DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

A KRÓNIKUS ALKOHOLFOGYASZTÁS HATÁSA A NITROGÉN MONOXID SZINTÉZISÉRE PATKÁNY ÉS EGÉR BÉLIDEGRENDSZERBEN

KRECSMARIK MÓNIKA

TÉMAVEZETŐ: Fekete Éva, Ph.D., D.Sc.

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Állattani és Sejtbiológiai Tanszék

SZEGED
2006

Rövidítések jegyzéke

cNOS	konstitutív nitrogén-monoxid szintáz (constitutive nitric oxide synthase)
DAF-FM	4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein
EFS	elektromos mező stimuláció (electrical field stimulation)
eNOS	endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (endothelial nitric oxide synthase)
HEPES	N-(2-hidroxetil)piperazin-N-(2-etánszulfonsav)
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz (inducible nitric oxide synthase)
L-NAME	N^{ω}-nitro-L-arginin metil-észter
L-NNA	nitro-L-arginin
mtsai.	munkatársai
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleoid-foszfát
NANC	nem adrenerg nem kolinerg (non-adrenergic non-cholinergic)
nNOS	neuronális nitrogén-monoxid szintáz (neuronal nitric oxide synthase)
NO	nitrogén-monoxid (nitric oxide)
NOS	nitrogén-monoxid szintáz (nitric oxide synthase)
PB	foszfát puffer (phosphate buffer)
PBS	foszfát pufferes sóoldat (phosphate buffered saline)
PFA	paraform-aldehid
$PGF_{2\alpha}$	prosztaglandin $F_{2\alpha}$
PGP9.5	fehérje géntermék 9.5 (protein gene product 9.5)
VIP	vazoaktív intesztinális polipeptid

I. BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

I.1. AZ EMLŐS BÉLIDEGRENDSZER

Az emlős bélidegrendszer a nyelőcső, a gyomor, a bélcsatorna, a hasnyálmirigy és az epehólyag falában elhelyezkedő neuronok és gliasejtek összessége. Az enterális neuronok funkcionális és neurokémiai sokszinűségét tekintve a bélidegrendszer igen hasonló a központi idegrendszerhez (Gershon és mtsai., 1994). A bélidegrendszer közel 100 millió neuront tartalmaz, megközelítőleg annyit, mint a vizsgált faj gerincvelője (Furness és Costa, 1987). Az idegsejtekhez szorosan kapcsolódó gliasejtek sajátosságait tekintve is inkább hasonlítanak a központi idegrendszer asztrocitáihoz, mint a perifériás idegrendszer Schwann-sejtjeihez (Bush, 2002).

Az enterális neuronok reflexíveket alkotnak a bélfalban és ezen reflexíveken keresztül valósul meg a perisztaltika, a vérátfolyás, a mirigyszekréció, a tápanyagfelszívás, valamint az endokrin szekréció és az immunvédekezés szabályozása (Wood és mtsai., 1999). A reflexívek komplexitását jól illusztrálja például a gastrocolonicus reflex, amelyben a gyomor telítődése kiváltja a colon ürülését és az enterogastricus reflex, amelyben a vékonybél falának nagymértékű tágulása és irritációja csökkenti a szekréció és motilitás mértékét a gyomorban. A reflexívek kialakításában különböző típusú enterális neuronok vesznek részt:

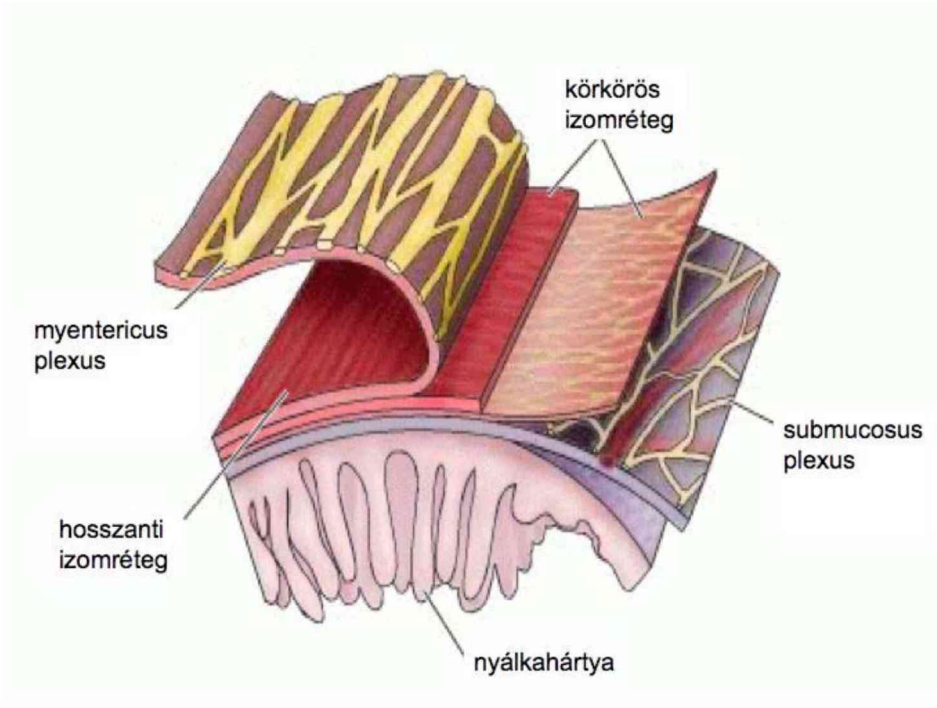
- *szenzoros neuronok*, amelyek érzékelik a bélfal feszülését vagy a béltartalom kémiai összetételét,
- *interneuronok*, melyek enterális neuronok között létesítenek kapcsolatot, és
- *motoneuronok*, melyek fő feladata a bélfal és az erek simaizmának beidegzése, és így a vérátfolyás és a perisztaltika szabályozása.

A bélidegrendszer szoros kapcsolatban áll az autonóm ganglionokkal és a központi idegrendszerrel. Ez a kapcsolat megvalósulhat enterális neuronokon keresztül, melyeknek axonjai a bélcsatornát elhagyva a prevertebrális szimpatikus ganglionokhoz futnak, illetve nem-enterális neuronokon keresztül, melyek sejttestjei autonóm ganglionokban vagy a központi idegrendszerben találhatóak és a bélidegrendszerbe projektálnak. Más szervekkel ellentétben azonban a bélcsatorna képes a központi idegrendszertől függetlenül is működni (Costa és mtsai., 2000;

Furness, 2000). Így elmondhatjuk, hogy a gasztrointesztinális rendszerben a központi idegrendszer a bélidegrendszer által szabályozott funkciókat a szervezet mindenkori állapotához igazítja, azok felülszabályozását végzi.

A bélidegrendszer felépítésére jellemző, hogy a neuronhálózatok a bélfal különböző szöveti rétegeiben, vagy azok között helyezkednek el. A neuronhálózatok közül kettőben a neuronok ganglionokba tömörülnek és a ganglionok közötti kapcsolatot az ún. internodális szegmensek biztosítják. A bélcsatorna két ganglionált plexusa:

- A *myentericus plexus*, amely a bélfal simaizomrétegei között helyezkedik el és a bélfal simaizom összehúzódásáért és elernyedéséért, és így a bélperisztaltika összehangolt működéséért felelős.
- A *submucosus plexus*ból eredő motoros axonok a bél epitheliumához futnak és a nyálkahártyában a szekréciót, a felszívást és az endokrin funkciókat szabályozzák (1. ábra).



1. ábra A bélfal szerkezetének sematikus képe. A nyálkahártya alatt a kötőszövetben elhelyezkedő submucosus plexus elsősorban a nyálkahártya mirigyszekrécióját, a tápanyag felszívását és az endokrin funkciókat szabályozza. A körkörös és hosszanti izomréteg között beágyazva található a myentericus plexus, amelynek axonjai a simaizomrostokhoz futnak és a bélperisztaltikát szabályozzák.

A ganglionált plexusok folytonos hálózatot alkotnak a gyomor-béltraktus egész hosszában és kerületében. A myentericus plexus jelen van a nyelőcső harántcsíkolt izomszövetében is ahol a motoros véglemezek működését szabályozza (Worl és mtsai., 1994). Az idegi szabályozásnak ez a fajtája egyedülálló, a szervezetben csak a nyelőcsőben fordul elő.

A myentericus ganglionok mérete, orientáltsága és alakja eltérő a különböző fajokban és a gyomor-béltraktus különböző szakaszain: a gyomorban, a duodenum, jejunum és ileum területén és a colonban. A ganglionokra általában jellemző, hogy érző, inter- és motoneuronokat is tartalmaznak, tehát nem különböztetünk meg tisztán érző vagy motoros ganglionokat.

A ganglionált plexusokon kívül a bél egyéb szöveti rétegei közé ágyazottan több kisebb, nem ganglionált plexus is található, amelyek előfordulása nem folyamatos az egész gyomor-béltraktusban. Ezek szerepe általában az adott szöveti réteg speciális funkcióinak szabályozása, illetve a ganglionált plexusok közötti kapcsolat megteremtése.

I.2 A NITROGÉN-MONOXID

1987-ben Palmer és munkatársai bizonyították be először, hogy az addig endotélium-eredetű relaxáló faktorként ismert, az erek endotélsejtjeiből felszabaduló simaizomrelaxáns nem más, mint a nitrogén-monoxid (NO). A mindössze néhány másodperc féléletidejű gáz nem a sejt felszínén lévő receptorokon keresztül fejti ki hatását, hanem a sejtmembránon átdiffundálva a sejt citoplazmájában kötődik a NO célfehérjéihez. Az NO-nak páratlan számú elektronja van, ezért nagyon reakcióképes szabad gyök. Így az oxigénnel ugyanúgy reagálni képes (például peroxinitritet hozva létre), mint bizonyos fémekkel, köztük a vassal. A belőle létrejövő nitrózoniumion (NO^+) és nitroxilion (NO^-) eltérő tulajdonságokkal és biológiai aktivitással rendelkezik (Stamler, 1994). Az, hogy a NO az adott sejtben mely formában van jelen, a sejtben lévő redox állapottól függ.

A szervezetben a NO forrása az arginin, amelynek az egyik aminocsoportja két lépésben oxidálódik, így citrullin és NO keletkezik (Wu és Morris, 1998). Ezt a reakciót a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) végzi, amelynek három izoformáját különítjük el: az endoteliális (eNOS), a neuronális (nNOS) és az indukálható NOS-t

(iNOS). A NOS enzimek nevezéktana először azon alapult, hogy a NO szintézis indukció hatására következik be aktivált makrofágokban (iNOS), ezzel szemben a eNOS és nNOS enzimek azonos szubsztrátokat igényelnek és folyamatosan, konstitutívan (cNOS) termelik a NO-t. Ma már azonban egyre több kísérletes bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy az eNOS és nNOS gének expressziója is indukálható, illetve az iNOS is működhet konstitutívan bizonyos sejttípusokban (Guo és mtsai., 1995). Kortikoszteroidok, bakteriális lipopoliszacharid és γ-interferon hatására a nNOS expressziója csökken, míg ösztrogén és tesztoszteron hatására növekszik (Bucher és mtsai., 1997). Az eNOS expressziója sejttípustól függően csökkenhet vagy növekedhet lipopoliszacharid és hipoxia hatására (Chen és mtsai., 1997).

Az eNOS-t először erek endotélsejtjeiből izolálták, de jelenlétét már sok más szövetben és sejttípusban, például a vérlemezkékben, a hippocampusban valamint a szívizomszövetben is kimutatták (Randriamboavonjy és Fleming, 2005; Hashiguchi és mtsai., 2004; Feron és mtsai., 1999). A nNOS elsősorban a központi és a perifériás idegrendszer neuronjainak citoplazmájában expresszálódik (Bredt és mtsai., 1990), de előfordul a vázizomzatban (Pattwell és mtsai., 2004), a vesében (Holmqvist és mtsai., 2005) és a hasnyálmirigyben is (Gunawardana és mtsai., 2006). A fentiekhez hasonlóan bár az iNOS-t először immunaktivált makrofágokban írták le, azóta széles körben vizsgálják az expresszióját szívizomsejtekben, gliasejtekben, valamint az erek simaizomsejtjeiben (Balligand és Cannon, 1997; Buskila és mtsai., 2005).

Az irodalmi adatok alapján egyre több bizonyíték van arra vonatkozóan is, hogy egy adott NOS izoforma a szövetspecifikus mRNS splicing következtében különböző aminosavszekvenciával rendelkezik a különböző sejttípusokban. A nNOS mRNS például más splice variánst és így eltérő szerkezetű fehérjét hoz létre a harántcsíkolt izomszövetben, mint az idegszövetben (Silvagno és mtsai., 1996). Az eNOS pedig más kaveolin izoformákkal reagál az endotélsejtekben, mint a szívizomszövetben (Feron és mtsai., 1996).

Valószínűsíthető tehát, hogy az NO különböző szövetekben és sejtekben megfigyelt eltérő biológiai funkciója függ:

- a sejtben lévő redox állapottól,
- az NO szintézisét végző NOS izoformától és
- az NO-val reagáló fehérjéktől.

I.3 NITROGÉN-MONOXID A BÉLCSATORNÁBAN

A NOS izoenzimek által termelt NO kulcsfontosságú a bélcsatorna fiziológiás és patofiziológiás folyamataiban. Az egyes enzimek lokalizációja a bélfalban jól körülhatárolt, az azonban, hogy az egyes izoformák milyen mértékben járulnak hozzá a NO által szabályozott funkciókhoz, még kevéssé ismert.

Az eNOS diffúz előfordulást mutat a hosszanti és a körkörös izom területén, a myentericus plexus neuronjaiban (Vannucchi és mtsai., 2002), valamint a nyálkahártyában. Az eNOS által termelt NO értágító hatással rendelkezik, gátolja a leukociták és a vérlemezkék aggregációját, valamint hatással van az erek simaizomsejtjeinek proliferációjára és ezáltal fontos szerepet játszik a nyálkahártya vérátfolyásának szabályozásában (Moncada és mtsai., 1991; Huang és mtsai., 1995). A leukociták és az endotélsejtek közötti kapcsolat kialakításában az eNOS által termelt NO játssza a fő szerepet. Az eNOS funkcióvesztéses mutáns egerekben a nNOS részben képes átvenni ezt a funkciót (Sanz és mtsai., 2001). Ezekben a mutáns egerekben a nNOS expressziójának növekedése a vázizomszövetben és a központi idegrendszerben is megfigyelhető, amely az nNOS és az eNOS enzimek közötti szabályozási kapcsolatra enged következtetni.

A bélcsatornában a nNOS enzim elsősorban a bélidegrendszerben fordul elő. Immunhisztokémiai vizsgálatok kimutatták a jelenlétét a myentericus és submucosus neuronok szubpopulációjának citoplazmájában, axonjában és dendritjeiben (Berthoud, 1995; Shuttleworth és Sanders, 1996). A nNOS-immunreaktív neuronoknak az összneuronszámhoz viszonyított százalékos aránya a myentericus plexusban viszonylag magas és az erre vonatkozó irodalmi adatok a nNOS faj- és bélszakasz specifikus eloszlására engednek következtetni. A NO szintézist folytató sejtek markereként használt nikotinamid adenin dinukleotid foszfát-diaforázt (NADPH-d) tartalmazó myentericus neuronok szubpopulációjának százalékos eloszlása patkány ileumban az összneuronszámhoz képest több mint 20% (Wilhelm és mtsai., 1998). Ugyanebben a bélszakaszban a NADPH-d-pozitív sejtek aránya a ganglionokban 27% (Cracco és Filogamo, 1994). Patkány duodenumban az összneuronszámhoz viszonyított nNOS tartalmú myentericus neuronok aránya eléri a 28%-ot (Jarvinen és mtsai., 1999). Egér vékonybélben Young és Ciampoli (1998) munkája alapján ez az arány 31,8%.

A bélidegrendszer neuronjaira - és így a nNOS tartalmú myentericus neuronokra is - jellemző, hogy több neurotranszmittert is tartalmaznak. Ez az enterális neuronok ún. neurokémiai kódja amely lehetővé tesz a neuronok projekcióinak és funkcióinak pontos meghatározását (Furness és mtsai., 1995). A különböző fajokban végzett immunhisztokémiai vizsgálatok a nNOS és a vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) együttes előfordulását mutatták ki (Sang és mtsai., 1997; Vittoria és mtsai., 2000; Tonini és mtsai., 2000). Egér myentericus plexusban a nNOS/VIP tartalmú neuronok 10%-a kolin-acetiltranszferázt is tartalmaz (Sang és Young, 1998). A csak nNOS/VIP tartalmú neuronok gátló motoneuronok illetve interneuronok lehetnek, míg a kolinerg nNOS/VIP neuronok kizárólag interneuronok (Sang és Young, 1998). Humán myentericus plexusban a nNOS/VIP neuronok az összneuronszám 5,8%-át adják a vékonybélben és 17,5%-át a vastagbélben (Brehmer, 2006).

Az enterális neuronokból származó NO, mint neurotranszmitter működik és fő szerepe a tápcsatorna perisztaltikus reflexének és záróizom működésének szabályozása. Farmakológiai (Zizzo és mtsai., 2005; Ueno és mtsai., 2004) és génkiütésés kísérletek (Mashimo és mtsai., 1996) bizonyították a nNOS által termelt NO szerepét a bélcsatorna simaizmának ún. nem-adrenerg nem-kolinerg (NANC) relaxációjában. A myentericus plexus által termelt NO szabályozza a bélmotilitás relaxációs komponensét (Foxx-Orenstein és Grider, 1996). A nem szelektív NOS gátló, az N^{ω}-nitro-L-arginin metil-észter (L-NAME) alkalmazása a tranzit lassulásához vezet patkány vastagbélben (Mizuta és mtsai., 1999).

A myentericus neuronokból felszabaduló NO más neurotranszmitterekkel ellentétben nem tárolható vezikulákban, akkor kell termelődnie, amikor szükséges. Ezen kívül a simaizomsejtek membránján nincs specifikus receptora, hanem a citoplazmában található guanilil-cikláz a célfehérjéje. Mint diffúzibilis molekula, a NO nemcsak a myentericus neuronok szinapszisain keresztül szabadul fel, hanem a sejttest és az axon felszínéről is (Olgart és mtsai., 2000).

Az iNOS a bélcsatornában elsősorban a nyálkahártya sejtjeiben és a makrofágokban fordul elő (Dijkstra és mtsai., 1998), de kimutatták jelenlétét a myentericus neuronok szubpopulációjának citoplazmájában is (Vannucchi és mtsai., 2002). Az iNOS által termelt NO hatása a bélcsatornában igen sokrétű és csak kevéssé tisztázott. Fő szerepe a kórokozók elleni immunvédekezésben van. Túl nagy mennyiségű NO ugyanakkor krónikus gyulladáshoz és szeptikus sokkhoz vezet

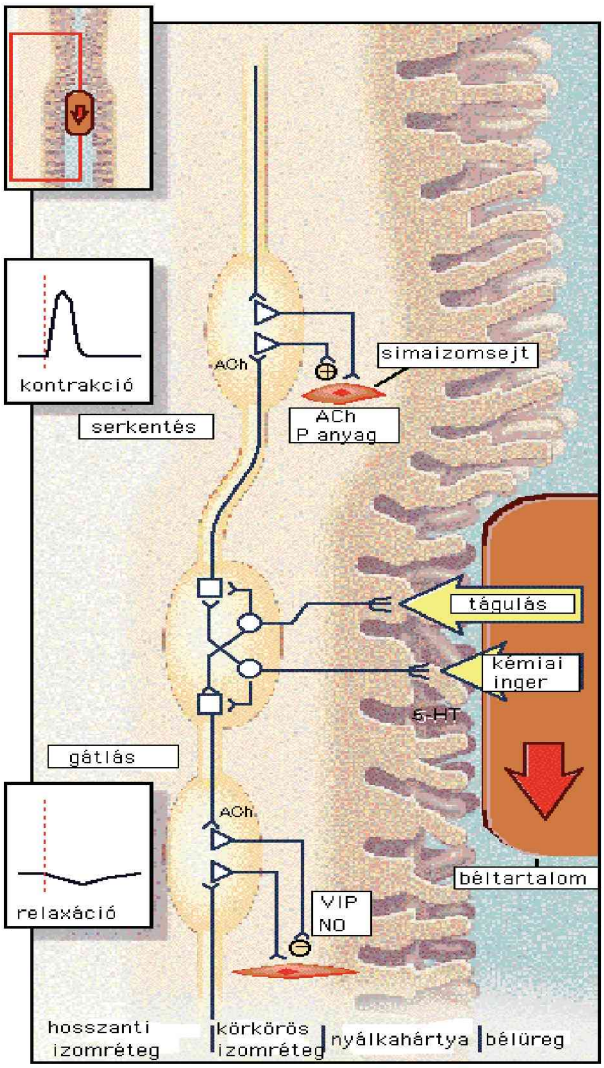
(Miller és Clarc, 1994). Az iNOS által lökésszerűen termelődő nagy (mikromoláris) mennyiségű NO hatására növekszik a nyálkahártya szekréciója és átjárhatósága.

