszki (2011) The endothelium of capillaries supplying the myenteric plexus are direct targets of diabetic damage. *Microcirculation* (submitted) **IF: 2.533**
8. M. Bagyánszki, **N. Bódi** (2011) Diabetes-related alterations in the enteric nervous system and its microenvironment. *World Journal of Diabetes* (submitted)

Nyomtatásban megjelent előadás kivonatok:

Idegen nyelven tartott konferencia előadás

N. Bódi, N. Linke, F. Izbéki, M. Bagyánszki, É. Fekete (2007) Loss of nitrergic myenteric neurons in diabetic rats coincides with structural alterations in capillaries supplying the myenteric plexus. 14th International Student Congress of Medical Sciences, Groningen, The Netherlands

N. Bódi, P. Talapka, M. Bagyánszki, A. I. Rosztóczy, É. Fekete, F. Izbéki, T. Wittmann (2010) The role of structural capillary damage in the loss of nitrergic myenteric neurons in a rat model of diabetes mellitus. 18th United European Gastroenterology Week, Barcelona, Spain (Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: Gut Supplement No III Vol 59, A90)

N. Bódi, P. Talapka, M. Poles, M. Bagyánszki, A. I. Rosztóczy, É. Fekete, F. Izbéki, T. Wittmann (2011) Diabetes-related structural, molecular and functional alterations in capillaries supplying to the myenteric plexus can be responsible for the region-specific nitrergic neuropathy in the gut of streptozotocin-induced diabetic rats. 19th United European Gastroenterology Week, Stockholm, Sweden

Magyar nyelven tartott konferencia előadás

Bódi N., Linke N., Izbéki F., Bagyánszki M., Fekete É. (2009) A myentericus plexust ellátó kapillárisok diabétesssel összefüggő strukturális és molekuláris változásai patkányban. Magyar Szabadgyök - Kutató Társaság V. Kongresszusa, Szeged, Magyarország [Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: Acta Biologica Szegediensis (2009) Volume 53 (Suppl. 1)]

Bódi N., Talapka P., Bagyánszki M., Rosztóczy A., Fekete É., Wittmann T., Izbéki F. (2010) Intestinal endothelial dysfunction may have a role in the development of myenteric nerve damage in a rat model of diabetes mellitus. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 52. Nagygyűlése, Tihany, Magyarország (Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: Z Gastroenterol 2010; 48:598-599)

Bódi N., Talapka P., Izbéki F., Wittmann T., Bagyánszki M., Fekete É. (2010) A myentericus plexust ellátó kapillárisok diabétesszel összefüggő strukturális és molekuláris változása patkányban. A Magyar Élettani Társaság (MÉT) LXXIV. Vándorgyűlése és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság (MFT) II. közös tudományos konferenciája, Szeged, Magyarország

Bódi N., Talapka P., Bagyánszki M., Rosztóczy A., Fekete É., Izbéki F., Wittmann T. (2010) A myentericus plexust ellátó kapillárisok strukturális és molekuláris változásainak szerepe a diabeteses nitreger neuropathia kialakulásában. Magyar Belgyógyász Társaság 43. Nagygyűlése, Budapest, Magyarország (Az előadás magyar nyelvű kivonata megjelent: Magyar Belorvosi Archivum, LXIII. évfolyam, 2. Supplementum, 40.)

Bódi N. (2011) A myentericus plexust ellátó kapillárisok diabétesszel összefüggő strukturális, molekuláris és funkcionális változásai streptozotocin-indukált diabeteses patkányban. Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia, Szeged, Magyarország [Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: Acta Biologica Szegediensis (in printed)]

Poszter nemzetközi konferencián

N. Linke, **N. Bódi**, V. Balázs, Zs. Feltóti, F. Izbéki, É. Fekete, M. Bagyánszki (2006) Quantitative changes in the nitregeric neurons in diabetic rat. International IBRO Workshop, Budapest, Hungary

N. Bódi, P. Talapka, F. Izbéki, T. Wittmann, É. Fekete, M. Bagyánszki (2010) Structural, molecular and functional alterations in capillaries supplying the myenteric plexus in the gut of the streptozotocin-induced diabetic rats. International IBRO Workshop, Pécs, Hungary

R. Á. Nagy, **N. Bódi**, P. Talapka, M. Bagyánszki, É. Fekete, T. Wittmann, F. Izbéki (2011) Effects of acute and chronic quinolinic acid treatment on gastrointestinal motility in mice. 19th United European Gastroenterology Week, Stockholm, Sweden

N. Linke, **N. Bódi**, V. Balázs, Zs. Feltóti, F. Izbéki, É. Fekete, M. Bagyánszki (2006) Quantitative changes in the nitrergic neurons in diabetic rat. Wind Spring 2006, 9th International Meeting for Hungarian Scientists, PhD Students and Researchers, Kaposvár, Hungary

N. Linke, **N. Bódi**, Á. B. Resch, É. Fekete, M. Bagyánszki (2007) Prenatal development of glutamatergic neurons in the human enteric nervous system. XI. Conferences of Hungarian Neuroscience Society, Szeged, Hungary

N. Linke, **N. Bódi**, Á. B. Resch, É. Fekete, M. Bagyánszki (2007) Glutamáterg neuronok prenatális fejlődése a humán bélidegrendszerben. X. Tavaszi Szél Konferencia, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, Magyarország

N. Linke, F. Izbéki, M. Bagyánszki, **N. Bódi**, A. Rosztóczy, É. Fekete, J. Lonovics, T. Wittmann (2007) Early insulin treatment prevents the loss of nitrergic neurons in the ileum and colon and restores altered gut motility in streptozotocin-induced diabetic rats. 49th Annual Meeting of the Hungarian Society of Gastroenterology, Tihany, Hungary; 2007, Gastroenterologie 2007, 5:434

N. Bódi, N. Linke, F. Izbéki, M. Bagyánszki, É. Fekete (2007) Loss of nitrergic myenteric neurons in diabetic rats coincides with structural alterations in capillaries supplying the myenteric plexus. XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitika Konferencia, Budapest, Hungary

N. Linke, **N. Bódi**, Á. B. Resch, É. Fekete, M. Bagyánszki (2007) Prenatal development of glutamatergic neurons in the human enteric nervous system. XVI. Nemzetközi Semmelweis Szimpózium és VI. Magyar Sejtanalitika Konferencia, Budapest, Hungary

Talapka P., **Bódi N.**, Poles M., Bagyánszki M., Fekete É. (2011) TNBS-indukált vastagbélgyulladás akut és krónikus hatásainak vizsgálata patkánymodellen. Magyar Gasztroenterológiai Társaság 53. Nagygyűlése, Tihany, Magyarország

Digitális jegyzet

Fekete É., Bagyánszki M., **Bódi N.** (2011) Állati szövetek – gyakorlati praktikum