

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

STRUKTURÁLIS ÉS MOLEKULÁRIS VÁLTOZÁSOK
CROHN-BETEG PATKÁNYOK BÉLIDEGRENDSZERÉBEN

TALAPKA PETRA

TÉMAVEZETŐK:

PROF. DR. FEKETE ÉVA

PROFESSZOR EMERITA

DR. BÓDI NIKOLETT

EGYETEMI ADJUNKTUS

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

ÉLETTANI, SZERVEZETANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK



SZEGED

2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA	5
I. BEVEZETÉS	7
I. 1. A bélfal szövettani szerkezete	7
I. 2. A bélidegrendszer általános felépítése és működése.....	9
I. 3. A gyulladásos bélbetegségek típusai	11
I. 4. A Crohn-betegség kísérletes modellezése	14
I. 5. Myenterikus neuropátia a gyulladásos bélbetegségekben.....	16
I. 6. A bélfal szövettani elváltozásai gyulladásos bélbetegségekben.....	17
I. 6. 1. Az epiteliális gát szerepe a bél permeabilitásának szabályozásában	17
I. 6. 2. A fibrózis szerepe a bélszűkületek kialakulásában	18
I. 7. Különböző gyulladásos jelmolekulák szerepe a Crohn-betegség kialakulásában.....	20
II. CÉLKITŰZÉSEK	22
III. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	24
III. 1. Crohn-beteg patkánymodell előállítása	24
III. 2. A vastagbél előkészítése makroszkópos, szövettani és molekuláris vizsgálatokhoz	24
III. 2. 1. Bélminták előkészítése fénymikroszkópos vizsgálatokhoz.....	25
III. 2. 2. Bélminták előkészítése transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz .	26
III. 2. 3. Bélminták előkészítése molekuláris biológiai vizsgálatokhoz	26
III. 2. 4. Bélminták előkészítése molekuláris biológiai vizsgálatokhoz	26
III. 3. Fénymikroszkópos vizsgálatok.....	27
III. 3. 1. A myenterikus neuronok kvantitatív és morfológiai paramétereinek vizsgálata	27
III. 3. 2. A nyálkahártya saját izomrétegének és a bélfal külső izomrétegeinek fénymikroszkópos morfológiai vizsgálata a bélszűkületek területén	29
III. 4. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok.....	30
III. 4. 1. Szoros sejtkapcsoló struktúrák állapotának vizsgálata	30
III. 4. 2. Simaizomsejtek távolságának meghatározása	30
III. 4. 3. Kaszpáz-9 posztembedding immunhisztokémia.....	31

III. 5. Különböző gyulladásos jelmolekulák és enzimek mRNS expressziójának meghatározása kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval.....	33
III. 5. 1. RNS izolálás és egyes szálú cDNS szintézis	33
III. 5. 2. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció	33
III. 6. Statisztikai analízis	34
IV. EREDMÉNYEK.....	35
IV. 1. Makroszkópos megfigyelések	35
IV. 1. 1. TNBS-val indukált akut vastagbélgyulladás tünetei, a kísérleti állatok testtömege	35
IV. 1. 2. A nyálkahártya fekélyesedése	36
IV. I. 3. Bélszűkületek kialakulása a vastagbélgyulladás krónikus fázisában.....	37
IV. 2. A myenterikus neuronok kvantitatív és morfometriai paramétereinek változása a vastagbélgyulladás akut és krónikus fázisában.....	38
IV. 2. 1. A myenterikus neuronok denzitása	38
IV. 2. 1. 1. A myenterikus neuronok denzitása a bélgyulladás akut fázisában	38
IV. 2. 1. 2. A myenterikus neuronok denzitása a bélgyulladás krónikus fázisában	38
IV. 2. 2. A myenterikus neuronok területének változása.....	40
IV. 2. 2. 1. A myenterikus neuronok területének változása a bélgyulladás akut fázisában	40
IV. 2. 2. 2. A myenterikus neuronok területének változása a bélgyulladás krónikus fázisában	40
IV. 3. A bélszűkületek szövettani és molekuláris biológiai vizsgálata.....	42
IV. 3. 1. A bélfalat felépítő izomrétegek morfometriai változásai	42
IV. 3. 1. 1. A lamina muscularis mucosae fénymikroszkópos morfometriai vizsgálata ..	42
IV. 3. 1. 2. A bélfal külső izomrétegeinek fénymikroszkópos morfometriai vizsgálata ..	42
IV. 3. 2. Ultrastrukturális változások a bélszűkületek területén	44
IV. 3. 2. 1. A lamina epithelialis elektronmikroszkópos vizsgálata	44
IV. 3. 2. 1. 1. A szoros sejtkapcsoló struktúrák morfometriai vizsgálata	45
IV. 3. 2. 2. A myenterikus ganglionok és mikrokörnyezetük elektronmikroszkópos vizsgálata	46
IV. 3. 2. 2. 1. A simaizomsejtek közötti extracelulláris mátrix morfometriai vizsgálata a bélfal körkörös izomrétegében	48

IV. 3. 2. 2. 2. Kvantitatív posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatok.....	49
IV. 3. 3. Molekuláris változások a bélgyulladás krónikus fázisában.....	51
IV. 3. 3. 1. A MMP9 és TIMP1 mRNS expressziója	51
IV. 4. Különböző gyulladásos markerek mRNS expressziójának változása a bélgyulladás akut és krónikus fázisában	52
IV. 4. 1. A TGF-beta 2 mRNS expressziója	52
IV. 4. 1. 1. A TGF-beta 2 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás akut fázisában	52
IV. 4. 1. 2. A TGF-beta 2 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás krónikus fázisában	52
IV. 4. 2. A TGF-beta 3 mRNS expressziója	54
IV. 4. 2. 1. A TGF-beta 3 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás akut fázisában	54
IV. 4. 2. 2. A TGF-beta 3 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás krónikus fázisában	54
IV. 4. 3. A HO-1 mRNS expressziója	56
IV. 4. 3. 1. A HO-1 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás akut fázisában.....	56
IV. 4. 3. 2. A HO-1 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás krónikus fázisában	56
V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	58
V. 1. Kísérletesen indukált Crohn-beteg patkánymodell.....	58
V. 2. A myenterikus neuronok kvantitatív és morфомetriai paramétereinek változásai ..	59
V. 3. Strukturális és molekuláris változások a bélszűkületek területén.....	61
V. 4. Különböző gyulladásos jelmolekulák expressziójának változása	63
V. 5. Következtetések	63
VI. ÖSSZEFOGLALÁS	65
VI. 1. Magyar nyelvű összefoglalás	65
VI. 2. Summary.....	69
VII. FELHASZNÁLT IRODALOM	73
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	84
IX. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA.....	85

RÖVIDÍTÉSEK MAGYARÁZATA

AH	utóhyperpolarizációs (afterhyperpolarizing) neuron
ANOVA	egyfaktoros varianciaanalízis (Analysis of variance)
AQP	aquaporin
ATG16L1	autofágia-kapcsolt gének egyik típusa (autophagy-related gene like 1)
ATP	adenozin-trifoszfát
AVD	apoptózist kísérő térfogat csökkenés (apoptotic volume decrease)
BSA	borjú szérum albumin (bovine serum albumin)
CD	Crohn-betegség (Crohn's disease)
cDNS	cirkuláris dezoxi-ribonukleinsav
DAB	diaminobenzidin
DTH	késői típusú túlérzékenységi reakció (delayed-type hypersensitivity)
ECM	extracelluláris mátrix
EPSP	serkentő posztzinaptikus potenciál (excitatory postsynaptic potential)
GALT	bélhez kapcsolódó nyirokrendszer (gut associated lymphoid tissue)
GI	gasztrointesztinális
HIF	hypoxia-indukálható faktor
HO	hemoxigenáz
HPRT	hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz
HuC/HuD	humán neuronális fehérje
IBD	gyulladásos bélbetegség (inflammatory bowel disease)
IBS	irritábilis bélszindróma (irritable bowel syndrome)
ICC	Cajal-féle interstitialis sejt (Interstitial Cell of Cajal)
IEL	intraepiteliális fehérvérsejt (intraepithelial lymphocyte)
INF	interferon
IPAN	saját érzőneuron (intrinsic primary afferent neuron)
LMM	lamina muscularis mucosae
MG	myenterikus ganglion
MMP	mátrix metalloproteináz (matrix metalloproteinase)
MP	myenterikus plexus
mRNS	hírvivő ribonukleinsav (messenger ribonucleic acid)
mtsai.	munkatársai

NANC	nem adrenerg, nem kolinerg (non-adrenergic, non-cholinergic)
PB	foszfát puffer (phosphate buffer)
qRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real time-polymerase chain reaction)
ROS	reaktív oxigén szabadgyökök (reactive oxygen species)
S	szinaptikus (synaptic) neuron
SD	szórás (standard deviation)
SEM	szórás (standard error of mean)
SP	submucosus plexus
TBS	TRIS-pufferes sóoldat (TRIS buffered saline)
TGF	transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
TIMPs	mátrix metalloproteinázok szöveti gátlói (tissue inhibitors of metalloproteinases)
TJk	szoros sejtkapcsolatok (tight junctions)
TNBS	2,4,6-trinitrobenzénszulfonsav
TNF	tumor nekrosis faktor
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)-propán-1,3-diol
UC	fekélyes vastagbélgyulladás (ulcerative colitis)
VIP	vazoaktív intesztinális polipeptid

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

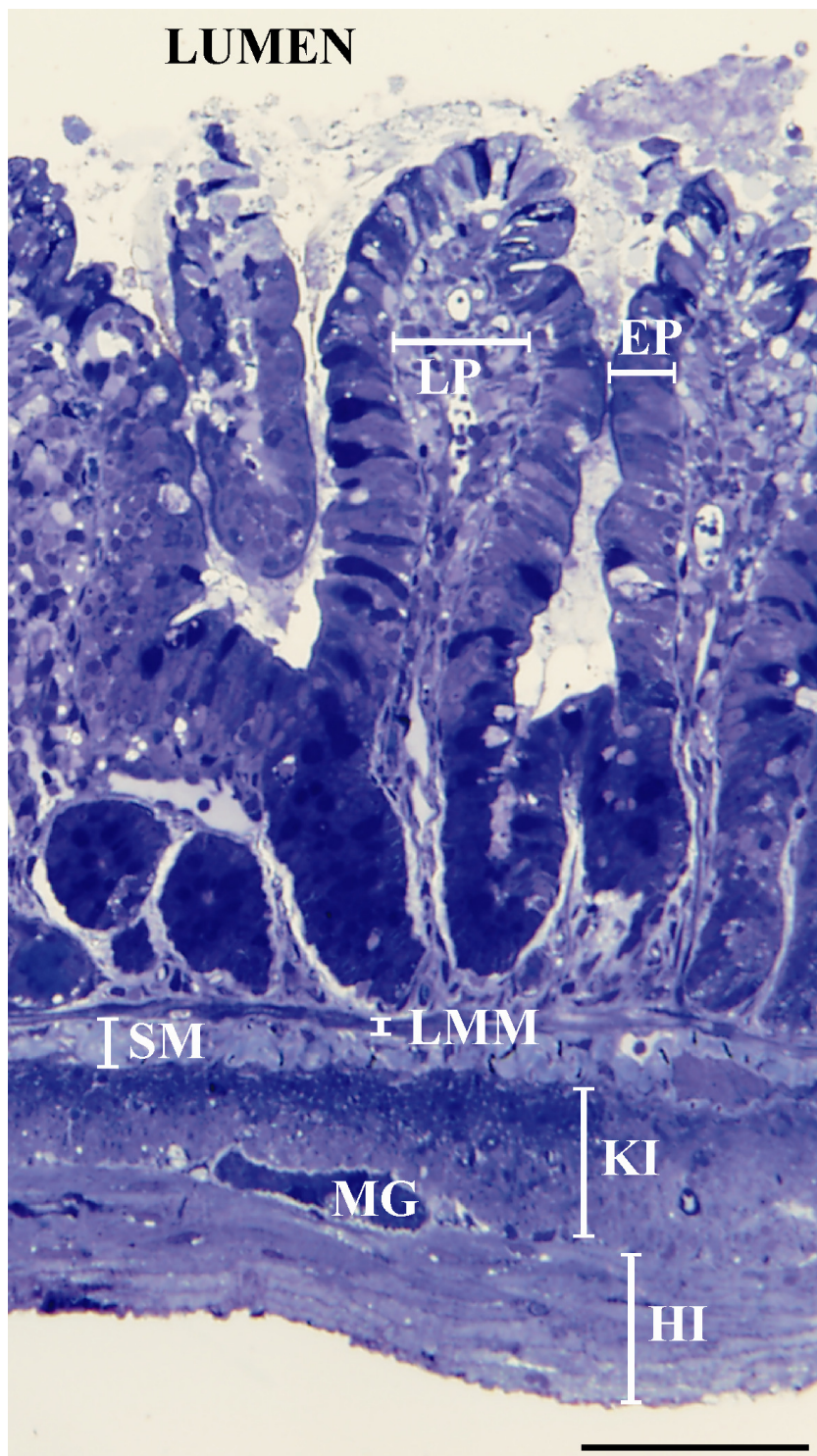
I. BEVEZETÉS

I. 1. A bél fal szövettani szerkezete

A bél lumenét borító nyálkahártya három rétegből áll (1. ábra). A lamina epithelialist alkotó enterociták laterális felszínén speciális sejtkapcsoló struktúrák biztosítják a sejtek szoros kapcsolódását és a közöttük lévő kommunikációt (Vetrano és mtsai., 2009). A sejtek oldalsó felszínének a béllumenhez közeli legapikálisabb részén található szoros sejtkapcsolatok (tight junctions, TJk) diffúziós gátként megakadályozzák a sejtek közötti szabad anyagáramlást. A TJk képezhetnek bi- vagy tricelluláris kapcsolatokat, attól függően, hogy két vagy három sejt találkozásánál jönnek létre (Ikenouchi és mtsai., 2005). A TJk kialakításában közel 40 fehérje vesz részt, melyek közül elsőként az occludint írták le (Furuse és mtsai., 1993), de a transzmembrán claudinok a legjelentősebbek (Turksen és Troy, 2004).

A lamina propriában vér- és nyirokerek, egyszerű csöves mirigyek, valamint a bélhez kapcsolódó nyirokrendszer (gut associated lymphoid tissue, GALT) kialakításában résztvevő nyiroktüszők találhatók. A lamina muscularis mucosae (LMM) (1. ábra) a nyelőcsőtől a végbélnyílásig húzódik. A bél fal külső izomrétegeitől eltérő morfológiájú simaizomsejtek alkotják (King és Arnold, 1922; King és mtsai., 1922; King és Church 1923; King és Robinson 1945; King és mtsai. 1947). A nyelőcsőben a simaizomsejtek hosszirányban rendeződnek, míg a vékony- és vastagbélben egy hosszanti és egy körkörös izomréteg is megfigyelhető (Freeman és Bracegirdle, 1967; Warwick és Williams 1985).

A bél fal külső simaizomzata (tunica muscularis externa) a submucosa réteg alatt helyezkedik el, és egy külső hosszanti- és belső körkörös izomrétegből áll (1. ábra). Ezek kontrakciója és relaxációja eredményezi a bél perisztaltikáját, biztosítja a béltartalom megfelelő keverését és továbbítását. A bélcsatornát kívülről az egyrétegű laphámból (mesothelium) és a kötőszövetből (lamina propria serosae) álló savós hártya (tunica serosa) határolja.



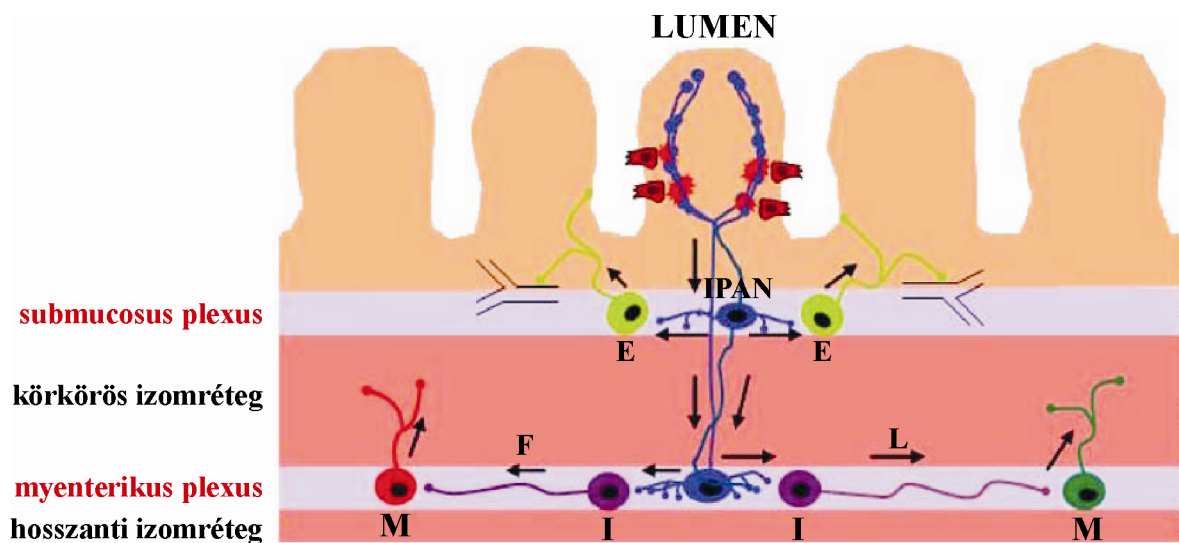
1. ábra Reprezentatív fénymikroszkópos felvétel patkány ileumából készült félvékony bélkeresztmetszetről toluidin-kék festés után. A nyálkahártyát három szövettani réteg, az epitélium (EP), a lamina propria (LP) és a lamina muscularis mucosae (LMM) alkotja. A submucosa (SM) alatt találjuk a bélfal külső simaizomzatát képező körkörös (KI) és hosszanti (HI) izomrétegeket. A myenterikus plexus a KI és HI között helyezkedik el (MG – myenterikus ganglion) (Bódi N. felvétele, 2013). Lépték: 100 μ m

I. 2. A bélidegrendszer általános felépítése és működése

A bélidegrendszer az autonóm idegrendszer része, a nyelőcsőtől a belső anális záróizomig húzódik, de megtalálható a hasnyálmirigyben, az epehólyag falában és az epevezetékben is (Furness, 2006; Di Nardo és mtsai., 2008). Feladata az emésztőcsatorna funkcióinak összehangolása, az abszorpció, a szekréció valamint a bélmotilitás szabályozása (Bush, 2002). Az emlős bélidegrendszerben több kisebb nem ganglionált és két nagyobb ganglionált plexus található (Meissner, 1857; Auerbach, 1864). A külső hosszanti és belső körkörös izomréteg között helyezkedik el a myenterikus plexus (MP), melynek fő feladata a bél motoros funkcióinak szabályozása, a perisztaltikus reflex kialakítása. A belső körkörös izomréteg és a submucosa között található a submucosus plexus (SP), amely a bélcsatorna szekretomotoros működését szabályozza.

A bélidegrendszerben a központi idegrendszer klasszikus ingerületátvivő anyagai mellett számos peptid természetű jelmolekula és egyéb neurotranszmitter is megtalálható (Lomax és Furness, 2000; Hens és mtsai., 2001). Ezek segítségével történik a bél saját motoros, szekretomotoros és lokális vazodilatátor reflexeinek jelátvitel. A poliszinaptikus myenterikus reflexívek a bélfal saját érzőneuronjaiból (intrinsic primary afferent neuron, IPAN), interneuronokból és izom-motorneuronokból állnak (Furness és mtsai., 2004). A reflexívek orális irányban felszálló serkentő, míg aborális irányban leszálló gátló információt közvetítenek (2. ábra). A bélidegrendszerben a serkentő neurotranszmisszió lehet gyors és lassú. A gyors szinaptikus transzmissziót a nikotinos receptorokon keresztül ható acetilkolin közvetíti. A legfontosabb lassú serkentő neurotranszmitterek a P-anyag és a neurokinin A, s a jeltovábbítás legtöbbször a G-fehérje kapcsolt receptorok családjába tartozó elemekkel történik (Galligan, 2002). A bélben a gátló ingerületátvitel főleg az úgynevezett nem adrenerg, nem kolinerg (NANC; non-adrenergic, non-cholinergic) transzmisszióval valósul meg (Bogers és mtsai., 1991; Bredt és Snyder, 1994; Mashimo és mtsai., 1996). Az ilyen NANC gátló neuronok elsősorban nitrogén-monoxidot és vazoaktív intesztinális polipeptidet (VIP) szabadítanak fel (Furness, 2000). A nitrerg myenterikus neuronok a perisztaltikus reflex leszálló fázisát szabályozzák, relaxálják a simaizmot (Furness, 2000). A IPAN-okat elektrofiziológiai tulajdonságaik alapján két csoportba sorolhatjuk. Az utóhiperpolarizációs (afterhyperpolarizing, AH) neuronok a kémiai és mechanikai stimulusokat lassú, a szinaptikus (synaptic; S) neuronok gyors serkentő posztzinaptikus potenciálok (excitatory postsynaptic potential, EPSP) segítségével közvetítik (Mawe és mtsai., 2009).

A tápcsatorna legfontosabb ritmusgeneráló sejtjei a mezenchimális eredetű Cajal-féle intersticiális sejtek (Interstitial Cell of Cajal, ICC), amelyek neurotranszmitter receptoraik segítségével közvetítik a bélidegrendszer aktiváló vagy gátló effektor neuronjainak ingerületét a simaizomzathoz (Sanders, 1996). A ICC-ek kontraktilis elemeket alig tartalmaznak, viszont membránpotenciáljukat képesek ritmikusan változtatni. Úgynevezett „lassú hullámokat”, vagyis spontán bekövetkező depolarizációs hullámokat generálnak, amelyek kis késéssel áttevődnek a velük érintkező simaizomsejtekre (Pluja és mtsai., 2001; Forrest és mtsai., 2008).



2. ábra Az enterikus reflexívek sematikus ábrázolása. A submucosus plexusban a bélfal saját érzőneuronjai (intrinsic primary afferent neuron, IPAN) közvetítik az információt a szekretomotoros vagy vazodilatátor effektorneuronok felé (E). A myenterikus plexus poliszinaptikus reflexívei IPAN-okból, interneuronokból (I) és izom-motoneuronokból (M) állnak. A reflexív felszálló ága (F) orális irányban serkentő, míg leszálló ága (L) aborális irányban gátló információt közvetít (Lomax és mtsai., 2006 nyomán).

A különböző bélmotilitási rendellenességek, a dysphagia, a gastroparesis, vagyis a gyomor ürülésének késése, a székrekedés a kor előrehaladtával egyre gyakrabban jelentkeznek (Wade, 2002), melynek hátterében az enterikus neuronok kvantitatív és morfometriai paramétereinek megváltozása áll. A bélcsatorna különböző szakaszaiban levő neuronok az öregedés hatására különböző mértékben sérülnek (Phillips és Powley, 2001). A legjelentősebb neuronális változások a colonban játszódnak le, itt emberben az enterikus neuronok pusztulása nagyon korán, már 4 éves korban elkezdődik (Wester és mtsai., 1998; Wester és mtsai., 1999), majd az idegsejtek száma 20 és 65 éves kor között már 37%-kal csökken (Gomes és mtsai., 1997). Patkányban 3 és 27 hónapos kor között a myenterikus

neuronok denzitása a vastagbélben és a végbélben 40%-kal csökken (Phillips és Powley, 2001). A posztnatális fejlődés során az enterikus neuronok mérete is régióspecifikus változásokat mutat. A kor előrehaladtával a neuronok a gyomorban, a vakbélben és a vastagbélben növekednek a legnagyobb mértékben (Gabella, 1970).

I. 3. A gyulladásos bélbetegségek típusai

A gyulladásos bélbetegségek (inflammatory bowel disease, IBD) az emésztőszervrendszer ismeretlen eredetű, krónikus megbetegedései. A betegeknél a súlyosabb vagy enyhébb gyulladásos folyamatok tünetmentes periódusokkal váltakozhatnak (Hart és Siew, 2011). Az elmúlt évtizedekben a fejlett nyugati kultúrákban, főleg a fiatal felnőttek körében rohamosan növekedett a gyulladásos bélbetegségek száma, Európában és az Egyesült Államokban ez ma már eléri a 3,6 milliót (Engel és Neurath, 2010). A IBD-ek patomechanizmusa a mai napig nem ismert, de a legelfogadottabb hipotézis szerint egy környezeti faktorra adott hibás, fokozott immunreakció az epiteliális gát funkciójának sérülését okozza, ami azután egy hosszan elnyúló gyulladásához vezet (Abraham és Cho, 2009; Kaser és mtsai., 2010).