I.4 A PERISZTALTIKA SZABÁLYOZÁSA

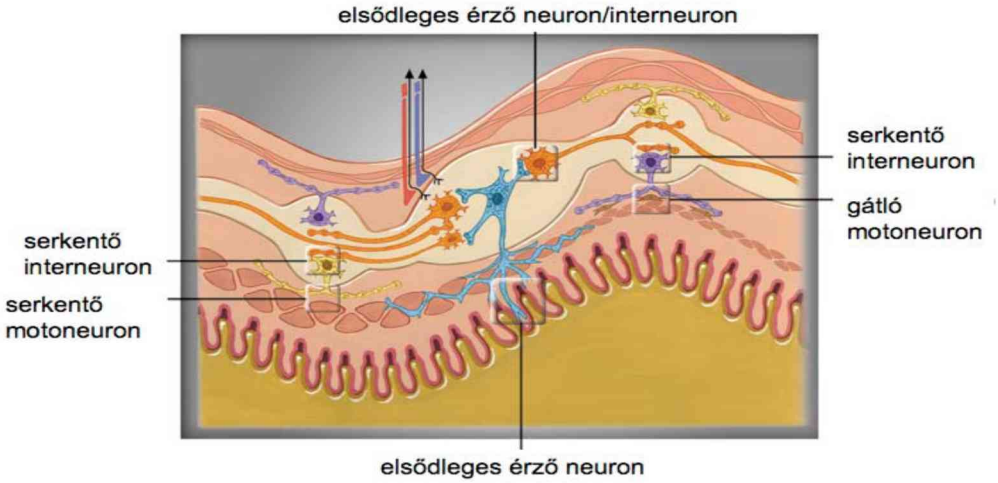
Már 1899 óta ismert, hogy a szervezetből izolált bélcsatornában a központi idegrendszertől függetlenül is megfigyelhető a perisztaltikus reflex. Ekkor mutatta ki Bayliss és Starling, hogy a nyálkahártya vagy a simaizomsejtek mechanikai ingerlése összetett perisztaltikus mozgást vált ki az izolált bélszakaszban. Ez a jelenség azt sugallta, hogy a bélfalban jelen vannak az inger kódolására és továbbítására alkalmas neuronok (Clerc és Furness, 2004). Ezek az ún. saját primer afferens neuronok (IPAN, intrinsic primary afferent neuron), amelyek sejttestjei a myentericus ganglionokban helyezkednek el és axonjaik egészen a bélfal epitéliumáig futnak. A szervezetben található más érző neuronokkal ellentétben az ezekből a neuronokból származó érzőinformáció nem a központi idegrendszerbe fut, hanem a bélfal saját reflexíveinek kiinduló állomása.

Az elsődleges érző neuronok fő ingere az epitéliumban található enterokromaffin sejtekből felszabaduló szerotonin (5-HT). A szerotonin felszabadulását kiválthatja a nyálkahártya kémiai vagy mechanikai ingerlése. A szerotonin hatására ingerületbe jött elsődleges érző neuronok az információt a myentericus ganglionokban elhelyezkedő interneuronoknak továbbítják. A perisztaltikus reflexben szerepet játszó interneuronok lehetnek felszálló vagy leszálló interneuronok attól függően, hogy orális vagy anális irányban projektálnak (2. és 3. ábra).

A reflexív végrehajtó neuronja a körkörösen elhelyezkedő simaizom beidegzéséért felelős motoneuron. A motoneuronok lehetnek serkentőek illetve gátlóak. A serkentő motoneuronok axonjai orális irányban vagy lokálisan váltják ki a simaizom összehúzódását, neurotranszmitterük az acetilkolin vagy a P-anyag. A gátló motoneuronok kaudális irányba projektálnak, NO vagy vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) segítségével váltják ki a simaizom-relaxációt (2. és 3. ábra).



2. ábra A bél perisztaltikus reflexe. A perisztaltika a helyi reflexek sorozataként valósul meg, amelynél az inger forrásától orális irányban a simaizom összehúzódik, kaudális irányban pedig elernyed (kis kép bal felső sarokban). A táplálék által a nyálkahártyára kifejtett mechanikai és kémiai ingerek hatására felszabaduló 5-HT az elsődleges érző neuronokat (❍) hozza ingerületbe (nagy kép). Az elsődleges érző neuronok felszálló és leszálló interneuronokat aktiválnak (❒) amelyek hatására orális irányban acetilkolin (ACh) vagy P-anyag szabadul fel a motoneuronokból (∇) és kiváltja a körkörös izom kontrakcióját. Ugyanakkor a motoneuronokból kaudális irányban felszabaduló nitrogén-monoxid (NO) vagy vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) hatására a simaizom elernyed. (Goyal és Hirano nyomán, 1996)



3. ábra A perisztaltikus reflexívben résztvevő neuronok elhelyezkedése a bélfalban. (Hansen nyomán, 2003)

A tápcsatorna motilitásának finoman szabályozott folyamatában beálló rendellenességeknek hátterében általában a bélidegrendszer neuronjainak pusztulása és/vagy elégtelen működése áll. A NO-t termelő nitrerg myentericus neuronok szelektív pusztulása figyelhető meg például nyelésképtelenség, achalasia esetében (Mearin és mtsai., 1993). Ennek a betegségnek a következtében az alsó nyelőcsősphincter és a nyelőcső alsó harmadának relaxációja nem, vagy csak elégtelen mértékben következik be. Ezáltal a nyelőcső alsó része állandóan tónusosan összehúzódott állapotban van és a gyomorba nem továbbítódik a táplálék.

Szintén a nitrerg neuronok elégtelen működése áll annak a veleszületett betegségnek a hátterében, amelynél a pylorus záróizma túlzott mértékben beszűkül. Ekkor a myentericus neuronok struktúrája és a plexus szerkezete normál fiziológiás állapotban van, de azok a gátló motoneuronok amelyek a simaizom relaxációért felelősek nem tartalmaznak nNOS-t (Vanderwinden és mtsai., 1992). A jelenség transzgenikus egereknél is megfigyelhető, ahol az nNOS gén célzott kiütésével hasonló tünetek tapasztalhatóak: a gyomor túlzott mértékben kitágul és a táplálék nem továbbítódik a vékonybélbe (Huang és mtsai., 1993).

A cukorbetegséget kísérő motilitási zavarok esetében szintén kimutatták a nitrerg neuronok szerepét. Az nNOS fehérje expressziójának csökkenését és a myentericus neuronok pusztulását figyelték meg diabeteszes patkány vastagbélben (Yoneda és mtsai., 2001) és egér vékonybélben (Surendran és Kondrapaka, 2005).

I.5 AZ ALKOHOL HATÁSAI A BÉLCSATORNÁRA

Irodalmi adatok alapján már régóta ismert, hogy a szeszes italokban található alkohol vagy etanol (etil-alkohol, C_2H_5OH) gátolja a tápanyagok, köztük sok vitamin felszívódását, valamint károsítja a vékonybél nyálkahártyáját és így az alkoholistákra jellemző hiányos tápláltsághoz vezet (Bode és Bode, 1990). Az alkoholfogyasztás káros hatással van a bélcsatorna immunrendszerére is, immunhiányos állapotot eredményez és így növeli a fertőzés esélyét (Jerells és Pruett, 1994).

Az akut és krónikus alkoholfogyasztás hatása emberben nagymértékben függ a bevitt alkohol mennyiségétől és koncentrációjától. Általában elmondható azonban, hogy az egészségre káros hatás férfiaknál >40g etanol/testtömegkg/nap, nőknél >20 etanol/testtömegkg/nap alkoholfogyasztás esetén következik be (Hüllinghorst, 1999).

Az elfogyasztott alkohol 20%-a a gyomorban, míg a maradék 80%-a a duodenum és a jejunum területén szívódik fel egyszerű diffúzióval. A bevitt etanolhoz hasonló magas koncentráció csak a vékonybél gyomorhoz közeli szakaszaiban, a duodenumban és a jejunumban fordul elő, így a nyálkahártya sérülése is itt a legkiterjedtebb (Mezey, 1985). A következő vékonybélszakaszban, az ileumban még egyszeri, igen nagy mennyiségű alkohol bevitele esetén is az etanol koncentrációja megegyezik a vér alkoholkoncentrációjával, amiből arra lehet következtetni, hogy az ileumba az alkohol a véráramból lép be.

A bélcsatorna következő szakaszában, a vastagbélben az etanol metabolizmusában a baktériumflóra játssza a kulcsszerepet (Salaspuro, 1996). A vastagbél lumenébe az ileumhoz hasonlóan a véráramon keresztül jut el az alkohol és itt a bakteriális alkohol-dehidrogenázok hatására toxikus acetaldehiddé alakul. A vastagbélben található baktériumflóra sokkal nagyobb affinitással képes az acetaldehid előállítására, mint a metabolizmus következő lépésére, amely az acetaldehidből ecetsavat állít elő és így az acetaldehid koncentrációja megnő. Ez az alkohol ún. bakteriokolonikus metabolizmusa, melynek során a mérgező acetaldehid károsítja a vastagbél nyálkahártyáját, karcinogén hatásánál fogva növeli a vastagbélrák kockázatát és a portális keringésbe jutva a súlyos májkárosodáshoz vezet.

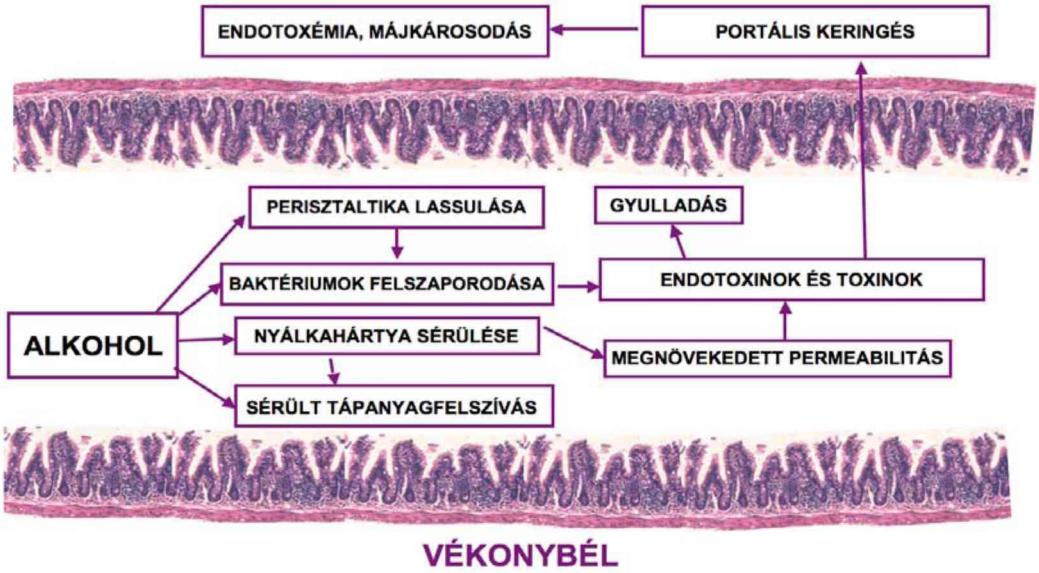
A krónikus alkoholfogyasztás igen eltérő mértékben érinti a különböző tápanyagok felszívását a bélfalon keresztül. A monoszacharidok, közöttük a D-xilóz felszívása a bevitt alkohol mennyiségétől és a vizsgált személy tápláltsági fokától függően 18 és 76% közötti értékkel csökkenhet (Bode, 1980). A glükóz felszívására ugyanakkor nincs hatással a krónikus alkoholfogyasztás (Beck és Dinda, 1981; Bode és Bode, 1990).

A fehérjék, zsírok és szénhidrátok felszívását vizsgálva kimutatták, hogy alkoholisták duodenumában ezekből a tápanyagokból szignifikánsan kevesebb jut be a keringésbe. A jejunumban azonban ilyen különbség nem tapasztaltak. A duodenum és a jejunum felszívási kapacitását átlagolva nem volt különbség az alkoholisták és az ugyanolyan korú kontroll csoport között. Ennek oka valószínűleg az, hogy a duodenumban a nyálkahártya sérülése sokkal kiterjedtebb mint a jejunumban, így a felszívás is nagyobb mértékben károsodik (Pfeiffer és mtsai., 1992).

A krónikus alkoholfogyasztás súlyosan károsítja a víz és az elektrolitok, közöttük is a nátriumionok felszívását elsősorban a jejunum és az ileum területén

(Pfeiffer és mtsai., 1992). A vitaminok közül pedig a folsav, a C vitamin és a B_6 vitamin felszívása károsodik a legnagyobb mértékben.

Az alkohol igen jelentős hatással van a bélcsatorna motilitására, ennek pontos mechanizmusa azonban ezidáig nem ismert. A perisztaltika megváltozása igen komoly bélrendszeri problémákhoz vezet, többek között kedvez a baktériumok felszaporodásának és így az endotoxinok és egyéb toxinok felhalmozódásának (4. ábra).



4. ábra A krónikus alkoholfogyasztás bélcsatornára gyakorolt hatásainak sematikus ábrázolása. A bélfal nyálkahártyájának károsítása és a baktériumflóra túlszaporodása mellett az alkohol jellemző hatásaként sérül a perisztaltikus reflex mechanizmusa a vékonybélben.

A motilitásra gyakorolt hatásként a tranzit lassulása figyelhető meg alkoholista betegeken a kontroll csoporttal összehasonlítva (Addolorato és mtsai., 1997; Wegener és mtsai., 1991). A tranzit lassulásának mértéke nem áll összefüggésben az elfogyasztott alkohol mennyiségével vagy a fogyasztás időtartamával (Addolorato és mtsai., 1997). Egyes vizsgálatok szerint a megváltozott motorikus funkciók magyarázata a bélfal simaizomsejtjeinek károsodása (Lu és mtsai., 1997). A motilitásra gyakorolt hatást feltehetően a gyomor-béltraktus lumenében és nem a vérben található alkohol váltja ki, hiszen a lumenbe juttatott etanol jóval erősebben gátolta a kontraktilitási hullámokat, mint az intravénásan adagolt etanol (Charles és

Phillips, 1995). Kísérletes körülmények között, patkányokban már 3%-os vízben oldott etanol krónikus, 8 hétig tartó fogyasztása csökkentette a spontán és tónusos simaizom összehúzódást a gyomorban és a duodenumban (Palasciano és mtsai., 1995).

II. CÉLKITŰZÉSEK

Mivel a NO szabályozza a perisztaltikus reflex leszálló gátlását, feltételeztük, hogy a NO és szintetizáló enzimeik szerepet játszanak a krónikus alkoholfogyasztást követő megváltozott motorikus funkciókban. A feltételezésünk teszteléséhez szükséges kísérleteket - az aktivitásmérés kivételével - én végeztem. A NOS enzimaktivitás mérése Dr. Kaszaki József érdeme.
Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan változik meg az egér bélcsatorna motilitása *in vivo*, krónikus alkoholfogyasztást követően?

- Változik-e a nitrerg neuronok által szabályozott simaizom-relaxáció krónikus alkoholfogyasztás után egér jejunumból készült myentericus plexus-simaizom preparátumban?

- Változik-e a nNOS-immunpozitív myentericus neuronok száma és az összneuronszám alkoholfogyasztást követően?

- Változik-e a myentericus neuronok által termelt NO mennyisége alkoholfogyasztás után?

- A NO-t szintetizáló neuronok és a nNOS-immunreaktív neuronok ugyanazok-e?

- Változik-e, és ha igen, milyen mértékben a cNOS és iNOS enzimek aktivitása krónikus alkoholfogyasztást követően a patkány bélcsatorna különböző szakaszain?

- Változik-e az eNOS és nNOS enzimfehérjék mennyisége alkoholfogyasztás után a patkány bélcsatorna különböző szakaszaiból készített homogenizátumokban?

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

III.1. FELHASZNÁLT ÁLLATOK

A kísérletekben használt állatok tartása és felhasználása az Európai Közösség Tanácsa irányelveinek (86/609/EEC) és a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998 és 243/1998) megfelelően, az intézményi etikai bizottság engedélyével történt.

Egerek

Két hónapos felnőtt Swiss egereket a kísérletek kezdetekor három csoportra osztottunk. Két kontroll csoportra, az egyik vizet, a másik az alkohollal megegyező energiatartalmú szacharózoldatot kapott, és egy alkoholkezelt csoportra. Az alkoholkezelt csoport a 10% és 15% etanoltartalmú két hetes adaptációs periódust követően még 3 hétig kapta a 20% etanol vizes oldatát. Az elfogyasztott folyadékot és az állatok súlyát folyamatosan mértük az 5 hét alatt. A napi alkoholfogyasztás átlagosan 7,8 g etanol/testtömeg kg volt. Az 5 hetes kezelési idő elején a vizes kontroll, a cukros kontroll és az alkoholkezelt állatok súlya 32±3,3 g, 28,5±2,9 g és 31,75±2,9 g, míg a kezelési idő végén 35,6±3,9 g, 34,6±3,4 g és 33±2,8 g volt. Az állatokat éteres altatást követően kivéreztetéssel áldoztuk fel.

Patkányok

Kísérleteinkhez felnőtt hím Wistar patkányokat használtunk amelyeket a kísérlet kezdetekor két csoportra osztottunk. A kontroll csoport vizet, míg az alkoholkezelt csoport az első héten 10% (v/v), a második héten 15%-os etanol vizes oldatát kapta. E két hét adaptációs periódust követően az alkoholkezelt csoport még 6 hétig fogyasztott 20%-os etanolt. A napi alkoholbevitel 5 g etanol/testtömeg kg volt. A nNOS-immunreaktív sejtek számának kvantitatív vizsgálatához csoportonként két állatból hetente vettünk mintát. NOS aktivitásméréshez és Western blothoz a 8 hetes alkoholkezelés után áldoztuk fel az állatokat. A kezelés kezdetekor a kontroll és alkoholkezelt állatok súlya 240±10 g volt, míg a kezelés végén az alkoholkezelt állatoké 329,1±5,2 g volt, míg a kontroll állatoké 354,4±6,3 g. Az állatokat cervikális diszlokációval áldoztuk fel.

III.2. MINTAELŐKÉSZÍTÉS

Kísérleteinkhez patkányok esetében a bélcsatorna duodenum, jejunum, ileum és proximális colon szakaszaiból vettünk mintát. A duodenum mintát 5-10 cm-re, míg a jejunum mintát 20-25 cm-re a pylorustól lévő vékonybél szakaszból vágtuk. A cecum és a colon határától 5-10 cm-re proximálisan az ileális mintát, míg 1-3 cm-re disztálisan a colon mintát vágtuk ki. NOS aktivitásméréshez és Western blothoz a mintákat felhasználásig -80 ºC-on tartottuk.

Egérkísérleteinkhez csak a vékonybél jejunum szakaszából vettünk mintát, a pylorustól kb. 10 cm távolságról.

III.3. *IN VIVO* TRANZITVIZSGÁLAT

Az egerektől 12 órával a kísérlet kezdete előtt megvontuk a táplálékot, majd éteres altatásban egy kanül segítségével 0,1 ml Evans-kék festéket (50 mg/ml) juttattunk a gyomorba. Az Evans-kék 0,5% metilcellulózt tartalmazott, ezért a festék közepesen folyékony állagú volt. Tizenöt perc elteltével az állatokat feláldoztuk. A tápcsatornát az alsó nyelőcsősphincternél és a pylorus alatt cérnával elkötöttük, hogy megakadályozzuk az Evans-kék további áramlását. A gyomrot és a vékonybelet kiboncoltuk. Ezután lemértük a pylorus és az Evans-kék legtávolabbi migrációs pontja közötti távolságot és az értéket a Evans-kék migrációjának százalékában fejeztük ki, ahol a 100% a vékonybél teljes hossza. A vékonybélben az Evans-kék további áramlását 5, egymástól egyenlő távolságra elhelyezett csipesszel akadályoztuk meg.

III.4. *IN VITRO* SIMAIZOM-RELAXÁCIÓ MÉRÉS

A kiboncolt jejunumot jéghideg Krebs pufferbe helyeztük (összetétel mM-ban: 118 NaCl, 4,75 KCl, 2,5 $CaCl_2$, 1,2 $MgSO_4$, 25 $NaHCO_3$, 1 NaH_2PO_4 és 11 glükóz; pH 7,4). A jejunumot a mezentérium mentén felvágtuk és a nyálkahártyát és az alatta lévő kötőszövetes réteget eltávolítottuk. Az így elkészített preparátumból 0,5 cm-es darabokat vágtunk és azokat szervedényekbe (5 ml) helyeztük, amelyben 95% O_2 és 5% CO_2 keverékével folyamatosan áramoltatott és 37°C-on tartott Krebs puffer

volt. Az ideg-izom preparátumokat két platinum gyűrű elektród közé helyeztük (távolság a gyűrűk között: 10 mm, a gyűrűk átmérője: 3 mm). A preparátum alsó vége rögzítve volt, a felső végét pedig egy erőátalakítóhoz csatlakoztattuk, amely folyamatosan mérte az izometrikus összehúzódások mértékét. Guanetidint (2-(2-azokan-1-iletil)guanidin; 198,309 g/mol; 3 μM) és atropint (endo-(±)-α-(hidroximetil)benzénecetsav 8-metil-8-azabiciklo[3.2.1]okt-3-il észter; 289,37 g/mol; 1 μM) használtunk az adrenerg és kolinerg válasz gátlására. Az ideg-izom preparátumokat prosztaglandin $F_{2\alpha}$ (0,3 μM) segítségével prekontraháltattuk és a NANC relaxációt elektromos mező stimuláció (EFS 1, 2, 4 és 8 Hz), NO (savanyított $NaNO_2$, 10 μM, 30 μM, 0,1 mM) és glicerol trinitrát (GTN, 1μM) hozzáadásával váltottuk ki. NOS inhibitorként nitro-L-arginint (L-NNA, 0,3 mM) használtunk. Az ideg-izom preparátumok relaxációjának mértékét a prosztaglandin $F_{2\alpha}$ által kiváltott kontrakcióra adott relaxációs válasz százalékában fejeztük ki.

III.5. NEURONÁLIS NOS, PGP9.5, HUC/D IMMUNHISZTOKÉMIA ÉS SEJTSZÁMOLÁS

Immunhisztokémia

A fixálás és az immunhisztokémia minden lépése szobahőmérsékleten történt. A bélszakaszokat Krebs pufferben mostuk, majd a mezentérium mentén felvágtuk. Ezután a mintát kifeszítve sylgarddal bélelt petricsészébe helyeztük és 4% paraformaldehiddel (PFA 0,1 M foszfát pufferben; pH 7,0) 2 órán át fixáltuk. Fixálás után a mintákat 0,01 M foszfát pufferben (PB; pH 7,4) mostuk majd wholemount preparátumokat készítettünk belőlük a nyálkahártya, az alatta lévő kötőszövet és a körkörös izom eltávolításával. Az így elkészített wholemount preparátumot - amely tartalmazta a savós hártyát, a hosszanti izomréteget és a rajta elhelyezkedő myentericus plexust - vittük tovább immunhisztokémiára.

A nem specifikus kötőhelyek blokkolása PB-ben oldott 10% kecske szérum, 0,1% marha szérum albumin, 0,05% thimerozál és 1% Triton X-100 keverékében történt 30 percig. A nNOS ellenanyagot a neuronális NOS izoformát tartalmazó myentericus neuronok jelölésére, míg a PGP9.5 és HuC/D ellenanyagot pánneuronális markerként használtuk. Az ellenanyagok neve, hígitása, az adott

lépéshez tartozó inkubációs idő és az ellenanyagok gyártója az 1. és a 2. táblázatban látható. Az egyes inkubációs lépések között a mintákat háromszor 10 percig mostuk PB-ben. A tormagyökér peroxidáz aktivitást diaminobenzidin és nikkel-klorid segítségével tettük láthatóvá. Az ellenanyagok specificitását negatív kontrollok készítésével ellenőriztük, ekkor elsődleges ellenanyag nélkül inkubáltuk a mintákat. A diaminobenzidinnel és nikkel-kloriddal előhívott mintákat glicerin-PB 1:3 arányú keverékével fedtük, míg a fluoreszcens mintákat Citifluorral.

Inkubációs lépés	Ellenanyag	Hígitás	Inkubációs idő	Gyártó
Elsődleges	Poliklonális anti-nyúl nNOS	1:1000	Éjszakán át	Euro Diagnostica
	Poliklonális anti-tengerimalac PGP9.5	1:500		Chemicon International
Másodlagos	Biotinilált anti-nyúl IgG	1:400	2 óra	Dako
	Cy3-konjugált anti-tengerimalac IgG	1:500		Jackson ImmunoResearch
Harmadlagos	Sztreptavidin-FITC	1:1000	1 óra	Jackson ImmunoResearch

1. táblázat Egér jejunum mintákon a kvantitatív immunhisztokémiához használt ellenanyagok, hígitásaik, az egyes lépésekhez tartozó inkubációs idő és az ellenanyagok gyártóinak listája.

Inkubációs lépés	Ellenanyag	Hígitás	Inkubációs idő	Gyártó
Elsődleges	Poliklonális anti-egér nNOS Monoklonális anti-egér HuC/D	1:200 1:20	Éjszakán át	Sigma Molecular Probes
Másodlagos	Biotinilált anti-egér IgG Biotinilált anti-egér IgG	1:100 1:500	4 óra 2 óra	Amersham Rockland
Harmadlagos	Sztreptavidin tormagyökér peroxidáz Sztreptavidin-Cy3	1:100 1:3000	Éjszakán át 4 óra	Amersham Jackson Immunoresearch

2. táblázat Patkány duodenum, jejunum, ileum és colon mintákon a kvantitatív immunhisztokémiához használt ellenanyagok, hígitásaik, az egyes lépésekhez tartozó inkubációs idő és az ellenanyagok gyártóinak listája.

A DAF-FM-mel festett preparátumokon végzett dupla jelöléses immunhisztokémiához a mintákat 1 órán át 4% PFA-ban fixáltuk, majd háromszor 10 percig mostuk. Ezt követően a nem specifikus kötőhelyek blokkolása a wholemountoknál használt módon történt. Elsődleges ellenanyagként poliklonális anti-nyúl nNOS-t (1:1000, Euro Diagnostica) és poliklonális anti-tengerimalac PGP9.5-t (1:500, Chemicon) használtunk egy éjszakát át tartó inkubáció során. Ezt követően a mintákat anti-nyúl biotinilált IgG (1:400, Dako) és Cy5-konjugált anti-tengerimalac IgG (1:500, Jackson) keverékében inkubáltuk 2 órán át. Majd

sztreptavidin-Cy3-mal (1:6000, Jackson) történő inkubáció következett 1 órán át. A mintákat Citifluorral fedtük.

Sejtszámolás

Egér minták

A wholemountokat Zeiss Axiophot mikroszkóppal vizsgáltuk. Wholemountonként 20 random választott látótérben számoltuk az egy látótérbe (0,74 mm^2) eső nNOS- és PGP9.5-immunoreaktív sejteket.

Patkány minták

A wholemountokat Zeiss Axiovert 200M fénymikroszkóppal és a hozzá tartozó Zeiss Axiocam HRc kamerával vizsgáltuk. Wholemountonként 20 random választott, azonos felbontású, méretű és nagyítású digitális képet készítettünk. A digitális képeken látható immunfestett sejteket a laboratóriumunkban kifejlesztett Plexus Pattern Analysis szoftver segítségével számoltuk le (Roman és mtsai., 2004).

III.6. NO FELSZABADULÁS MÉRÉSE FLUORESZCENS FESTÉKKEL (DAF-FM) ÉLŐ SZÖVETBEN

A myentericus neuronokban termelődő NO mérésére a DAF-FM (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein) diacetát fluoreszcens prekurzort használtuk. A membránpermeábilis DAF-FM diacetát a sejtbe jutva a citoplazmatikus észterázok hatására elveszti permeabilitását. Az így kialakult DAF-FM NO és oxigén jelenlétében egy erősen fluoreszkáló, fénystabil triazol formává alakul, amelynek fluoreszcencia intenzitása arányos a NO koncentrációjával (Itoh és mtsai., 2000).

A jejunumot kiboncoltuk és 95% O_2 és 5% CO_2 keverékével folyamatosan áramoltatott, 1 μM nifedipint tartalmazó jéghideg Krebs pufferbe helyeztük. Az előzőekben már leírt módon wholemount preparátumot készítettünk, majd a preparátumot egy kb. 1 cm átmérőjű aranyból készült gyűrűn rögzítettük. Ezután a

gyűrűt 5 μM DAF-FM-et tartalmazó oxigenáltatott Krebs pufferbe helyeztük és szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percig. Majd háromszor 5 perc mosás után újabb 30 perc inkubáció következett Krebs pufferben. Ezt követően a mintákat egy kis kamrába helyeztük amelynek az alját egy vékony fedőlemez képezte. A digitális felvételeket 25x plan-neofluar vizes immerziós objektívvel (0,8 nm apertúra), Zeiss Axiovert 100M mikroszkóppal készítettük, Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóp rendszerben. A DAF-FM gerjesztését 488 nm-es argon lézerrel (200 mW) és 505 nm-es filterrel végeztük. A különböző mintákban lévő fluoreszcens értékek összehasonlíthatóságának érdekében minden felvételt azonos mikroszkóp beállítások mellett készítettünk nem több mint 30 perccel az inkubálás után, szobahőmérsékleten. A digitális felvételeken a neuronokat körberajzoltuk és a Zeiss LSM 510 V2.53 analizáló szofver segítségével megállapítottuk a neuronok átlag fluoreszcencia értékét.

A DAF-FM specificitásának ellenőrzéséhez csoportonként 10-10 wholemountot inkubáltunk 15 percig 1 mM L-NAME-ben.

III.7. cNOS ÉS iNOS AKTIVITÁSMÉRÉS

A krónikus alkoholfogyasztás hatását a cNOS és iNOS enzimek aktivitására a patkány bélcsatorna duodenum, jejunum, ileum és colon szakaszaiban határoztuk meg és az eredményt fmol/mg fehérje/perc mértékegységben tüntettük fel. Az enzimek által termelt NO mértékét a [^{3}H]L-citrullinból átalakult [^{3}H]L-arginin mennyisége alapján határoztuk meg Szabó és munkatársai szerint (1993). A jégen tartott mintákat 50 mM tris-(hidroximetil) aminometán-HCl-t (Tris-HCl), 0,1 mM etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA), 0,5 mM ditiotreitolt, 1 mM fenilmetilszulfonil-fluoridot és 10 μg/ml szójabab tripszin gátlót tartalmazó PB-ben (pH 7,4) homogenizáltuk.

A homogenizátumokat 24 000 g-n, 4°C-on 20 percig centrifugáltuk és a felülúszót féligáteresztő oldatkoncentráló centrifugacsőbe tettük át. A csöveket 1000 g-n 150 percig centrifugáltuk, majd a besűrűsödött felülúszót az ultrafilterből 300 μl homogenizáló pufferrel mostuk ki. A mintákat DOWEX kationcserélő gyantán (50W-X8, Na^+ forma) 5 percig inkubáltuk, hogy az endogén L-arginint a mintából eltávolítsuk. A gyantát centrifugálással választottuk el (1500 g-n 10 percig) és a felülúszót használtuk a NOS enzimaktivitás mérésére.

cNOS aktivitásméréshez 50 µl enzimextraktumot és 100 µl reakcióelegyet (pH 7,4; 50 mM Tris-HCl puffer, 1 mM NADPH, 10 µM tetrahidrobiopterin, 1,5 mM $CaCl_2$, 100 U/ml kalmodulin és 0,5 µCi [^{3}H]L-arginin) inkubáltunk 30 percig 37°C-on. A reakciót 2 mM etilén glikol tetraecetsavat (EGTA) és 2 mM EDTÁ-t tartalmazó 1 ml jéghideg HEPES puffer (pH 5,5) hozzáadásával állítottuk le. A NOS aktivitástól független [^{3}H]L-citrullin termelés megállapítása érdekében méréseket végeztük forralt enzimmel és 3,2 mM L-NNA-nal.

Az iNOS aktivitást kalmodulin nélkül és 8 mM EGTA hozzáadásával határoztuk meg. A DOWEX kationcserélő gyantán (AG 50W-X8, Na^+ forma) inkubált 1 ml reakcióelegyet 2 ml desztillált vízzel eluáltuk. Az eluált [^{3}H]L-citrullin aktivitását Tri-Carb folyadék szcintillációs detektorral mértük. A minták fehérjekoncentrációjának meghatározása Lowry és munkatársai (1951) szerint történt.

III.8. eNOS ÉS nNOS FEHÉRJEMENNYISÉG MEGHATÁROZÁSA WESTERN BLOTTAL

A szárazjégen tartott mintákat folyékony N_2 folyamatos hozzáadásával dörzsmozsárban porrá törtük. Ezt követően 4x koncentrált Laemmli mintapuffert adtunk a mintákhoz, összedörzsöltük vele, majd azonnal felforraltuk. A 3 percig forralt mintákban ezután az RC/DC (BioRad) kittel meghatároztuk a fehérjekoncentrációt. A mintánként 50 µg fehérjét 7,5%-os nátrium-dodecil szulfát-poliakrilamid gélre vittük, majd 0,2 mm nitrocellulóz filterre (Schleicher&Schuell) blottoltuk. A filtert szárítás után foszfát pufferes sóoldatban (PBS) rehidratáltuk, majd 1%-os BSA-PBT-ben (PBS+0,05% Tween-20, Sigma) 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a filtert az elsődleges ellenanyaggal egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Elsődleges ellenanyagként egér anti-nNOS-t (Sigma, 1:3000), anti-eNOS-t (Sigma, 1:3000), és anti-β-aktint (Sigma, 1:10000) használtunk. A blotokat 3x10 percig mostuk PBT-ben majd anti-egér alkalikus foszfatáz-konjugált ellenanyaggal (Sigma, 1:30000) inkubáltuk egy órát szobahőmérsékleten. Ezután a blotokat háromszor PBT-ben és egyszer alkalikus fosztatáz pufferben (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$) mostuk. Az előhívás alkalikus foszfatáz pufferben feloldott 0,33 és 0,17 mg/ml koncentrációjú nitrozokék tetrazolium és 5-bromo-4-

kloro-3-indolil foszfát p-toluidin só (Sigma) segítségével történt. A blotok kiértékelése a NIH Image 1.63F-fel történt három független nNOS-sal illetve eNOS-sal festett bloton. Belső kontrollként minden esetben β-aktint használtunk.

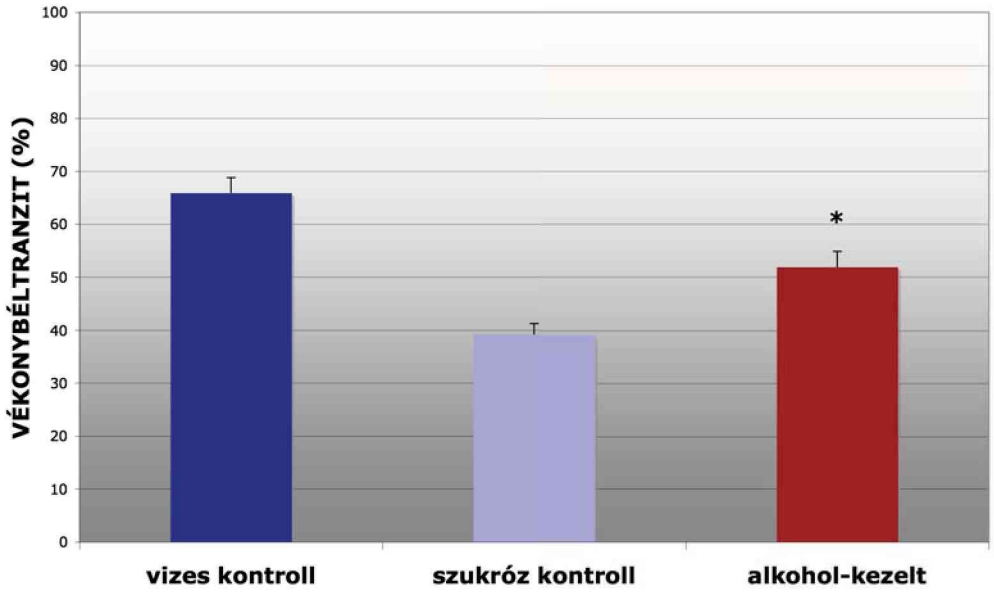
III.9. STATISZTIKAI ANALÍZIS

Statisztikai analízishez – ha másként nem említjük – az egyutas varianciaanalízist (ANOVA) használtuk SPSS szoftverrel, *post-hoc* teszthez pedig a Student-Newman-Keuls tesztet. A $P<0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat átlag±szórás (SEM, standard error of the mean) formában tüntettük fel. Eredményeinknél n a csoportonként felhasznált állatok számát, míg v a kvantitatív immunhisztokémiánál leszámolt wholemountok számát jelenti. A DAF-FM fluoreszcencia intenzitás statisztikai értékeléséhez L-NAME inkubáció előtt és után a páros t próbát használtuk.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. A KRÓNIKUS ALKOHOLFOGYASZTÁS HATÁSA A VÉKONYBÉLTRANZITRA

A krónikus alkoholfogyasztás vékonybéltranzitra gyakorolt hatását egerekben *in vivo* vizsgáltuk. Az eredményeket Evans-kék festék migrációjának a vékonybél hosszához viszonyított százalékában fejeztük ki. A krónikus alkoholkezelt egerekben a vékonybéltranzit a vizes kontrollokkal összehasonlítva szignifikánsan késett 51,89±2,94%-ra 65,86±2,96%-ról, az izokalorikus cukoroldattal kezelt kontroll csoporttal összehasonlítva pedig szignifikánsan gyorsult 39,14±2,12%-ról 51,89±2,94%-ra (P<0,05, n=12, 5. ábra).