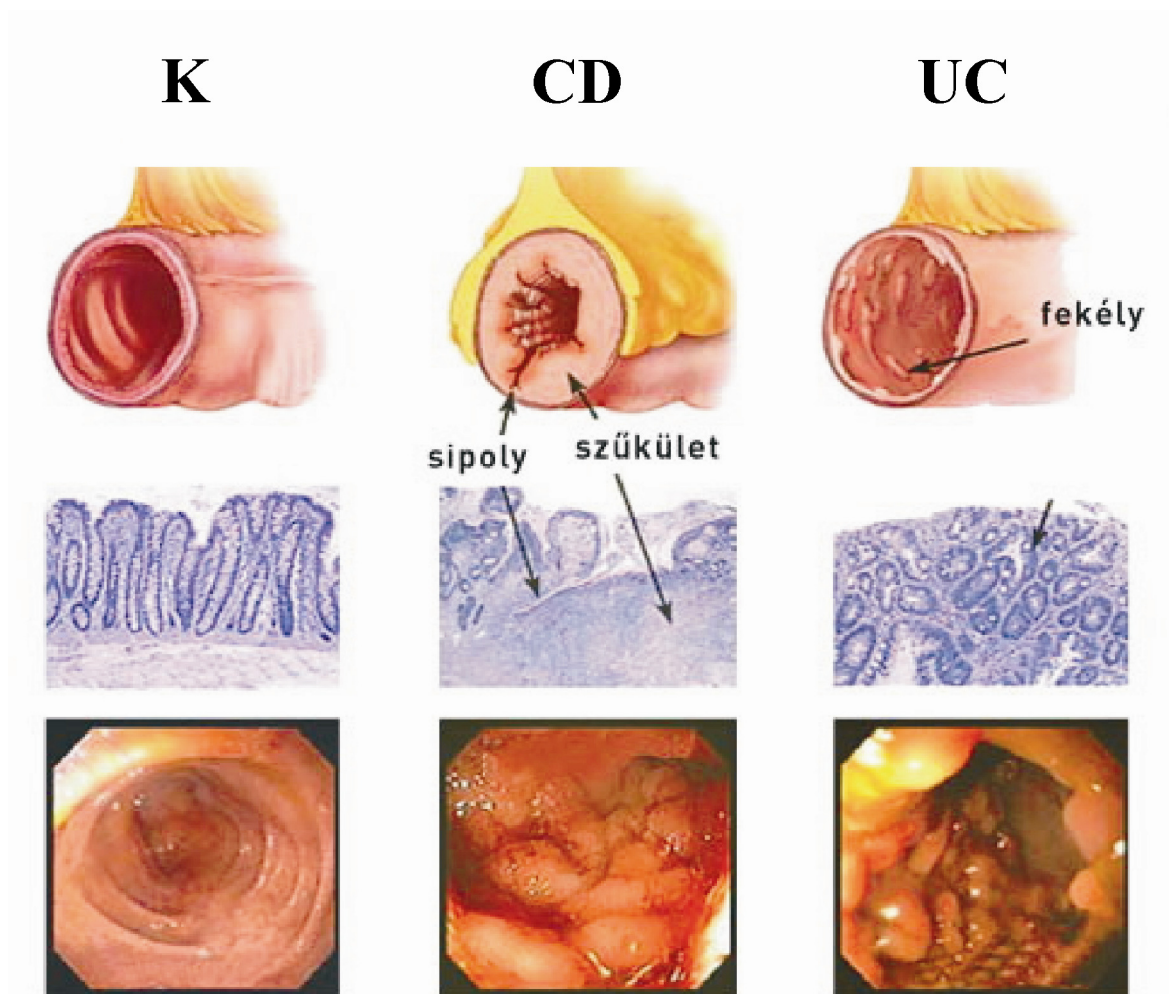
A IBD-ek két leggyakoribb típusa a Crohn-betegség (Crohn's disease, CD) és a fekélyes vastagbélgyulladás (ulcerative colitis, UC). Ezek a legtöbb esetben klinikailag, anatómiailag és szövettanilag is jól elkülöníthetők (3. ábra). A UC csak a colon nyálkahártya összefüggő területeit érinti (Lakhan és mtsai., 2010). A CD viszont a bélfal minden rétegére kiterjed. Előfordulása a vastagbélben és a csípőbél terminális részén a leggyakoribb, de a tápcsatorna teljes szakaszán, a szájüregtől a végbélnyílásig bárhol kialakulhat (Hart és Siew, 2011). A betegség elhúzódó hasmenéssel, lázzal és alhasi fájdalommal jár. A gyulladásos folyamat gyakran más szervrendszerekre is kiterjed, így a Crohn-betegségeknél jellemző az ízületi gyulladás, a szem gyulladásos megbetegedései, a máj és epe utak károsodása, valamint a bőrkiütések és fekélyek megjelenése is (Monsen és mtsai., 1990; Bouhnik és mtsai., 1993).

A IBD-ek elsősorban a fejlett társadalmak népbetegségei. A legújabb kutatások szerint a IBD-ek gyakoriságának ugrásszerű növekedését az ipari vegyi anyagok okozta levegő- és vízszennyeződés, s a tartósítószeret tartalmazó élelmiszerek idézték elő (Ekblom és mtsai., 1991; Loftus és mtsai., 2004).

A CD kialakulásában a genetikai tényezőknek is fontos szerepe van. Egy korábbi tanulmányban a 16. kromoszómán azonosították az IBD-1 lókuszt (Hugot és mtsai., 1996).

Később ebben a régióban három munkacsoport egymástól függetlenül kimutatta a bakteriális citoszol receptort kódoló NOD2 gént (Hugot és mtsai., 2001; Ogura és mtsai., 2001), melynek mutációja CD kialakulásához vezethet. A NOD2 gén leucin gazdag régiójának deléciója például antigén jelenléte nélkül is folyamatos, kontrollálatlan gyulladást okoz (Maeda és mtsai. 2005).

A bélcsatornában az immunrendszer különlegesen fejlett és jól szervezett. A változatos baktérium flóra, az enterociták, valamint a kötőszövetben található immunsejtek összessége alakítja ki a szervezet legnagyobb védekező rendszerét, a GALT-t. A IBD-ekben a GALT egyensúlyának felborulása a mikroflóra összetételének megváltozását, s a nyálkahártya integritásának sérülését okozhatja (Bene és mtsai., 2011). Az adaptív immunrendszer aktiválását követően különböző fenotípusú T-limfocita klónok keletkeznek (Th1, Th2 vagy regulátor T-sejtek), melyek meghatározzák az immunválasz jellegét. A CD-re inkább Th1 dominancia, vagyis a sejt-közvetített immunválasz serkentése jellemző (Inohara és mtsai., 2003). Az antigén prezentációt a makrofágok és a dendritikus sejtek végzik, miközben interleukin-12, interleukin-23, tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) és interferon- γ (IFN- γ) citokinek termelődnek. A CD-ben a szabályozatlan Th1 típusú immunválaszt legtöbbször hosszú nyugalmi fázis követi, és a bélfalban nem alakul ki szöveti károsodás. A CD gyakori, súlyos szövődményeként azonban bélszűkületek, striktúrák alakulnak ki, s ezek bélelzáródáshoz vagy akár halálhoz is vezethetnek (Marlow és Blennerhassett, 2006). A striktúrák, fistulák (sipolyok), perforációk (bélfal átlyukadása) megjelenése sokkal inkább függ a gyulladásos folyamatok intenzitásától, mint a betegség fennállásának időtartamától (Louis, 2012).



3. ábra A bélfal keresztmetszetének sematikus ábrázolása, szövettani szerkezete és endoszkópos képe egészséges (K), illetve Crohn-betegségben (CD) és fekélyes vastagbélgyulladásban (UC) szenvedő betegeknél. <http://www.hopkins-gi.org>

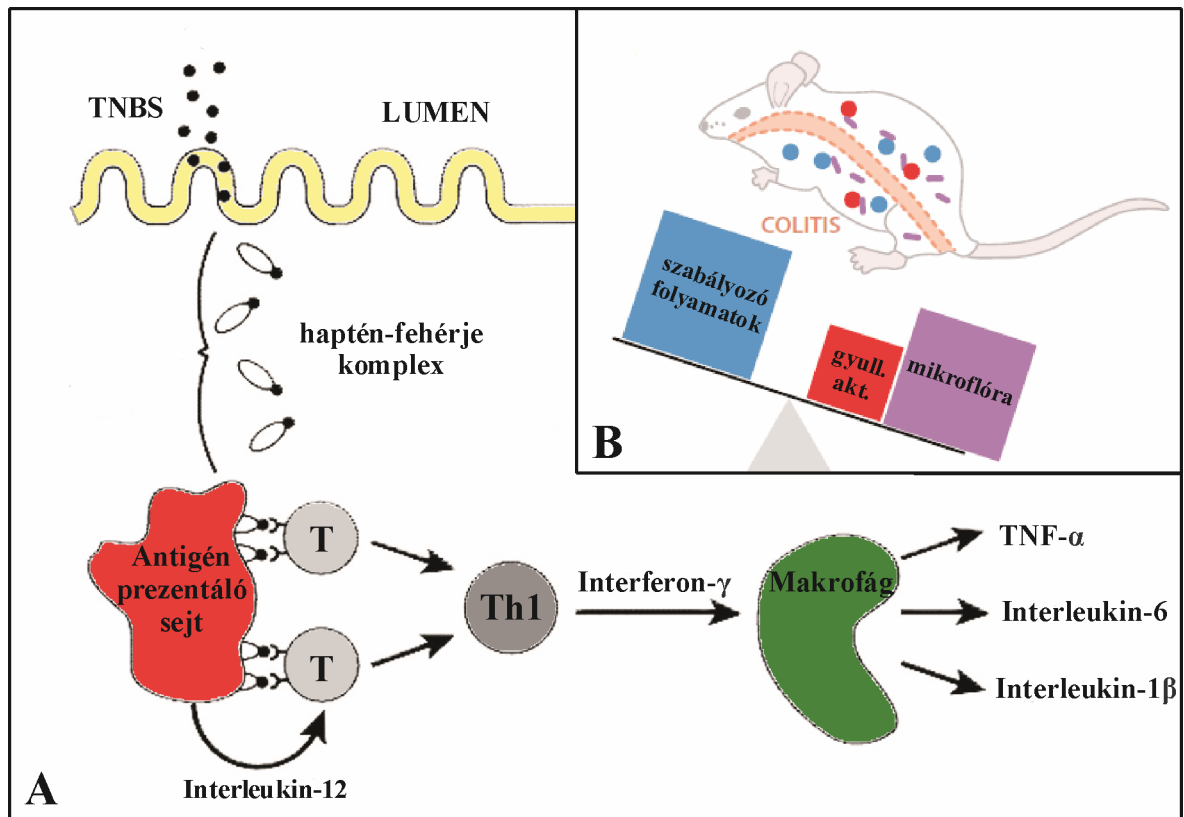
I. 4. A Crohn-betegség kísérletes modellezése

A IBD-ek patogenezisével kapcsolatos ismereteink jelentős része állatkísérletes eredményekből származik. Az elmúlt két évtizedben több mint húszféle állatmodellt hoztak létre a IBD-ek tanulmányozására. Ezek öt nagyobb csoportba sorolhatók: (1) génkiütéses (knock out) modellek; (2) transzgenikus egér- és patkánymodellek; (3) spontán colitisek; (4) indukált colitisek; (5) adoptív transzfermodellek (Jurjus és mtsai., 2004).

A kémiai indukció széles körben elterjedt módszer, mely során az egészséges állatokat olyan anyaggal kezelik, mely károsítja a nyálkahártya integritását (Hibi és mtsai., 2002). A leggyakrabban alkalmazott kémiai anyag a 2, 4, 6-trinitrobenzénszulfonsav (TNBS), amelyet általában etanolos oldatban juttatnak a disztális vastagbélbe (Morris és mtsai., 1989; Wallace és mtsai., 1995; te Velde és mtsai., 2006). A TNBS egy kisméretű haptén molekula, melyet a szervezet csak egy nagyobb vivőfehérjéhez (carrier) kapcsolódva érzékel antigénként. A TNBS a nyálkahártya különböző fehérjéire trinitrofenil csoportokat kapcsol, melyek így speciális helper T-limfocitákat (Th1) aktiválnak, ezzel elindítva a késői típusú túlérzékenységi reakciót (delayed-type hypersensitivity; DTH) (Cavani és mtsai., 1995). A folyamat első fázisa a szenzitizálódás, vagyis a Th1-sejtek elszaporodása, mely az antigénnel való első érintkezést követő 1-2 héten belül lezajlik. Az antigén újbóli megjelenése vagy tartós jelenléte beindítja az effektor fázist, mikor az aktivált Th1 sejtek által termelt citokinek monociták infiltrációját és makrofágokká differenciálódását idézik elő. A makrofágok a gyulladás helyén maradva lizoszomális enzimeik révén súlyos szöveti károsodást okozhatnak (Strober, 1998) (4. ábra).

Korábbi tanulmányokban a TNBS egyszeri, nagy dózisú alkalmazása akut, nekrotizáló enterocolitist váltott ki, mely három napon belül az állatok pusztulását okozta (Abad és mtsai., 2005; Busserolles és mtsai., 2005). A TNBS-val indukált colitis modelleket így sokáig csak a bélgyulladás akut fázisának tanulmányozására használták. Az utóbbi években felismerték, hogy a CD-re jellemző fellángoló gyulladásos folyamatok modellezése ismételt, kisebb dózisú TNBS kezelésekkel lehetséges, ugyanis a lokális DTH reakciók ismétlődésével a CD-re jellemző citokinek termelődnek (te Verde és mtsai., 2006). Az ismételt TNBS kezelések hatásairól a mai napig kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre. Ezekben a kísérletekben az állatok hetente, növekvő dózisban kapták a TNBS-at. Ez a vastagbél falának megvastagodását, fibrotikus szövettani elváltozásokat és a

kollagén rostok felhalmozódását eredményezte (Fichtner-Feigl és mtsai., 2005; Zhu és mtsai., 2012).



4. ábra 2, 4, 6-trinitrobenzén-szulfonsavval (TNBS) indukált vastagbélgyulladás során lezajló immunfolyamatok. **(A)** A TNBS a nyálkahártya különböző fehérjéire trinitro-fenil csoportokat kapcsol, melyeket az antigén prezentáló sejtek (makrofágok, dendritikus sejtek) mutatnak be a T-limfocitáknak. Az interleukin-12 citokin mennyiségének növekedése a lamina propriában differenciálatlan, Th1 típusú immunválaszt generál. A Th1 sejtek által termelt interferon- γ további makrofágokat aktivál, mely újabb gyulladások keltő faktorok felszabadulásához vezet (TNF- α , interleukin-6, interleukin-1 β). **(B)** Az epiteliális gát sérülését követően beinduló gyulladásos kaszkád mechanizmusok kiesnek az immunrendszer ellenőrzése alól (Strober és mtsai., 1998; Izcue és mtsai., 2009 nyomán).

I. 5. Myenterikus neuropátia a gyulladásos bélbetegségekben

Mivel a bélidegrendszer myenterikus neuronjai felelősek a bél motilitásának szabályozásáért, a CD-ben szenvedő betegek gasztrointesztinális (GI) panaszainak jelentős részét a myenterikus neuronok sérülése okozhatja (Collins és mstai., 1996; Lomax és mtsai., 2006; Mawe és mstai., 2009). Bár a szakirodalomban sok klinikai (Dvorak és mtsai., 1985; Geboes és Collins, 1998) és állatkísérletes (Sanovic és mtsai., 1999; Poli és mtsai., 2001; Linden és mtsai., 2005) adat van a IBD-ek során kialakuló myenterikus neuropátiáról, a CD-re jellemző fellángoló gyulladásos folyamatok következtében kialakuló enterális neuropátiáról szinte semmit sem tudunk.

A bélidegrendszer strukturális elváltozásai, úgymint az enterikus neuronok pusztulása vagy az axonok súlyos és kiterjedt nekrozisa megkülönbözteti a CD-et a IBD-ek más típusaitól (Dvorak és mtsai., 1985). Az enterikus neuronok denzitásának csökkenését patkányokban több korábbi tanulmányban is leírták. Dinitrobenzén-szulfonsavval kezelt patkányokban az enterikus neuronok száma a vastagbél fekélyes szakaszain a gyulladás kiváltását követő 4. napig közel 50%-kal csökkent (Sanovic és mtsai., 1999). A nyálkahártya regenerációját és a gyulladásos folyamatok lecsengését követően, a 35. napon is hasonló denzitás értékeket mértek, mely a myenterikus neuronok irreverzibilis károsodására utal. Egy későbbi tanulmányban kimutatták, hogy TNBS-val indukált colitises patkányok myenterikus plexusában a nyálkahártyában termelődő szöveti transzglutaminázok hatására apoptotikus folyamatok indultak el. Ennek hatására a gyulladás kiváltását követő 7. napra a neuronok száma 20%-kal csökkent a vastagbél fekélyes és attól proximálisan elhelyezkedő területein is (Sarnelli és mtsai., 2009). Marlow és Blennerhassett (2006) a bélszűkületek területén a myenterikus neuronok teljes hiányát figyelték meg. Ezek az eredmények egyértelműen mutatják azt, hogy a IBD-ekben a nyálkahártyából kiinduló gyulladásos folyamatok kulcsszerepet játszanak a myenterikus neuropátia kialakulásában.

Kísérletesen indukált vastagbélgyulladás során azonban a myenterikus neuronok denzitásának csökkenése nem járt együtt a ganglionok számának csökkenésével, és a bélfal körkörös, valamint hosszanti izomrétegébe projektáló axonok mennyisége sem változott (Sanovic és mtsai., 1999). CD-ben szenvedő betegekből származó mintákban pedig az enterikus ganglionok és idegkötegek száma növekedett (Dvorak és mtsai., 1985; Steinhoff és Kodner, 1988; Geboes és Collins, 1998; Villanacci és mstai., 2008), mely arra utal, hogy a szervezet az innerváció sérülését gyors axonproliferációval próbálja kivédeni.

A bélidegrendszer funkcionális változásai azonban a bélgyulladás lecsengését követően is fennállnak. TNBS-val indukált colitises patkányokban az AH neuronok még a gyulladás kiváltását követő 8. héten is túlérzékenyek voltak, és az S neuronokban a gyors EPSP-ok amplitúdója szignifikánsan magasabb volt a kontroll állatokban mért értékekhez viszonyítva (Lomax és mstai., 2006). Emellett a szinaptikus jelátvitel sérülése nem korlátozódott a gyulladás területére. A noradrenalin neurotranszmisszió gátlását például megfigyelték a disztális és transzverzális colonban, valamint a terminális ileumban is (Jacobson és mtsai., 1995).

I. 6. A bélfal szövettani elváltozásai gyulladásos bélbetegségekben

I. 6. 1. Az epiteliális gát szerepe a bél permeabilitásának szabályozásában

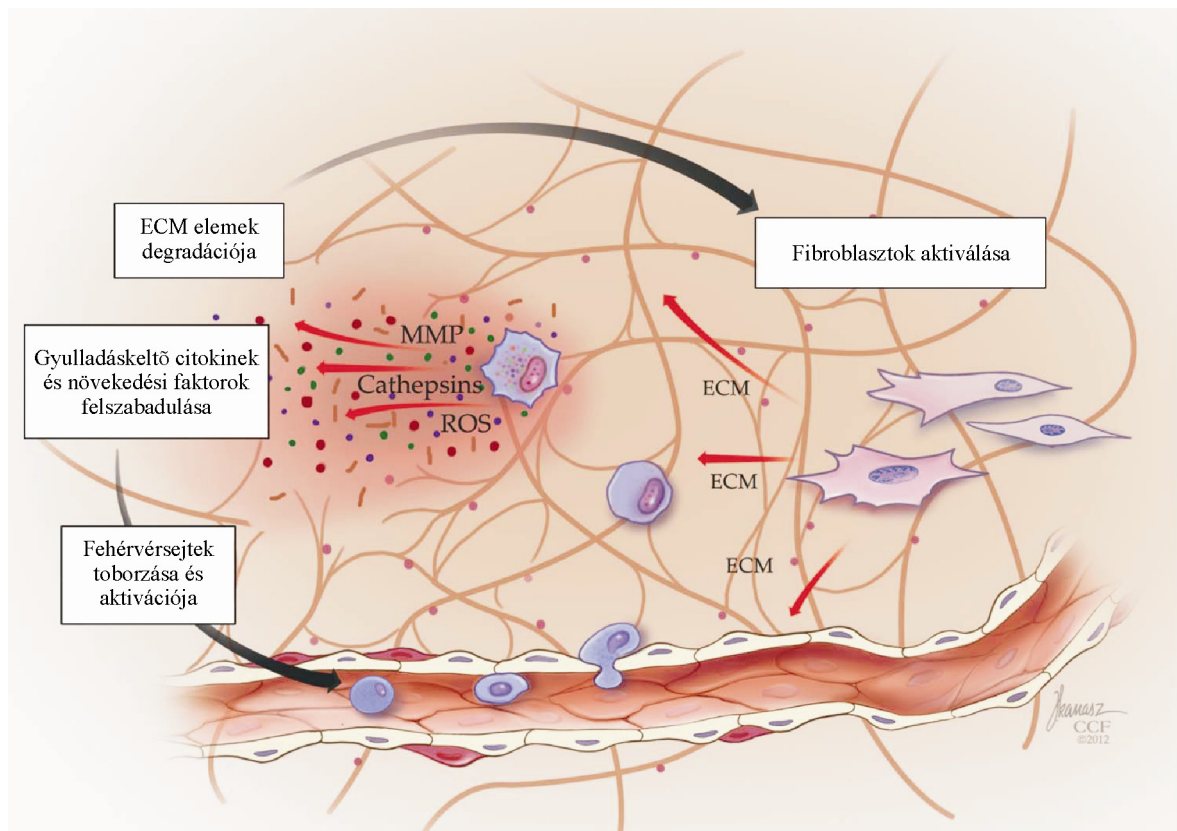
Fiziológiás körülmények között az enterociták elsődleges feladata az epiteliális gát fenntartása, s egyben az optimális permeabilitás biztosítása. Az epiteliális gát megakadályozza a káros anyagok, patogének és a lumenális antigének bejutását a szervezetbe. Bár a makromolekulák transzportja elsősorban az enterocitákon keresztül, transzcitózissal történik, az ionok és egyéb tápanyagok méret- és ionszelektív paracelluláris transzportjának szabályozásában a TJk-nak meghatározó szerepe van. A TJk révén az epitélium egy szelektív szemi-permeabilis gátat képez, amelynek kulcsszerepe van a nyálkahártya homeosztázisának fenntartásában (Shen és mtsai., 2008). Irodalmi adatokból ismert, hogy CD-ben a bélnyálkahártya integritása súlyosan károsodik, ami a paracelluláris permeabilitás fokozódásához vezet (Hollander 1993; Yacyshyn és Meddings, 1995; Peeters és mtsai., 1997). Irodalmi adatok bizonyítják azt is, hogy CD-ben a LMM motoros aktivitása is megváltozik, amely a felszívás és nyálkahártya szekréció megváltozását okozhatja (Kirsner, 2000; Van Montfrans és mtsai., 2002; Lembo and Camilleri, 2003; Mertz, 2003).

I. 6. 2. A fibrózis szerepe a bélszűkületek kialakulásában

A Crohn-betegek közel 75%-ánál a gyulladáson átesett sérült szövetek kóros sebgyógyulási folyamata, a fibrózis következtében bélszűkületek alakulhatnak ki (Greenway és mtsai., 1999; Freeman, 2003; Van Assche és mtsai., 2004). A striktúrák csak sebészeti úton kezelhetők, és a páciensek 45%-ánál a beavatkozást követően is visszatérnek (Whelan és mtsai., 1985). Fibroplázia vagy fibrotikus sebgyógyulás során a sérült terület kiesik a normál szöveti kontroll alól (Wynn, 2007), az extracelluláris mátrix (ECM) elemek lerakódása miatt a bélfal minden rétege megvastagszik (Becker, 1999; Graham, 1995; Rieder és mtsai., 2013), s az adott bélszakasz elveszti eredeti funkcióját (Wynn, 2008). A nyálkahártya regeneráció és a fibrotikus sebgyógyulás vizsgálatára alkalmasak a kémiai indukción alapuló, TNBS-val, dextrán-szulfát nátriummal vagy peptidoglikán poliszacharidokkal előidézett colitises állatmodellek. Ezek az anyagok azonban csak ismételt dózisban alkalmasak a CD-re jellemző szövettani elváltozások vizsgálatára (Elson és mtsai., 1998; Lawrance és mtsai., 2000).

A szakirodalomban sok ellentmondásos adat van arról, hogy mi történik a bélfal izomrétegeiben fibrózis során. Egy korábbi tanulmányban Crohn-betegek bélcsatornájának külső izomrétegeiből származó szövetmintákban főleg vimentin-pozitív sejteket találtak (Suekane és mtsai., 2010). Mivel a vimentin elsősorban a fibroblasztok és myofibroblasztok jellegzetes intermedier filamentuma, ez arra utal, hogy a bélfal megvastagodását a myofibroblasztok vándorlása és felhalmozódása okozza (Powel és mtsai., 1999; Pucilowska és mtsai., 2000a; Rogler, 2011). A myofibroblasztok főleg makrofágok és granulociták által termelt különböző enzimek és gyulladásos mediátorok hatására a csontvelő eredetű mezenchimális sejtekből, vagy a sérült területen lévő epitel- és endotélsejtekből keletkeznek (Quan és mtsai., 2006; Rieder, 2007) (5. ábra). Az aktivált myofibroblasztok a seb felületének összehúzásában játszanak fontos szerepet. Pucilowska és mtsai. (2000b) két elméletet dolgoztak ki. Az egyik szerint a súlyos, akut gyulladás következtében a mezenchima sejtekből alakulnak ki a fibrogén fenotípusú sejtek (fibroblasztok, myofibroblasztok), majd ezek szaporodnak el. A másik elmélet szerint a mezenchima sejtek proliferációjukat követően a kóros szabályozás miatt alakulnak át myofibroblasztokká. A folyamatban kulcsszerepet játszanak különböző növekedési faktorok, úgymint a transzformáló növekedési faktor beta (transforming growth factor-beta, TGF-beta), a vérlemezke-eredetű növekedési faktor vagy az inzulin-szerű növekedési faktor, melyek elősegítik a sejtek átalakulását, proliferációját és serkentik az I-es típusú

kollagén szintézisét (McKaig és mtsai., 2002; Simmons és mtsai., 2002; Otte és mtsai., 2003; Vallance és mtsai., 2005).



5. ábra A szöveti térbe vándorló aktivált fehérvérsejtek és a mezenchima sejtek által szabályozott összehangolt folyamatok a bél falban fibrózis során. ECM: extracelluláris mátrix; ROS: reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species); MMP: mátrix metalloproteinázok (Rieder és mtsai., 2013 nyomán)

Más tanulmányok eredményei arra utalnak, hogy inkább differenciálódott simaizomsejtek okozzák a bélszűkületek kialakulását (Graham és mtsai., 1987, Graham és mtsai., 1988; Graham, 1995). A striktúrák területén ugyanis mind a LMM, mind a bél fal külső izomrétegeinek területén speciális, vimentin-pozitív, kollagént termelő simaizomsejteket találtak. A vimentin a sejtek migrációját segíti elő (Connel és mtsai., 1983; Van Muijen és mtsai., 1987), így a módosult simaizomsejtek a submucosába vándorolnak, s a bél fal tónusos összehúzódását idézik elő (Suekane és mtsai., 2010). A CD-re jellemző fellángoló gyulladásos folyamatok során a simaizomsejtek kontraktilitása is megváltozik (Shi és mtsai., 2003; Wells és Blennerhassett, 2004; Alkahtani és mtsai., 2013).

A simaizomsejtek strukturális és funkcionális elváltozásain kívül a fibrotikus folyamatokban fontos szerepet játszanak az ECM elemek termelésének, átrendeződésének és lebontásának szabályozásáért felelős molekulák. Az elasztázok a makrofágokból és neutrofil granulocitákból aktív formában szabadulnak fel (Vaday és Lider, 2000), míg a mátrix metalloproteinázok (matrix metalloproteinase, MMP) inaktív zimogének formájában termelődnek és enzimatis hasítással aktiválódnak. A MMP-ok aktivitását saját szöveti gátlók szabályozzák (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP). A MMP-ok és a TIMP-k egyensúlyának zavara az ECM elemek felhalmozódását okozhatja (Di Sabatino és mtsai., 2009). A zselatinázok közé tartozó MMP9 felelős a IV-es típusú kollagén lebontásáért (Birkedal-Hansen és mtsai., 1993). Mivel azonban a MMP-ok inaktív előalakjai a fibrotikus szövetekben gyakran kollagén rostokhoz kapcsolódnak, és nem aktiválódnak, a CD-re jellemző bélszűkületek kialakulása nem magyarázható az ECM elemek lebontásáért felelős MMP-ok szintjének csökkenésével. A MMP-ok túltermelődését mRNS és fehérje szinten is igazolták, melyet nem követett a TIMP-k expressziójának növekedése (Nagase és Woessner, 1999; von Lampe és mtsai., 2000; Heuschkel és mtsai., 2000; Kirkegaard és mtsai., 2004). A MMP9 fokozott expresszióját TNBS-val indukált colitises patkányokban és Crohn-betegekből származó szövetmintákban mind a fekélyes, mind a szövettanilag épnek tűnő bélszakaszokon kimutatták (Baugh és mtsai., 1999; Medina és mtsai., 2006).