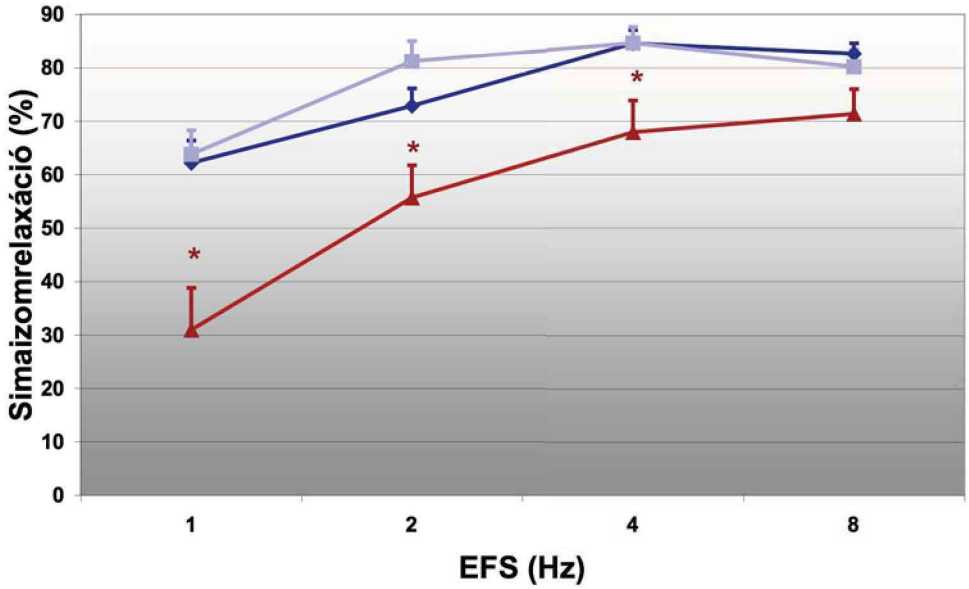


5. ábra Az Evans-kék festék *in vivo* migrációja a vékonybélben vizes kontroll, izokalorikus cukoroldattal kezelt kontroll és krónikus alkoholkezelt egerekben. Krónikus alkoholkezelt egerekben a tranzit szignifikánsan késett a vizes kontroll csoporttal összehasonlítva, az izokalorikus cukoroldattal kezelt kontroll csoporttal összehasonlítva azonban szignifikáns gyorsulást mutatott. *P<0,05

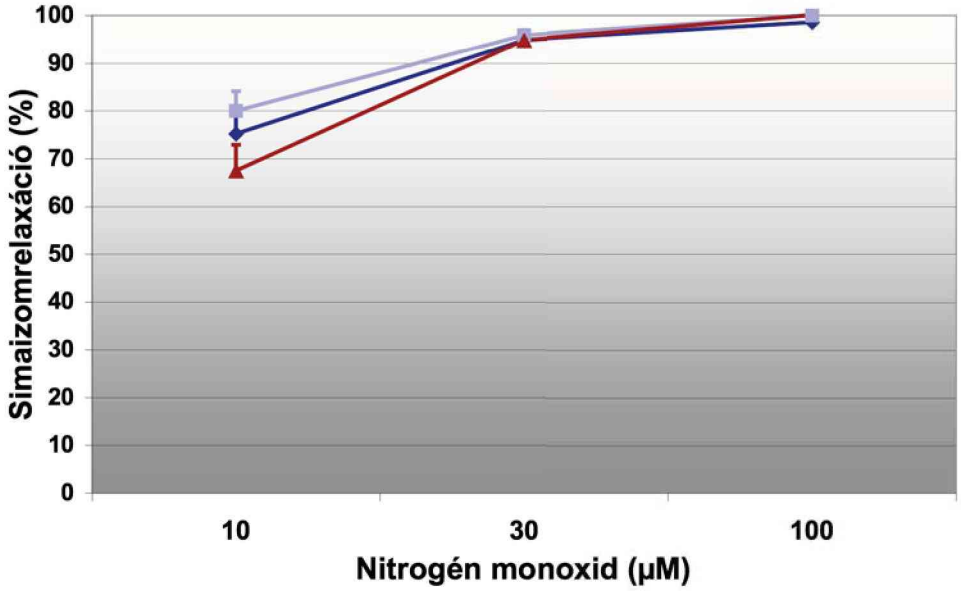
IV.2. A KRÓNIKUS ALKOHOLFOGYASZTÁS HATÁSA A NO-MEDIÁLT SIMAIZOM-RELAXÁCIÓRA

A krónikus alkoholfogyasztás hatását a NO által szabályozott simaizom-relaxációra egér jejunum ideg-izom preparátumon vizsgáltuk *in vitro*. Mind a vizes, mind az izokalorikus cukoroldatot fogyasztó kontroll mintákkal összehasonlítva a NO-mediált simaizom-relaxáció 1, 2 és 4 Hz EFS hatására szignifikánsan lecsökkent a krónikus alkoholkezelt mintákban (n=8; P<0,05). Ezeket az eredményeket a 6.A ábra és a 3. táblázat foglalja össze. Az EFS-re adott simaizom-relaxáció a nem szelektív NOS inhibitor, az L-NNA segítségével teljesen blokkolható volt. Ezeket az eredményeket itt nem szemléltetem.

A növekvő koncentrációjú exogén NO-ra adott relaxációs válasz nem különbözött szignifikánsan a vizes, az izokalorikus cukoroldatot fogyasztó és krónikus alkoholkezelt állatokból származó minták között (6.B ábra, 3. táblázat).



6.A ábra



6.B

6. ábra NANC simaizom-relaxáció EFS (A) és exogén NO (B) hatására jejunum ideg-izom preparátumban vizes kontroll (◆), cukor kontroll (■) és krónikus alkoholkezelt (▲) egerekben. Az eredményeket a $PGF_{2\alpha}$-által kiváltott simaizomkontrakcióra adott relaxációs válasz %-ában fejeztük ki. *P<0,05; mindkét kontrolltól szignifikánsan különböző.

	EFS				NO		
	1 Hz	2 Hz	4 Hz	8 Hz	10 μM	30 μM	100 μM
Vizes kontroll	62.17 ±4.2%	72.86 ±3.3%	84.57 ±2.4%	82.6 ±1.9%	75.26 ±4.49%	92.06 ±1.43%	98.64 ±0.8%
Cukor kontroll	63.79 ±4.5%	81.25 ±3.8%	84.64 ±2.9%	80.19 ±3.2%	80.01 ±4.13%	95.97 ±1.13%	100%
Alkohol kezelt	30.95 ±7.8% *	55.71 ±6% *	67.92 ±5.9% *	71.38 ±4.6%	67.51 ±5.44%	94.93 ±1.46%	100 ±0.6%

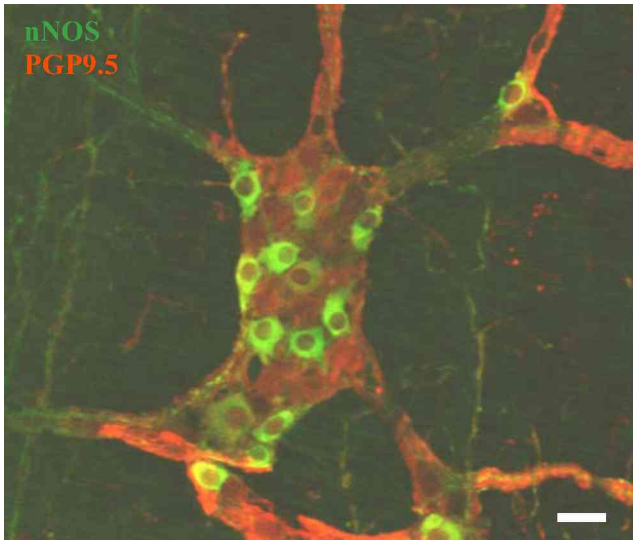
3. táblázat A NANC simaizom-relaxáció százaléka EFS és exogén NO hatására jejunum ideg-izom preparátumban vizes kontroll, cukoroldatot fogyasztó kontroll és krónikus alkoholkezelt egerekben Az 1, 2 és 4 Hz EFS hatására szignifikánsan csökkent a simaizom-relaxációs válasz krónikus alkoholkezelt mintákban mind a vizes kontroll, mind a cukoroldatot fogyasztó kontroll mintákkal összehasonlítva. A növekvő koncentrációjú exogén NO-ra adott válasz nem különbözött szignifikánsan a három csoport között. *P<0,05, a kontrolltól szignifikánsan különböző.

IV.3. AZ ÖSSZNEURONSZÁM ÉS A nNOS-IMMUNOPOZITÍV MYENTERICUS NEURONOK SZÁMÁNAK VÁLTOZÁSA ALKOHOLFOGYASZTÁS UTÁN

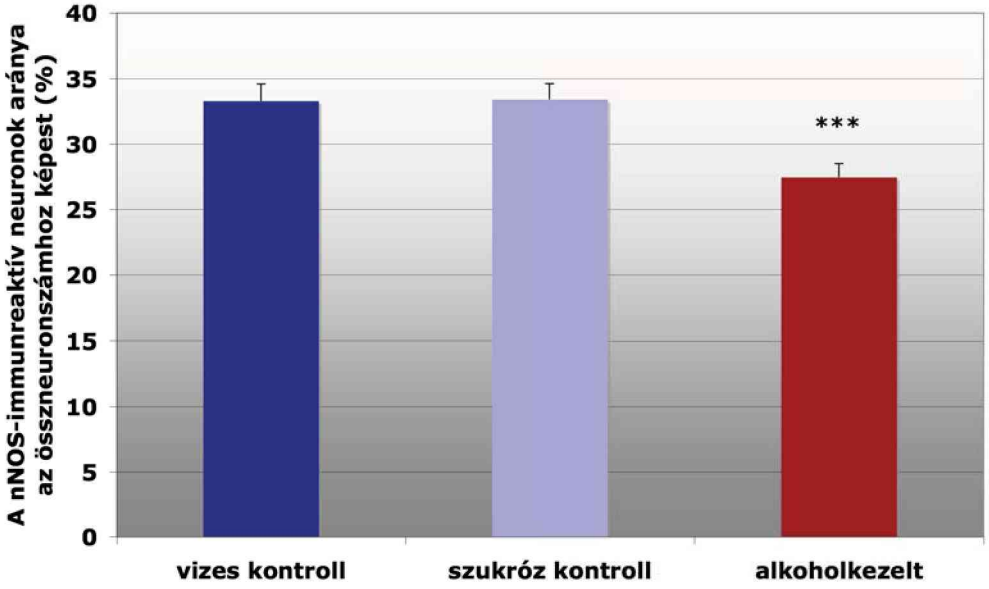
Egér minták

Az alkoholfogyasztás hatását a myentericus összneuronszámra (PGP9.5) és nNOS-immunreaktív neuronok százalékos arányára vizes kontroll, cukoroldatot fogyasztó kontroll és alkoholkezelt egerek jejunumából származó mintákban vizsgáltuk (n=8). Az immunfestett mintákon (7. ábra) sejtszámolás (v=332) és statisztikai analízis után nem volt szignifikáns különbség a PGP9.5-immunoreaktív neuronok számában a vizes, a cukoroldatot fogyasztó kontroll és az alkoholkezelt állatokból származó minták között (41,07±2,62, 40,83±2,99, 40,53±3,08 neuron/látótér; P>0,05).

A nNOS-immunreaktív neuronoknak az összneuronszámhoz viszonyított százalékos arányában nem volt különbség a vizes és a cukoroldatot fogyasztó kontroll csoport között (33,2±1,31%, 33,41±1,21%; P>0,05; 8. ábra). Alkoholfogyasztást követően azonban a nNOS-immunreaktív neuronok aránya mindkét kontroll csoporttal összehasonlítva szignifikánsan lecsökkent (27,44±1,06%; P<0,001; 8. ábra).



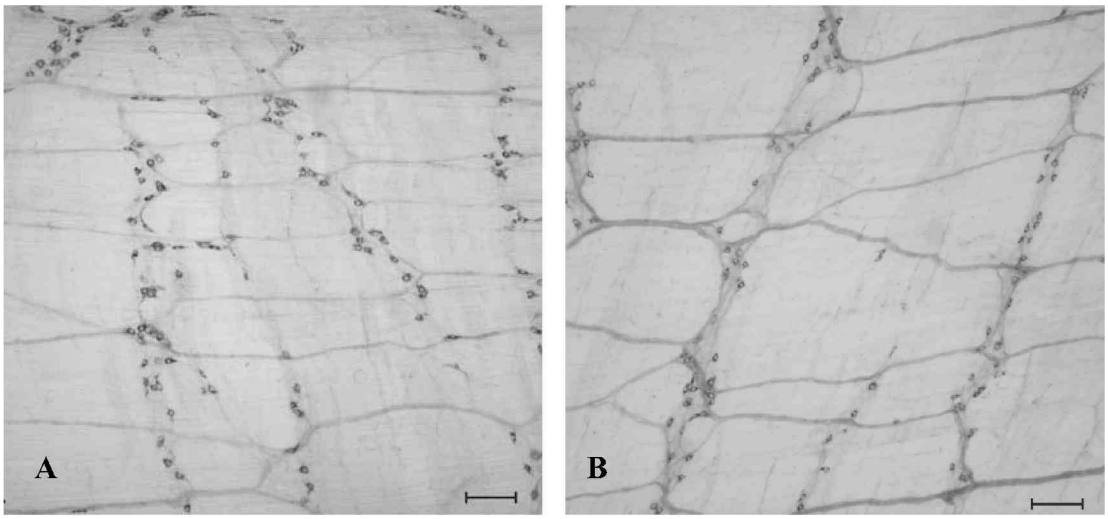
7. ábra Konfokális mikroszkóppal készült felvétel nNOS- (FITC, zöld fluoreszcencia) és PGP9.5-immunreaktív (Cy3, piros fluoreszcencia) myentericus neuronokról kontroll egér jejunumából származó mintában. Lépték: 20 μm.



8. ábra Vizes kontroll, cukoroldatot fogyasztó kontroll és krónikus alkoholkezelt egerekben a nNOS- és PGP9.5-immunpozitív myentericus neuronokat megszámoltuk és az adatokat statisztikai analízisnek vetettük alá. Az összneuronszámhoz (PGP9.5) viszonyított nNOS-immunreaktív neuronok százalékos aránya szignifikánsan lecsökkent krónikus alkoholkezelt egerekben mindkét kontroll csoporttal összehasonlítva. ***P<0,001

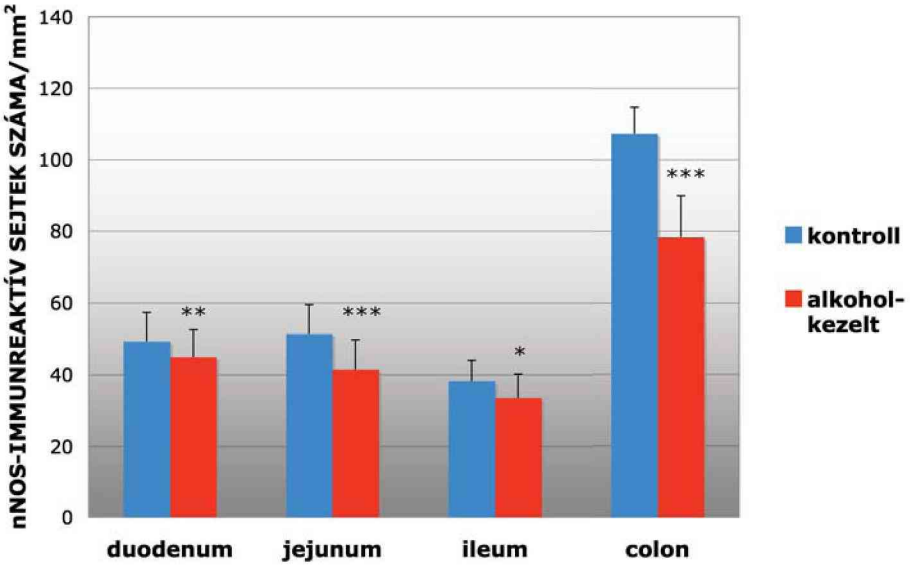
Patkány minták

Annak meghatározására, hogy az alkoholfogyasztás időtartama hogyan befolyásolja a nNOS- és HuC/D-immunreaktív (pánneuronális marker) sejtek számát, krónikus alkoholkezelt és vizet fogyasztó kontroll patkányok bélszakaszaiból a 20%-os alkoholfogyasztás ideje alatt hetente vettünk mintát. nNOS- (9.A,B ábra) és HuC/D- (nincs kép bemutatva) immunhisztokémia után kontroll és alkoholkezelt állatokból származó wholemount preparátumokon megszámoltuk az immunreaktív sejteket.

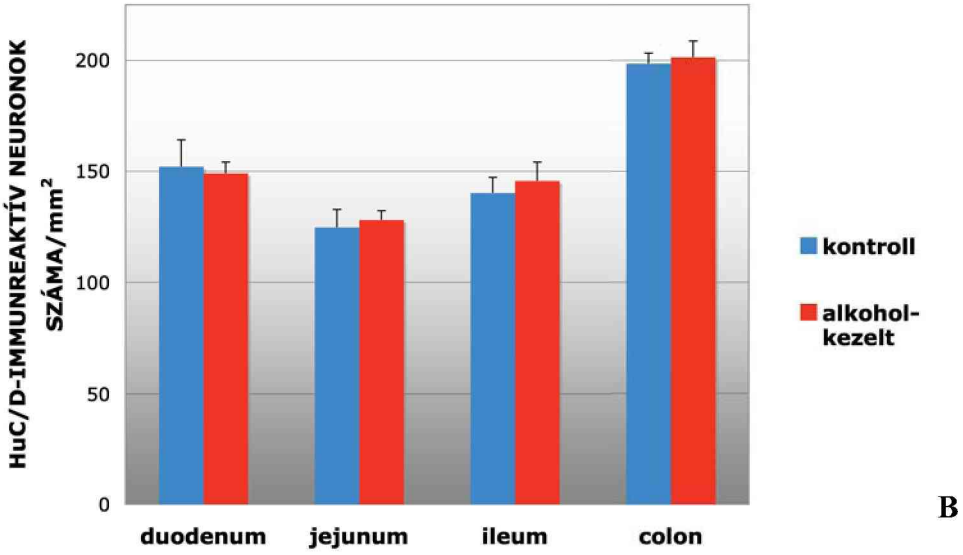


9. ábra Fénymikroszkópos felvétel kontroll (A) és alkoholkezelt (B) patkány duodenumából származó wholemount preparátumról nNOS-immunfestés után. Lépték: 150 µm.

A nNOS-immunreaktív sejtek száma már az alkoholkezelés első hete után szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest. Ez a számadat a vizsgált 6 hét során nem változott szignifikánsan, ezért a grafikus ábrázolásnál az egyes oszlopokban a 6 hét számadatainak átlagát mutatom be (10.A,B ábra). A sejtszámcsökkenés a jejunum és a colon területén volt a legszembetűnőbb (51,33±8,15 vs. 41,48±8,25 sejt/mm^2, és 107,27±14,7 vs. 78,29±21,63 sejt/mm^2, P<0,001), de a nNOS-immunreaktív sejtek száma a duodenum (49,27±8 vs. 44,90±7,6 sejt/mm^2, P<0,01) és az ileum (38,26±5,8 vs. 33,53±6,2 sejt/mm^2 P<0,05) területén is szignifikánsan lecsökkent (10.A ábra).



A

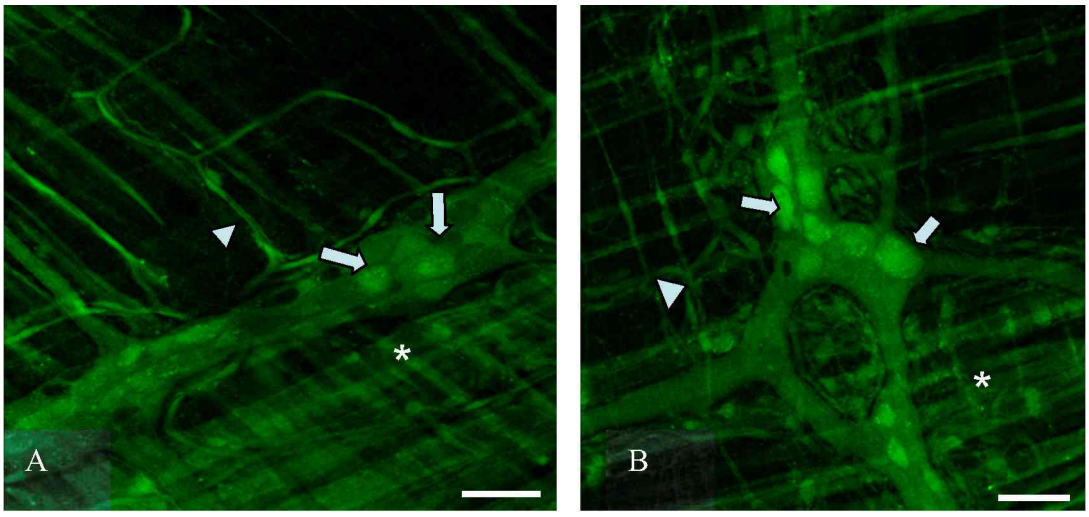


10. ábra A nNOS- (A) és HuC/D- (B) immunreaktív neuronok száma kontroll és krónikus alkoholkezelt patkányok különböző bélszakaszainak myentericus plexusában. A sejteket a 6 hetes alkoholkezelés alatt hetente számoltuk. (A) Már az első héten szignifikáns csökkenés mutatkozott a nNOS-immunreaktív sejtek számában alkoholkezelés hatására a kontroll csoporttal összehasonlítva és ez az érték nem változott szignifikánsan a kezelés végéig, ezért a 6 hét adatait átlagolva mutatom be. $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$. (B) Az összneuronszám (HuC/D-immunreaktív sejtek) nem változott szignifikánsan a kezelés időtartama alatt. (Az oszlopban látható értékek szintén 6 hét adatainak átlagai).

A HuC/D-immunreaktív sejtek száma egyik bélszakaszban sem változott szignifikánsan a krónikus alkoholkezelés hatására (duodenum: 152,16±12 vs. 149,1±5, jejunum: 124,77±8 vs. 128,05±4,2, ileum: 140,21±7 vs. 145,78±8,4, colon: 198,56±4,7 vs. 201,43±7,3 sejt/mm^2; 10.B ábra).

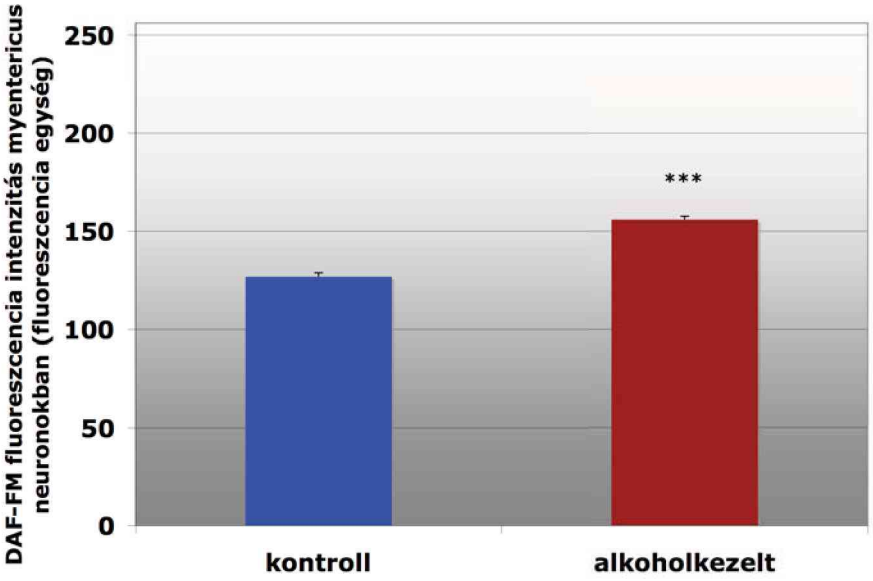
IV.4. AZ ALKOHOLFOGYASZTÁS HATÁSA A MYENTERICUS NEURONOK NO SZINTÉZISÉRE

A myentericus neuronok NO termelésének mérésére a DAF-FM fluoreszcens festéket használtuk, amelynek fluoreszcencia intenzitása arányos az NO koncentrációval. Az egér jejunumból származó wholemount preparátum DAF-FM-mel történő inkubációja után a myentericus neuronok, idegrostok, erek és simaizomsejtek mutattak intenzív festődést (11.A, B ábra). A fluoreszcens jel intenzitása L-NAME-mel (NOS inhibitor) való inkubáció után 52,5%-kal csökkent (P<0,001). Ez a jelenség arra utal, hogy a fluoreszcencia valóban a NO termelés eredménye.



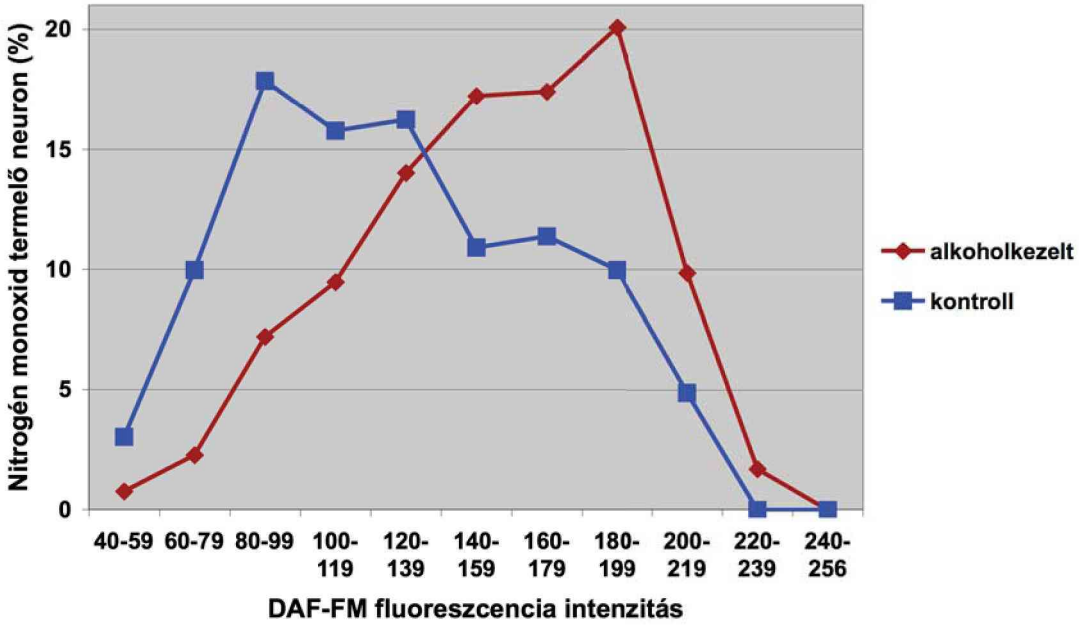
11. ábra Konfokális mikroszkóppal készült felvételek kontroll (A) és alkoholkezelt (B) egér jejunumából származó wholemount preparátumról. A DAF-FM fluoreszcens jel (NO jelző festék, zöld) myentericus neuronokban (nyíl), erekben (nyílhegy) és simaizomsejtekben (*) figyelhető meg. Lépték: 50 μm.

A jelölt myentericus neuronok fluoreszcencia intenzitását egy általunk felállított 0-tól 256-ig terjedő skálán (fluoreszcencia egység, f.e.) meghatároztuk, az értékeket átlagoltuk és statisztikailag analizáltuk (n=11). A fluoreszcencia intenzitás a kontroll egerekből származó mintákkal összehasonlítva krónikus alkoholkezelt állatokban szignifikánsan növekedett (959 neuron átlaga, 431 neuron alkoholkezelt állatokból származó mintákból és 528 neuron kontroll mintákból) (P<0,001; 126,68±2,12 f.e. vs. 155,88±1,66; 12. ábra).



12. ábra Az NO-specifikus fluoreszcens festék, a DAF-FM intenzitásának változása kontroll és krónikus alkoholkezelt egerek jejunális myentericus neuronjaiban. Az eredményeket egy általunk felállított 0-tól 256-ig terjedő fluoreszcencia egység skálán mutatom be. A fluoreszcencia intenzitás szignifikánsan növekedett krónikus alkoholfogyasztás hatására (***P<0,001).

A krónikus alkoholkezelt és kontroll állatok myentericus neuronjaiban mért fluoreszcencia intenzitás különbség jobb szemléltetésére a 0-tól 256-ig terjedő fluoeszcencia intenzitás skálát 20-asával felosztottuk. Ezután ábrázoltuk azoknak a neuronoknak a százalékos eloszlását, amelyek fluoreszcencia intenzitása egy-egy 20-as egységbe esett (13. ábra, 4. táblázat). A kontroll csoportban az összes NO termelő neuron legnagyobb aránya a 80-99 f.e. értékű csoportba esett, a krónikus alkoholkezelt csoportban ez az arány a 180-199 f.e. értékű csoportban volt.

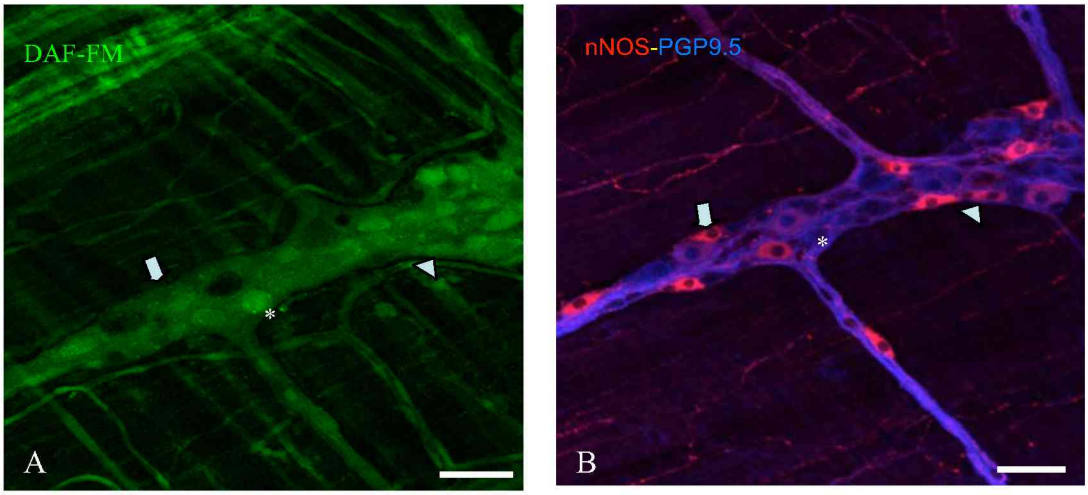


13. ábra A krónikus alkoholfogyasztás hatása jejunális myentericus neuronok DAF-FM fluoreszcencia intenzitására. A fluoreszcencia intenzitás skálát 20-as értékeket tartalmazó csoportokra osztottam és az abba az intenzitástartományba tartozó NO-t szintetizáló neuronok százalékát ábrázoltam. Míg a vizet fogyasztó kontroll csoportban a legtöbb neuron (17,86%) a 80-99 fluorenszcencia intenzitású, addig az alkoholkezelt csoportban a legtöbb neuron (20,07%) a 180-199 fluoreszcencia intenzitású csoportba tartozik.

DAF-FM fluoreszcencia intenzitás (fluoreszcencia egység)	A DAF-FM fluoreszcens (NO termelő) neuronok százaléka	
	kontroll	alkoholkezelt
40-59	3,01	0,75
60-79	9,97	2,27
80-99	17,86	7,19
100-119	15,77	9,46
120-139	16,24	14,01
140-159	10,95	17,23
160-179	11,36	17,42
180-199	9,97	20,07
200-219	4,87	9,84
220-239	0	1,76
240-256	0	0

4. táblázat A 13. ábrán látható grafikon értékeinek számszerű megjelenítése. A fluoreszcencia intenzitás skálát 20-as értékeket tartalmazó csoportokra osztottam és az abba az intenzitástartományba tartozó NO-t szintetizáló neuronok százalékát tüntettem fel. Míg a vizet fogyasztó kontroll csoportban a legtöbb neuron (17,86%) a 80-99 fluorenszcencia intenzitású, addig az alkoholkezelt csoportban a legtöbb neuron (20,07%) a 180-199 fluoreszcencia intenzitású csoportba tartozik.

Ezután megvizsgáltuk, hogy a DAF-FM fluoreszcens neuronok tartalmazzák-e a NOS neuronális izoformáját. DAF-FM festés után (14.A ábra) a szövetet fixáltuk, majd nNOS- és PGP9.5-immunhisztokémiát végeztünk (14.B ábra). A neuronok 22,7%-ában a DAF-FM a nNOS-sal együtt fordult elő, 42,3% nNOS immunreaktivitást mutatott, de nem jelölődött DAF-FM-mel és 35% csak DAF-FM fluoreszcenciát mutatott, de nNOS immunreaktivitást nem (*n*=4). 100%-nak a DAF-FM-mel és/vagy nNOS-sal festett sejteket tekintettük.

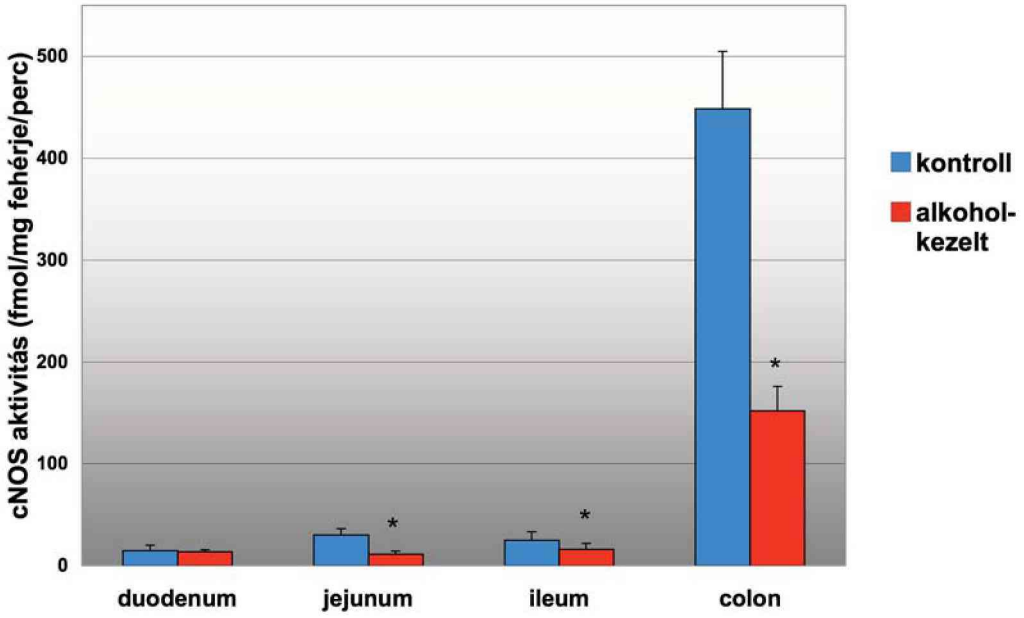


14. ábra Konfokális mikroszkóppal készült felvételek kontroll egér jejunumából származó wholemount preparátumról. DAF-FM festést követően (A), nNOS és PGP9.5 immunhisztokémiai festés után (B) DAF-FM és nNOS (nyílhegy) együttes előfordulását mutató sejteket, valamint csak DAF-FM-mel (*) illetve csak nNOS-sal festődött (nyíl) sejteket láttunk. Lépték: 50 µm.

IV.5. AZ ALKOHOLFOGYASZTÁS HATÁSA A NOS IZOENZIMEK AKTIVITÁSÁRA

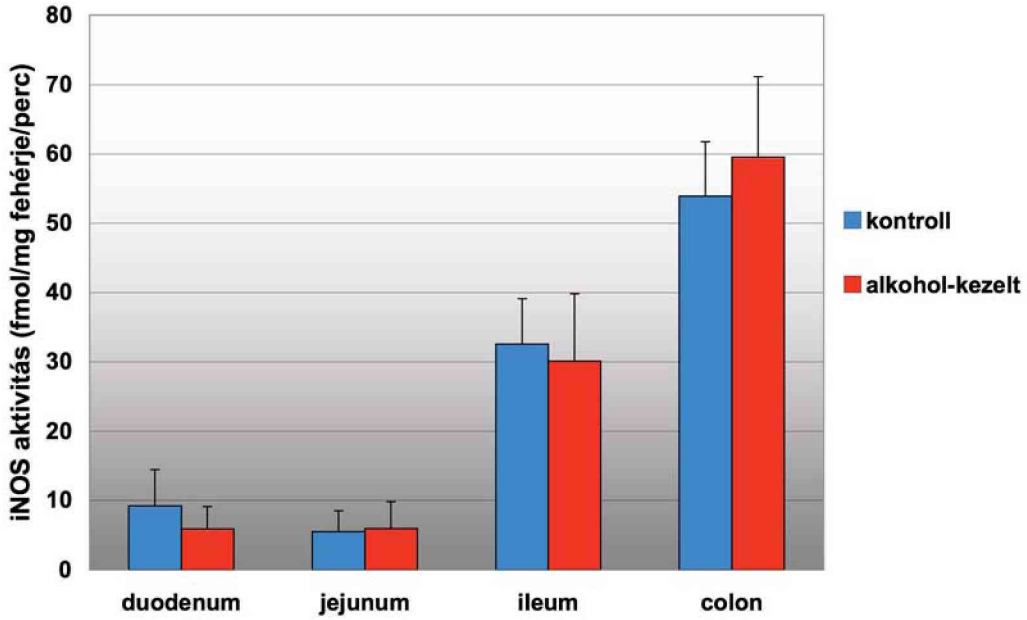
A krónikus alkoholkezelés hatását a cNOS és iNOS enzimek aktivitására patkány bélcsatorna duodenum, jejunum, ileum és colon szakaszaiban határoztuk meg.

A kontroll fiziológiás cNOS aktivitás húszszor magasabb volt a colonban, mint a duodenumban, jejunumban és ileumban (448,6±56,2, 14,5±5,5, 29,9±6 és 24,7±8,4 fmol/mg fehérje/perc, n=10). Krónikus alkoholfogyasztás hatására a cNOS aktivitás nem változott szignifikánsan a duodenumban (13,3±2,1 fmol/mg fehérje/perc, $P>0,05$), de szignifikánsan lecsökkent a jejunumban, ileumban és colonban (11,1±2,8, 15,8±6,1 és 151,8±23,9 fmol/mg fehérje/perc, n=8, $P<0,05$) a kontroll cNOS aktivitásértékekkel összehasonlítva (15. ábra).



15. ábra Konstitutív nitrogén-monoxid szintáz (cNOS) aktivitás a patkány bélcsatorna különböző szakaszaiban krónikus alkoholkezelt és kontroll körülmények között. Az oszlopok 10 kontroll és 8 alkoholkezelt állatból származó átlag±szórás értékek. A cNOS aktivitás szignifikánsan lecsökkent a jejunumban, ileumban és colonban krónikus alkoholfogyasztás hatására. *$P<0,05$

A normál fiziológiás iNOS aktivitás alacsonyabb volt a duodenumban és a jejunumban (9,2±5,2 és 5,47±3 fmol/mg fehérje/perc) mint az ileumban és a colonban (32,5±6,5 és 53,8±7,8 fmol/mg fehérje/perc, n=10). Ez az iNOS aktivitás nem változott szignifikánsan krónikus alkoholfogyasztás hatására (5,8±3,2, 5,9±3,8, 30,11±9,6 and 59,5±11,6 fmol/mg protein/min, n=10, *P*>0,05; 16. ábra).

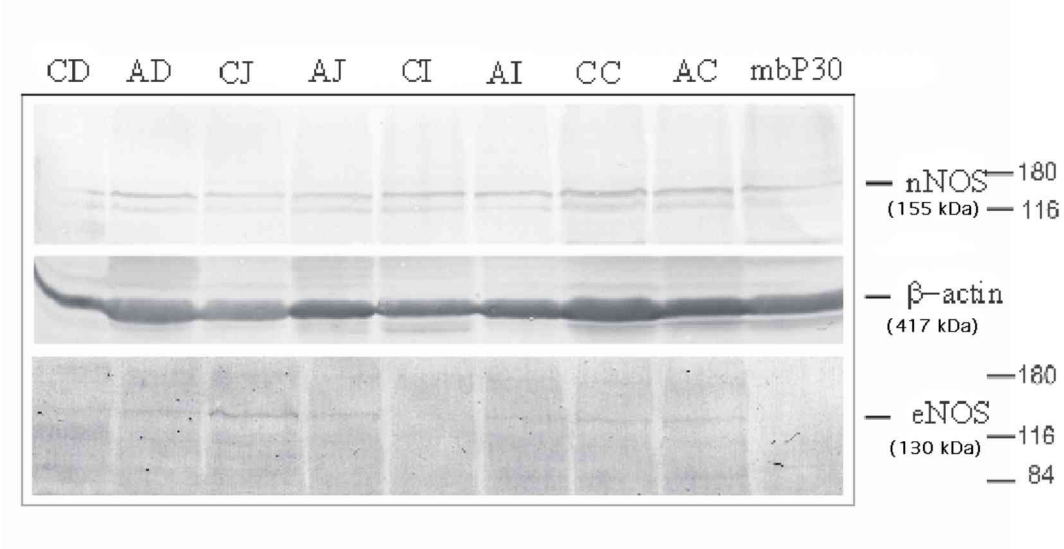


16. ábra Indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) aktivitás patkány bélcsatorna különböző szakaszaiban krónikus alkoholkezelt és kontroll körülmények között. Az oszlopok 10 kontroll és 8 alkoholkezelt állatból származó átlag±szórás értékek. Az iNOS aktivitás értékekben nincs szignifikáns különbség a kontroll és a krónikus alkoholkezelt állatokból származó minták között.