I. 7. Különböző gyulladásos jelmolekulák szerepe a Crohn-betegség kialakulásában

A IBD-ekben az oxidatív stressz nagymértékben hozzájárul a szöveti károsodáshoz (Pavlick és mtsai., 2002; Pravda és mtsai., 2005; Karp és Koch, 2006). Oxidatív stressz során a képződő reaktív nitrogén és oxigén szabadgyökök (reactive oxygen species, ROS), és a semlegesítésüket végző antioxidánsok egyensúlya felborul, így az egyes szövetek és szervek biomolekulái sérülnek. CD-ben a nyálkahártya sérült területein felszabaduló szabadgyökök legfontosabb forrásai a makrofágok (Baldassano és mtsai., 1993), melyek a kóros folyamatok során képződő ROS ellen a plazmamembránjukban található nikotinamid adenin dinukleotid foszfát oxidáz enzimmel védekeznek (Chanok és mtsai., 1994), miközben az extracelluláris térbe szuperoxid gyököket szabadítanak fel. Ezért a makrofágokban az enzim aktivációja fokozza a gyulladás következtében kialakuló oxidatív stresszt (Hausmann és mtsai., 2001). A ROS mennyisége így már a gyulladásos folyamatok kezdetén ugrásszerűen megnövekszik, s így meghatározza a betegség

lefolyását (Tanida és mtsai., 2011). Ugyanakkor a hemoxigenáz-1 (HO-1) enzim korai aktivációját mind Crohn-beteg páciensekben, mind kísérletes colitises állatmodellekben kimutatták (Wang és mtsai., 2001; Paul és mtsai., 2005; Abraham és Kappas, 2008), sőt, az enterikus neuronok közelében elhelyezkedő makrofágokban is fokozott expressziót detektáltak (Lakhan és Kirchgessner, 2010). Ezek az eredmények egyértelműen mutatják azt, hogy a szervezet antioxidáns védelmi rendszere azonnal aktiválódik, s a HO rendszer kulcsszerepet játszik a szöveti károsodás (Guo és mtsai., 2001; Vijayan és mtsai., 2010) és a myenterikus neuropátia kivédésében is. A szakirodalom azonban nem szolgál adatokkal arra nézve, hogy a HO aktivitás hogyan változik a fellángoló gyulladásos periódusok során.

Irodalmi adatok szerint a TGF-beta növekedési faktor család tagjai kulcsszerepet játszanak a bélszűkületek kialakulását kísérő fibrotikus folyamatokban. A TGF-beta 1 és 2 elősegíti az ECM elemek felhalmozódását, s így a hegesedést a sérült szövetekben (Shah és mtsai., 1994). A TGF-beta 3 ellentétes hatású, az epitélium regenerációját segíti, de eközben nem indít el fibrotikus folyamatokat (Shah és mtsai., 1995). UC-ban és CD-ben szenvedő betegek szöveti mintáiból nyert myofibroblasztok vizsgálata során kimutatták, hogy a TGF-beta fehérjék kifejeződése a IBD-ek különböző típusaiban eltérő mintázatot mutat. UC-ban elsősorban a 3-as izoforma génje aktiválódott, míg Crohn-betegekben a TGF-beta 3 fehérje egyáltalán nem fejeződött ki, míg a 2-es izoforma expressziója fokozódott. Ez arra utal, hogy a TGF-beta 2 fehérjék hozzájárulhatnak a CD-re jellemző bélszűkületek kialakulásához (McKaig és mtsai., 2002).

II. CÉLKITŰZÉSEK

Az elmúlt évtizedekben kidolgozott állatmodelleknek (Jurjus és mtsai., 2004) köszönhetően a CD-et kísérő akut bélgyulladás patomechanizmusa ma már jól ismert. Ugyanakkor a CD-re jellemző gyulladásos és tünetmentes periódusok patológiás folyamatairól, illetve azoknak a betegek életét veszélyeztető krónikus következményeiről alig tudunk valamit. Ezért doktori munkám elsődleges célja egy olyan krónikus bélgyulladásos patkánymodell előállítása volt, amely alkalmas a CD legsúlyosabb krónikus szövődményeként megjelenő bélszűkületek (striktúrák) kiváltó okainak vizsgálatára. Az állatmodell előállításakor a fellángoló bélgyulladásokat ismételt TNBS kezelésekkel modelleztük. A kezeléseket követő első és nyolcadik nap között a bélgyulladás akut, míg a hatvanadik és százhuszadik nap között annak krónikus következményeit vizsgáltuk fény- és elektronmikroszkópos morfológiai, immunhisztokémiai, morfometriai és molekuláris biológiai módszerekkel.

II. 1. Az állatmodell tervezésekor az alapvető kérdésünk az volt, hogy milyen feltételeknek kell megfelelnie egy olyan patkánymodellnek, amely alkalmas a krónikus bélgyulladás, s speciálisan a CD krónikus szövődményeként megjelenő striktúrák vizsgálatára? A következő paramétereket határoztuk meg:

- A kezeléseket követően rövid időn belül, jól reprodukálhatóan jelentkezzenek a bélgyulladásra jellemző GI tünetek
- A kezeléseket követően jól reprodukálhatóan mérhetőek legyenek az akut nyálkahártya gyulladás makroszkópos paraméterei
- A kezelt állatok testtömege a krónikus periódusban ne térjen el lényegesen a kontroll csoport állatainak a testtömegétől
- A krónikus periódusban jól láthatóan jelenjenek meg a bélszűkületek
- A kísérleti periódus alatt a mortalitás a lehető legkisebb legyen

II. 2. A második kérdésünk az volt, hogy a gyulladás akut fázisában hogyan változnak a myenterikus neuronok kvantitatív paraméterei?

- Különös figyelmet fordítottunk arra, hogy ha van változás, akkor az csak a gyulladt nyálkahártya alatti területre koncentrálódik, vagy kiterjed-e a

gyulladt területhez proximálisan vagy disztálisan kapcsolódó colon szakaszokra is?

- Vizsgáltuk továbbá azt is, hogy a TNBS kezelések száma befolyásolja-e a neuronok számának, vagy a neuronok méretének változását?

II. 3. Ezt követően megvizsgáltuk azt, hogy a gyulladás krónikus fázisában milyen változások történnek a myenterikus neuronok kvantitatív paramétereiben?

- E kérdés megválaszolásakor is vizsgáltuk a neuronális változások proximális és disztális irányú terjedését, illetve az ismételt TNBS kezelések hatásait is.

II. 4. A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy van-e a bélfalnak olyan strukturális eleme, amelynek kitüntetett szerepe lehet a striktúrák kialakulásában?

- Vizsgáltuk a bélnyálkahártyát a kontroll állatok egészséges és a colitises patkányok beszűkült bélszakaszaiban, mely során különös figyelmet fordítottunk a bélhámsejtek közötti TJk állapotára.
- Mértük a bélfal izomrétegeinek vastagságát, a simaizomsejtek közötti távolságot, melyből következtettünk az ECM kiterjedésére, valamint figyelemmel kísértük a myenterikus ganglionok (MG) és a ICC-ek strukturális változásait.
- Molekuláris biológiai módszerek segítségével meghatároztuk az ECM szabályozásában fontos szerepet játszó MMP9 és TIMP1 mRNS expresszióját a bélgyulladás krónikus fázisában.

II. 5. Végül arra voltunk kíváncsiak, hogy a gyulladásos folyamat egyes stádiumaiban hogyan változnak bizonyos, a CD-re jellemző gyulladásos jelmolekulák expressziós mintázatai?

- A gyulladás akut és krónikus fázisában mértük a TGF-beta 2-es és 3-as izoformáját valamint a HO-1-et kódoló mRNS-ek expresszióját a különböző kísérleti állatcsoportokban.

III. ANYAGOK ÉS VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

III. 1. Crohn-beteg patkánymodell előállítás

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

A kísérlet során 200-220 g tömegű fiatal felnőtt, hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk. A vastagbélgyulladást TNBS-val (Sigma, USA) indukáltuk, melyet 25%-os etanolban oldva, 10 mg/250 µl dózisban alkalmaztunk. A gyulladásos periódusok CD-re jellemző fellángolását a TNBS kezelések ismétlésével, két hetes időeltolódással idéztük elő. A kísérleti állatokat random módon kontroll (n=34), egyszer (n=42), kétszer (n=40) és háromszor (n=50) kezelt csoportokra osztottuk. A bélgyulladást lokálisan a colonban, mély dietil-éteres altatás alatt, rugalmas polietilén kanül segítségével váltottuk ki, melyet egységesen a végbélnyílástól 8 cm távolságra helyeztünk fel. A TNBS-oldat beinjektálása után a kanült minden esetben egy perc elteltével távolítottuk el a vastagbélből, majd figyelemmel kísértük a patkányok ébredését. A kontroll csoport állatai a TNBS kezelésekkel egy időben azonos térfogatú fiziológiás sóoldatot kaptak. Az állatokat a kezelések kezdete előtt 12 órával éhezettük. Ezt követően az állatok a vizet és a tápot a kísérlet teljes ideje alatt korlátlan mennyiségben fogyaszthatták, tömegüket és állapotukat hetente mértük és ellenőriztük.

III. 2. A vastagbél előkészítése makroszkópos, szövettani és molekuláris vizsgálatokhoz

A kezeléseket követően a különböző kísérleti csoportokba tartozó colitises (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) és kontroll állatokat cervikális diszlokációval áldoztuk fel a bélgyulladás akut (2., 4. és 8. nap) és krónikus (60., 90. és 120. nap) fázisának meghatározott időpontjaiban. A patkányok hasüregét U alakban feltártuk, a vastagbelet kiboncoltuk, majd foszfát pufferrel (PB; phosphate buffer; 0,05 M; pH 7,4) átmostuk. A következőkben minden vizsgált időpontban és kísérleti csoportban a vastagbél végbélnyílástól számított utolsó 8 cm-es szakaszát használtuk fel.

III. 2. 1. Bélminták előkészítése makroszkópos vizsgálatokhoz

A makroszkópos vizsgálatokhoz a vastagbélről közvetlenül a kiboncolás után, majd a PB-rel átmosott és feltöltött állapotban is készítettünk digitális felvételeket (SONY, 16,1 megapixel). Ezt követően a vizsgált bélszakaszt a mezentérium mentén felvágtuk, nyálkahártyával felfelé kiterítettük, s így is lefényképeztük. A nyálkahártyában kialakult fekélyek kiterjedését az Image J 1.44 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) morfometriai program segítségével határoztuk meg. A fekélyes területek (cm^2) és a vizsgált colon szakaszok teljes területének (cm^2) arányát oszlopdiagramon ábrázoltuk.

III. 2. 2. Bélminták előkészítése fénymikroszkópos vizsgálatokhoz

A fénymikroszkópos vizsgálatokhoz a bélgyulladás akut fázisában (4. és 8. nap) a colon fekélyes részéről, illetve az ahhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó területekről vettünk mintákat. Bár a krónikus fázisban a bélnyálkahártyában fekélyeket már nem láttunk, a sebgyógyulást kísérő hegesedés miatt a korábbi fekélyes területet el tudtuk különíteni a vastagbél makroszkóposan épnek tűnő szakaszaitól. Ezért ezekben az időpontokban is tudtunk mintákat venni a colon korábban fekélyes, valamint az attól proximálisan és disztálisan elhelyezkedő területeiről. Mivel azonban a 60. és 90. nap között makroszkópos vizsgálataink során lényeges strukturális változást nem láttunk, a továbbiakban csak a 90. és 120. napon vett mintákat használtuk fel. A kontroll állatok esetén a vastagbél utolsó 8 cm-es szakaszának középső részét vizsgáltuk. Az egyes bélszakaszokat 4%-os paraformaldehid-oldatban (0,1 M PB-vel készült) 4°C-on kifeszítve fixáltuk egy éjszakán keresztül. A fixálást követően a mintákat PB-ben (0,05 M) mostuk, majd a colon szegmenteiből bélnyúzat (whole-mount) preparátumokat készítettünk. Sztereomikroszkóp alatt eltávolítottuk a nyálkahártyát és az alatta levő submucosa réteget. Ezután csipesz segítségével lehúztuk a körkörös simaizomréteget, így szabaddá vált a hosszanti simaizomréteg és a felszínén elhelyezkedő MP.

III. 2. 3. Bélminták előkészítése transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz

A transzmissziós elektronmikroszkópiához 2-3 mm széles béldarabokat használtunk fel, melyeket 2%-os paraformaldehid és 2%-os glutáraldehid elegyében (0,05 M PB-rel készült az oldat) 4 °C-on egy éjszakán át fixáltuk, majd PB-ben alaposan átmostuk. A colon különböző területeiről származó mintákat fixálás és mosás után 1%-os ozmium-tetroxid (OsO_4) oldatban (0,1 M PB-rel készült az oldat) egy óráig utófixáltuk. A mintákat PB-ben mostuk (0,1 M; pH 7,4), majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük. Az 50, majd 70%-os alkohol oldattal való víztelenítés után a mintákat 5 percre uranil-acetáttal telített 70%-os etanolba tettük, majd a 96%-os etanolban, abszolút alkoholban és acetonban folytattuk a víztelenítést. Ezt követően a mintákat aceton intermédiumon át Epon gyantába ágyasztuk, majd a gyantát 60 °C-on polimerizáltattuk.

Minden vizsgált területről és kísérleti csoportból két mintát ágyasztunk be, majd a blokkokból először félvékony metszeteket (0,7 μm vastag) készítettünk. Toluidin-kék festést követően ezeken a félvékony metszeten választottuk ki azokat a területeket, melyekből az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz ultravékony metszeteket készítettünk.

Az ultravékony metszeteket (70 nm) Reichert típusú ultramikrotómmal készítettük, majd Formvar-kezelte hártyás nikkel-rostélyokra helyeztük (3 rostély/blokk) és Reynolds-féle módszerrel (1963) kontrasztoltuk. Ehhez a metszeteket 20 percre uranil-acetát (Merck, Germany) oldatcseppre tettük, majd desztillált vízzel mostuk, ezután 3 percre ólom-citrát (Merck, Germany) oldatba helyeztük és ismét mostuk. Az ultravékony metszeteket MEGAVIEW II kamerával felszerelt Philips CM 10 típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

III. 2. 4. Bélminták előkészítése molekuláris biológiai vizsgálatokhoz

A molekuláris vizsgálatokhoz a III. 2. 2. pontban ismertett módon vettünk mintákat a kontroll, illetve colitises állatokból (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) a colon fekélyes, illetve ahhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó területeiről a bélgyulladás akut (4. és 8. nap) és krónikus (90. és 120. nap) fázisában. A bélmintákat RNA Later oldatban (Qiagen, Venlo, Netherlands) tároltuk 4°C-on egy éjszakán keresztül. Ezt követően a mintákat a felhasználásig -80 °C-on tartottuk.

III. 3. Fénymikroszkópos vizsgálatok

III. 3. 1. A myenterikus neuronok kvantitatív és morфомetriai paramétereinek vizsgálata

A myenterikus neuronok denzitását és a neuronok sejtestjének méretét a bélnyúzat preparátumokon HuC/HuD immunhisztokémiai festés után vizsgáltuk. A mintákat az immunjelölés előtt 30 percen keresztül 0,1% BSA-t (borjú szérum albumin), 10% normál kecske szérumot, Triton X 100-at és 0,05 M PB-t tartalmazó normál szérum hígítóban előinkubáltuk. A továbbiakban neuronális Huc/HuD ellen termeltetett elsődleges antitestet, majd biotinilált fajspecifikus másodlagos antitestet, harmadlagos szérumként biotinilált streptavidin tormagyökér peroxidázt használtunk (1. táblázat). Minden inkubációs lépés szobahőmérsékleten történt. A mintákból az elsődleges, másodlagos és harmadlagos szérumot PB-ben mosva eltávolítottuk. A biotinilált streptavidin tormagyökér peroxidáz alkalmazása után az immunreakciót diaminobenzidin (DAB) kromogén (0,1%, 20 perc) és hidrogén-peroxid (H₂O₂) szubsztrát (0,03%, 10 perc) alkalmazásával tettük láthatóvá. A mintákat glicerín:PB 3:1 arányú oldatában tárgylemezre helyeztük és lefedtük.

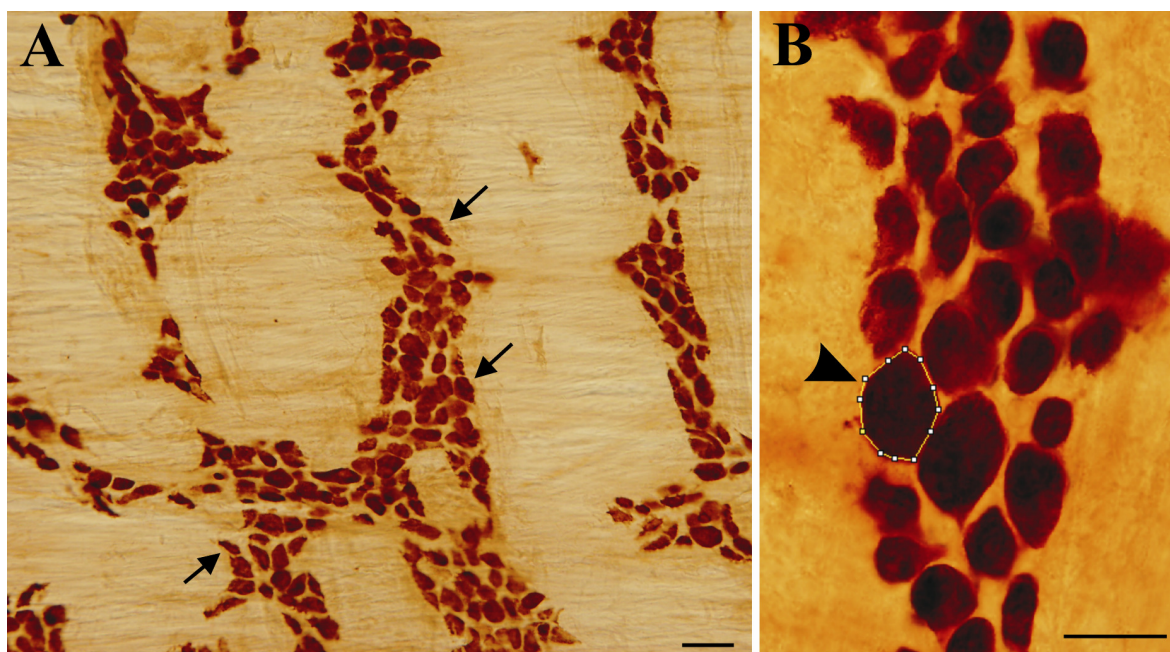
Szérum	Gazda	Hígítás	Inkubáció ideje	Gyártó
anti-HuC/HuD (elsődleges)	egér	1:50	egy éjszaka	Sigma, USA
anti-egér biotinilált IgG (másodlagos)	bárány	1:100	6 óra	Amersham, UK
biotinilált streptavidin tormagyökér peroxidáz (harmadlagos)		1:100	egy éjszaka	GE Healthcare, UK

1. táblázat Immunhisztokémiai festésekhez használt antitestek és fontosabb jellemzőik

Az immunjelölt mintákat Olympus DP70 digitális kamerával felszerelt Olympus BX51 típusú mikroszkóppal vizsgáltuk. Minden kísérleti csoportról, a vastagbél fekélyes szakaszáról, illetve az ahhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó területekről 200x nagyításon 20-20 digitális felvételt készítettünk. A HuC/HuD immunpozitív neuronok sejtmagjának koordinátáit a laboratóriumunkban kifejlesztett Plexus Pattern Analysis

szoftverrel digitalizáltuk (Román és mtsai. 2004). A digitális képeken az egér segítségével bejelöltük a myenterikus neuronok sejtmagját, majd a program megszámolta azokat (6. A ábra). A kapott sejtszám értékeket 1 mm^2 -re vonatkoztatva adtuk meg.

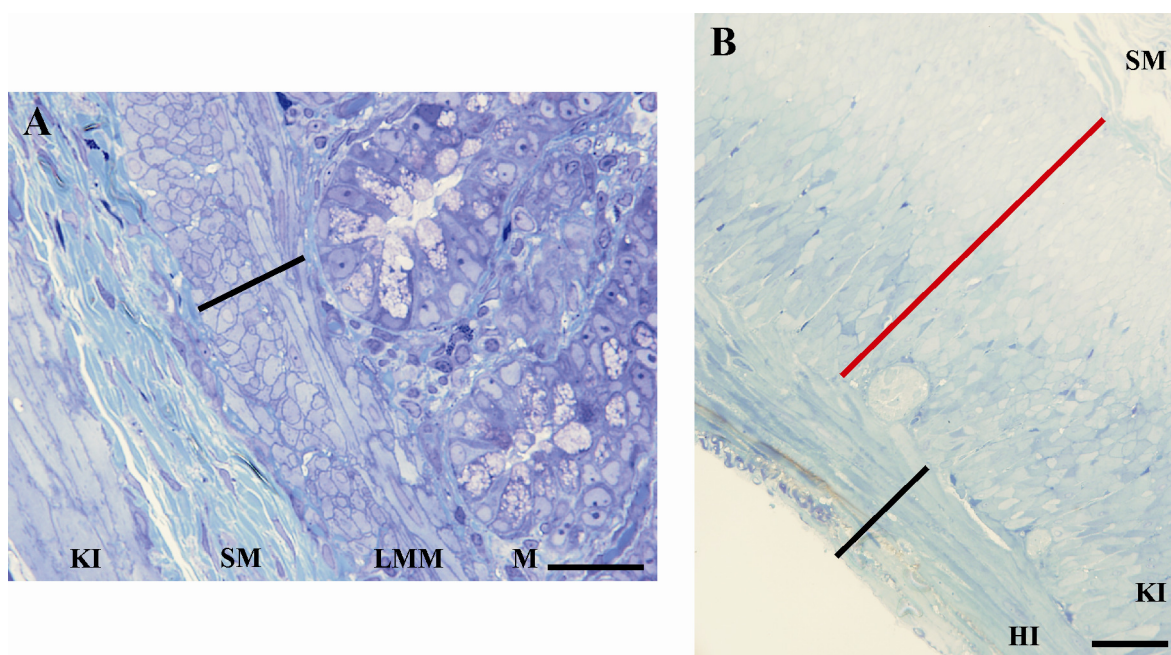
A myenterikus neuronok sejttestjének területét az Image J morfometriai program segítségével határoztuk meg mindhárom vizsgált colon szakaszon. A $600\times$ nagyításon készült felvételeken a sejttestet az egérrel körberajzoltuk (6. B ábra), majd a program segítségével meghatároztuk területüket. A sejtméretet μm^2 -re vonatkoztatva adtuk meg.



6. ábra Patkány colon myenterikus plexusról készült reprezentatív digitális felvételek HuC/HuD immunhisztokémiai festés után. (A) A Plexus Pattern Analysis szoftver segítségével mértük a myenterikus neuronok (nyilak) denzitását, majd a program segítségével meghatároztuk az egy mm^2 -re eső sejtek számát. Lépték: $50 \mu\text{m}$ (B) A szóma (nyílhegy) területének meghatározásához az Image J morfometriai programot használtuk. Lépték: $50 \mu\text{m}$

III. 3. 2. A nyálkahártya saját izomrétegének és a bélfal külső izomrétegeinek fénymikroszkópos morfológiai vizsgálata a bélszűkületek területén

A toluidin-kékkel megfestett félvékony metszeteken (0,7 μ m vastag) mértük a LMM, valamint a bélfal külső hosszanti és belső körkörös simaizomrétegének vastagságát a kontroll és TNBS-kezelt csoportokban egyaránt. A mérésekhez minden kísérleti állatból és mindegyik vizsgált területről adott nagyításokon (200x, 400x, 1000x) 15-15 digitális felvételt készítettünk (Olympus BX51 mikroszkóp; Olympus DP70 kamera). A morfológiai méréseket az Image J képfeldolgozó program segítségével random pontokon, a szövettani rétegekre merőlegesen végeztük (7. ábra).

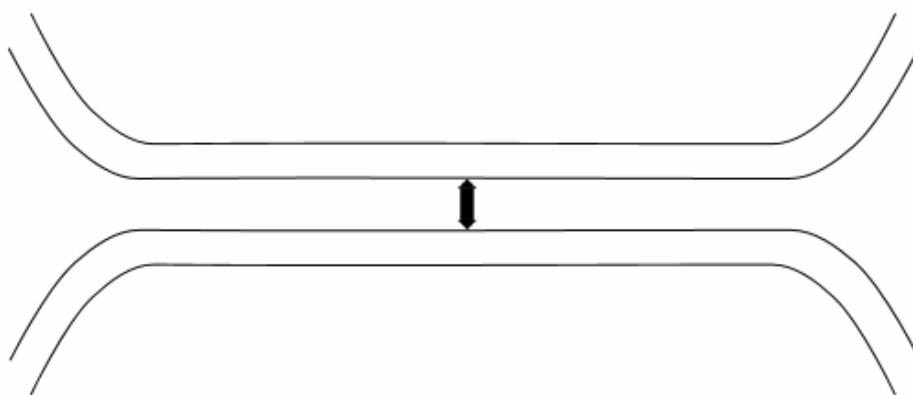


7. ábra Reprezentatív fénymikroszkópos felvételek toluidin-kékkel festett félvékony bélkeresztmetszetekről, melyeken a lamina muscularis mucosae (A) és a bélfal külső hosszanti és belső körkörös izomrétegének (B) vastagságát mértük. HI – hosszanti izomréteg, KI – körkörös izomréteg, LMM - lamina muscularis mucosae, M – mucosa, SM – submucosa. Lépték: 25 μ m (A) és 50 μ m (B)

III. 4. Transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok

III. 4. 1. Szoros sejtkapcsoló struktúrák állapotának vizsgálata

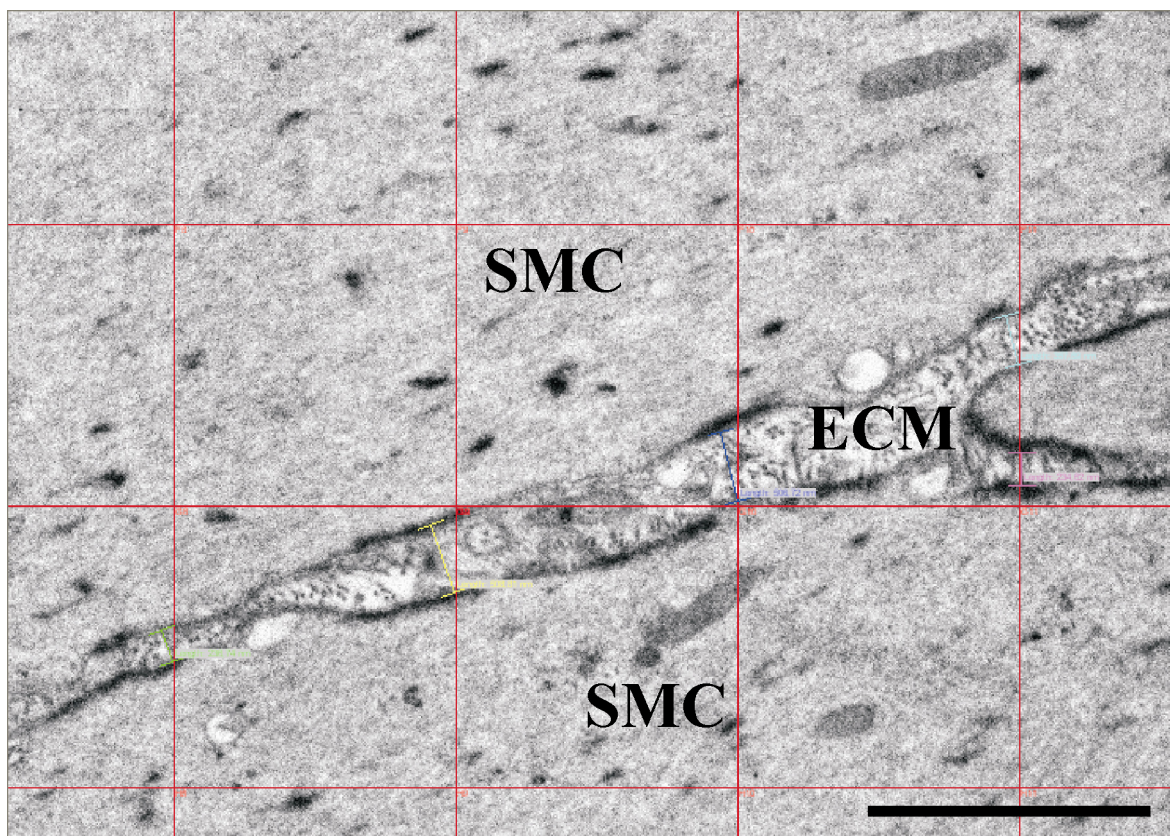
Az epiteliális gát strukturális vizsgálatához mértük az epitelsejtek közötti TJk szélességét, vagyis a lamina epithelialisban a szomszédos enterociták távolságát (8. ábra). Ehhez minden kísérleti csoportból 20-20 digitális képet készítettünk (46000x nagyítás), a méréseket az AnalySIS 3.2 program segítségével random pontokon végeztük. Irodalmi adatoknak megfelelően (Bódi és mtsai., 2012), ha a szomszédos epitelsejtek közti távolság 3 nm-nél kisebb volt, a szoros sejtkapcsolatot zártnak, ha a 3 nm-t meghaladta, a kapcsolatot nyitottnak tekintettük.