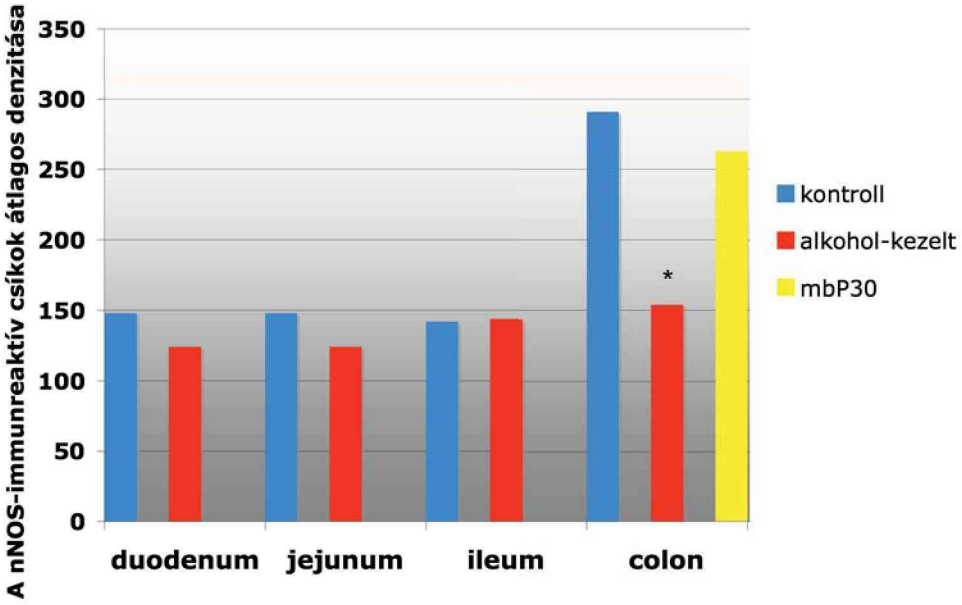
IV.6. A NOS FEHÉRJE MENNYISÉGÉNEK VÁLTOZÁSA ALKOHOLFOGYASZTÁST KÖVETŐEN

A kontroll és alkoholkezelt patkányok duodenum, jejunum, ileum és colon bélszakaszaiból származó fehérjehomogenizátumokról készült Western blotok mindegyikén kimutatható volt a nNOS-nak, illetve az eNOS-nak megfelelő 155 és 130 kDa csík (17. ábra). A duodenumból, jejunumból és ileumból származó nNOS fehérje denzitásában nem volt detektálható különbség krónikus alkoholkezelt és a kontroll minták között, a colonban azonban szignifikánsan lecsökkent a nNOS fehérje mennyisége alkoholfogyasztás hatására (18. ábra).

Az eNOS fehérje mennyisége igen alacsony volt mind a kontroll mind az alkoholkezelt mintákban, ezért kvantitatív összehasonlítás nem volt lehetséges (17. ábra).



17. ábra Neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) és endoteliális nitrogén-monoxid szintáz (eNOS) ellenanyaggal festett reprezentatív Western blot kontroll (C) és alkoholkezelt (A) egerek bélcsatornájából származó fehérjehomogenizátumokból (D-duodenum, J-jejunum, I-ileum, C-colon). A 155 kDa nNOS immunreaktív csík denzitása a colonban szignifikánsan lecsökkent alkoholfogyasztást követően.
A 130 kDa eNOS immunreaktív csík denzitása túl alacsony volt és így nem nyílt lehetőség a kvantitatív analízisre. Belső kontrollként β-aktint, pozitív kontrollként pedig MbP30-t (egy hónapos egér agyából készült homogenizátum) használtunk. A nNOS ellenanyag az MbP30 mintában a ~155 kDa-os fehérjét ismerte fel. Az eNOS ellenanyag nem mutatott ki fehérjét.



18. ábra Kontroll és alkoholkezelt patkányok négy különböző bélszakaszából származó fehérjehomogenizátumokban a neuronális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS)-immunreaktív csíkok denzitása. A nNOS fehérjecsíkok denzitásait három különböző Western blot mérés átlagaként tüntettük fel. A colonban a fehérjedenzitás krónikus alkoholfogyasztást követően szignifikánsan lecsökkent (*P<0,05). A denzitást a β-aktin fehérjecsíkokhoz normalizáltuk. A blotokon jelenlévő degradációs termékeket nem vettük figyelembe. Pozitív kontrollként MbP30-t (egy hónapos egér agyából készült homogenizátum) használtunk.

V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Régóta ismert az, hogy a krónikus alkoholfogyasztás a bélmotilitás megváltozásához vezet (Jian és mtsai., 1986; Papa és mtsai., 1998; Izbeki és mtsai., 2001). A bélmotilitási rendellenességeknek igen nagy jelentőségük van a klinikai gyakorlatban. A kóros perisztaltika következményeként felszaporodhatnak a baktériumok, növekedhet a toxikus anyagok mennyisége a bél lumenében és károsodhat a tápanyagok felszívása. Az ezzel járó tünetek nagymértékben hozzájárulnak az alkoholista betegek életminőségének romlásához.

Mivel a bélidegrendszer nitrerg neuronjaiból felszabaduló NO szabályozza a perisztaltikus reflex leszálló gátlását, feltételeztük, hogy a NO és szintetizáló enzimei szerepet játszhatnak az alkoholfogyasztást kísérő motilitási rendellenességek kialakulásában.

Hipotézisünk tesztelésére két kísérletsorozatot állítottunk fel. Az egyikben egereket, míg a másikban patkányokat használtunk az alkoholfogyasztást kísérő változások felderítésére. Egerek esetében a napi alkoholfogyasztás 7,8 g etanol/testtömeg kg volt, míg patkányok esetében 5 g etanol/testtömeg kg. Ez az alkoholdózis hasonló az alkoholista betegek napi etanolbeviteléhez (European Medicines Agency, 1997). A kezelés végén sem az alkoholkezelt egerek sem a patkányok esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll és krónikus alkoholkezelt állatok súlya között, ezért kizártuk a krónikus alkoholfogyasztás hatására bekövetkező alultápláltságot. Egerek esetében a vizet fogyasztó kontroll csoport és az alkoholkezelt csoport közötti kalóriabeviteli különbségből adódó esetleges félrevezető eredmények kiküszöbölése érdekében izokalorikus cukoroldatot fogyasztó kontroll csoporttal is bővítettük kísérleteinket.

Kísérleteink során meghatároztuk a krónikus alkoholfogyasztás hatását a vékonybéltranzitra, a NO által közvetített simaizom-relaxációra, a nNOS-immunpozitív neuronok számára és az összneuronszámra. Ezen kívül élő szövetben mértük a szintetizált NO mennyiségét myentericus neuronokban, meghatároztuk a cNOS és iNOS enzimek aktivitását valamint a nNOS és eNOS fehérjék mennyiségét krónikus alkoholkezelt és kontroll állatok bélcsatornájából származó bélmintákban.

A krónikus alkoholfogyasztás hatása a vékonybéltranzitra egérben

Az alkoholnak a béltranzitra gyakorolt hatásáról több ellentmondó irodalmi adat ismert. A bevitt etanol dózisától és a bevitel módjától függően az alkohol gyorsítja, lassítja, illetve nem befolyásolja a béltranzitot (Pirola és Davis, 1970; Robles és mtsai., 1974; Moor és mtsai., 1981; Keshavarazian és mtsai., 1986; Palasciano és mtsai., 1995). Számos kísérletes bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy a nagy dózisban elfogyasztott alkohol a perisztaltika lassulását okozza a bélcsatornában (Barboriak és Meade, 1970; Jian és mtsai., 1986; Scroggs és mtsai., 1986; Wilson és mtsai., 1990).

Fontos volt ezért tisztáznunk, hogy az általunk vizsgált egérmodellben milyen jellegű a tranzit megváltozása. Kísérleteink során a 3 hétig tartó alkoholfogyasztást követően a béltranzit szignifikánsan lassult az alkoholkezelt állatokban a vizet fogyasztó kontroll csoporttal összehasonlítva. Amikor azonban az izokalorikus cukoroldatot fogyasztó kontroll csoporthoz hasonlítottuk az alkoholkezelt állatok tranzitidejét, akkor szignifikáns gyorsulást tapasztaltunk. Az alkoholfogyasztás hatását vizsgáló kísérletekben igen gyakran alkalmaznak izokalorikus cukoroldatot fogyasztó kontroll csoportot (Preedy és Peters, 1990; Poonia és mtsai., 2006; Brien és mtsai., 2006; Bhalla és mtsai., 2004). Az általunk végzett kísérletekben használt, a 20%-os alkoholos oldatnak megfelelő izokalorikus cukoroldat koncentrációja 284 g/l volt. Ez a koncentráció elég magas ahhoz, hogy a folyadék ozmotikumként viselkedjen. Egyéb, az izokalorikus cukoroldatot fogyasztó kontroll csoportot használó kísérleteinkben, úgy mint a nNOS-immunpozitív sejtszámolás és a bélfal simaizom-relaxáció mérése, nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a vizes és a cukros kontroll csoport között. Ez arra utalhat, hogy a cukor hatására a tranzitban megfigyelt különbség szisztémásan, és nem lokálisan váltódik ki. A magas koncentrációjú szacharóz béltranzitra gyakorolt hatásmechanizmusának felderítése további kísérleteket igényel, azonban az általunk végzett tranzitkísérletek alapján elmondható, hogy az izokalorikus cukoroldat nem a legmegfelelőbb kontroll az alkoholfogyasztás bélcsatornára gyakorolt hatásait vizsgáló kísérletekhez. E megfigyelésünk alapján a vizet fogyasztó kontroll csoportnál kapott eredményeket tekintettük értékelhetőnek és a patkányokon végzett kísérleteinkben már nem alkalmaztuk az izokalorikus cukoroldatot fogyasztó kontroll csoportot.

Az alkoholfogyasztást követő tranzitlassulás hátterében az állhat, hogy a perisztaltikus reflex során az orális irányban bekövetkező megfelelő mértékű simaizom-kontrakciót nem követi megfelelő mértékű relaxáció.

Alkoholfogyasztás hatása a simaizom-relaxáció mértékére egérben

A krónikus alkoholfogyasztással járó megváltozott motilitás neuronális hátterének felderítésére megvizsgáltuk a nitrerg neuronok által mediált simaizom-relaxáció mértékét jejunumból származó ideg-izom preparátumban *in vitro*. NANC körülmények között az EFS-re adott relaxáció mértéke krónikus alkoholfogyasztást követően szignifikánsan lecsökkent mind a vizet mind az izokalorikus cukoroldatot fogyasztó kontroll csoporttal összehasonlítva. Ezt a relaxációs választ a NOS gátló L-NNA teljesen blokkolta, ami bizonyítja, hogy a relaxációs választ valóban NO közvetíti. A növekvő koncentrációban adott exogén NO hatására nem változott a simaizom-relaxáció mértéke a három vizsgált csoport között.

Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy a lecsökkent simaizom-relaxáció nem receptorszinten váltódik ki. A simaizom megfelelően reagál a NO-ra, azonban a nNOS által termelt és a nitrerg neuronokból felszabaduló NO vagy nem elegendő mennyiségű vagy nem jut el megfelelően a simaizomsejtekig.

A nNOS-t tartalmazó myentericus neuronok számának és az összneuronszámnak változása egérben és patkányban

A lelassult tranzit és a csökkent NO-mediált simaizom-relaxáció felvetette a kérdést, hogy vajon krónikus alkoholfogyasztás hatására változik-e a nNOS-t tartalmazó nitrerg neuronok száma a myentericus plexusban. Irodalmi adatokból ismert, hogy patológiás körülmények között a különböző neurotranszmittereket tartalmazó myentericus neuronok száma megváltozik. Bruley des Varannes és munkatársai (2006) kimutatták, hogy achalázia során emberi gyomorban 26%-kal lecsökken a nNOS-immunpozitív sejtek száma. A nitrerg myentericus neuronok száma számottevően (21%) csökken diabeteses patkányban (Wrzos és mtsai., 1997). Az általunk végzett kísérletek során krónikus alkoholkezelést követően mind patkányban, mind egérben szignifikánsan lecsökkent a nNOS-immunpozitív sejtek száma, míg az összneuronszám nem változott. Ez a jelenség arra enged következtetni,

hogy nem az alkohol hatására bekövetkező neuronális apoptózisról van szó, hanem a myentericus neuronokban szelektíven lecsökken a nNOS fehérje expressziója és ezáltal csökken az immunpozitív sejtek száma. Patkányban végzett kísérleteink során az alkoholfogyasztás időtartama nem befolyásolta a nNOS-immunpozitív sejtek számának csökkenését. Már az első hét után szignifikánsan kevesebb volt a nNOS-immunreaktív sejtek száma és a csökkenés mértéke nem változott szignifikánsan a vizsgált 6 hét alatt. Ez arra utal, hogy a NO rendszerben fellépő változások viszonylag rövid ideig tartó alkoholfogyasztás után már bekövetkeznek. Részben ez, részben a kísérleti állatok szenvedésének csökkentése miatt egérkísérleteinkben már elegendőnek tartottuk a 3 hétig tartó alkoholkezelést.

A nNOS enzim expressziójának megváltozása a myentericus neuronokban feltehetőleg befolyásolja a nNOS által termelt NO mennyiségét is. Az alkoholfogyasztást követő csökkent NO így magyarázatot adhat a simaizom-relaxáció csökkenésére és a tranzit lassulására.

A NO szintézis mértékének megváltozása alkoholfogyasztás hatására

Az élő szövetekben felszabaduló NO kimutatása a molekula rövid, mindössze néhány másodperces féléletidejét tekintve igen nehéz feladat. Évekkel ezelőtt azonban a Kojima és munkatársai (1999) által kifejlesztett diaminofluoreszcein (DAF) fluoreszcens indikátor lehetővé tette a NO mérését élő szövetekben. E molekula továbbfejlesztett változata a DAF-FM (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoreszcein) diacetát, amely nem a NO-dal, hanem fiziológiás körülmények között specifikusan annak első oxidációs termékével, a NO^+-val reagál (Balcerczyk és mtsai., 2005). A DAF-FM nem toxikus a sejtekre és a fluoreszcencia erőssége arányos a felszabaduló NO mennyiségével (Itoh és mtsai., 2000). A DAF-FM-et sikeresen használták NO mérésére különböző sejttípusokban (Kojima és mtsai., 2001; Sheng és mtsai., 2005) valamint patkány gyomor myentericus plexusában (Quintana et al., 2004). A mi vizsgálatunkban elsőként határoztuk meg egér bélcsatorna myentericus plexusában a felszabaduló NO mennyiségét. A vizet fogyasztó kontroll és krónikus alkoholkezelt egerek jejunumában a myentericus neuronokban, valamint az erekben és a simaizomsejtekben figyeltünk meg fluoreszcens jelet. A NOS inhibitor, L-NAME előinkubálásával a fluoreszcencia intenzitás (FI) több mint felére csökkent, ami arra utal, hogy a fluoreszcens jel valóban NO eredetű. A myentericus neuronokban mért

átlag FI értékek összehasonlítása után a krónikus alkoholkezelt állatokból származó mintákban a kontrollal összehasonlítva szignifikáns növekedést tapasztaltunk. Ez arra utalt, hogy a myentericus nitrerg neuronok NO termelése megnövekedett alkoholfogyasztás hatására.

Ez az eredmény ellentmondott az ideg-izom preparátumokban tapasztalt NO-mediált simaizom-relaxáció csökkenésének, valamint a nNOS-immunpozitív neuronok számában tapasztalt csökkenésnek. Ennek az ellentmondásnak a tisztázására és mivel a DAF-FM nem tesz különbséget a különböző NOS izoformák által termelt NO között, ezért a DAF-FM jelölt preparátumokon a szövet fixálása után nNOS- és PGP9.5-immunhisztokémiát végeztünk. A DAF-FM és/vagy nNOS jelölt neuronok 22,7%-ában figyeltünk meg kolokalizációt, míg 35%-a csak DAF-FM-mel, 42,3%-a csak nNOS-sal jelölődött.

Az a neuronpopuláció, amely DAF-FM immunfluoreszcenciát mutatott, tehát termelt NO-t, viszont immunhisztokémiai módszerrel nem volt kimutatható benne a nNOS, feltehetőleg más NOS izoformát tartalmaz. Immunhisztokémiai vizsgálatok igazolják, hogy a myentericus neuronokban mindhárom NOS izoforma jelen van (Vannucchi és mtsai., 2002), azonban a simaizom-relaxáció kiváltására a bélcsatornában csak a nNOS izoforma által termelt NO képes (Terauchi és mtsai., 2005; Mang és mtsai., 2002; Kim és mtsai., 1999). Az iNOS és az eNOS jelenlétének oka és funkciója a myentericus neuronokban ezidáig tisztázatlan. A DAF-FM fluoreszcencia és így a felszabaduló NO forrásaként nem zárhatjuk ki egy nemrég felfedezett, feltehetőleg negyedik NOS izoformát, a mitokondriális vagy mtNOS-t sem (Lacza és mtsai., 2003). Ezen kívül a megnövekedett NO termelésért egy NOS-tól független mechanizmus is felelőssé tehető: a sejtek képesek arra, hogy nitrozotiolokból egy Ca^{2+}-függő mechanizmussal NO-t szabadítsanak fel (Chvanov és mtsai., 2006).

Számos kísérletes bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy a termelt NO képes visszacsatolásos mechanizmussal szabályozni saját termelődését és felszabadulását. Patkány gyomorban a NO-donorok ugyanúgy gátolták a NANC simaizom-relaxáció nitrerg komponensét, mint a NOS inhibitorok (De Man és mtsai., 1995). Előzetes vizsgálatok többféle sejttípusban kimutatták, hogy a NO képes gátolni a cNOS-t (Rogers és Ignarro, 1992; Assreuy és mtsai., 1993; Buga és mtsai., 1993; Rengasamy és Johns, 1993; Griscavage és mtsai., 1994). Feltételezzük, hogy a myentericus neuronokban más, mindeddig tisztázatlan forrásból származó, az alkoholfogyasztás

következményeként termelt nagy mennyiségű NO gátolja a nNOS enzim expresszióját. Ezt a feltevést támasztják alá azok a megfigyeléseink is, miszerint krónikus alkoholfogyasztást követően a myentericus neuronokból felszabaduló megnövekedett mennyiségű NO mellett is lassul a vékonybéltranzit, csökken a NO-mediált simaizom-relaxáció és a nNOS-immunreaktív sejtek száma.

A 42,3%-ban jelenlévő nNOS-immunpozitív sejtek amelyek DAF-FM fluoreszcenciát nem mutattak, szintén különös figyelmet érdemelnek. Ismert, hogy az eNOS és nNOS enzimek aktivitása is szabályozott, bár ez nagymértékben különbözik a citokinek és bakteriális antigének által aktivált iNOS szabályozásától. A nNOS aktivációja Ca^{2+}-kalmodulin kötődésével valósul meg, amely a normál fiziológiás intracelluláris koncentrációnál jóval magasabb Ca^{2+} koncentrációt igényel (Abu-Soud és mtsai., 1994). Kimutatták továbbá, hogy a nNOS Ca^{2+}-kalmodulin-függő kinázokkal történő foszforilációja csökkenti az enzim aktivitását, és így a termelt NO mennyiségét is (Komeima és mtsai., 2000; Hayashi és mtsai., 1999; Nakane és mtsai., 1991). A nNOS enzim aktivitását gátolhatják endogénen jelenlévő fehérjék is, ilyen például a nNOS inhibitor fehérje (PIN, protein inhibitor of NOS; Jaffrey és Snyder, 1996). Feltételezzük, hogy a nNOS-immunreaktív, de DAF-FM fluoreszcenciát nem mutató sejtpopulációban a nNOS fehérje aktivitása gátolt.