8. ábra A lamina epithelialis enterocitái közötti távolság, vagyis a TJk szélességének mérési módszere.

III. 4. 2. Simaizomsejtek távolságának meghatározása

A körkörös izomrétegben felhalmozódó ECM mennyiségét az egymás melletti izomsejtek távolságának meghatározásával becsültük meg. Ehhez 10500x nagyításon minden vizsgált bélszakaszban és kísérleti csoportban 10-10 digitális montázs képet készítettünk, melyeken meghatároztuk a simaizomsejtek távolságát. A méréseket a képekre helyezett adott méretű (2000x2000 nm) rácsozat segítségével random pontokon, a rácsvonalak metszéspontjaiban, az izomsejtekre merőlegesen (AnalySIS 3.2 program, 9. ábra) végeztük.



9. ábra Reprezentatív transzmissziós elektronmikroszkópos montázs felvétel a bélfal simaizomsejtjeiről (smooth muscle cell, SMC) a körkörös izomrétegben. A simaizomsejtek közötti távolságot 2000x2000 nm rácsozat segítségével mértük. ECM - extracelluláris mátrix. Lépték: 2 μ m

III. 4. 3. Kaszpáz-9 posztembedding immunhisztokémia

A bélszűkületek területéről vett szövetmintákból készített ultravékony metszeteken anti-kaspáz-9 elsődleges antitest segítségével posztembedding immunhisztokémiai festéseket végeztünk.

A metszeteket először 1%-os perjódsvanában inkubáltuk (9 perc), majd desztillált vízben mostuk (3x5 perc), ezután pedig 2%-os Na-perjodátba (10 perc) tettük. Újabb desztillált vizes mosást (3x5 perc) követően a metszeteket TBS-cseppekre (TRIS-pufferes sóoldat; pH 7,4) helyeztük (3x2 perc). Ezt követően a mintákat 1%-os borjú szérum albuminban 30 percig inkubáltuk [(BSA); 0,05 g BSA, 5 ml TBS (pH 7,4)]. Ezután ismételt desztillált vizes mosást (2x5perc), majd TBS-kezelést (2x3 perc) követően a metszeteket az elsődleges antitest oldatában inkubáltuk szobahőmérsékleten, nedves kamrában, egy éjszakán át (2. táblázat). Ezután a rostélyokat ismét TBS oldatra (2x10 perc), majd GOLD-GAR pufferre tettük [2x5 perc; 0,05 g BSA, 25 μ l Tween-20, 5 ml TRIS (pH 7,6)]. Ezt követően a mintáinkat az arannyal-konjugált másodlagos antitest

oldatában inkubáltuk (3 óra, szobahőmérséklet; 2. táblázat) (Talapka és mtsai., 2011). A festés végén a rostélyokat desztillált vízben (3x5 perc) alaposan mostuk, majd a III. 2. 3. pontban leírtaknak megfelelően kontrasztoltuk. Az immunreakció specifitását úgy ellenőriztük, hogy a metszeteket elsődleges antitest nélkül, csak az aranykolloidot tartalmazó másodlagos antitesttel inkubáltuk.

A myenterikus neuronok vizsgálatához 5-5 ganglionról (30 kép/csoport; 34000x nagyítás), a bélfal izomrétegének vizsgálatához pedig 10-10 simaizomsejtről (25000x nagyítás, montázs) készítettünk digitális képeket minden kísérleti csoportból, melyeken meghatároztuk a festődés intenzitását, vagyis az egységnyi területre eső kaszpáz-9-et jelölő arany szemcsék számát. A simaizomsejtekben az 1 μm^2 -re eső arany szemcsék számolását 1000x1000 nm méretű rácsháló segítségével az Analysis 3.2 programmal végeztük.

Szérum	Gazda	Hígítás	Inkubáció ideje	Gyártó
anti-kaspáz-9 (elsődleges)	nyúl	1:50	egy éjszaka, szobahőmérséklet	Sigma, USA
anti-nyúl 18 nm arany-konjugált IgG (másodlagos)	kecske	1:20	3 óra, szobahőmérséklet	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA

2. táblázat Posztembedding immunhisztokémiai festés során használt ellenanyagok és fontosabb jellemzőik.

III. 5. Különböző gyulladásos jelmolekulák és enzimek mRNA expressziójának meghatározása kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakcióval

III. 5. 1. RNS izolálás és egyes szálú cDNS szintézis

A kontroll és colitises (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) állatokból származó vastagbél szövetmintákat (40 mg) 1 ml AccuZol oldatban (Bioneer, Daejeon, Korea) homogenizáltuk, majd a gyártó által mellékelt protokoll szerint össz-RNS-t izoláltunk. Az RNS mennyiségét NanoDrop ND-1000 (Thermo scientific, Wellmington, USA) spektrofotométerrel határoztuk meg. Egyes szálú cDNS-t mintánként 2-2 µg össz-RNS bemérésével a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével állítottunk elő a gyártó útmutatása szerint. Az átírást a következő reakció körülményeket alkalmazva végeztük: reverz transzkriptáz aktiváció: 25 °C, 5 perc; átírás: 37 °C, 2 óra; reverz transzkriptáz inaktiváció: 75 °C, 10 perc (Faragó és mtsai., 2013).

III. 5. 2. Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció

A különböző gyulladásos markereket kódoló génekről a mRNA kifejeződésének mértékét kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time polimerase chain reaction; qRT-PCR) segítségével határoztuk meg. A specifikus primer szekvenciákat (3. táblázat) a Reference Sequences adatbázisában található szekvenciák alapján terveztük. A cDNS amplifikációt Bioneer Exicycler™ 96 készülékkel (Bioneer, Daejeon, Korea) végeztük. A keletkező termékek mennyiségi meghatározásához FastStart SYBR Green PCR Master Mix (Roche, Penzberg, Germany) reagenst használtunk a következő reakció körülményeket alkalmazva: 95 °C 15 mp; 60 °C 25 mp; 72 °C 25 mp, fluoreszcens jel detektálása (45 ciklus) (Faragó és mtsai., 2013). Referencia génnek a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HPRT) belső kontroll gént használtuk. A méréseket 96-lyukú PCR Microplate-en (Axygen Scientific, Union City, CA) végeztük, minden esetben három párhuzamos reakciót futtatunk.

Vizsgált fehérje	Reference Sequences kód	Forward primer szekvencia	Reverz primer szekvencia
HPRT	NM_012583.2	5' gaccggttctgtcatgtcg3'	5' acctggttcacatcactaatcac3'
HO-1	NM_012580.2	5' gtcaagcacagggtgacaga3'	5' ctgcagctcctcaaacagc3'
TGF-beta 2	NM_031131.1	5' agtgggcagcttttgctc3'	5' gtagaaagtgggcgggatg3'
TGF-beta 3	NM_013174.2	5' gaagagggccctggacac3'	5' gcgcacacagcagttctc3'
MMP 9	NM_031055.1	5' cctctgcatgaagacgacataa 3'	5' ggtcaggttagagccacga 3'
TIMP1	NM_053819.1	5' cagcaaaaggccttcgtaa 3'	5' tggctgaacagggaacact 3'

3. táblázat A kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció során alkalmazott primer szekvenciák

III. 6. Statisztikai analízis

A fény- és elektronmikroszkópos vizsgálataink során nyert adatokat statisztikai analízisnek vetettük alá. Egyfaktoros varianciaanalízist (Analysis of variance, ANOVA) és Newman-Keuls tesztet végeztünk (GraphPad Prism 4.0). A varianciaanalízis feltételei - a random mintavétel, a függetlenség és a varianciák homogenitása - teljesültek. A kapott eredményeket oszlopdiagramokon ábrázoltuk, az értékeket átlag±szórás (standard error of mean, SEM) formában tüntettük fel. A szignifikancia szintjét $p<0,05$ valószínűségi értékben határoztuk meg.

A qRT-PCR-t követően minden mintában meghatároztuk a vizsgált génekről átíródó mRNS-ek HPRT-vel korrigált expresszióját. A mRNS-ek mennyiségét a kontroll állatokban 1-nek tekintettük, majd a colitises állatokban meghatároztuk a kontrollhoz viszonyított relatív mRNS expressziót (ΔCT). Az egyes csoportok közötti eltéréseket „comparative CT” ($\Delta\Delta CT$) módszerrel mutattuk ki, és az eredményeket oszlopdiagramon ábrázoltuk. Az értékeket átlag ± szórás (standard deviation, SD) formában tüntettük fel.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. Makroszkópos megfigyelések

IV. 1. 1. TNBS-val indukált akut vastagbélgyulladás tünetei, a kísérleti állatok testtömege

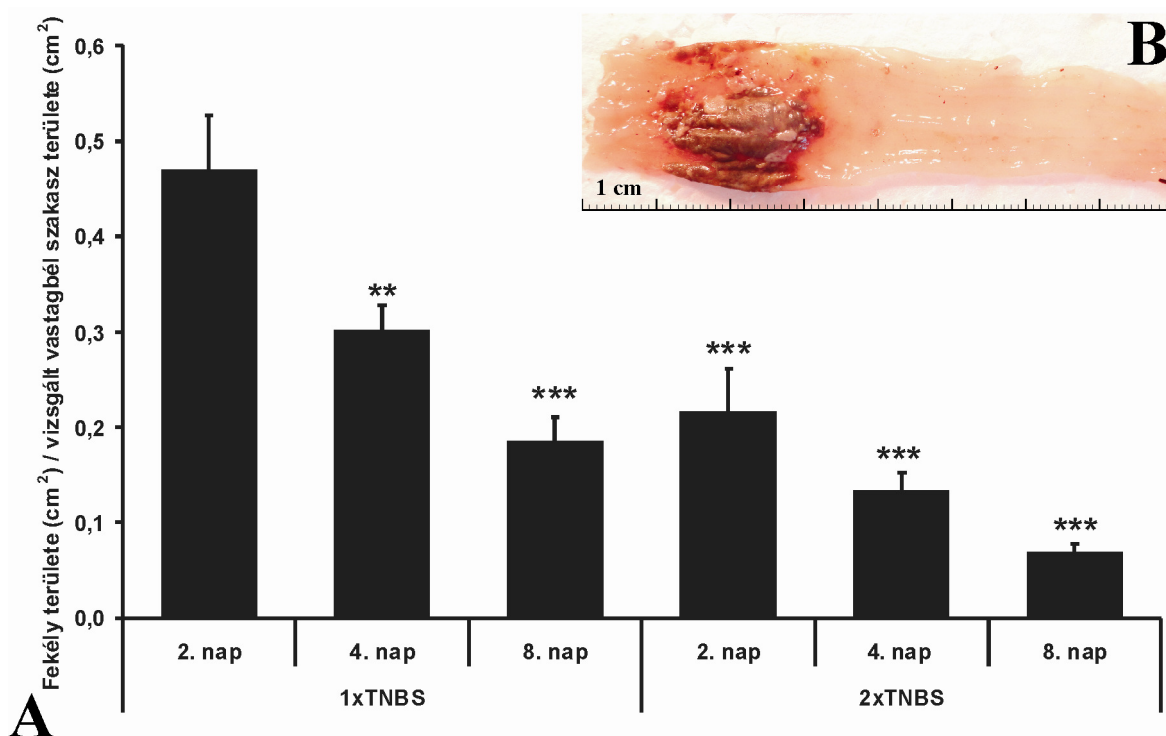
A TNBS-kezelt állatokban minden esetben súlyos, fekélyes vastagbélgyulladás alakult ki, de a mortalitás elhanyagolható volt. A kísérletek során mindössze két állat pusztult el. Az akut bélgyulladás tüneteit (súlyos hasmenés, véres, nyákos széklet, csökkent aktivitás) a TNBS dózisok számától függetlenül már a kezelést követő 1. napon megfigyeltük. Az első TNBS kezelés után a bélgyulladást kísérő akut tünetek még a kezelést követő 8. napon is erőteljesek voltak. A TNBS dózisok ismétlését követően azonban ezek már a 4. napra jelentősen mérséklődtek, s a 6. napra teljesen megszűntek. Az állatok testtömegét a kísérleti periódus alatt hetente mértük. A patkányok testsúlya az ismételt TNBS kezelések mellett is folyamatosan gyarapodott (4. táblázat).

	Testtömeg (g) $\pm$ SEM	
	Kezdeti (TNBS kezelések előtt)	Végső (120. nap)
Kontroll	201,5 $\pm$ 0,8 (n=34)	521 $\pm$ 1,8 *** (n=9)
1xTNBS	214,3 $\pm$ 3,9 (n=42)	459,4 $\pm$ 6,8 *** (n=4)
2xTNBS	211,7 $\pm$ 3,7 (n=40)	445,5 $\pm$ 10,3 *** (n=4)
3xTNBS	197,2 $\pm$ 3,5 (n=50)	513,5 $\pm$ 9,8 *** (n=8)

4. táblázat A kísérlet során felhasznált kontroll és TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok testtömege (kezdeti vs. végső: ***p<0,001).

IV. 1. 2. A nyálkahártya fekélyesedése

Miután a patkányokat feláldoztuk, az egyes kísérleti csoportok vastagbél mintái között szabad szemmel is jól látható és mérhető különbségeket figyeltünk meg. A colitis kiváltását követő 2. napon a nyálkahártyában fekélyeket (10. B ábra) és bevérzéseket láttunk. Bár a gyulladást kísérő vérbőség (hyperémia) a TNBS dózisok számától függetlenül még a kezelést követő 8. napon is látható volt, a fekélyek kiterjedése a colitis kiváltását követő 2. és 8. nap között szignifikánsan csökkent ($p < 0,01$ és $p < 0,001$) (10. A ábra). A TNBS kezelések ismétlésével a nyálkahártya regenerációja felgyorsult. Míg a fekélyes terület és a teljes vizsgált colon szakasz (anustól 8 cm) aránya az egyszer kezelt állatokban a 8. napon megközelítőleg 0,2 volt, a második kezelés után ez az arány alig érte el a 0,1-et (10. A ábra), a harmadik dózis alkalmazását követően pedig már nem volt mérhető.

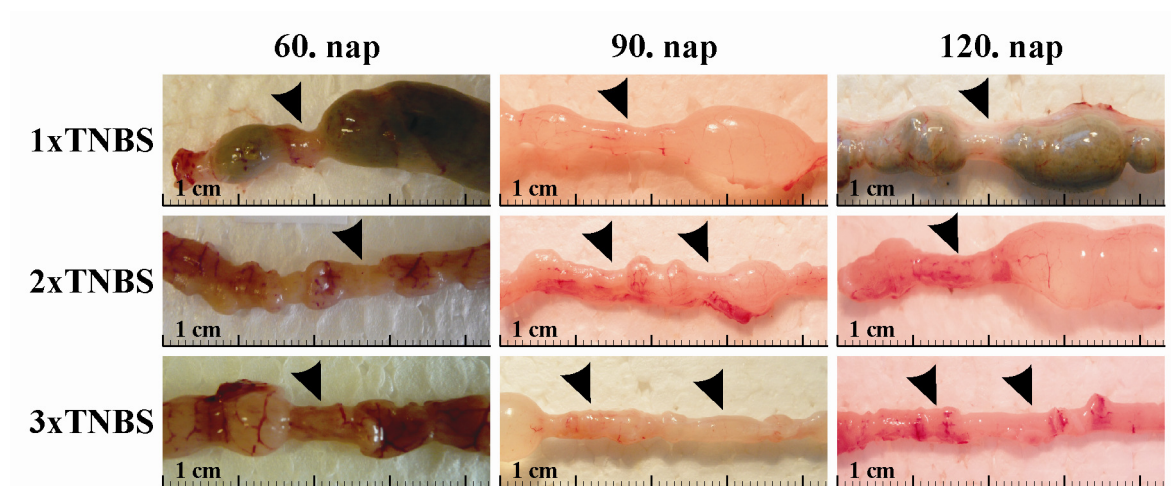


10. ábra (A) A nyálkahártya fekélyes területének (cm²) és a vizsgált vastagbél szakasz területének (cm²) aránya az első (1xTNBS) és második (2xTNBS) TNBS kezelést követő 2., 4. és 8. napon. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. Az első TNBS kezelést követő 2. napon mért értékekhez viszonyított szignifikáns különbségeket csillaggal (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) jelöltük. **(B)** A colon aborális részéről készült reprezentatív digitális felvétel az első TNBS kezelést követő 4. napon.

IV. I. 3. Bélszűkületek kialakulása a vastagbélgyulladás krónikus fázisában

A colitises patkányokban már az első TNBS kezelést követő 60. napon megjelentek a CD-re jellemző bélszűkületek. A szabad szemmel is jól látható striktúrák száma és kiterjedése a TNBS kezelések számának megfelelően növekedett (11. ábra).

Az egyszer kezelt állatokban a 60. napon megfigyelt 3-4 mm hosszúságú striktúrák száma nem változott, de kiterjedésük a 120. napig 5 mm-re növekedett. A második TNBS dózist követően a kísérleti periódus 60. és 120. napja között a bélszűkületek hossza közel kétszeresére növekedett. A harmadik TNBS kezelés után már a 60. napon több, közel 1 cm-es striktúrát figyeltünk meg, és a disztális colon utolsó 8 cm-es szakasza a 120. napig teljesen beszűkült (11. ábra).



11. ábra A bélszűkületekről készült reprezentatív digitális felvételek patkányok vastagbelében az első (1xTNBS), második (2xTNBS) és harmadik (3xTNBS) TNBS kezelést követő bélgyulladás krónikus fázisában.

IV. 2. A myenterikus neuronok kvantitatív és morfológiai paramétereinek változása a vastagbélgyulladás akut és krónikus fázisában

IV. 2. 1. A myenterikus neuronok denzitása

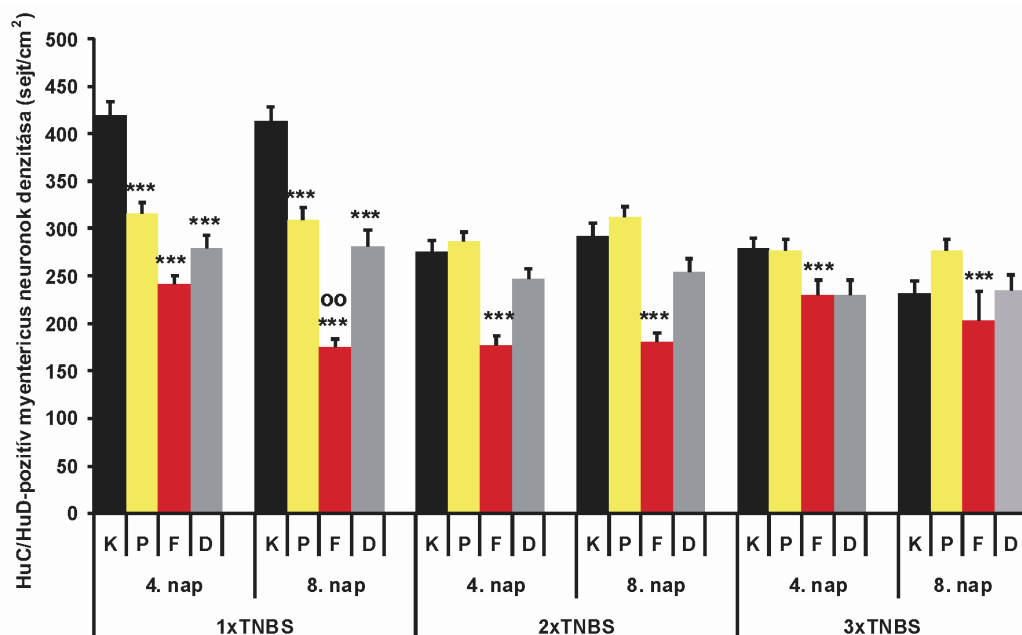
A myenterikus neuronok kvantitatív változásait bélnyúzat preparátumokon, HuC/HuD immunhisztokémiai vizsgálatokkal követtük. A colon fekélyes, illetve ahhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó területein meghatároztuk a neuronok denzitását a különböző kísérleti csoportokban. A kontroll állatokban a sejtek száma a kísérleti periódus 1. és 90. napja között folyamatosan csökkent (12. és 13. ábra), ezért a colitises állatokban mért denzitás értékeket minden esetben az azonos korú, kontroll állatokból származó értékekkel hasonlítottuk össze.

IV. 2. 1. 1. A myenterikus neuronok denzitása a bélgyulladás akut fázisában

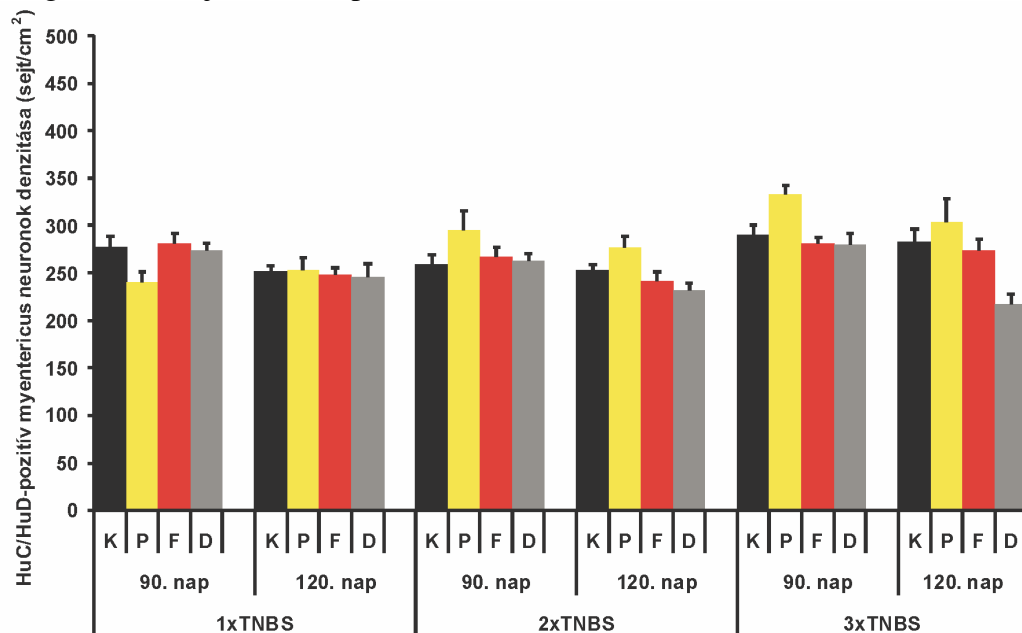
A myenterikus neuronok denzitása az első TNBS kezelést követő vastagbélgyulladás akut fázisában mindhárom vizsgált colon szakaszon szignifikánsan csökkent (12. ábra). A vastagbél fekélyes területein a kezelést követő 4. napon mintegy 43%-os denzitás csökkenést tapasztaltunk, majd a 8. napig további 15%-os csökkenést detektáltunk a kontroll értékekhez viszonyítva ($p < 0,001$). A második és harmadik TNBS kezelést követően szintén a 4. napra csökkent szignifikánsan a myenterikus neuronok száma ($p < 0,001$), azonban a csökkenés mértéke kisebb volt (36% és 23%), mint az első kezelés után, és az ismételt kezeléseket követő 4. és 8. nap között újabb csökkenést már nem tapasztaltunk. A fekélyes bélszakaszhoz kapcsolódó proximális és disztális területeken az első TNBS dózis után a 4. és 8. napon is szignifikáns, bár kisebb mértékű (25% és 34%; $p < 0,001$) sejtszám csökkenést tapasztaltunk. Az ismételt kezelések után szignifikáns neuronszám csökkenés már csak a fekélyes területen volt (12. ábra).

IV. 2. 1. 2. A myenterikus neuronok denzitása a bélgyulladás krónikus fázisában

A vastagbélgyulladás krónikus fázisában a myenterikus neuronok száma a kezelések számától függetlenül már nem változott. A kezelést követő 90. és 120. napon a colon korábbi fekélyes, illetve ahhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó területein is a kontrollhoz hasonló értékeket kaptunk (13. ábra).



12. ábra HuC/HuD-pozitív myenterikus neuronok denzitása kontroll (K) és TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 4. és 8. napon. Kísérleteink során a vastagbél fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. Az adatokat átlag±SEM formában tüntettük fel. A kontroll és TNBS-kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket csillaggal (***) $p < 0,001$), a kezeléseket követő 4. és 8. nap közti szignifikáns különbségeket körrel jelöltük (°° $p < 0,01$).



13. ábra HuC/HuD-pozitív myenterikus neuronok denzitása kontroll (K) és TNBS-kezelt patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 90. és 120. napon. Kísérleteink során a vastagbél korábban fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. Az adatokat átlag±SEM formában tüntettük fel.

IV. 2. 2. A myenterikus neuronok területének változása

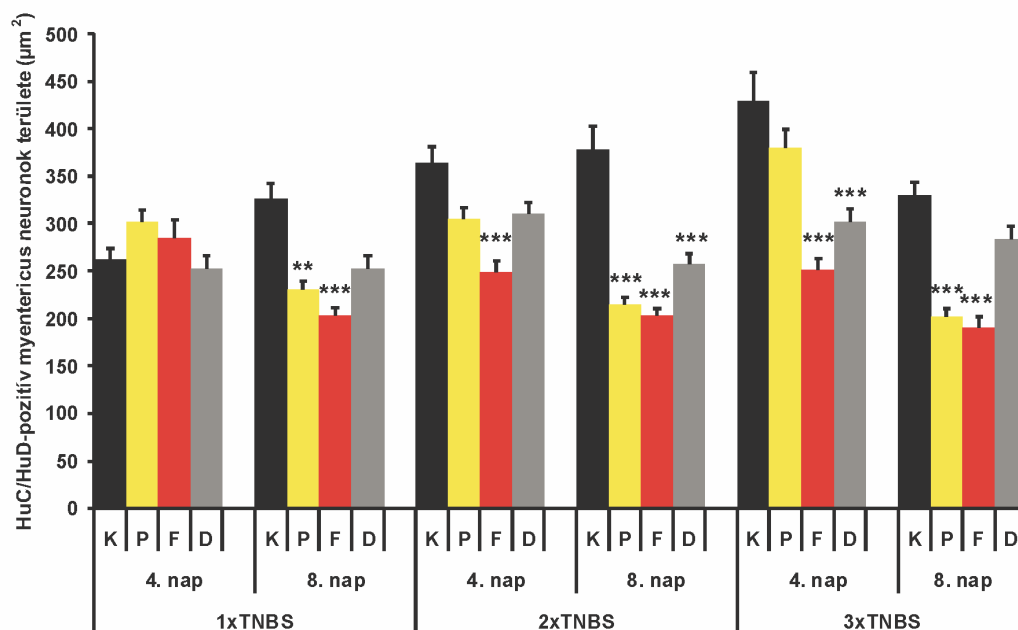
Az előző vizsgálatokhoz használt bélnyúzat preparátumokon a myenterikus neuronok méretváltozását is követtük az egyes kísérletes állatcsoportokban a bélgyulladás különböző fázisaiban. Mivel a kontroll állatokban a sejtek területe a kísérleti periódus 1. és 90. napja között folyamatosan növekedett (14. és 15. ábra), ezért a colitises állatokban mért értékeket morfometriai vizsgálataink során is minden esetben az azonos korú, kontroll állatokból származó értékekhez viszonyítottuk.

IV. 2. 2. 1. A myenterikus neuronok területének változása a bélgyulladás akut fázisában

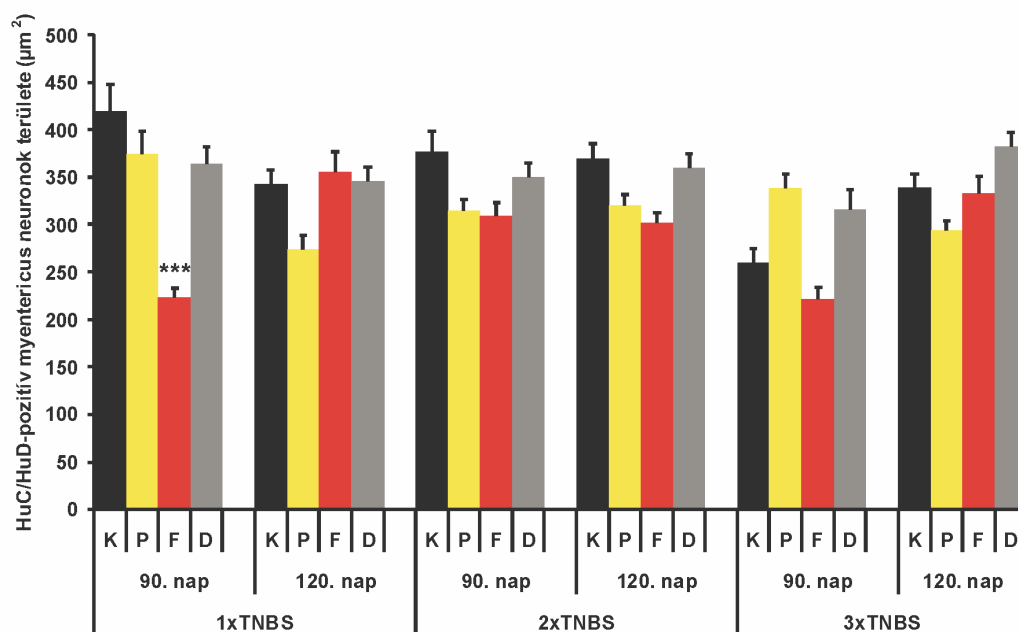
Az első TNBS kezelés után szignifikáns sejtméret változásokat először a kezelést követő 8. napon tapasztaltunk, ekkor a fekélyes colon szakaszon a myenterikus neuronok sejtestjének területe közel 40%-kal csökkent a kontroll értékekhez viszonyítva ($202,3 \pm 8,8$ vs. $326,4 \pm 15,9$) (14. ábra). A kétszer és háromszor kezelt kísérleti csoportokban a myenterikus neuronok méretének szignifikáns csökkenése már a colitis akut fázisának 4. napján nagyon kifejezett volt ($248,9 \pm 12$ és $251,5 \pm 11,7$ vs. $363,6 \pm 17,6$ és $429,2 \pm 30,2$; $p < 0,001$), majd a 8. napig a szóma mérete még tovább csökkent. A fekélyes szakaszoktól proximálisan és disztálisan is megfigyeltünk kisebb mértékű, de legtöbbször szignifikáns ($p < 0,001$) sejtméret csökkenést mind az első, mind az ismételt TNBS kezeléseket követő bélgyulladás akut fázisában (14. ábra).

IV. 2. 2. 2. A myenterikus neuronok területének változása a bélgyulladás krónikus fázisában

A vastagbélgyulladás krónikus fázisában csak az egyszeri TNBS dózis alkalmazása után mértünk szignifikáns sejtméret csökkenést ($p < 0,001$) (15. ábra). A korábban fekélyes colon szakaszon a neuronok területe a 90. napon a kontroll állatokban mért értékek közel felére csökkent ($223,5 \pm 9,81$ vs. $420,4 \pm 27,41$). A második és harmadik kezelést követően azonban egyre kisebb mértékben zsugorodtak a sejtek, a háromszor kezelt patkányokban a 120. napon már a kontrollhoz hasonló értékeket kaptunk. A sérült szakaszokhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó területeken a szóma mérete a 90. és 120. nap között az ismételt kezelések ellenére sem változott (15. ábra).



14. ábra HuC/HuD-pozitív myenterikus neuronok területének változása kontroll (K) és TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 4. és 8. napon. Kísérleteink során a vastagbél fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. Az adatokat átlag±SEM formában tüntettük fel. A kontroll és kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket csillaggal (** p<0,01; *** p<0,001) jelöltük.



15. ábra HuC/HuD-pozitív myenterikus neuronok területének változása kontroll (K) és TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 90. és 120. napon. Kísérleteink során a vastagbél korábban fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. Az adatokat átlag±SEM formában tüntettük fel. A kontroll és kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket csillaggal (***) p<0,001) jelöltük.

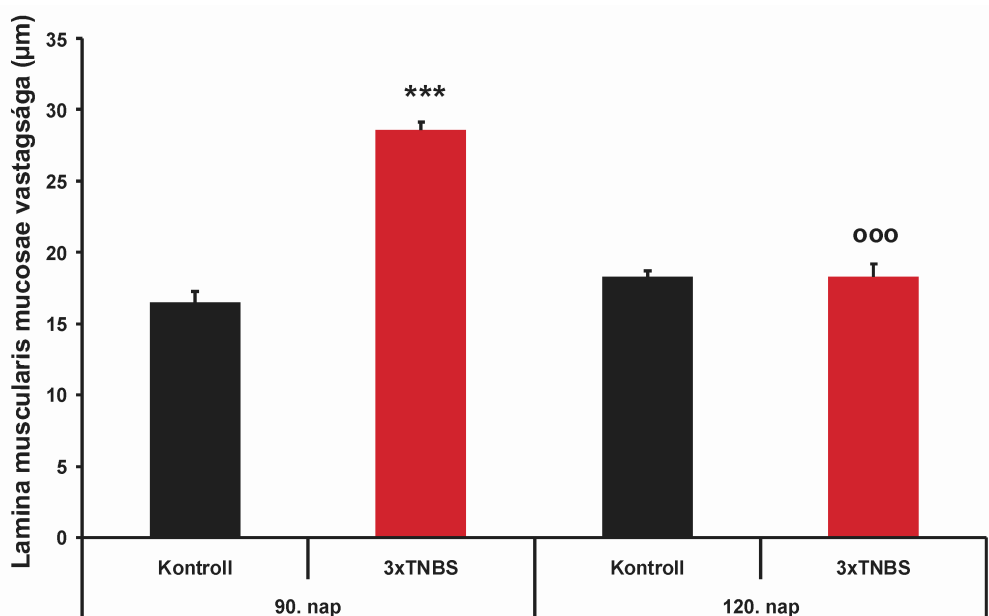
IV. 3. A bélszűkületek szövettani és molekuláris biológiai vizsgálata

Bár a bélgyulladás krónikus fázisában a striktúrák a TNBS kezelések számától függetlenül mindig megjelentek (IV. 1. 3.), számuk és kiterjedésük a harmadik kezelés után volt a legkifejezettebb, ezért a beszűkült bélszakasz strukturális és molekuláris vizsgálatánál erre a kísérleti állatcsoportra koncentráltunk.

IV. 3. 1. A bélfalat felépítő izomrétegek morfológiai változásai

IV. 3. 1. 1. A lamina muscularis mucosae fénymikroszkópos morfológiai vizsgálata

A LMM vastagsága a gyulladás kiváltását követő 90. napon a kontroll értékek kétszeresére növekedett ($17 \pm 0,8$ vs. $29 \pm 0,6$; $p < 0,001$), a 120. napon azonban már a kontrollhoz hasonló értékeket mértünk ($18 \pm 0,4$ vs. $18 \pm 0,9$) (16. ábra).

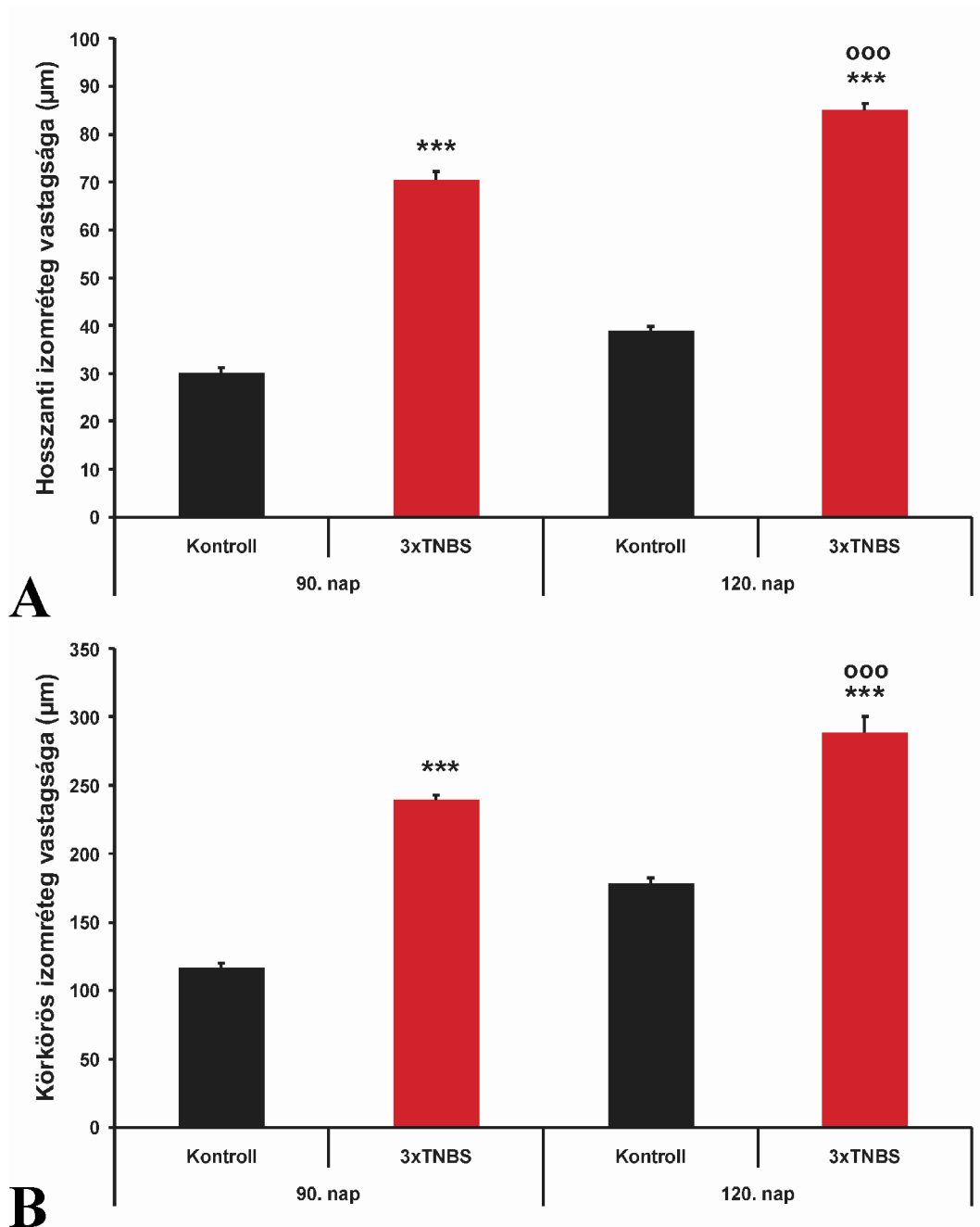


16. ábra A nyálkahártya saját izomrétegének vastagsága kontroll és háromszor TNBS-kezelt patkányok (3xTNBS) vastagbelében. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. A kontroll és kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket csillaggal (*** $p < 0,001$), a TNBS-kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket körrel (ooo $p < 0,001$) jelöltük.

IV. 3. 1. 2. A bélfal külső izomrétegeinek fénymikroszkópos morfológiai vizsgálata

A striktúrák területén a bélfal külső izomrétegeinek vastagságában is jelentős különbségek voltak (17. ábra). A harmadik TNBS dózis alkalmazását követő 90. napon mind a külső hosszanti (17. A ábra), mind a belső körkörös (17. B ábra) izomréteg

vastagsága a kontroll állatokban mért értékek több mint kétszeresére növekedett (30 ± 9 vs. 70 ± 2 és $117 \pm 3,5$ vs. $240 \pm 3,2$), és a 120. napig további szignifikáns vastagodást mértünk ($p < 0,001$).

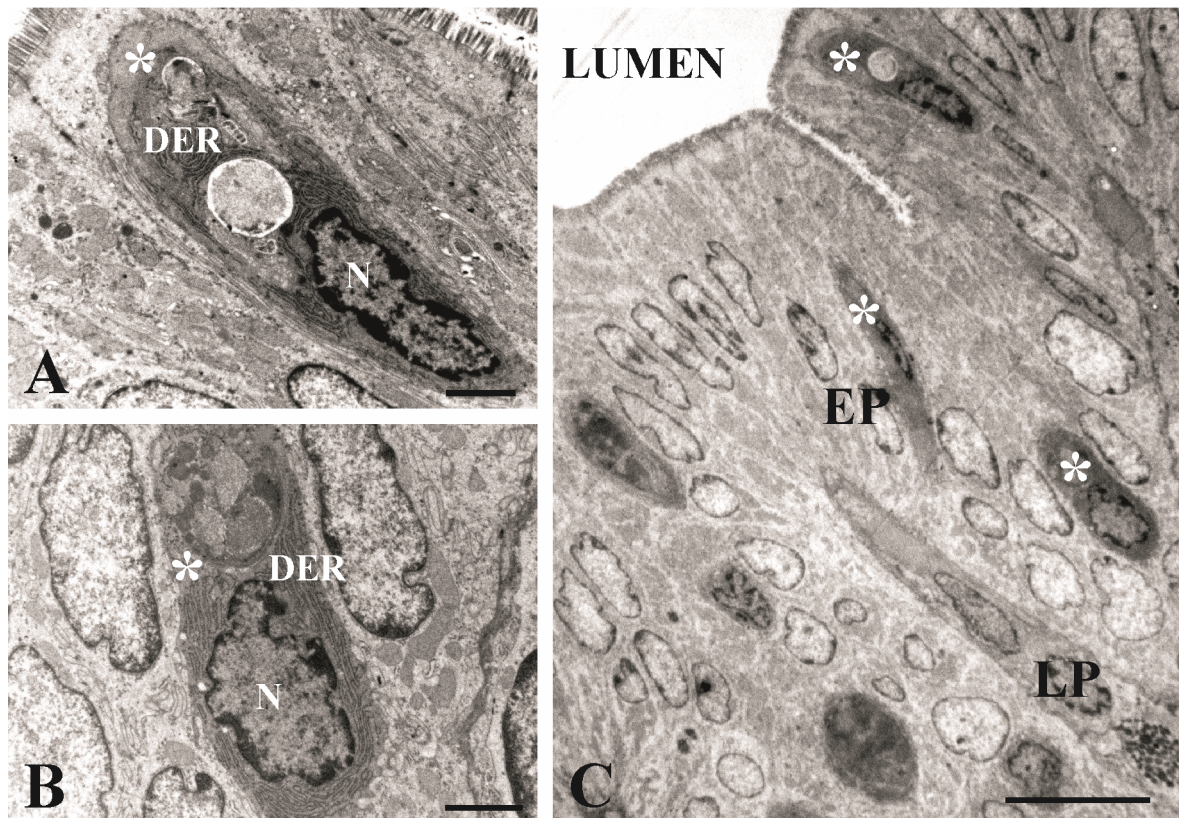


17. ábra A bél fal külső hosszanti (A) és belső körkörös (B) izomrétegének vastagsága kontroll és háromszor TNBS-kezelt (3xTNBS) patkányok vastagbélében a bélszűkületek területén. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. A kontroll és kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket csillaggal (***) $p < 0,001$), a TNBS-kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket körrel (000 $p < 0,001$) jelöltük.

IV. 3. 2. Ultrastrukturális változások a bélszűkületek területén

IV. 3. 2. 1. A lamina epithelialis elektronmikroszkópos vizsgálata

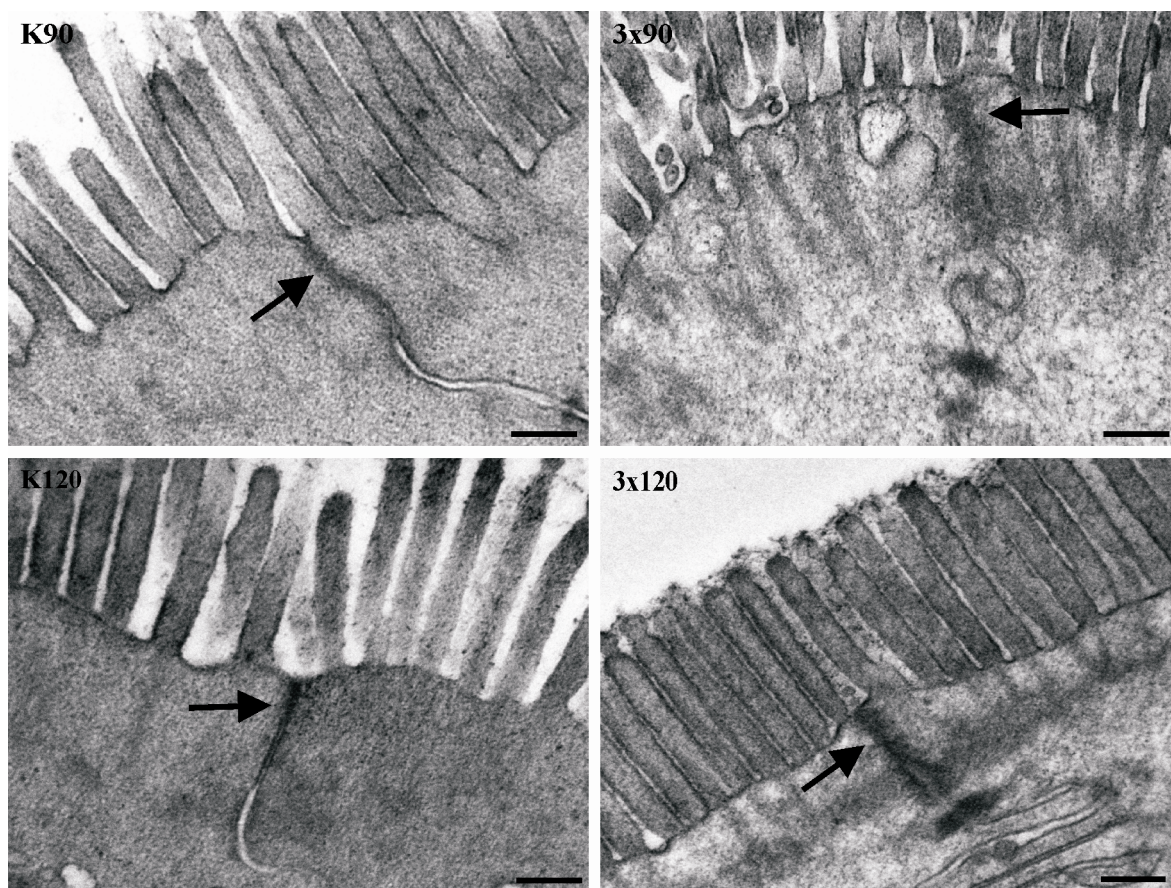
A harmadik TNBS kezelést követő 90. napra a lamina epithelialis ultrastrukturális szinten teljesen regenerálódott, az enterociták mikrovilláris felszíne a kontrollhoz hasonló volt, de a bélhámsejtek között gyakran immunsejteket figyeltük meg (18. ábra).



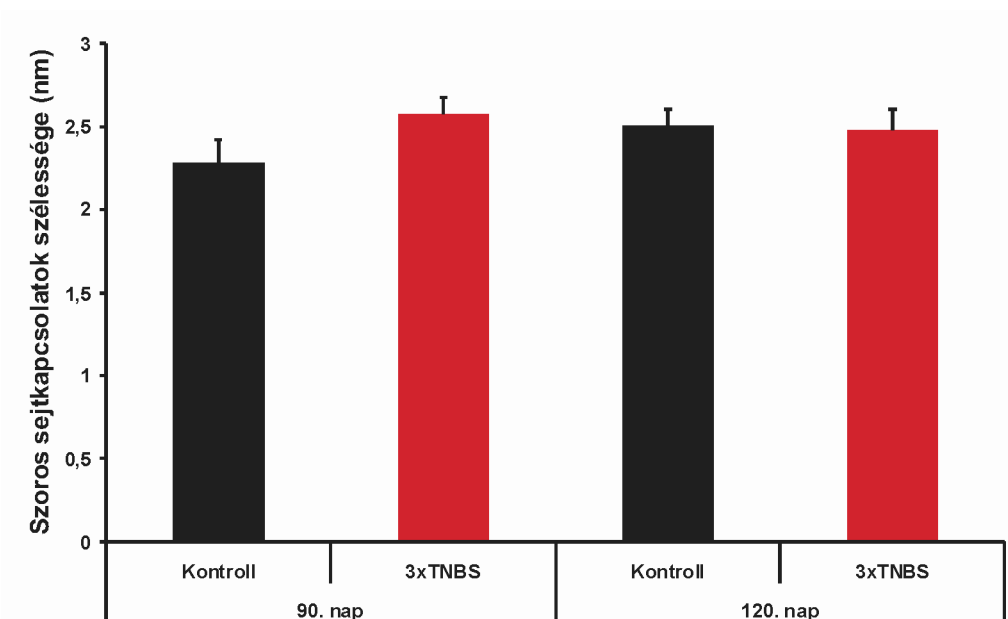
18. ábra A bélnyálkahártya epitéliumáról készült reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek a harmadik TNBS kezelést követő 90. napon. Az enterociták között még a bélgyulladás krónikus fázisában is gyakran láttunk immunsejteket (csillagok). DER – durvafelszínű endoplazmatikus retikulum, EP – epitélium, LP – lamina propria; Lépték: 2 μm (A, B) és 10 μm (C).

IV. 3. 2. 1. 1. A szoros sejtkapcsoló struktúrák morfológiai vizsgálata

A következőkben mértük az enterociták közötti TJk szélességét, vagyis a bélhámsejtek közötti távolságot. Mivel a TJk szélessége a 3. TNBS kezelést követő 90. és 120. napon sem különbözött a kontroll mintákban mért értékektől és nem közelítette meg az irodalmi adatok alapján meghatározott 3 nm-es határértéket, a TJk-at zártak tekintettük (19. és 20. ábra).