A NOS enzimek aktivitásának változása a patkány bélcsatorna különböző szakaszain

Mivel a simaizom-relaxációban (Nowak és Harrington, 1987) és a nitrerg neuronok eloszlásában (Furness és mtsai., 1994) is regionális különbségek figyelhetőek meg a bélcsatornában, feltételeztük, hogy a NOS enzimek is eltérően reagálnak az etanolra a bél különböző szakaszain. Ennek tisztázására aktivitásmérést és fehérjemennyiség meghatározást végeztünk patkány bélcsatorna három vékonybél és egy vastagbél szegmensében. A cNOS aktivitásában a duodenum kivételével különböző mértékű, de szignifikáns csökkenést figyeltünk meg a bélcsatorna jejunum, ileum és colon szakaszain alkoholkezelés hatására. A jejunumban felére, míg az ileumban 25%-kal, a colonban pedig több mint 70%-kal lecsökkent a cNOS enzimek aktivitása. Feltételezzük, hogy a cNOS aktivitás regionális különbségeit a NO-nak a különböző bélszakaszokban betöltött eltérő funkciója okozza. Kontroll körülmények

között a proximális colonban általunk mért cNOS aktivitásérték megegyezik Takahashi és Owyang (1998) által mért aktivitásértékkel. Ez az érték több mint húszszor nagyobb, mint a vékonybél bármely három szakaszában mért cNOS aktivitás. Irodalmi adatok szerint a proximális és disztális colonban a NOS enzimek transzkripciója és szintézise eltérő, amely lényegesen nagyobb mértékű NANC relaxációt eredményez a proximális colonban (Takahashi és Owyang, 1998). Az általunk a proximális colonban krónikus alkoholkezelés hatására mért 70%-os cNOS aktivitáscsökkenés a NO kitüntetett szerepére utalhat ebben a bélszakaszban. Ennek a feltételezésnek az igazolása azonban további vizsgálatokat igényel.

A központi idegrendszerben az iNOS fehérje fiziológiás körülmények között nincs jelen, de különböző káros hatásokra expresszálódik (Park és mtsai., 1994). A bélben azonban fiziológiás körülmények között is kimutatható az iNOS jelenléte (Mancinelli és mtsai., 2001; McCafferty és mtsai., 1999; Singer és mtsai., 1999; Vannuchi és mtsai., 2002). Kísérleteink során iNOS enzim aktivitást figyeltünk meg a duodenumban, jejunumban, ileumban és colonban. Az iNOS enzimaktivitás mértéke egyik bélszakaszban sem mutatott szignifikáns változást krónikus alkoholfogyasztás hatására.

A nNOS és eNOS fehérje mennyiségének változása a patkány bélcsatorna különböző szakaszain

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy patkány vékonybélben a cNOS aktivitás 80%-áért a nNOS felelős (Qu és mtsai., 1999). Az általunk is használt [^{3}H]citrullin felszabadulásán alapuló mérés nem tesz különbséget a nNOS és az eNOS által termelt NO között (Forstermann és mtsai., 1994; Teng és mtsai., 1996), ezért fontossá vált, hogy megközelítőleg meghatározzuk külön-külön a nNOS és eNOS enzimek szerepét a krónikus alkoholfogyasztás hatására bekövetkező cNOS aktivitás csökkenésében. Ennek tisztázására nNOS és eNOS ellenanyaggal Western blot analízist végeztünk alkoholkezelt és kontroll körülmények között tartott patkányok bélszakaszaiból származó fehérjehomogenizátumokon. Az eNOS fehérjéből igen kis mennyiséget sikerült kimutatni az egyes bélszakaszokban, így a mért eredmények statisztikai analízisre nem voltak alkalmasak. A nNOS fehérje mennyisége azonban krónikus alkoholfogyasztást követően különböző mértékben minden vizsgált bélszakaszban

lecsökkent. A fehérjemennyiség csökkenése a colonban elérte az 50%-ot. Ez alapján feltételezzük, hogy az alkoholfogyasztás hatására mért cNOS aktivitás csökkenés a nNOS enzim csökkent működésének következménye.

Doktori értekezésemben leírt eredményeimet a következőkben foglalom össze. Két különböző, egymástól független kísérletsorozat alapján kimutattuk a NO-rendszer érintettségét patkány és egér bélidegrendszerben krónikus alkoholfogyasztást követően.

- Egér vékonybélben a tranzit lassulását figyeltük meg, amelynek oka lehet az, hogy a simaizom kontrakcióját nem követi megfelelő mértékű relaxáció.
- Ezt a hipotézist támasztotta alá a jejunumban az endogén NO által közvetített simaizom-relaxáció csökkenése.
- Egér és patkány mintákban is kimutattuk, hogy a nNOS-immunreaktív neuronok száma szignifikánsan lecsökkent, míg az összneuronszám nem változott. A nNOS enzim jelenlétének ez a csökkenése utalhat a myentericus neuronokból a nNOS által termelt NO mennyiségének csökkenésére.
- A DAF-FM-mel kimutatható NO szintézis mértéke növekedett krónikus alkoholfogyasztást követően. A NO termelő neuronok azonban csak igen limitált kolokalizációt (20%) mutattak a nNOS fehérjét tartalmazó neuronokkal. Feltételezhető, hogy a megemelkedett NO szintézis más NOS izoformák által termel NO-tól származik, illetve NOS független módon termelődik.
- Patkány bélcsatorna különböző szakaszaiban a nNOS aktivitásának és a nNOS fehérje mennyiségének bélszakaszspecifikus csökkenését figyeltük meg.

Ezek a kísérleti eredmények alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a krónikus alkoholfogyasztás a központi idegrendszerhez hasonlóan (Naassila és mtsai., 2003), a bélidegrendszerben is hatással van a NO szintézisére. A nitrerg rendszerben bekövetkezett változás pedig szerepet játszhat az alkoholista betegek gasztrointesztinális motilitási rendellenességeinek kialakulásában.

VI. IRODALOMJEGYZÉK

Abu-Soud H, Yoho L, Stuehr D. (1994) Calmodulin controls neuronal nitric-oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. J. Biol. Chem. 269, 32047–32050.

Addolorato G, Capristo E, Gasbarrini G, Stefanini GF. (1997) Depression, alcohol abuse and orocaecal transit time. Gut 41: 417 – 418.

Assreuy J, Cunha F, Liew F, Moncada S. (1993) Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide, Br. J. Pharmacol. 108(3):833-7.

Balcerczyk A, Soszynski M, Bartosz G. (2005) On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. Free. Radic. Biol. Med. 39(3):327-35.

Balligand J, Cannon P. (1997) Nitric oxide synthases and cardiac muscle. Autocrine and paracrine influences. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17(10):1846-58.

Barboriak J, Meade R. (1970) Effect of alcohol on gastric emptying in man. Am. J. Clin. Nutr. 23:1151–1153.

Bayliss MW, Starling EH (1899) The movement and innervation of the small intestine J. Physiol. (London) 24: 100-143.

Beck IT, Dinda PK. (1981) Acute exposure of small intestine to ethanol. Effects on morphology and function. Dig. Dis. Sci. 26: 817 – 838.

Berthoud, HR. (1995) Anatomical demonstration of vagal input to nicotinamide acetamide dinucleotide phosphate diaphorase-positive (nitrergic) neurons in rat fundic stomach. J. Comp. Neurol. 358, 428-439.

Bhalla S, Mahmood S, Mahmood A. (2004) Effect of prenatal exposure to ethanol on postnatal development of intestinal transport functions in rats. Eur. J. Nutr. 43(2):109-15.

Bode JC, Bode C. (1990) Alcohol malnutrition and the gastrointestinal tract. In Watson RR & Watzl B (eds) Nutrition and Alcohol, pp 403 – 428. Boca Raton, FL: CRC Press

Bode JC. (1980) Alcohol and the gastrointestinal tract. Ergeb. Inn. Med. Kinderheilkd. 45:1-75

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. Nature. 347(6295):768-70.

Brehmer A. (2006) Structure of enteric neurons. Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol. 186:1-91.

Brien JF, Chan D, Green CR, Iqbal U, Gareri J, Kobus SM, McLaughlin BE, Klein J, Rao C, Reynolds JN, Bocking AD, Koren G. (2006) Chronic prenatal ethanol exposure and increased concentration of fatty acid ethyl esters in meconium of term fetal Guinea pig. Ther. Drug. Monit. 28(3):345-50.

Bruley des Varannes S, Chevalier J, Pimont S, Le Neel JC, Klotz M, Schafer KH, Galmiche JP, Neunlist M. (2006) Serum from achalasia patients alters neurochemical coding in the myenteric plexus and nitric oxide mediated motor response in normal human fundus. Gut. 55(3):319-26.

Bucher M, Ittner KP, Zimmermann M, Wolf K, Hobbhahn J, Kurtz A. (1997) Nitric oxide synthase isoform III gene expression in rat liver is up-regulated by lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. FEBS Lett. 412: 511-514.

Buga G, Griscavage J, Rogers N, Ignarro L. (1993) Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. Circ. Res. 73, 808.

Bush TG. (2002) Enteric glial cells. An upstream target for induction of necrotizing enterocolitis and Crohn's disease? Bioessays 24(2):130-40.

Buskila Y, Farkash S, Hershfinkel M, Amitai Y. (2005) Rapid and reactive nitric oxide production by astrocytes in mouse neocortical slices. Glia. 52(3):169-76.

Charles F, Phillips SF. (1995) Effects of ethanol, xylose, and glucose on canine jejunal motility. Am. J. Physiol. 269:G363-9.

Chen K, Inoue M, Wasa M, Fukuzawa M, Kamata S, Okada A. (1997) Expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase mRNA in gastrointestinal mucosa and its downregulation by endotoxin. Life Sci. 61: 1323-1329.

Chvanov M, Gerasimenko OV, Petersen OH, Tepikin AV. (2006) Calcium-dependent release of NO from intracellular S-nitrosothiols. EMBO J. 25(13):3024-32.

Clerc N, Furness JB. (2004) Intrinsic primary afferent neurones of the digestive tract. Neurogastroenterol. Motil. 16:24–7.

Costa M, Brookes SJ, Hennig GW. (2000). Anatomy and physiology of the enteric nervous system. Gut. 47 Suppl 4: iv15-9.

Cracco C, Filogamo G. (1994) Quantitative study of the NADPH-diaphorase-positive myenteric neurons of the rat ileum. Neuroscience. 61(2):351-9.

De Man JG, Boeckxstaens GE, De Winter BY, Moreels TG, Herman AG, Pelckmans PA. (1995) Inhibition of non-adrenergic non-cholinergic relaxations by nitric oxide donors. Eur. J. Pharmacol. 285(3):269-74.

Dijkstra G, Moshage H, van Dullemen HM, de Jager-Krikken A, Tiebosch AT, Kleibeuker JH, Jansen PL, van Goor H. (1998) Expression of nitric oxide synthases and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. J. Pathol. 186(4):416-21.

Feron O, Zhao YY, Kelly RA. (1999) The ins and outs of caveolar signaling. m2 muscarinic cholinergic receptors and eNOS activation versus neuregulin and ErbB4 signaling in cardiac myocytes. Ann. N Y Acad. Sci. 30;874:11-9.

Feron, O., L. Belhassen, L. Kobzik, T.W. Smith, R.A. Kelly, T. Michel. (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.

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994) Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. Hypertension 23:1121-1131.

Foxx-Orenstein AE, Grider JR. (1996) Regulation of colonic propulsion by enteric excitatory and inhibitory neurotransmitters. Am. J. Physiol. 271:G433–7.

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

Furness JB, Li ZS, Young HM, Forstermann U (1994) Nitric oxide synthase in the enteric nervous system of the guinea-pig: a quantitative description. Cell. Tissue. Res. 277:139-149.

Furness JB, Young HM, Pompolo S, Bornstein JC, Kunze WA, McConalogue K. (1995) Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. Gastroenterology. 108(2):554-63.

Furness, J.B. (2000) Types of neurons in the enteric nervous system. J. Auton. Nerv. Syst. 81: 87-96.

Gershon MD, Kirchgessner AL, Wade PR. (1994) Functional anatomy of the enteric nervous system. Physiology of the gastrointestinal tract. 3.kiadás, New York: Raven Press, 381-422.

Goyal RK, Hirano I. (1996) The enteric nervous system. N. Engl. J. Med. 334(17):1106-15.

Griscavage JM, Fukuto JM, Komori Y, Ignarro LJ. (1994) Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. J. Biol. Chem. 269, 21644.

Gunawardana SC, Rocheleau JV, Head WS, Piston DW. (2006) Mechanisms of time-dependent potentiation of insulin release: involvement of nitric oxide synthase. Diabetes. 55(4):1029-33.

Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, Stuehr DJ, Thunnissen FB, Erzurum SC. (1995) Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:7809–7813.

Hansen MB. (2003) The enteric nervous system II: Gastrointestinal functions. Pharmacol. Toxicol. 92, 249-257.

Hashiguchi A, Yano S, Morioka M, Hamada J, Ushio Y, Takeuchi Y, Fukunaga K. (2004) Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase via phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 24(3):271-9.

Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y. (1999) Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. J. Biol. Chem. 274, 20597–20602.

Holmqvist B, Olsson CF, Svensson ML, Svanborg C, Forsell J, Alm P. (2005) Expression of nitric oxide synthase isoforms in the mouse kidney: cellular localization and influence by lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4. Mol. Histol. 36(8-9):499-516.

Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH, Fishman MC. (1993) Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. Cell 75:1273-86.

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. Nature. 377(6546):239-42.

Hüllinghorst R. (1999) Alkoholkonsum—Zahlen und Fakten. In Singer MV & Teyssen S (eds) Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten, pp 32 – 39. Berlin: Springer

Itoh Y, Ma FH, Hoshi H, Oka M, Noda K, Ukai Y, Kojima H, Nagano T, Toda N. (2000) Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. Anal Biochem. 287(2):203-9.

Izbeki F, Wittmann T, Csati S, Jeszenszky E, Lonovics J (2001) Opposite effects of acute and chronic administration of alcohol on gastric emptying and small bowel transit in rat. Alcohol. Alcohol. 36(4):304-8.

Jaffrey SR, Snyder SH. (1996) PIN : an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. Science (Washington, D.C.) 274, 774–777.

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.

Jerells TR, Pruett SB. (1994) Immunotoxic effects of ethanol. In Dean JH, Luster MI, Munson AE, Kimber I (eds) Immunotoxicology and Immunopharmacology, 2. kiadás. pp 323 – 347. New York: Raven Press

Jian R, Cortot A, Ducrot F, Jobin G, Chayvialle JA, Modigliani R (1986) Effect of ethanol ingestion on postprandial gastric emptying and secretion, biliopancreatic secretions, and duodenal absorption in man. Dig. Dis. Sci. 31:604–614 953–966.

Keshavarazian A, Iber FL, Greer P, Wobbleton J. (1986) Gastric emptying of solid meal in chronic alcoholics. Alcohol. Clin. Exp. Res. 10:432–435.

Kim CD, Goyal RK, Mashimo H. (1999) Neuronal NOS provides nitrergic inhibitory neurotransmitter in mouse lower esophageal sphincter. Am. J. Physiol. 277:G280–4.

Kojima H, Hirata M, Kudo Y, Kikuchi K, Nagano T. (2001) Visualization of oxygen-concentration-dependent production of nitric oxide in rat hippocampal slices during aglycemia. J. Neurochem. 76(5):1404-10.

Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. (1999) Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 38(21):3209-3212.

Komeima K, Hayashi Y, Naito Y, Watanabe Y. (2000) Inhibition of neuronal nitric-oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha through Ser847 phosphorylation in NG108–NG115 neuronal cells. J. Biol. Chem. 275, 28139–28143.

Lacza Z, Snipes JA, Zhang J, Horvath EM, Figueroa JP, Szabo C, Busija DW. (2003) Mitochondrial nitric oxide synthase is not eNOS, nNOS or iNOS. Free. Radic. Biol. Med. 35(10):1217-28.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265–75.

Lu G, Sarr MG, Szurszewski JH. (1997) Effects of ethyl alcohol on canine jejunal circular smooth muscle. Dig. Dis. Sci. 42: 2403 – 2410.

Mancinelli R, Fabrizi A, Vargiu R, Morrone L, Bagetta G, Azzena GB. (2001) Functional role of inducible nitric oxide synthase on mouse colonic motility. Neurosci. Lett. 311:101-104.

Mang CF, Truempler S, Erbelding D, Kilbinger H. (2002) Modulation by NO of acetylcholine release in the ileum of wild-type and NOS gene knockout mice Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 283: G1132 – G1138.

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.

McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, Sharkey KA, Kubes P. (1999) Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. Gut. 45:864-873.

Mearin F, Mourelle M, Guarner F. (1993) Patients with achalasia lack nitric oxide synthase in the gastro-oesophageal junction. Eur. J. Clin. Invest. 23:724-8.

Mezey E. (1985) Effect of ethanol on intestinal morphology, metabolism, and function. In Seitz HK & Kommerell B (eds) Alcohol Related Diseases in Gastroentreology, pp 342 – 360. Berlin: Springer

Miller MJS, Clark DA. (1994) Nitric oxide synthase inhibition can initiate or prevent gut inflammation: role of enzyme source. Agents Actions 41:C231-2.

Mizuta Y, Takahashi T, Owyang C. (1999) Nitrergic regulation of colonic transit in rats. Am. J. Physiol. 277:G275–9.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43(2):109-42.

Moor JG, Christian PE, Datz FL. (1981) Effect of wine on gastric emptying in humans. Gastroenterology 81:1072–1075.

Naassila M, Pierrefiche O, Beauge FJ, Sebire N, Daoust M. (2003) Chronic ethanol exposure differentially regulates NOS1 mRNA levels depending on rat brain area. Neurosci. Lett. 338(3):221-224.

Nakane M, Mitchell J, Forstermann U, Murad F. (1991) Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 180, 1396–1402.

Nowak TV, Harrington B. (1987) Evidence for diminished inhibitory neuromuscular transmission in distal small intestine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 240:381-387.

Olgart C, Gustafsson LE, Wiklund NP. (2000) Evidence for nonvesicular nitric oxide release evoked by nerve activation. Eur. J. Neurosci. 12(4):1303-9.

Palasciano G, Portincasa P, Di Ciaula A, Palmieri V. (1995) Prolonged consumption of moderate doses of alcohol and in vitro gastro-duodenal and ileal contractility in the rat. Eur. J. Clin. Invest. 25(3):171-5.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 327(6122):524-6.

Papa A, Tursi A, Cammarota G, Certo M, Cuoco L, Montalto M, Cianci R, Papa V, Fedeli P, Fedeli G, Gasbarrini G. (1998) Effect of moderate and heavy alcohol consumption on intestinal transit time. Panminerva. Med. 40(3):183-5.

Park SK, Grzybicki D, Lin HL, Murphy S. (1994) Modulation of inducible nitric oxide synthase expression in astroglial cells. Neuropharmacology. 33:1419-1423.

Pattwell DM, McArdle A, Morgan JE, Patridge TA, Jackson MJ. (2004) Release of reactive oxygen and nitrogen species from contracting skeletal muscle cells. Free. Radic. Biol. Med. 37(7):1064-72.

Pfeiffer A, Schmidt T, Vidon N. (1992) Absorption of a nutrient solution in chronic alcoholics without nutrient deficiencies and liver cirrhosis. Scand. J. Gastroentero 27: 1023 – 1030.

Pirola RC, Davis AE. (1970) Effects of intravenous alcohol on motility of the

duodenum and of the sphincter of Oddi. Aust. Ann. Med. 1:24.

Poonia B, Nelson S, Bagby GJ, Zhang P, Quniton L, Veazey RS. (2006) Chronic alcohol consumption results in higher simian immunodeficiency virus replication in mucosally inoculated rhesus macaques. AIDS. Res. Hum. Retroviruses. 22(6):589-94.

Preedy VR, Peters TJ. (1990) Protein synthesis of muscle fractions from the small intestine in alcohol fed rats. Gut. 31, 305–310.

Qu XW, Wang H, Rozenfeld RA, Huang W, Hsueh W. (1999) Type I nitric oxide synthase (NOS) is the predominant NOS in rat small intestine. Regulation by platelet-activating factor. Biochim. Biophys. Acta 1451:211-217.

Quintana E, Hernandez C, Alvarez-Barrientos A, Esplugues JV, Barrachina MD. (2004) Synthesis of nitric oxide in postganglionic myenteric neurons during endotoxemia: implications for gastric motor function in rats. FASEB J. 18(3):531-3.

Randriamboavonjy V, Fleming I. (2005) Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in platelets: how is it regulated and what is it doing there? Pharmacol Rep. 57 Suppl:59-65.

Rengasamy A, Johns RA. (1993) Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. Mol. Pharmacol. 44, 124.

Robles EA, Mezey E, Halsted CH, Schuster MM. (1974) Effect of ethanol on motility of the small intestine. Johns. Hopkins. Med. J. 135:17–24.

Rogers NE, Ignarro LJ. (1992) Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 242.

Roman V, Bagyanszki 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 57A:108-112.

Salaspuro M. (1996) Bacteriocolonic pathway for ethanol oxidation: characteristics and implications. Ann. Med. 28: 195 – 200.