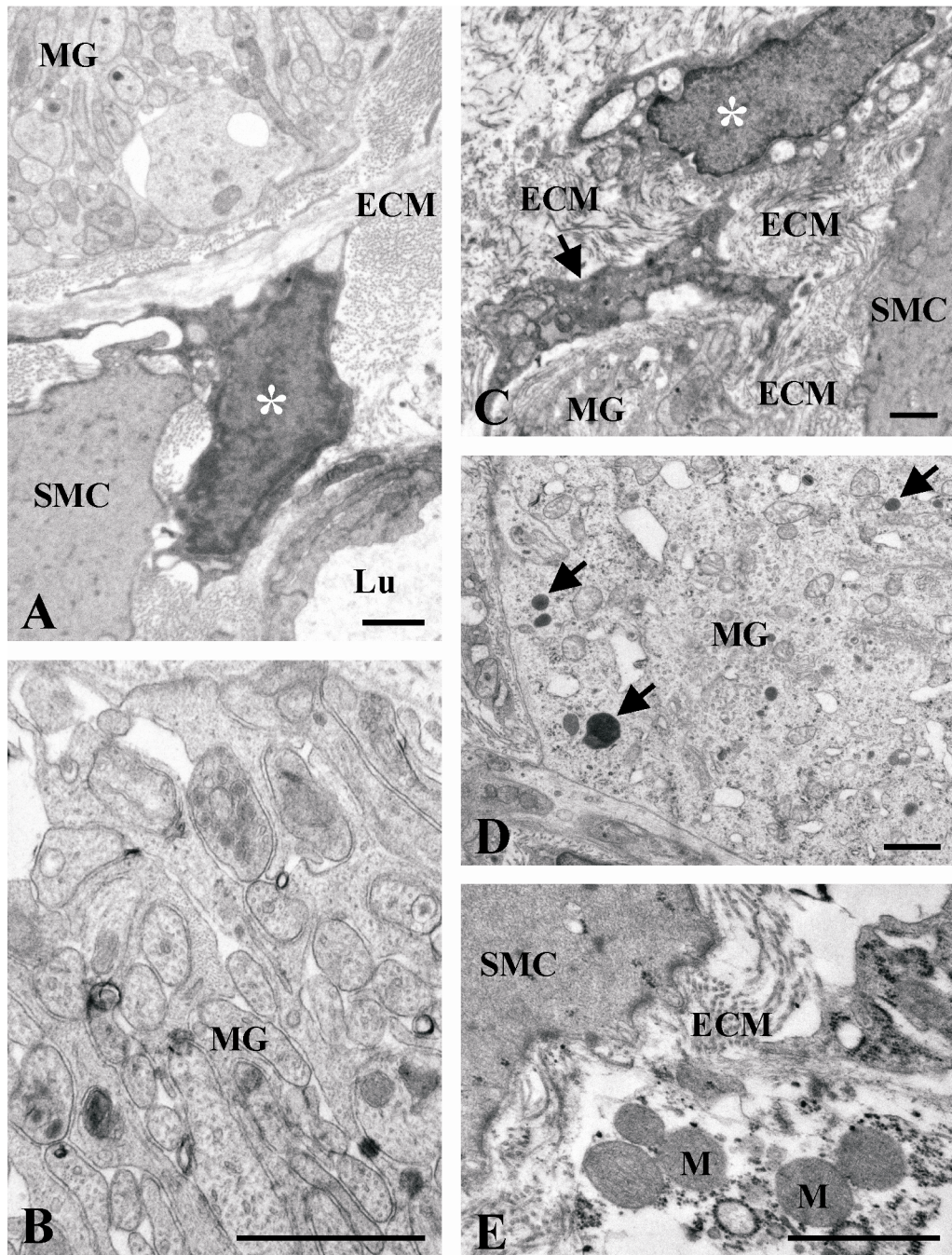
19. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek az enterociták közötti szoros kapcsolatokról (nyilak) kontroll (K90, K120) és colitises patkányok vastagbeléből készített ultravékony metszeteken a harmadik TNBS kezelést követő 90. és 120. napon (3x90, 3x120). Lépték: 200 nm



20. ábra Szoros sejtkapcsoló struktúrák (tight junction, TJ) szélessége kontroll és háromszor TNBS-kezelt (3xTNBS) patkányok vastagbelében a kezeléseket követő 90. és 120. napon. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

IV. 3. 2. 2. A myenterikus ganglionok és mikrokörnyezetük elektronmikroszkópos vizsgálata

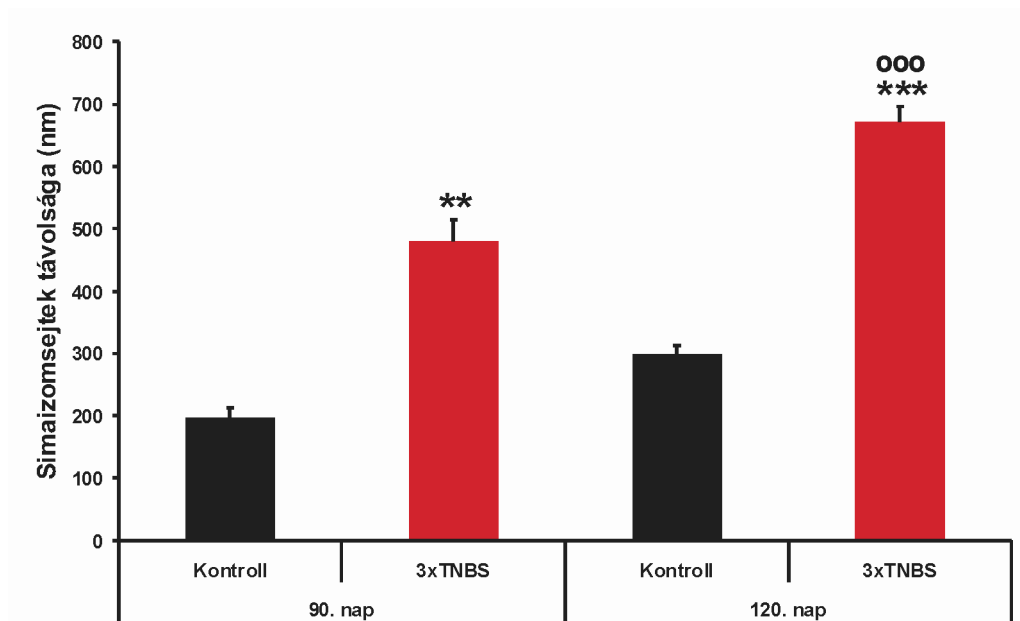
A myenterikus ganglionok a kontroll mintákban a 90. napon még strukturálisan épnek tűntek, és mind a simaizomsejtekkel, mind a ICC-kel kapcsolatban álltak (21. A és B ábra). A harmadik TNBS kezelést követő 90. napra azonban a bélfal külső izomrétegeiben a simaizomsejtek és ganglionok között ECM elemek halmozódtak fel, mely a 120. napig jelentősen fokozódott (21. C ábra). A szöveti átrendeződés miatt a myenterikus ganglionok súlyosan károsodtak, erre utal a ganglionokban megfigyelhető sérült mitokondriumok és lipofuszcín szemcsék jelenléte is (21. D ábra). Mindemellett a 120. napon a simaizomsejtek között szabad mitokondriumokat és egyéb sejtalkotókat figyeltünk meg (21. E ábra).



21. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek kontroll és colitises patkányok vastagbeléből készített ultravékony metszetekről. **(A)** A 90. napon a kontroll mintákban a vélhetően Cajal-féle interstitiális sejtek (interstitial cell of Cajal, ICC) (csillag) még mind a myenterikus ganglionokkal (MG), mind a simaizomsejtekkel (smooth, muscle cell, SMC) valamint a körülöttük elhelyezkedő kapillárisokkal (Lu – ér lumen) is kapcsolatban álltak. **(B)** A 90. napon a kontroll állatokban a MG-ok még strukturálisan épnek tűntek. **(C)** A colitises állatok vastagbelében azonban a 120. npra az extracelluláris mátrix elemek (ECM) felhalmozódása miatt a MG-ok, a simaizomsejtek, a ICC-ek (csillag) és a fibroblaszt-szerű sejtek (nyíl) eltávolodtak egymástól. **(D)** A 120. napon a lipofuszcín szemcsék (nyilak) jelenléte a MG-okban azok súlyos károsodására utalt. **(E)** A bélfall körkörös izomrétegében a 120. napon a simaizomsejtek között szabad mitokondriumokat (M) és egyéb sejtalkotókat figyeltünk meg. Lépték: 1 μ m

IV. 3. 2. 2. 1. A simaizomsejtek közötti extracelulláris mátrix morfológiai vizsgálata a bélfal körkörös izomrétegében

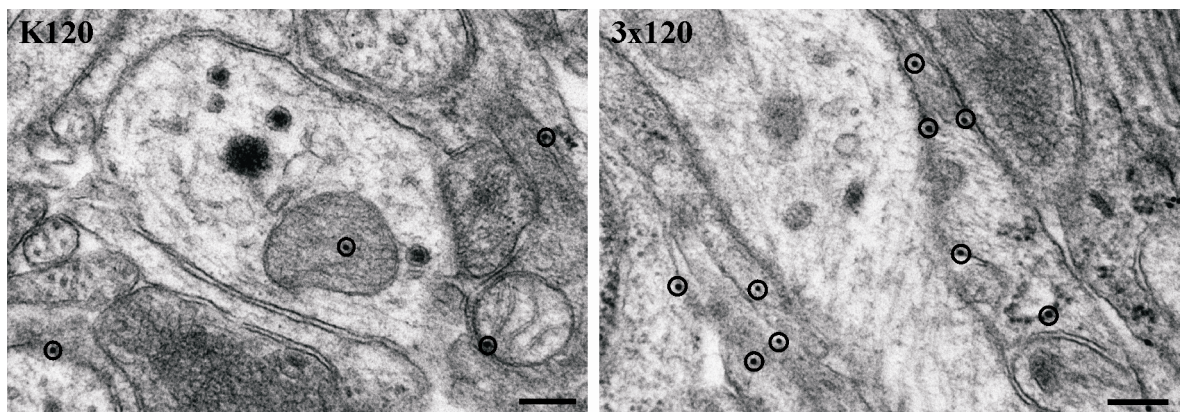
Morfológiai vizsgálataink során mértük a simaizomsejtek közti távolságot, s ebből következtettünk az ECM megnövekedett mennyiségére is. A körkörös izomrétegben a simaizomsejtek már a harmadik TNBS kezelést követő 90. napon eltávolodtak egymástól, majd távolságuk a 120. napig a kontroll csoporthoz viszonyítva nagyon jelentősen növekedett ($197,4 \pm 16,31$ vs. $480,7 \pm 33,09$ és $298,3 \pm 13,93$ vs. $671,4 \pm 24,67$) (22. ábra).



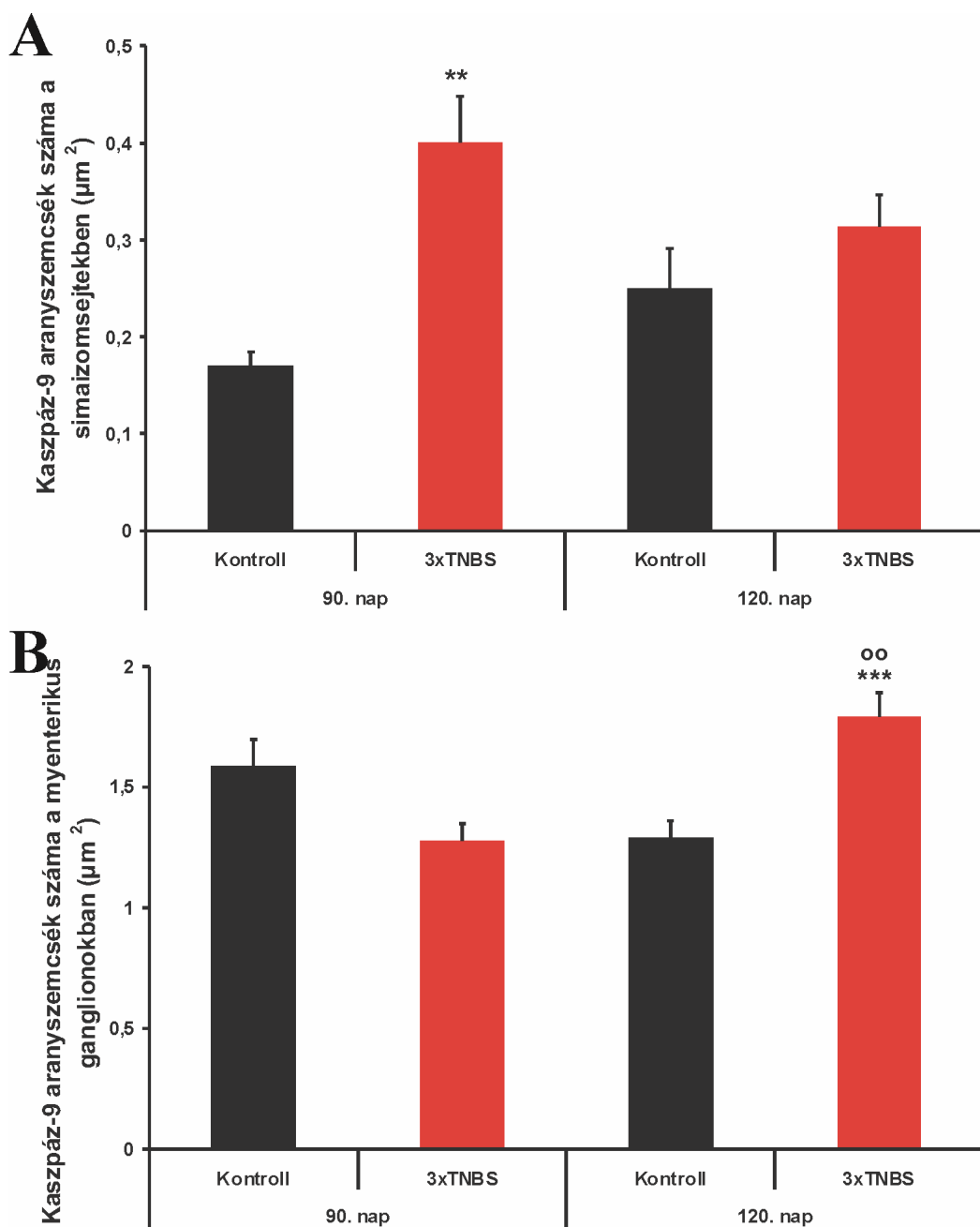
22. ábra A simaizomsejtek távolsága a harmadik TNBS kezelést (3xTNBS) követő 90. és 120. napon patkányok vastagbélében. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. A kontroll és kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket csillaggal (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), a TNBS-kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket körrel (ooo $p < 0,001$) jelöltük.

IV. 3. 2. 2. 2. Kvantitatív posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatok

A bélszűkületek területén a MG-ok és a körkörös simaizomsejtek sérülésének vizsgálatához Kaszpáz-9 pro-apoptotikus marker segítségével posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk (23. ábra). A harmadik TNBS kezelést követő 90. napon a Kaszpáz-9-et jelölő 18 nm-es aranyzemcsék száma a simaizomsejtekben megduplázódott ($p < 0,01$), míg a myenterikus ganglionokban nem változott. A 120. napon az aranyzemcsék adott területre vonatkoztatott mennyisége a bélfal simaizomsejtekben már nem mutatott jelentős változást, azonban a myenterikus ganglionokban szignifikánsan növekedett ($p < 0,001$) a kontroll értékekhez viszonyítva (24. ábra).



23. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek myenterikus ganglionokról kontroll (K120) és colitises (3x120) patkányok vastagbeléből készített ultravékony metszeteken kaszpáz-9 posztembedding immunhisztokémia után. Lépték: 200 nm. kör-kaspáz-9-et jelölő 18 nm-es aranyzemcse



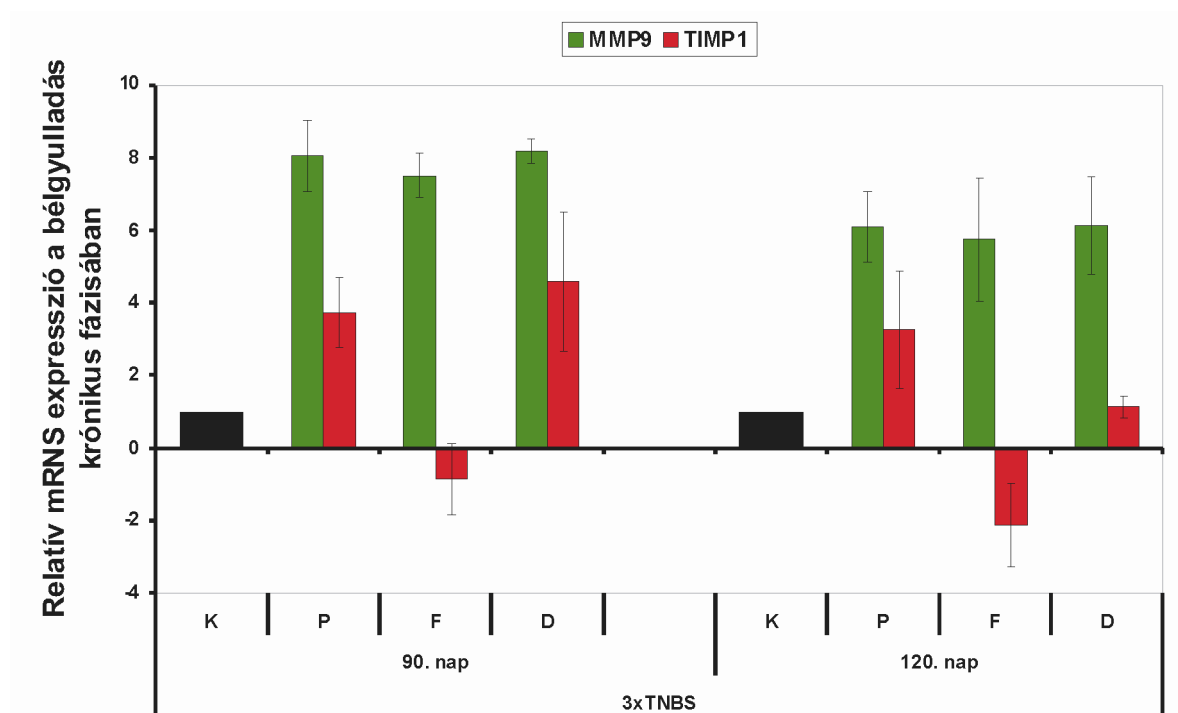
24. ábra Kaspáz-9-et jelölő arany szemcsék számának változása a bélfal simaizomsejtjeiben (**A**) és a myenterikus ganglionokban (**B**) kontroll és háromszor TNBS-kezelt (3xTNBS) patkányok vastagbelében a 90. és 120 napon. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel. A kontroll és kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket csillaggal (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$), a TNBS-kezelt csoportok közti szignifikáns különbségeket körrel (^{oo} $p < 0,001$) jelöltük.

IV. 3. 3. Molekuláris változások a bélgyulladás krónikus fázisában

IV. 3. 3. 1. A MMP9 és TIMP1 mRNS expressziója

A harmadik TNBS kezelést követő bélgyulladás krónikus fázisában a MMP9 mRNS-ek túltermelődését a vastagbél korábban fekélyes, és az ahhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó területein is detektáltuk, a relatív mRNS expresszió ekkora a kontroll értékek többszörösére növekedett (25. ábra).

Amíg a TIMP1-et kódoló gén a korábban fekélyes colon szakaszokon a 90. és 120. napon represszált állapotban volt, addig a sérült területhez kapcsolódó ép bélszakaszokon a mRNS-ek túltermelődését detektáltuk (25. ábra).



25. ábra A mátrix metalloproteináz 9 (MMP9) és saját szöveti gátlójának (TIMP1) mRNS expressziója a vastagbél korábban fekélyes (F), illetve az ahhoz proximálisan (P) és disztálisan (D) kapcsolódó területein a harmadik TNBS kezelést (3xTNBS) követő 90. és 120. napon. A mRNS expressziót a kontroll (K) mintákban 1-nek tekintettük, és a colitises patkányokban mért értékeket minden esetben ehhez viszonyítottuk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel.

IV. 4. Különböző gyulladásos markerek mRNS expressziójának változása a bélgyulladás akut és krónikus fázisában

IV. 4. 1. A TGF-beta 2 mRNS expressziója

IV. 4. 1. 1. A TGF-beta 2 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás akut fázisában

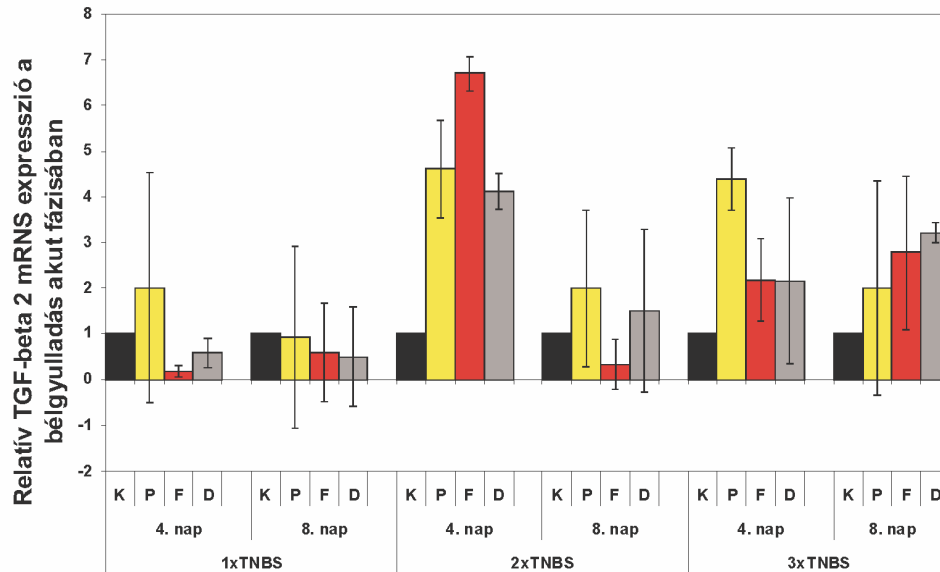
A colon fekélyes területein a TGF-beta 2-es izoformáját kódoló gén aktivációját először a második TNBS kezelést követő 4. napon detektáltuk, ekkora a mRNS-ek relatív szintje a kontroll értékek közel hétszeresére emelkedett (26. ábra), a 8. napig azonban a kontroll szint alá csökkent. A TGF-beta 2 túltermelődését a harmadik TNBS kezelést követő 4. napon is igazoltuk, és a mRNS-ek mennyisége a 4. és 8. nap között tovább növekedett (26. ábra).

A fekélyes területhez proximálisan kapcsolódó colon szakaszokon a TGF-beta 2 a 4. napra mindhárom TNBS kezelést követően aktiválódott (26. ábra), s bár a mRNS-ek relatív szintje a 8. napig mindhárom colitiszes állatsoportban csökkent, csak az első TNBS dózis után érte el a kontroll szintet (26. ábra). A disztális területeken a TGF-beta 2 mRNS-ek túltermelődését csak az ismételt TNBS kezelések után detektáltuk. Amíg mennyiségük a második TNBS dózis után a 4. és 8. nap között csökkent, addig a harmadik TNBS kezelés után a kontroll értékek közel közel háromszorosára növekedett (26. ábra).

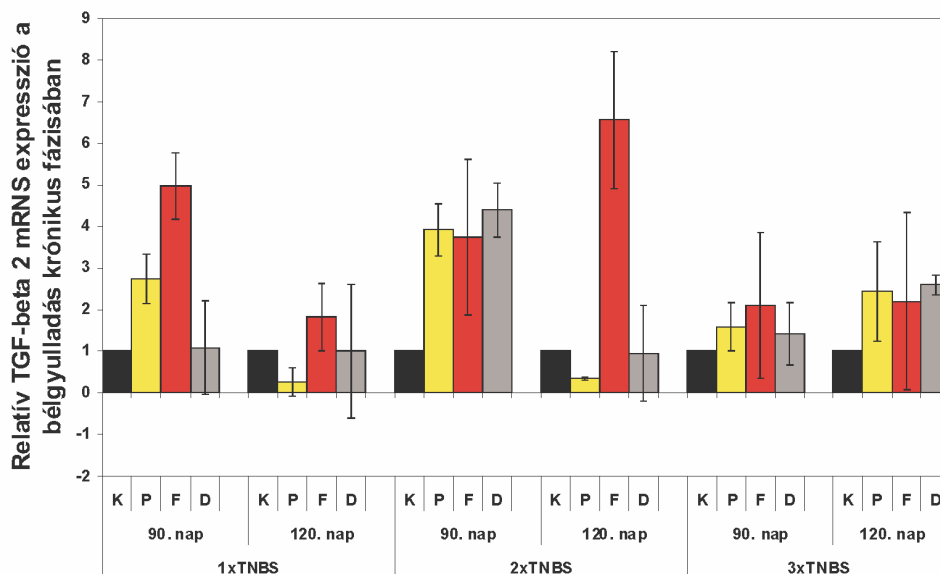
IV. 4. 1. 2. A TGF-beta 2 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás krónikus fázisában

A korábban fekélyes területeken a TGF-beta 2 mRNS-ek túltermelődését a 90. napon mindhárom TNBS kezelést követően igazoltuk (27. ábra). Amíg a relatív mRNS expresszió az első TNBS dózis után a 120. napig csökkent, addig az ismételt kezelések után a 90. és 120. nap között növekedett (27. ábra).

Az ép bélszakaszokon az első TNBS kezelést követő 90. napon csak a korábbi fekélyes területtől proximálisan detektáltunk fokozott TGF-beta 2 expressziót, és a 120. napon már a kontrollhoz hasonló értékeket mértünk (27. ábra). Az ismételt TNBS kezeléseket követő 90. napra azonban a TGF-beta 2-t kódoló mRNS-ek relatív szintje a proximális és disztális területeken is a kontroll értékek többszörösére növekedett. Amíg a mRNS expresszió a második TNBS kezelés után a kontroll szintre csökkent, addig a harmadik dózis után a 120. napig tovább növekedett (27. ábra).



26. ábra A transzformáló növekedési faktor-beta 2 (TGF-beta 2) mRNS expressziója TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 4. és 8. napon. Kísérleteink során a vastagbél fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. A mRNS expressziót a kontroll (K) mintákban 1-nek tekintettük, és a colitises patkányokban mért értékeket minden esetben ehhez viszonyítottuk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel.



27. ábra A transzformáló növekedési faktor-beta 2 (TGF-beta 2) relatív mRNS expressziója TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 90. és 120. napon. Kísérleteink során a vastagbél korábban fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. A mRNS expressziót a kontroll (K) mintákban 1-nek tekintettük, és a colitises patkányokban mért értékeket minden esetben ehhez viszonyítottuk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel.

IV. 4. 2. A TGF-beta 3 mRNS expressziója

IV. 4. 2. 1. A TGF-beta 3 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás akut fázisában

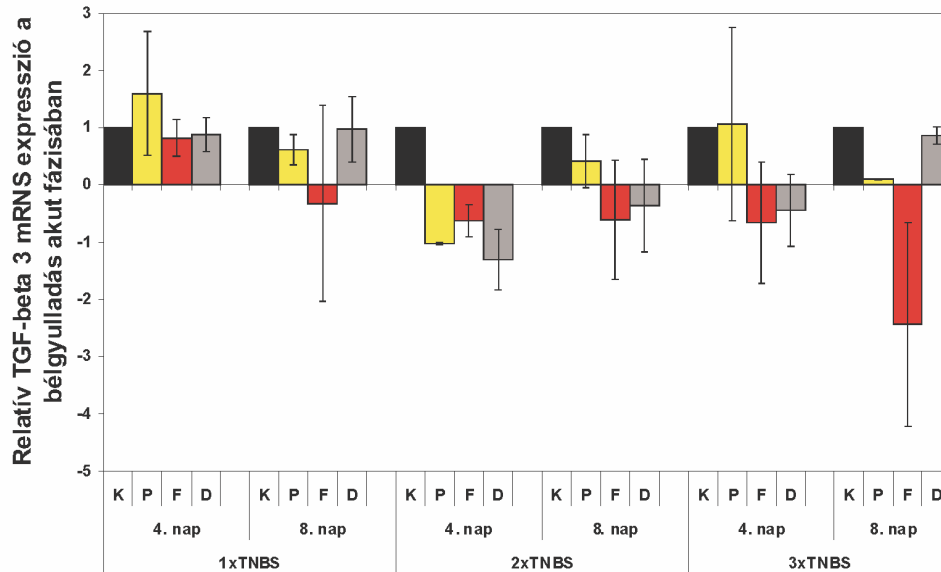
A TGF-beta 3-as izoformáját kódoló gén túltermelődését a colon fekélyes területein csak az első TNBS kezelést követő 4. napon igazoltuk, ezt követően a gén az ismételt kezelések után is represszált állapotban volt (28. ábra).

A TGF-beta 3 represszióját a fekélyes területtől proximálisan és disztálisan azonban a bélgyulladás akut fázisában egyértelműen nem tudtuk kimutatni (28. ábra).

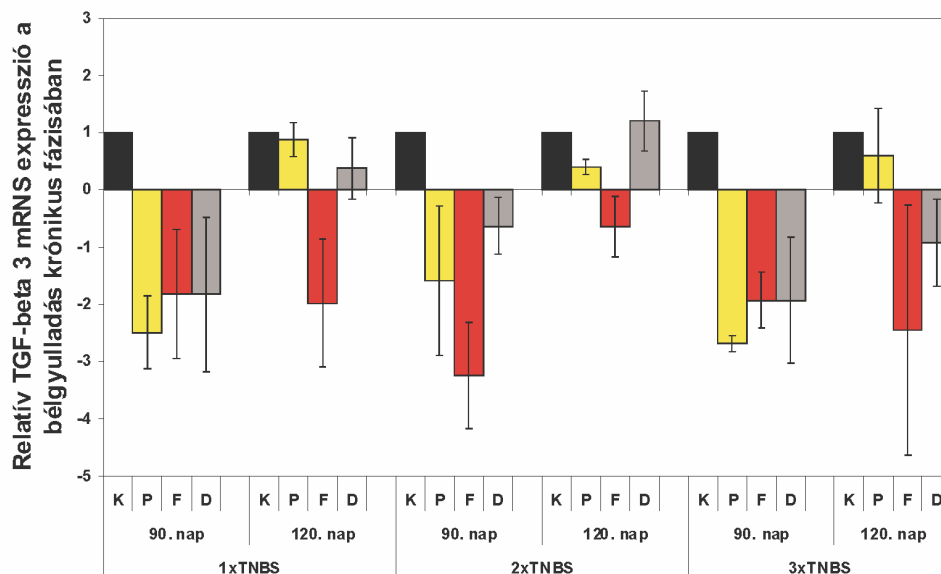
IV. 4. 2. 2. A TGF-beta 3 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás krónikus fázisában

A vastagbél fekélyes területein a TGF-beta 3 gén a bélgyulladás krónikus fázisában is végig represszált állapotban maradt (29. ábra).

A gén inaktivációját a TNBS kezeléseket követő 90. napon a fekélyes területhez kapcsolódó proximális és disztális bélszakaszokon is igazoltuk (29. ábra). A proximális területeken a mRNS-ek mennyisége a 120. napig a kezelések számától függetlenül növekedett, relatív expressziójuk azonban soha nem érte el a kontroll szintet (29. ábra). Az első és második TNBS kezelést követő 90. és 120. nap között a disztális szakaszokon is emelkedett a TGF-beta 3 mRNS-ek relatív szintje, azonban a harmadik dózis után a gén végig represszált állapotban volt (29. ábra).



28. ábra A transzformáló növekedési faktor-beta 3 (TGF-beta 3) mRNS expressziója TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 4. és 8. napon. Kísérleteink során a vastagbél fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. A mRNS expressziót a kontroll (K) mintákban 1-nek tekintettük, és a colitises patkányokban mért értékeket minden esetben ehhez viszonyítottuk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel.



29. ábra A transzformáló növekedési faktor-beta 3 (TGF-beta 3) mRNS expressziója TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 90. és 120. napon. Kísérleteink során a vastagbél korábban fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. A mRNS expressziót a kontroll (K) mintákban 1-nek tekintettük, és a colitises patkányokban mért értékeket minden esetben ehhez viszonyítottuk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel.

IV. 4. 3. A HO-1 mRNS expressziója

IV. 4. 3. 1. A HO-1 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás akut fázisában

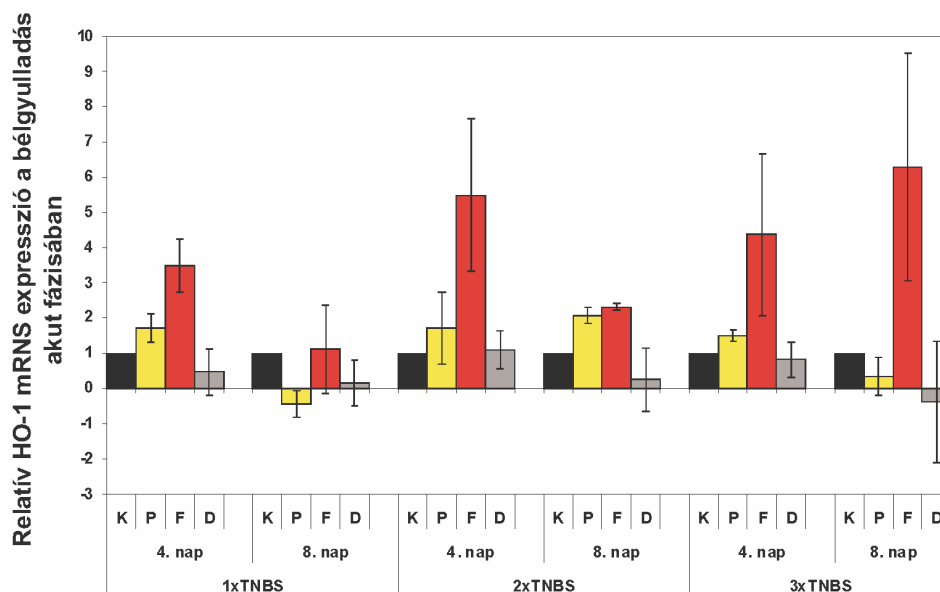
A HO-1 mRNS-ek relatív expressziója a fekélyes colon szakaszokon már az első TNBS kezelést követő 4. napra a kontroll értékek háromszorosára növekedett, és a génexpresszió az ismételt kezeléseket követően fokozódott (30. ábra). Amíg a HO-1 mRNS-ek mennyisége a 8. napig az egyszer és kétszer TNBS-kezelt állatokból származó mintákban csökkent, a harmadik TNBS kezelést követően a 4. és 8. nap között tovább növekedett (30. ábra).

A fekélyes területekhez proximálisan és disztálisan kapcsolódó bélszakaszokon a bélgyulladás akut fázisában a kontroll értékekhez közeli HO-1 mRNS expressziót mértünk. (30. ábra).

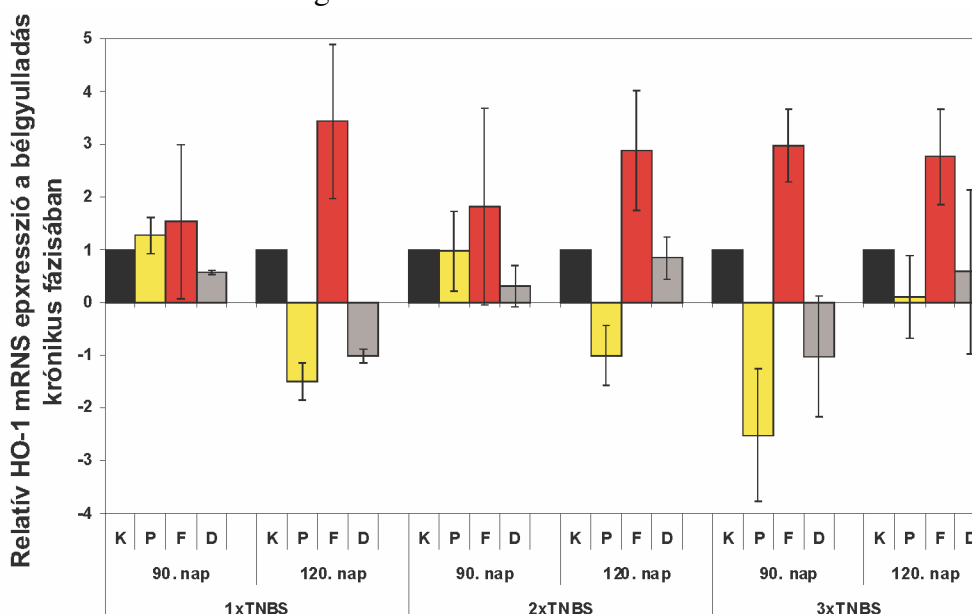
IV. 4. 3. 2. A HO-1 mRNS expressziójának változása a bélgyulladás krónikus fázisában

A HO-1 mRNS-ek relatív expressziója a fekélyes colon területeken az első és ismételt TNBS kezelések utáni 90. és 120. napon is a kontroll értékek többszöröse volt (31. ábra).

A fekélyes területhez proximálisan és disztálisan kapcsolódó bélszakaszokon az első és második TNBS kezelést követő 90. napon a mRNS-ek mennyisége a kontrollhoz hasonló volt. Ezt követően azonban a HO-1 expresszió csökkent, és a 120. napon a gén represszióját figyeltük meg (31. ábra). A HO-1 expresszió gátlását az ép bélszakaszokon a harmadik TNBS kezelés után már a 90. napon detektáltuk, s bár ezt követően a 120. napig a mRNS-ek relatív expressziója növekedett, a kontroll szintet nem érte el (31. ábra).



30. ábra A hemoxigenáz-1 (HO-1) mRNS expressziója TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 4. és 8. napon. Kísérleteink során a vastagbél fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. A mRNS expressziót a kontroll (K) mintákban 1-nek tekintettük, és a colitises patkányokban mért értékeket minden esetben ehhez viszonyítottuk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel.



31. ábra A hemoxigenáz-1 (HO-1) mRNS expressziója TNBS-kezelt (1xTNBS, 2xTNBS, 3xTNBS) patkányok vastagbelében a colitis kiváltását követő 90. és 120. napon. Kísérleteink során a vastagbél korábban fekélyes (F), illetve attól proximálisan (P) és disztálisan (D) elhelyezkedő területeit vizsgáltuk. A mRNS expressziót a kontroll (K) mintákban 1-nek tekintettük, és a colitises patkányokban mért értékeket minden esetben ehhez viszonyítottuk. Az adatokat átlag $\pm$ SD formában tüntettük fel.

V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

V. 1. Kísérletesen indukált Crohn-beteg patkánymodell

Munkánk során a szakirodalomban először létrehoztunk egy olyan TNBS-val indukált colitises patkánymodellt, mely alkalmas a CD-re jellemző fellángoló bélgyulladás akut és krónikus következményeinek vizsgálatára is. A gyulladásos periódusok fellángolását ismételt TNBS kezelésekkel modelleztük, s a korábban közöltekkel ellentétben (Fichtner-Feigl és mtsai., 2005; Zhu és mtsai., 2012) kisebb TNBS dózisokat (10 mg) és alacsonyabb etanol koncentrációt (25%) alkalmaztunk.

A colitises patkányokra jellemző súlyos GI tüneteket (Morris és mtsai., 1989; Sanovic és mtsai., 1999), a véres hasmenést és az aktivitás csökkenését a laboratóriumunkban előállított kísérleti állatokon minden esetben megfigyeltük, de az alacsonyabb TNBS dózisok mellett a mortalitás gyakorlatilag elhanyagolható volt. A patkányok testtömege a TNBS kezelések ismétlését követően is folyamatosan gyarapodott, s a kísérleti periódus végén, a 120. napon már alig különbözött a kontroll állatokétól. Mivel Crohn-betegeknél a súlyos, akár halálos szövődmények nem a betegség akut fázisában, hanem akár sok évvel azután, ma még alig ismert krónikus gyulladásos folyamatok következményeként alakulnak ki (te Velde és mtsai., 2006), az alacsony mortalitás alapvető fontosságú a CD patomechanizmusának vizsgálatára alkalmas kísérletes állatmodellek létrehozásakor.

IBD-ek során a nyálkahártya sérülésének mértéke összefügg a gyulladásos periódusok időtartamával és intenzitásával. Mivel a nyálkahártya regenerációját Crohn-betegek vizsgálatánál a fekélyek elmúlásával azonosítják (Pineton de Chambrun és mtsai., 2010), makroszkópos vizsgálataink során elsőként mi is azt vizsgáltuk, hogy a TNBS kezelések ismétlése befolyásolja-e a nyálkahártya gyulladás mértékét, kiterjedését, vagy a sebgyógyulás időtartamát. Ezért mértük a fekélyek kiterjedését a különböző kísérleti csoportokban. Eredményeink azt mutatták, hogy a TNBS kezelések ismétlésével nemcsak hogy enyhültek az akut bélgyulladást kísérő GI tünetek, de a nyálkahártya fekélyek kiterjedése is egyre kisebb volt az egyszer TNBS-kezelt állatokhoz viszonyítva. Ez alapján feltételezzük, hogy az akut gyulladásos epizódok ismétlődése során olyan strukturális és molekuláris változások történhetnek a bélfalban, amelyek védik, „prekondicionálják” a nyálkahártyát, s így megakadályozzák annak visszafordíthatatlan károsodását.

A betegek életminőségének javítása érdekében az akut nyálkahártya gyulladás kezelése a napi klinikai gyakorlatban nagyon fontos. CD esetén azonban, ahol a gyulladásos folyamat a bélfal minden rétegére kiterjed (Hart és Siew, 2011; Rogler, 2011), a nyálkahártya akut gyulladásának kezelése nem lehet az egyetlen terápiás célpont. Az általunk előállított állatmodell vizsgálata során kapott eredményeink is ezt erősítik. Bár az akut gyulladás többszöri fellángolása után a nyálkahártya regenerációja jól mérhetően felgyorsult, a krónikus szövődmények egyértelműen súlyosbodtak, a bélszűkületek száma és kiterjedése az ismételt TNBS kezelések után megnőtt. Klinikai megfigyelések és az állatkísérletek eredményei is azt mutatják, hogy a szöveti károsodást kísérő hypoxia, s ennek következtében a mikrokeringés megváltozása hozzájárulhat az „irritábilis”, gyulladásos közeli állapot fenntartásához, s így a krónikus szövődmények kialakulásához (Deniz és mtsai., 2003). Gyulladásos bélbetegekből származó mintákban a hypoxia-indukálható faktor (HIF) 1-es és 2-es típusának aktivációja a gyulladt területen a mikroerek denzitásának növekedését okozta (Giatromanolaki és mtsai., 2003). A vastagbél vérkeringése TNBS-val indukált colitises patkányokban már a gyulladás kiváltását követő 1. napon fokozódott, s csak a 14. napon érte el újból a kontroll értéket (Foitzik és mtsai., 1999; Deniz és mtsai., 2003). A disztális colon gyulladt területének elhúzódó vérbőségét (hyperémia) a laboratóriumunkban előállított colitises állatokon is megfigyeltük. A hyperémia a kezelések számától függetlenül az akut fázis végét jelentő 8. napig minden esetben kifejezett volt.

V. 2. A myenterikus neuronok kvantitatív és morfometriai paramétereinek változásai

Fénymikroszkópos kvantitatív immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei szerint a myenterikus neuronok kvantitatív paraméterei, így a neuronok száma és mérete a TNBS kezelések számától függően jelentősen megváltoztak. Mivel patkányokban az öregedési folyamatok során a myenterikus neuronok denzitása csökken, területe pedig nő (Gabella és mtsai., 1970; Phillips és Powley, 2001), adatainkat minden esetben az azonos korú kontroll állatokban mért értékekhez viszonyítottuk.

A myenterikus neuronok száma az irodalmi adatoknak megfelelően (Sanovic és mtsai., 1999; Poli és mtsai., 2001; Linden és mtsai., 2005; Boyer és mtsai., 2005) már az első TNBS kezelés utáni 4. napon szignifikánsan lecsökkent, s a csökkenés a kezelést követő 8. napig tovább fokozódott. A neuronok száma a bélgyulladás kiváltását követően a fekélyes területhez proximálisan és disztálisan kapcsolódó colon szakaszokon is

szignifikánsan csökkent. Ez összhangban van azokkal a klinikai megfigyelésekkel, amelyek szerint a bélidegrendszer sérülése a fekélyes bélszakaszok felől áttérjed a szomszédos proximális bélszakaszokra, s így a bélidegrendszer minden bizonnyal szerepet játszik a bélgyulladás proximális irányú kiterjedésében (Geboes és Collins, 1998; Ferrante és mtsai., 2006; Ohlsson és mtsai., 2007; Sokol és mtsai., 2009). Bár a bélgyulladás disztális irányú terjedéséről klinikai adatokat nem ismerünk, a mi eredményeink nem zárják ki ennek a lehetőségét sem. Az a megfigyelésünk, hogy az ismételt TNBS kezelések után szignifikáns neuronszám csökkenést csak a kezelést követő 4. napig tapasztaltunk, s az is csak a fekélyes területre korlátozódott arra utal, hogy az ismétlődő akut gyulladásos epizódok során a bélfalban aktiválódó védelmi mechanizmusok a gyulladások akut fázisában nem csak a nyálkahártyát, de a bélidegrendszert is megvédik a visszafordíthatatlan károsodásoktól. A vastagbélgyulladás krónikus fázisában a myenterikus neuronok denzitás értékei egyik kísérletes csoportban sem tértek el szignifikánsan az azonos korú kontroll csoportokban mért értékektől. Ez a megfigyelés megengedi azt a feltételezést, hogy az irodalmi adatokkal ellentétben (Marlow és Blennerhassett, 2006) a myenterikus neuronok nem, vagy legalábbis nem elsődleges célpontjai azoknak a bélfalban lejátszódó strukturális és molekuláris eseményeknek, amelyek Crohn-betegekben a striktúrák kialakulásához, s a bélműködés visszafordíthatatlan sérüléséhez vezetnek.

A myenterikus neuronok denzitás értékeinek vizsgálata mellett morfológiai mérésekkel követtük a neuronok méretbeli változásait is a gyulladásos folyamatok különböző fázisaiban. Az első TNBS kezelés után szignifikáns sejtméret csökkenést először a kezelést követő 8. napon, míg az ismételt kezeléseket követően már a 4. napon detektáltunk. Vagyis a sejtméret változás minden állatcsoportban közvetlenül az intenzív sejtpusztulás befejeződése után, s feltehetőleg a sejtpusztulást követő ganglionális átrendeződés során jelentkezett. Ezért feltételezzük, hogy a ganglionális átrendeződést kísérő bonyolult anyagcserefolyamatok során a ganglionokon belül felborulhatott a vízháztartás egyensúlya, s ez vezethetett azután a myenterikus neuronok zsugorodásához. Egy, a múlt évben megjelent közlemény (Zhao és mtsai., 2013) ezt a feltételezésünket alá is támasztotta. A közleményben bemutatott eredmények szerint a gyulladás kiváltását követő 7. napon, vagyis egy nappal azelőtt, amikor mi az első TNBS kezelés után a myenterikus neuronok méretének a csökkenését tapasztaltuk, az aquaporin (AQP) 3 és 8 csatornafehérjék expressziója a colon proximális és disztális szakaszán is lecsökkent, sőt,

az AQP 8 fehérjét a disztális colonban egyáltalán nem tudták kimutatni. A sejtestek mérete bár kisebb mértékben, de a proximális és disztális colon szakaszokon is csökkent. Ez megerősítette azt a feltevésünket, hogy a bélidegrendszer meghatározó szerepet játszik a CD proximális és disztális irányú terjedésében. A vastagbélgyulladás krónikus fázisában a myenterikus neuronok mérete egyik kísérletes csoportban sem tért el az azonos korú kontroll csoportokban mért értékektől.

V. 3. Strukturális és molekuláris változások a bélszűkületek területén

Mivel az irodalmi adatok arra utalnak, hogy a bélnyálkahártya integritásának sérülése nagymértékben hozzájárul a CD krónikus szövődményeinek kialakulásához (Hollander 1993; Yacyshyn és Meddings, 1995; Peeters és mtsai., 1997), transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálataink során először a lamina epithelialis általános morfológiáját vizsgáltuk, ami minden esetben nagyon hasonló volt a kontroll mintákéhoz. A nagy számban előforduló intraepitheliális fehérvérsejtek (intraepithelial lymphocyte; IEL) jelentőségét ebben a munkában nem tanulmányoztuk, hanem elfogadtuk az irodalmi adatokat, miszerint az IEL-ek fiziológiás körülmények között is jelen vannak a bélfalban, s számuk az öregedési folyamatok során jelentősen meg is emelkedhet (Wells és mtsai., 2011). Különös figyelmet fordítottunk ugyanakkor a TJK állapotának vizsgálatára. Méréseink szerint a nyálkahártya enterocitáinak távolsága a harmadik TNBS kezelést követő 90. és 120. napon a kontroll értékekhez hasonló volt, ezért a TJK-at zártan tekintettük. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a bélgyulladás krónikus fázisában a nyálkahártya integritása és ezzel együtt az epitelsejtek közötti ion- és anyagtranszport is helyreállt. Ez azt valószínűsíti, hogy az enterociták nem közvetlen célsejtjei azoknak a bélfalban lejátszódó folyamatoknak, amelyek a CD késői szövődményeinek a kialakulásához vezetnek.

A félvékony metszeteken végzett morfometriai vizsgálatokkal az általunk előállított állatmodellben is igazoltuk azokat a korábbi irodalmi adatokat, miszerint a CD krónikus fázisában a bélfal minden izomrétege jelentősen megvastagszik (Graham és mtsai. 1987, Koukoulis és mtsai. 2001). A megvastagodás időbeni lefutása és mértéke azonban nagyon különbözött a vizsgált izomcsoportokban. Amíg a LMM a kezelést követő 90. napra érte el a legnagyobb vastagságát és a 120. napon mért értékek már megegyeztek a kontroll értékekkel, addig a krónikus fázis 90. és 120. napja között mind a bélfal külső hosszanti, mind a belső körkörös izomrétegben nagyon jelentős további vastagodást mértünk. Ennek

okait tovább keresve elektronmikroszkópos morfológiai méréseket végeztünk, s az izomsejtek között már a krónikus fázis 90. napján nagymértékű ECM felhalmozódást igazoltunk. Irodalmi adatok alapján feltételeztük, hogy az ECM elemek túlermelődését a simaizomsejtek megváltozott MMP9/TIMP1 expressziója okozta (Matthes és mtsai., 1992; Graham és mtsai., 1995; Baugh és mtsai., 1999; von Lampe és mtsai., 2000; Heuschkel, 2000; Medina 2006). Bár munkánk jelenlegi fázisában nem tudjuk pontosan megmondani, hogy milyen molekuláris események vezetnek el az ECM felhalmozódásához, de azt saját vizsgálataink alapján is biztosan mondhatjuk, hogy az MMP9/TIMP1 mRNS expresszió szabályozásában a CD krónikus fázisában valami alapvető hiba történt. Molekuláris vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a harmadik TNBS kezelést követően a MMP9 mRNS-ek relatív szintje a 90. és 120. napon is a kontroll értékek közel nyolcszorosa volt, ugyanakkor a TIMP1 mindkét esetben represszált volt. A MMP-ok a citoplazmában inaktív formában termelődnek, s ha így hozzákapcsolódnak a kollagénnel, akkor a későbbiekben már nem is aktiválódnak (Nagase és Woessner, 1999; von Lampe és mtsai., 2000; Heuschkel és mtsai., 2000; Kirkegaard és mtsai., 2004). Így a fokozott MMP9 mRNS expresszió ellenére a citoplazmából érkező visszajelzés szerint a MMP-ok koncentrációja alacsony, s feltehetően ezért a TIMP-k mRNS expressziója gátolt. Az ECM-nek egy kritikus szint feletti akkumulációja a simaizomsejtek pusztulásához, s így a bél funkciójával összeegyeztethetetlen és visszafordíthatatlan károsodásokhoz, például striktúrák kialakulásához vezethet. Intenzív sejtpusztulásra utalnak a krónikus fázis 90. napján az izomsejtek körül felhalmozódó sejttörmelékek, illetve a kaszpáz-9 proapoptotikus markerrel végzett posztembedding immunhisztokémiai vizsgálataink, amelyekkel a simaizomsejtekben egyértelműen kimutattuk az apoptotikus kaskád beindulását. Feltételezzük, hogy a pusztuló simaizomsejtek helyét további ECM komponensek töltik ki (Sorokin, 2010), így az egészséges sejtek egyre távolabb kerülnek egymástól, valamint az őket innerváló axon terminálisoktól és ICC-ektől is. Emiatt gyors neurodegeneratív folyamatok indulnak be. S bár kvantitatív vizsgálataink azt mutatták, hogy a gyulladás krónikus fázisában sem a sejtszám, sem a sejtek mérete nem tér el a kontroll értékektől, sőt a krónikus fázis 90. napján még a MG-k ultrastruktúrája is a kontrollhoz hasonló volt, a 120. napon a lipofuszcín szemcsék felhalmozódása és a kaszpáz-9 posztembedding immunhisztokémia eredményei is egyértelműen jelzik az apoptotikus folyamatok beindulását.

V. 4. Különböző gyulladásos jelmolekulák expressziójának változása

Kísérleti állatainkban a harmadik TNBS kezelés után a TGF-beta két izoformájának CD-re jellemző, klinikai adatokból ismert expressziós mintázatát a bélgyulladás akut fázisában a fekélyes, míg a krónikus fázisban az ahhoz kapcsolódó ép bélszakaszokon is igazoltuk (McKaig és mtsai., 2002). A TGF-beta 2-t kódoló gén indukálódott, míg a 3-as izoforma génje represszált állapotban volt. Így molekuláris biológiai vizsgálatainkkal is sikerült alátámasztanunk, hogy egy olyan colitises patkánymodellt hoztunk létre, mely alkalmas a CD-re jellemző patológias folyamatok vizsgálatára.

Az antioxidáns HO rendszer szerepét a IBD-eket kísérő oxidatív stressz elleni védelemben mind klinikai, mind kísérletes eredmények alátámasztják (Paul és mtsai., 2005; Inoue és mtsai., 2008; Vijayan és mtsai., 2010). Kísérleteink során a HO-1 indukcióját a colon fekélyes területein már a bélgyulladás kiváltását követő 4. napon kimutattuk. A TNBS kezelések ismétlésével a HO-1 mRNS-ek relatív szintje tovább növekedett, s a nyálkahártya regenerációját követően a krónikus fázisban is végig magas maradt. Giris és mtsai. (2007) megfigyelték, hogy a HO-1 indukciója TNBS-val indukált colitises patkányokban csökkentette a nyálkahártya károsodását. Tamion és mtsai. (2002) pedig patkányokban igazolták a HO-1 prekondicionáló szerepét az iszkémia/reperfúziót követő szöveti károsodás elleni védelemben. Ezért feltételezzük, hogy kísérleti állatainkban a colitis kiváltását követően a nyálkahártya regenerációban és a bélidegrendszer károsodásának kivédésében is szerepet játszó akut prekondicionálás hátterében a HO-1 fokozott expressziója áll. Mivel azonban a bélgyulladás krónikus fázisában az akut gyulladásos folyamatok fellángolásával fokozódó strukturális és molekuláris elváltozásokat figyeltük meg, úgy tűnik a HO-1 aktiválása nem akadályozza meg a CD-re jellemző krónikus szövődmények kialakulását.

V. 5. Következtetések

Mind strukturális szövettani, mind molekuláris biológiai vizsgálataink eredményei bizonyítják, hogy sikerült előállítanunk egy olyan TNBS-val indukált colitises patkánymodellt, mely alkalmas a CD-et kísérő patológias folyamatok akut és krónikus következményeinek a vizsgálatára is.