Sang Q, Williamson S, Young HM. (1997) Projections of chemically identified myenteric neurons of the small and large intestine of the mouse. J Anat. 190 (Pt 2):209-22.

Sang Q, Young HM. (1998) The identification and chemical coding of cholinergic neurons in the small and large intestine of the mouse. Anat. Rec. 251(2):185-99.

Sanz MJ, Hickey MJ, Johnston B, McCafferty DM, Raharjo E, Huang PL, Kubes P. (2001) Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. Br. J. Pharmacol. 134(2):305-12.

Scroggs R, Abruzzo M, Advokat C. (1986) Effects of ethanol on gastrointestinal transit in mice. Alcohol. Clin. Exp. Res. 10:452– 456.

Sheng JZ, Wang D, Braun AP. (2005) DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin. J. Pharmacol. Exp. Ther. 315(2):931-40.

Shuttleworth CW, Sanders KM. (1996) Involvement of nitric oxide in neuromuscular transmission in canine proximal colon. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 211, 16-23.

Silvagno F, Xia H, Bredt D. (1996) Neuronal nitric-oxide synthase an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. J. Biol. Chem. 271:11204–11208.

Singer II, Kawka DW, Scott S. (1999) Expression of inducible nitric oxide synthase and trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis in mice. Gut. 45:864-873.

Stamler JS. (1994) Redox signalling: nitrosylation and related target interaction of nitric oxide. Cell 106, 675-683.

Surendran S, Kondapaka SB. (2005) Altered expression of neuronal nitric oxide synthase in the duodenum longitudinal muscle-myenteric plexus of obesity induced diabetes mouse: implications on enteric neurodegeneration. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338(2):919-22.

Szabó C, Mitchell JA, Thiemermann C, Vane JR. (1993) Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. Br. J. Pharmacol. 108:786–92.

Takahashi T, Owyang C. (1998) Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and distal colon in rats. Gastroenterology 115:1504-1512.

Teng B, Murthy K, Kuemmerle J, Grider J, Makhlouf G. (1996) Expression of constitutive endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in rabbit and human gastrointestinal smooth muscle cells (abstr). Gastroenterology 110:A1125.

Terauchi A, Kobayashi D, Mashimo H. (2005) Distinct roles of nitric oxide synthases and interstitial cells of Cajal in rectoanal relaxation. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 289(2):G291-9.

The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (1997) Veterinary Medicines Evaluation Unit 7 Westferry Circus, Canary Wharf, London, E14 4HB, UK

Tonini M, De Giorgio R, De Ponti F, Sternini C, Spelta V, Dionigi P, Barbara G, Stanghellini V, Corinaldesi R. (2000) Role of nitric oxide- and vasoactive intestinal polypeptide-containing neurones in human gastric fundus strip relaxations. Br. J. Pharmacol. 129(1):12-20.

Ueno T, Duenes JA, Zarroug AE, Sarr MG. (2004) Nitrergic mechanisms mediating inhibitory control of longitudinal smooth muscle contraction in mouse small intestine. J. Gastrointest. Surg. 8(7):831-41.

Vanderwinden J-M, Mailleux P, Schiffmann SN, Vanderhaeghen J-J, De Laet M-H. (1992) Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis. N. Engl. J. Med. 327:511-5.

Vannucchi MG, Corsani L, Bani D, Faussone-Pellegrini MS. (2002) Myenteric neurons and interstitial cells of Cajal of mouse colon express several nitric oxide synthase isoforms. Neurosci. Lett. 326(3):191-5.

Vittoria A, Costagliola A, Carrese E, Mayer B, Cecio A. (2000) Nitric oxide-containing neurons in the bovine gut, with special reference to their relationship with VIP and galanin. Arch. Histol. Cytol. 63(4):357-68.

Wegener M, Schaffstein J, Dilger U. (1991) Gastrointestinal transit of solid-liquid meal in chronic alcoholics. Dig. Dis. Sci. 36: 917 – 923.

Wilhelm M, Batori Z, Pasztor I, Gabriel R. (1998) NADPH-diaphorase positive myenteric neurons in the ileum of guinea-pig, rat, rabbit and cat: a comparative study. Eur. J. Morphol. 36(3):143-52.

Wilson CA, Bushnell D, Keshavarzian A. (1990) The effect of acute and chronic ethanol administration on gastric emptying in cats. Dig. Dis. Sci. 35:444–448.

Wood JD, Alpers PH, Andrews PL. (1999) Fundamentals of neurogastroenterology. Gut. 45:11–6.

Worl J, Mayer B, Neuhuber WL. (1994) Nitrergic innervation of the rat esophagus: focus on motor endplates. J. Auton. Nerv. Syst. 49:227-33.

Wrzos HF, Cruz A, Polavarapu R, Shearer D, Ouyang A. (1997) Nitric oxide synthase (NOS) expression in the myenteric plexus of streptozotocin-diabetic rats. Dig. Dis. Sci. 42(10):2106-10.

Wu G, Morris SM Jr. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Biochem. J. 336:1-17.

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(1-2):65-71.

Young HM, Ciampoli D. (1998) Transient expression of neuronal nitric oxide synthase by neurons of the submucous plexus of the mouse small intestine. Cell Tissue Res. 291(3):395-401.

Zizzo MG, Mule F, Serio R. (2005) Mechanisms underlying the nitric oxide inhibitory effects in mouse ileal longitudinal muscle. Can. J. Physiol. Pharmacol. 83(8-9):805-10.

VII. MAGYAR NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

A nitrogén-monoxid (NO) intracelluláris és extracelluláris jelátvivő molekula, amelyet a nitrogén-monoxid szintáz enzim (NOS) termel. Emlősökben három NOS izoforma ismert: az indukálható NOS (iNOS) és a konstitutívan expresszálódó (cNOS) endotheliális (eNOS) és neuronális NOS (nNOS).

Az enterális idegrendszerben a NO a fő gátló neurotranszmitter, így kiemelkedően fontos szerepet játszik a perisztaltikus reflex leszálló gátlásában. A klinikai gyakorlatban ismert, hogy az alkoholisták emésztési funkciói, így a motilitás is jelentősen károsodik.

Hipotézisünk ezért az volt, hogy a krónikus alkoholfogyasztás hatására bekövetkező motilitási rendellenességek hátterében a NO szintézisének megváltozása állhat. Két kísérletsorozatot állítottunk fel hipotézisünk teszteléséhez. Az egyik kíséreletsorozatban Swiss egereket használtunk amelyek két hét adaptációs periódust követően 20%-os ethanol vizes oldatát kapták 3 hétig, a kontroll egerek izokalorikus cukoroldatot vagy vizet kaptak. A másik kísérletsorozatban hím Wistar patkányokat használtunk amelyek szintén 2 hét adaptációs periódus után 6 hétig kapták a 20%-os ethanol vizes oldatát.

Egerekben meghatároztuk a krónikus alkoholfogyasztás béltranzitra gyakorolt hatását *in vivo*, valamint körkörös izom-myentericus plexus preparátumban mértük a nitrerg neuronok által mediált simaizom-relaxációt elektromos mező stimuláció (EFS) és exogén NO hatására *in vitro*. Patkány és egér bélidegrendszerében megállapítottuk az összneuronszámot és a nitrerg neuronok számát a myentericus plexusban krónikus alkoholkezelést követően. Egér jejunumból származó élő simaizom-myentericus plexus preparátumokban DAF-FM fluoreszcens festékkel meghatároztuk a myentericus neuronok NO szintézisének mértékét. A DAF-FM diacetát könnyen bejut a sejtekbe ahol aztán az intracelluláris észterázok hasítása után már nem tud átjutni a sejtmembránon és a sejtből kidiffundálni. Az így a sejtben lévő DAF-FM a NO-dal képes reakcióba lépni aminek hatására egy erősen fluoreszkáló vegyület jön létre és a fluoreszcencia intenzitása egyenesen arányos az NO koncentrációjával. A DAF-FM által jelzett NO eredetét nNOS immunhisztokémiával határoztuk meg majd kvantifikáltuk azt, hogy a DAF-FM-pozitív sejtekben megtalálható-e a nNOS enzim.

Patkány bélcsatorna duodenum, jejunum, ileum és colon szakaszában meghatároztuk az iNOS és cNOS enzimek aktivitását, valamint az eNOS és nNOS fehérjék mennyiségét.

A béltranzit szignifikánsan késett krónikus alkoholkezelés hatására a kontroll csoporttal összehasonlítva. Ez a motilitási késés bekövetkezhet azért, mert a perisztaltikus reflex során a simaizom kontrakcióját nem követi megfelelő mértékű relaxáció. A nitrerg simaizom-relaxáció mérése myentericus plexus-simaizom preparátumokban ezt igazolta, hiszen alkoholkezelt egerekben a simaizom relaxáció EFS hatására szignifikánsan csökkent. Az izompreparátumokhoz adott exogén NO hatására viszont nem változott a simaizom-relaxáció mértéke, ami arra enged következtetni, hogy a lecsökkent simaizom-relaxáció nem receptorszinten váltódik ki. A simaizom megfelelően reagál a NO-ra, azonban a nNOS által termelt és a nitrerg neuronokból felszabaduló NO vagy nem elegendő mennyiségű vagy nem jut el megfelelően a simaizomsejtekig.

A nNOS-immunreaktív neuronok száma patkány és egér mintákban is minden vizsgált bélszakaszban szignifikánsan lecsökkent alkoholkezelést követően a kontroll mintákkal összehasonítva. Az összneuronszám azonban egyik vizsgált mintában sem változott. Ez arra utal, hogy nem az alkohol hatására bekövetkezett neuronális apoptózis miatt csökken a nNOS-immunreaktív sejtek száma, hanem a nNOS expressziója csökken le a sejtekben.

A simaizom-myentericus plexus preparátumoknak DAF-FM festékkel történő inkubációja után a myentericus neuronok, idegrostok, erek és simaizomsejtek mutattak intenzív festődést. A fluoreszcencia intenzitása L-NAME hatására 52,5%-kal csökkent ami azt mutatja hogy a fluoreszcencia valóban NO eredetű. A myentericus neuronokban történt fluoreszcencia intenzitás (FI) mérése és statisztikai analízise után azt tapasztaltuk, hogy a FI szignifikánsan emelkedett a krónikus alkoholkezelt állatokból származó mintákban a kontroll csoporthoz képest. Ez az intenzitás növekedés ellentmondott az alkoholfogyasztás hatására tapasztalt csökkent simaizomrelaxációnak és a nNOS-immunreaktív sejtszám csökkenésének. Ennek tisztázására és mert a DAF-FM nem tesz különbséget a különböző NOS izoformák által termelt NO között a DAF-FM festett preparátumokon nNOS immunhisztokémiát végeztünk. A neuronok 22,7 százalékában kolokalizált a DAF-FM a nNOS-sal, 42,3 százaléka csak nNOS immunreaktivitást mutatott és 35 százalékuk pedig csak DAF-FM-mel festődött és nem mutatott nNOS immunreaktivitást. Az igen kis százalékban

jelen lévő DAF-FM festett és nNOS-t tartalmazó sejtek száma arra utal, hogy a megnövekedett FI valószínűleg más NOS izoformák által termelt NO-tól származik, ez a NO azonban nem alkalmas a megfelelő mértékű simaizomrelaxáció kiváltására.

A cNOS aktivitása a jejunum, ileum és colon területén az alkoholkezelt állatokban szignifikánsan kisebb volt mint a kontroll állatokban míg a duodenum területén nem különbözött szignifikánsan a két állatcsoport között. Az iNOS aktivitása egyik bélszakaszban sem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll és alkoholkezelt állatok között. A nNOS ellenanyaggal történő inkubáció után a duodenum, jejunum, ileum és colon homogenizátumokban a 155 kDa-os immunreaktív csík minden preparátumban megjelent. A duodenum, jejunum és ileum területén nem volt detektálható különbség a fehérje mennyiségében az alkoholkezelt és kontroll állatok között. A colonban azonban krónikus alkoholfogyasztás után jelentősen csökkent a fehérje mennyisége. A bélszakaszokból származó mintákból készült blotokon az iNOS illetve eNOS csíkok igen vékonyak voltak ezért azok kvantitatív analízise nem volt lehetséges.

Összefoglalásképpen elmondhatjuk, hogy egerekben és patkányokban kimutattuk a myentericus nitrerg rendszer bélszakasz-specifikus érintettségét alkoholfogyasztás hatására. A NO szintézisének megváltozása szerepet játszhat a krónikus alkoholfogyasztást kísérő bélmotilitási zavarok pathologiás mechanizmusában.

VIII. ENGLISH SUMMARY

Chronic intake of alcohol has been shown to severely affect all organs of the body by altering the function of various cell types and signaling pathways. In the gastrointestinal tract, chronic alcohol consumption prominently disturbs normal intestinal motor function leading to motility disorders. Altered motility has been observed in humans and in experimental animals following chronic alcohol intake, but the underlying cellular mechanism remains unknown.

Nitric oxide (NO) is the major mediator of inhibitory neurotransmission in the gut. NO is synthesized by three distinct isoform of NO synthase: neuronal (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) NO synthase through distinct regulatory mechanisms. Neurons immunoreactive for nNOS have been localized to a subpopulation of cells in the myenteric plexus and the submucosus plexus of the gastrointestinal tract. Since the reflex circuits of the myenteric plexus control the motility of the intestine, our work focused on the three NOS isoforms and NO synthesis of the myenteric plexus. The subpopulation of nNOS-immunreactive cells in this plexus consists of mostly inhibitory motor neurons and to a smaller extent inhibitory interneurons.

The role of nNOS-derived NO in the physiological relaxations of gastrointestinal muscle has been demonstrated in pharmacological studies and in knockout animals. Inhibitors of nNOS have been shown to reduce nerve-mediated relaxations. Therefore, we hypothesized the role of myenteric neuronal NO in the observed motility disturbances following chronic alcohol consumption. Using chronic alcohol-treated and control mice and rats we measured the effect of chronic alcohol consumption on different aspects of the nitrergic system of the gastrointestinal tract. In mice, we determined the effect of alcohol consumption on small intestinal transit, measured nitrergic relaxations to electrical field stimulus or exogenous NO. In both mice and rats, we have quantified the total number of myenteric neurons and nNOS-immunoreactive neurons after alcohol-treatment. In the mouse jejunum, we measured the release of NO in real time with a NO-reactive fluorescent dye in response to chronic alcohol intake. Furthermore, we determined NOS enzymatic activities and the amount of nNOS and eNOS proteins in four different segments of the rat intestine.

We found that the intestinal transit time of mice was significantly delayed in

response to chronic alcohol consumption when compared to the control group. This delay might be due to an inadequate relaxation of small intestinal smooth muscle. In intestinal smooth muscle-myenteric plexus preparations, we observed a significant impairment of NO-mediated smooth muscle relaxations to electrical field stimulus after chronic alcohol-treatment, while relaxations to exogenous NO remained unchanged. This suggests that the effect that ethanol exerts on smooth muscle relaxation is not due to a defective responsiveness of the smooth muscle to NO but appears to be originating from impaired nitrergic innervation. The quantification of nNOS-immunreactive cells and the total number of cells in the myenteric plexus showed that in both mice and rats the number of nNOS-immunreactive cells significantly decreased while the total number of cells did not change. This indicates an adaptive change in the expression of nNOS in myenteric neurons rather than an apoptotic process.

The fluorescence intensity of the NO-sensitive dye DAF-FM was significantly increased in myenteric neurons after chronic alcohol consumption. This result seemed contradictory to the decrease in nNOS-immunoreactive neurons and to the observed impaired nitrergic relaxations. In light of this discrepancy and because DAF-FM does not distinguish between NO produced by different NOS isoforms, we performed nNOS immunohistochemistry on DAF-FM loaded preparations. We found that in 22.7% of neurons DAF-FM colocalized with nNOS, 42.3% was stained with nNOS only, and 35% was stained with DAF-FM only. This partial colocalization with nNOS suggests that other NOS isoforms might be present in myenteric neurons, and these isoforms synthesize NO, however this NO produced does not seem to compensate for the impaired nitrergic transmission.

Measurement of the physiological constitutive NOS (cNOS) activity revealed a 20 times higher activity in the colon than in the small intestine and after chronic ethanol treatment demonstrated a significant decrease in the jejunum, ileum, and colon, while in the duodenum it remained unchanged as compared with the control group. The physiological iNOS activity was higher in the ileum and colon than in the duodenum and jejunum, and these levels were not significantly affected by ethanol. The nNOS protein content measured by Western blotting indicated a significant decrease in the colon after ethanol consumption, while in other intestinal segments change was not detectable.

In conclusion, the selective impairment of nNOS in the gastrointestinal tract following chronic alcohol consumption might play an important role in the motility disturbances observed in alcoholic patients and laboratory animals.

IX. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek, Dr. Fekete Évának, aki nemcsak szakmailag, de emberileg is példát mutatott nekem. Szerencsésnek mondhatom magam, hogy szakdolgozatomat és doktori disszertációmat is az általa vezetett laboratóriumban készíthettem el és mindig szívesen, jó érzéssel fogok emlékezni erre az időre.

Köszönettel tartozom Dr. Bagyánszki Máriának is, aki nemcsak a magyarországi, de a belgiumi munkám során is sokat segített. Köszönöm még a labor többi tagjának, Linke Nikolettnek és Bódi Nikolettnek a barátságos és jó hangulatú napokat a laborban is és a laboron kívül. Azt gondolom hogy nagyon jó csapatot alkottunk együtt.

Köszönöm Dr. Gulya Károlynak, hogy munkámat a tanszéken lehetővé tette, és köszönöm a tanszék dolgozóinak, Dr. Bakota Lídiának, Dr. Körtvély Elődnek, Mikola Tamásnak, Szigeti Csabának, Várszegi Szilviának és Ambrus Józsefnének a szakmai segítséget. Köszönöm továbbá Dr. Izbéki Ferencnek és Dr. Kaszaki Józsefnek a patkánykísérletekben nyújtott segítségét.

Legvégül szeretném megköszönni férjemnek, Szabó Áronnak, hogy sok egyéb csodálatos tulajdonsága mellett még a Western blottoláshoz is ért és segített elkészíteni a kísérleteim során használt fehérjehomogenizátumokat.

X. PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

TELJES KÖZLEMÉNYEK:

1. **Krecsmarik M**, Izbéki F, Bagyánszki M, Linke N, Bódi N, Kaszaki J, Katarova Z, Szabó Á, Fekete É, Wittman T (2006) *Chronic ethanol exposure impairs neuronal nitric oxide synthase in the rat intestine.* Alcohol Clin Exp Res, Vol 30, No 6, 967–973 IF:2.63

2. **Krecsmarik M,** Katarova Z, Bagyánszki M, Szabó G, Fekete É (2004) *Gastrointestinal phenotype of GAD67lacZ transgenic mice with early postnatal lethality.* Histol. Histopathol. 20: 75-82 IF:2.02

3. Román V, Bagyánszki M, **Krecsmarik M,** Horváth A, Resch B. Á, Fekete É (2004) *Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the developing myenteric plexus of the human fetal intestine.* Cytometry Feb;57A(2):108-12. IF:2.11

4. Román V, **Krecsmarik M**, Bagyánszki M, Fekete É (2001) *Evaluation of the total number of myenteric neurons in the developing chicken gut using cuprolinic blue histochemical staining and neurofilament immunocytochemistry.* Histochem Cell Biol 116:241-246. IF:2.23

NYOMTATÁSBAN MEGJELENT KIVONATOK:

1. **Krecsmarik M**, Winter BY de, Man JG de, Bagyánszki M, Nassauw L Van, Fekete É, Pelckmans PA, Timmermans J-P *Chronic alcohol consumption impairs nitrergic inhibition in the mouse small intestine.* Digestive Disease Week and the 107th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, Los Angeles, USA. Gastroenterology 2006 Apr; 130 (4 suppl 2) A1-911 IF:12.38

2. Izbéki F, **Krecsmarik M**, Szabó S, Kaszaki J, Kuris A, Bagyánszki M, Rosztóczy A, Fekete É, Wittmann T *Decreased number of nitrergic and serotonergic cells in the small intestine of chronic alcohol-treated rats.* 12th European Neurogastroenterology and Motility Meeting. Neurogastroenterol Motil 2004 16(6) 829-873 IF:2.56