Kísérleti eredményeink választ adtak a célkitűzéseinkben megfogalmazott kérdésekre:

I. Colitises állatainkban kialakultak az akut bélgyulladásra jellemző GI tünetek, de a mortalitás gyakorlatilag elhanyagolható volt. A patkányok testtömege a TNBS kezelések ismétlését követően is folyamatosan gyarapodott, s a krónikus fázisban már nem különbözött lényegesen a kontroll állatokétól. Bár a nyálkahártya regenerációja a TNBS kezelések ismétlésével felgyorsult, a krónikus szövődmények egyértelműen súlyosbodtak.

II. A myenterikus neuronok száma és területe már az első TNBS kezelést követően mind a fekélyes, mind az ahhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó colon szakaszokon csökkent. Az akut gyulladásos periódusok fellángolásával a myenterikus neuronok kvantitatív paramétereiben egyre kisebb mértékű, s csak a fekélyes területre koncentrálódó változásokat figyeltünk meg.

III. A bélgyulladás krónikus fázisában a myenterikus neuronok denzitása és mérete a fekélyes, illetve ép bélszakaszokon sem tért el szignifikánsan az azonos korú kontroll csoportokban mért értékektől.

IV. Az enterociták közötti TJK a beszűkült colon szakaszokon zártak voltak. A bélfal izomrétegei megvastagodtak, s a MG-okban és a ICC-ekben a 90. és 120. nap között fokozódó strukturális változásokat figyeltünk meg. A simaizomsejtek között ECM elemek halmozódtak fel, melynek hátterében a MMP9 és TIMP1 megváltozott expressziója állhat. Ezért úgy gondoljuk, hogy a striktúrák kialakulását az ECM kóros felhalmozódása okozta, mely a simaizomsejtek innervációjának sérüléséhez vezetett, s ez okozta az izomsejtek pusztulását, majd a ganglionokban a neurodegeneratív folyamatok beindulását.

V. A TGF-beta izoformák kifejeződése a CD-re jellemző mintázatot mutatta. A HO-1 indukcióját a bélgyulladás akut és krónikus fázisában is kimutattuk. Feltételezzük, hogy a colitis kiváltásakor a bélfalban aktiválódó védelmi mechanizmusok hátterében a HO-1 tartósan magas szintje állhat. Ez azonban nem akadályozza meg a CD krónikus szövődményeinek kialakulását.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

VI. 1. Magyar nyelvű összefoglalás

A bélsatorna különböző feladatainak szabályozását egy komplex idegi hálózat, a bélidegrendszer végzi. A bélidegrendszert felépítő neuronok, gliasejtek és Cajal-féle intersticiális sejtek ganglionált plexusokat hoznak létre, így biztosítják a felszívás, a szekréció és a bélperisztaltika összehangolt működését. A külső hosszanti és belső körkörös izomréteg között helyezkedik el a myenterikus plexus, melynek fő feladata a bél motoros funkcióinak szabályozása.

Napjainkban a fejlett nyugati kultúrákban, főleg a fiatal felnőttek körében rohamosan növekszik a gyulladásos bélbeteggek száma. A Crohn-betegség (Crohn's disease, CD) a bélfal ismeretlen eredetű, annak minden rétegére kiterjedő, bélszakaszonként eltérő mértékű gyulladása. A betegeknél a súlyosabb vagy enyhébb gyulladásos folyamatok tünetmentes periódusokkal váltakozhatnak. A CD szövődményeként a korábban gyulladáson átesett területeken a bélfal megvastagszik, szűkületek, striktúrák alakulhatnak ki, mely bélelzáródáshoz, vagy akár halálhoz is vezethet. Bár a striktúrák a CD legsúlyosabb és leggyakoribb szövődményei, kialakulásuk oka még nem ismert.

Az utóbbi évtizedben számos kísérletes állatmodellt dolgoztak ki, melyek jól modellezik a CD-et kísérő akut gyulladásos folyamatokat, azonban egyik sem alkalmas a CD krónikus szövődményeinek vizsgálatára. Ezért munkánk elsődleges célja egy olyan colitises patkánymodell előállítás volt, mely alkalmas a CD-re jellemző gyulladásos és tünetmentes periódusok váltakozását kísérő patológiás folyamatok akut és krónikus következményeinek tanulmányozására. A colitist 2, 4, 6-trinitrobenzénszulfonsavval (TNBS) indukáltuk. A TNBS-t (10 mg) etanolos oldatban (25%) juttattuk a vastagbél disztális területére. A gyulladásos periódusok fellángolását a TNBS kezelések ismétlésével váltottuk ki, s a kezelést követő első és nyolcadik nap között a bélgyulladás akut, míg a hatvanadik és százhuszadik nap között annak krónikus következményeit vizsgáltuk.

A TNBS kezeléseket követően kísérleti állatainkban kialakultak az akut bélgyulladást kísérő gasztrointesztinális tünetek, de a mortalitás gyakorlatilag elhanyagolható volt, a patkányok testtömege folyamatosan gyarapodott a 120 napos kísérleti periódus alatt. Makroszkópos morfológiai vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a nyálkahártyában a fekélyek kiterjedése a TNBS kezelések ismétlésével

folyamatosan csökkent. A krónikus fázisban mégis bélszűkületek alakultak ki, melyek száma és kiterjedése a gyulladásos periódusok fellángolásával növekedett.

Bár a Crohn-beteg páciensek gasztrointesztinális panaszainak jelentős részét a myenterikus neuropátia okozza, a bélidegrendszerben az ismétlődő gyulladásos folyamatok következtében kialakuló strukturális és molekuláris elváltozások a mai napig nem ismertek. Ezért fénymikroszkópos vizsgálataink során HuC/HuD pánneuronális markerrel immunhisztokémiai festéseket végeztünk, és mértük a myenterikus neuronok denzitását és területét a bélgyulladás akut (4. és 8. nap) és krónikus (90. és 120. nap) fázisának különböző időpontjaiban. Irodalmi adatokból ismert, hogy az öregedési folyamatok során az enterikus neuronok száma csökken, méretük pedig nő, ezért az adatokat minden esetben az azonos korú kontroll állatokban mért értékekhez viszonyítottuk. A neuronok denzitása a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően már az első TNBS kezelést követő 4. npra a vastagbél fekélyes, illetve az ahhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó ép területein is szignifikánsan lecsökkent. A 8. napig a fekélyes területen további szignifikáns sejtszám csökkenést detektáltunk. A második és harmadik TNBS kezelés után azonban a neuron pusztulás kisebb mértékű volt, csak a fekélyes területre korlátozódott, a sejtek száma a 4. és 8. nap között már nem csökkent. A bélgyulladás krónikus fázisában a neuronok száma egyik kísérletes csoportban sem tért el szignifikánsan az azonos korú kontroll csoportokban mért értékektől.

A myenterikus neuronok méretének szignifikáns csökkenését minden állatcsoportban közvetlenül az intenzív sejtpusztulás befejeződése után, az első TNBS kezelést követő 8. napon, s az ismételt kezeléseket követő 4. napon detektáltuk. Ezért feltételezzük, hogy a ganglionális átrendeződést kísérő bonyolult anyagcserefolyamatok során a ganglionokon belül felborulhatott a vízháztartás egyensúlya, s ez vezethetett azután a myenterikus neuronok zsugorodásához.

A bélszűkületek területén bekövetkező ultrastrukturális változásokról még keveset tudunk, ezért fény- és elektronmikroszkópos kvantitatív és morfológiai módszerekkel vizsgáltuk a bélfal szövettani szerkezetét a harmadik TNBS kezelést követő bélgyulladás krónikus fázisában kialakult striktúrák területén. Mivel a szomszédos enterociták közötti szoros sejtkapcsolatok szélessége a 90. és 120. napon is a kontrollhoz hasonló volt, megállapítottuk, hogy a nyálkahártya integritása helyreállt. A 90. npra mind a nyálkahártya saját izomrétege, mind a bélfal külső hosszanti és belső körkörös izomrétege megvastagodott. Amíg a nyálkahártyában reverzibilis, addig a külső izomrétegekben

irreverzibilis szövettani elváltozások történtek. A 90. napon a myenterikus ganglionok strukturálisan épnek tűntek, azonban a 120. napon az apoptózis jeleit figyeltük meg. Emellett a ganglionok és a környezetükben elhelyezkedő Cajal-féle intersticiális sejtek és simaizomsejtek körül extracelluláris mátrix elemek halmozódtak fel. A körkörös izomrétegben az extracelluláris mátrix mennyiségére a simaizomsejtek közötti távolságból következtettünk, mely a 90. és 120. napon is a kontroll értékek többszöröse volt. Morfometriai méréseink eredményeit molekuláris biológiai vizsgálatainkkal is sikerült alátámasztanunk. Az extracelluláris mátrix degradációjának szabályozásáért felelős mátrix metalloproteináz 9-et (MMP9) kódoló mRNS-ek fokozott expresszióját a harmadik TNBS kezelést követően a fekélyes, valamint az ahhoz kapcsolódó ép bélszakaszokon is kimutattuk. A vastagbél fekélyes területein ugyanakkor saját szöveti gátlójának (TIMP1) represszióját detektáltuk. A kaszpáz-9 proapoptotikus markerrel végzett posztembeding immunhisztokémiai vizsgálatainkkal a 90. napon a simaizomsejtekben, majd a 120. napon a myenterikus ganglionokban is kimutattuk az apoptotikus kaszkád beindulását.

A továbbiakban megvizsgáltuk azt, hogy különböző molekuláris faktorok hogyan befolyásolják a bélgyulladást kísérő akut és krónikus patológias folyamatokat. Kísérleteink során az antioxidáns hemoxigenáz (HO) rendszer indukálható tagjának, a HO-1-nek fokozott mRNS expresszióját a colon fekélyes területein már a bélgyulladás kiváltását követő 4. napon detektáltuk. A TNBS kezelések ismétlésével a HO-1 mRNS-ek relatív szintje tovább növekedett, s a nyálkahártya regenerációját követően a krónikus fázisban is végig magas maradt. Bár a HO-1 indukciót a bélgyulladás akut fázisában a fekélyes területhez proximálisan is kimutattuk, a krónikus fázisban az enzim az ép bélszakaszokon represszált állapotban volt. A TNBS kezelések ismétlését követően a transzformáló növekedési faktor beta (TGF-beta) citokin 2-es és 3-as izoformájának mRNS expressziója a CD-re jellemző, klinikai adatokból ismert mintázatot mutatta. A TGF-beta 2-t kódoló gén indukálódott, míg a 3-as izoforma génje represszált állapotban volt.

Szövettani és molekuláris biológiai módszerekkel is bizonyítottuk, hogy sikerült előállítanunk egy olyan TNBS-val indukált colitises patkánymodellt, mely alkalmas a CD-re jellemző fellángoló bélgyulladás akut és krónikus következményeinek vizsgálatára is. Feltételezzük, hogy a colitis kiváltását követően a bélfalban aktiválódó védelmi mechanizmusok hátterében a HO-1 fokozott expressziója áll. Bár a nyálkahártya regenerációját elősegítő akut prekondíció az ismétlődő gyulladásos folyamatok során a bélidegrendszerben is érvényesült, nem befolyásolta a krónikus szövődmények

kialakulását. Megállapítottuk, hogy a bélfal izomrétegeinek megvastagodását, s így a striktúrák kialakulását nem a bélnyálkahártya integritásának sérülése, s nem a bélgyulladást kísérő myenterikus neuropátia, hanem az extracelulláris mátrix elemek felhalmozódása miatt a simaizomsejtek innervációjának sérülése okozta.

VI. 2. Summary

Digestive functions are regulated by a complex neuronal network, the enteric nervous system (ENS). The enteric neurons, the interstitial cells of Cajal's and the glial cells organized into two major ganglionated plexuses and direct the processes of absorption, secretion and peristalsis. The motor functions are regulated by the myenteric plexus located between the circular and longitudinal layers of the muscularis externa.

Inflammatory bowel diseases (IBDs) are the group of chronic intestinal inflammatory conditions. Nowadays IBDs are becoming more common in Western societies particularly among young people. Crohn's disease (CD) is a multifactorial, relapsing disorder with chronic inflammation involving all layers of the gut wall. The development of irreversible pathological alterations including stricturing complications in response to the repetitive relapsing inflammations characteristic of CD leading to partial or total intestinal obstruction with potentially life-threatening consequences. Nevertheless, the pathogenesis of strictures is still unclear and no direct therapeutic strategies exist to effectively prevent or reverse this condition.

Over the past two decades, experimental animal models of IBDs have proven to be important tools for detecting potential therapeutic agents and investigating pathogenesis. One of the most widely used Crohn-like model obtained by local application of the haptinizing agent 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). Nevertheless, in most cases the induction of acute enterocolitis with a single high dose of TNBS was not able to generate pathological alterations characteristic to CD not mentioned the high mortality rate. Therefore, we aimed to establish a rat model of chronic colitis suitable to investigate structural and molecular changes in the whole thickness of the gut wall throughout a 120 day experimental period. Repeated administration of TNBS (10 mg) in 25% ethanol was applied to mimic repetitive recurrent inflammations, and between the 1st and 8th day post-induction the acute, while between 60th and 120th day the chronic consequences of colitis were investigated.

TNBS-treated rats displayed severe ulcerative intestinal inflammation, but the mortality was negligible, and a gradual increase of body weight was characteristic in all the rats throughout the experimental period. Irrespectively of the number of treatments the severity of the first symptoms was equivalent however, the length of the recovery time decreased spectacularly after repeated treatments. Besides, alleviated macroscopic mucosal damage and also accelerated mucosal healing were salient in the acute phases of

inflammation after repeated doses. Strictures first appeared 60 days after the TNBS treatments and the frequency of strictures increased until day 120th.

The intestinal symptoms common among CD patients are often caused by intestinal motility abnormalities related to myenteric neuropathy. Although there have been numerous studies of the ENS in inflammation, the structural and molecular changes to the ENS under the repetitive recurrent inflammations have not been studied yet. Therefore light microscopic immunohistochemistry using HuC/HuD as a pan-neuronal marker were used for determine the density and the area of myenteric neurons in different time points of acute (4th and 8th day) and chronic (90th and 120th day) intestinal inflammation in all three TNBS-treated groups. Since age-related loss and swelling of enteric neurons is well documented, data were always compared to age-matched controls.

According to previous data, significant decrease in the number of neurons was first demonstrated 4 days after the administration of a single dose of TNBS, and further significant decrease was demonstrated until day 8th. Moreover, the decrease in myenteric neuronal density was not limited to the apparent inflamed area. Proximal and distal to the inflamed colonic segment significant neuronal loss with smaller scale was noticed 4 days after the first TNBS administration. However after applying repeated doses of TNBS neuronal loss was strictly limited to the inflamed segments of the colon, and did not accelerated between 4th and 8th days. Nevertheless, eight days after the treatments further neuronal loss was not detected, myenteric neuronal numbers were equal with the aged-matched controls.

Shrinkage of neuronal cell bodies was demonstrated in the acute phase of inflammation in the inflamed and also adjacent proximally and distally to the inflamed segment of the colon. Decrease in neuronal size after a single dose of TNBS was demonstrated first at the 8th day, and already at the 4th day after the repeated doses. Since myenteric neuronal loss was completed until these time points, we hypothesized that the inflammation accompanying imbalance of water homeostasis was resulted in the morphometric alterations. In the chronic phase the restoration of impaired morphology of myenteric neurons was observed, which was speeded up after repeated treatments.

Light- and transmission electron microscopic morphometry was used to investigate the ultrastructure of intestinal strictures developed in the chronic phase of the inflammation after the third TNBS treatment. Morphometrical analyzes revealed significant thickening of the lamina muscularis mucosae and the external muscle layers on the 90th day. While

until the 120th day further significant thickening was measured in the external longitudinal and circular muscle layers, the thickness of lamina muscularis mucosae was similar to the controls.

Transmission electron microscopy showed complete reepithelialization in the strictured region. The width of TJs between adjacent epithelial cells did not change compared to controls. Intraepithelial lymphocytes were commonly observed, which contributed to maintaining the functional integrity of the mucosal barrier and ensuring epithelial regeneration. On the day 90th myenteric ganglia and interstitial cells of Cajal's were seemingly intact, while on the day 120th the morphological signs of apoptosis were frequently seen and excess matrix deposition was recorded between smooth muscle cells within the circular muscle layer. The induction of apoptosis was confirmed by quantitative post-embedding immunohistochemistry using anti-caspase-9 primary antibody on the 90th day in the smooth muscle cells and on the 120th day also in myenteric ganglia.

Alterations in mRNA expression of different inflammatory markers and other regulatory molecules under the repetitive relapsing inflammations were investigated by quantitative real-time polymerase chain reaction. Marked increase in the gene expression of the antioxidant enzyme, hemeoxygenase-1 (HO-1) was demonstrated in the inflamed colonic segment already after the 4th day of the single dose of TNBS administration. Overexpression was observed to a great extent after the second and even more after the third treatment, and high level of HO-1 mRNA was sustained even in the chronic phase of inflammation. While induction of HO-1 was also detected adjacent proximally to inflamed segment in the acute phase of the inflammation, gene repression was demonstrated in the non-inflamed sites of the colon in the chronic phase. CD-like expression profile of the transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms was showed after repeated TNBS doses, TGF-beta 2, but not TGF-beta 3 mRNA was upregulated in the inflamed and also in the non-inflamed sites. Matrix metalloproteinase 9 (MMP), which is involved in the remodelling of ECM was upregulated after the third TNBS treatment in all three colonic segments. Nevertheless, downregulation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP1) was detected in the inflamed segment at the same time.

In conclusion, we provided a suitable rat model to investigate acute and also chronic consequences of bowel inflammation characteristic to CD. Our findings indicate that experimentally provoked recurrent repetitive inflammations develop preconditioning effect by speeding up mucosal healing and restoring myenteric neuronal injury. Decreased

severity of gut inflammation after repeated TNBS treatments might be associated with the persistent upregulation of HO-1 expression. However, HO-1 activation could not prevent the development of chronic pathological alterations occurred within the gut wall. Therefore, we suggest that deficient innervation of smooth muscle cells due to the accumulation of extracellular matrix rather than impairment of mucosal barrier function or myenteric neuropathy resulted in stricture formation.

VII. FELHASZNÁLT IRODALOM

Abad C, Juarranz Y, Martinez C et. al. (2005) cDNA array analysis of cytokines, chemokines, and receptors involved in the development of TNBS-induced colitis: homeostatic role of VIP. *Inflamm Bowel Dis.* 11; 674-684.

Abraham C, Cho JH (2009) Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 361; 2066-2078.

Abraham NG, Kappas A (2008) Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev.* 60; 79-127.

Alkahtani R, Mahavadi S, Al-Shboul O, Alsharari S, Grider JR, Murthy KS (2013) Changes in the expression of smooth muscle contractile proteins in TNBS- and DSS-induced colitis in mice. *Inflammation* 36(6); 1304-1315.

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

Baldassano RN, Schreiber S, Johnston JrRB et al. (1993) Crohn's disease monocytes are primed for accentuated release of toxic oxygen metabolites. *Gastroenterology* 105; 60-66.

Baugh MG, Perry M, Hollander A, Davies DR, Cross SS, Lobo AJ, Taylor CJ, Evans GS (1999) Matrix metalloproteinases levels are elevated in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 117; 814-822.

Becker JM (1999) Surgical therapy for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 28; 371-390.

Bene L, Falus A, Baffy N, Fulop AK (2011) Cellular and molecular mechanisms in the two major forms of inflammatory bowel disease. *Pathol Oncol Res.* 17(3); 463-472.

Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4; 197-250.

Bódi N, Talapka P, Poles MZ, Hermes E, Jancsó Zs, Katarova Z, Izbéki F, Wittmann T, Fekete É, Bagyánszki M (2012) Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus. *Microcirculation.* 19(4); 316-326.

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

Bouhnik Y, Benamouzig R, Rybojad M, Matuchansky C, Rambaud JC (1993) Systemic manifestations associated with chronic inflammatory bowel diseases. *Gastroenterol Clin Biol.* 17; 121-129.

Boyer L, Ghoreishi M, Templeman V, Vallance BA, Buchan AM, Jevon G, Jacobson K (2005) Myenteric plexus injury and apoptosis in experimental colitis. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 117; 41–53.

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

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

Busserolles J, Payá M, D'Auria MV et. al. (2005) Protection against 2, 4, 6-trinitrobenzenesulphonic acid-induced colonic inflammation in mice by the marine products bolinaquinone and petrosaspongiolide. *M Biochem Pharmacol.* 69; 1433-1440.

Cavani A, Hackett CJ, Wilson KJ, Rothbard JB, Katz SI (1995) Characterization of epitopes recognized by hapten-specific CD4+ T cells. *J Immunol.* 154; 1232-1238.

Chanok SJ, el Benna J, Smith RM et al. (1994) The respiratory burst oxidase. *J Biol Chem.* 269; 24519-24522.

Collins SM, Blennerhassett P, Vermillion DL, Davis K, Langer J, Ernst PB (1996) The immunomodulation of enteric neuromuscular function: implications for motility and inflammatory disorders. *Gastroenterology* 111; 1683-1699.

Connell ND, Rheinwald JG (1983) Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture. *Cell* 34; 245-253.

Deniz M, Cetinel S, Kurtel H (2003) Blood flow alterations in TNBS-induced colitis: Role of endothelin receptors. *Inflamm Res.* 53; 329-336.

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

Di Sabatino A, Jackson CL, Pickard KM, Buckley M, Rovedatti L, Leakey NA, Picariello L, Cazzola P, Monteleone G, Tonelli F, Corazza GR, MacDonald TT, Pender SL (2009) Transforming growth factor beta signalling and matrix metalloproteinases in the mucosa overlying Crohn's disease strictures. *Gut* 58(6); 777-789.

Dvorak AM, Silen W (1985) Differentiation between Crohn's disease and other inflammatory conditions by electron microscopy. *Ann Surg.* 201; 53-63.

Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO (1991) The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 100; 350-358.

Elson CO, Cong Y, Brandwein S, Weaver CT, McCabe RP, Mahler M, Leiter EH (1998) Experimental models to study molecular mechanism underlying intestinal inflammation. *Ann NY Acad Sci.* 859; 85-95.

Engel MA, Neurath MF (2010) New pathophysiological insights and modern treatment of IBD-EK. *J Gastroenterol.* 45; 571-583.

Faragó N, Kocsis ÁK, Lovas S, Molnár G, Boldog E, Rózsa M, Szemenyei V, Vámos E, Nagy LI, Tamás G, Puskás LG (2013) Digital PCR to determine the number of transcripts from single neurons after patch-clamp recording. *Biotechniques* 54(6); 327-336.

Ferrante M, de Hertogh G, Hlavaty T, D'Haens G, Penninckx F, D'Hoore A, Vermeire S, Rutgeerts P, Geboes K, van Assche G (2006) The value of myenteric plexitis to predict early postoperative Crohn's disease recurrence. *Gastroenterology* 130; 1595-1606.

Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, Strober W, Kitani A (2005) Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF- κ B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest.* 115; 3057-3071.

Foitzik T, Kruschewski M, Kroesen A, Buhr HJ (1999) Does microcirculation play a role in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases? Answers from intravital microscopic studies in animal models: *Int J Colorect Dis.* 14; 29-34.

Forrest A, Huizinga JD, Wang X-Z, Liu LWC (2008) Increase in stretch-induced rhythmic motor activity in the diabetic rat colon is associated with loss of ICC of the submuscular plexus. *Am J Physiol.* 294; 315-326.

Freeman HJ (2003) Natural history and clinical behavior of Crohn's disease extending beyond two decades. *J Clin Gastroenterol.* 37; 216-219.

Freeman, W H Bracegirdle, B (1967) *An Atlas of Histology*, Heinemann Educational Book, London.

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

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

Furness JB, Jones C, Nurgali K, Clerc N (2004) Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol.* 72(2); 143-164.

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

Gabella G (1970) Neuron size and number in the myenteric plexus of the newborn and adult rat. *J. Anat.* 109(1); 81-95.

Galligan JJ (2002) Pharmacology of synaptic transmission in the enteric nervous system. *Curr Opin Pharmacol.* 2(6); 623-629.

Geboes K, Collins S (1998) Structural abnormalities of the nervous system in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Neurogastroenterol Motil.* 10; 189-202.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E, Papazoglou D, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI (2003) Hypoxia inducible factor 1alpha and 2alpha overexpression in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol.* 56; 209-213.

Giris M, Erbil Y, Dogru-Abbasoglu S, Yanik BT, Ahs H, Olgac V, Toker GA (2007) The effect of heme oxygenase-1 induction by glutamine on TNBS-induced colitis. *Int J Colorectal Dis.* 22; 591-599.

Gomes OA, deSouza RR, Liberti EA (1997) A preliminary investigation of the effects of aging on the nerve cell number in the myenteric ganglia of the human colon. *Gastroenterology* 43; 210-217.

Graham MF (1995) Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease – an update. *Inflam Bowel Dis.* 1; 220-227.

Graham MF, Drucker DE, Diegelmann RF, Elson CO (1987) Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. *Gastroenterology* 2; 400-405.

Graham MF, Drucker DE, Diegelmann RF, Elson CO, Lindblad WJ, Gotschalk N, Gay S et al. (1988) Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology* 94; 257-265.

Greenway SE, Buckmire MA, Marroquin C et al. (1999) Clinical subtypes of Crohn's disease according to surgical outcomes. *J Gastrointest Surg.* 3; 145-151.

Guo X, Shin VY, Cho CH (2001) Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. *Life Sci.* 69; 3113-3119.

Hart AL, Siew C (2011) Crohn's disease. *Medicine* 39 (4); 229-236.

Hausmann M, Spottl T, Andus T et al. (2001) Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages. *Clin Exp Immunol.* 125; 48-55.

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

Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SI (2000) Imbalance of stromelysin 1 and TIMP1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 47; 57-62.

Hibi T, Ogata H, Sakuraba A (2002) Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 37; 409-417.

Hollander D (1993) Permeability in Crohn's disease: altered barrier functions in healthy relatives? *Gastroenterology* 104; 1848-1851.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S et. al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411; 599-603.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM et. al. (1996) Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379; 821-823.

Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita Sa, Tsukita Sh (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol.* 171; 939-945.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A et al (2003) Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem.* 278; 5509–5512.

Inoue K, Takahashi T, Uehara K, Shimuzu H, Ido K, Morimatsu H, Omori E, Katayama H, Akagi R, Morita K (2008) Protective role of heme oxygenase 1 in the intestinal tissue injury in hemorrhagic shock in rats. *Shock* 29(2); 252-261.

Izcue A, Coombes JL, Powrie F (2009) Regulatory lymphocytes an intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol.* 27; 313-338.

Jacobson K, McHugh K, Collins SM (1995) Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology* 109; 718-722.

Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM (2004) Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 50(2); 81-92.

Karp SM, Koch TR (2006) Oxidative stress and antioxidants in inflammatory bowel disease. *Dis Mon.* 52; 199-207.

Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS (2010) Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol.* 28; 573-621.

King, C E and Church, J G (1923) The motor reaction of the muscularis mucosae to some drugs. *Am J Physiol.* 66; 428–436.

King, C E and Robinson, M H (1945) The nervous mechanisms of the muscularis mucosae. *Am J Physiol.* 143; 325–335.

King, C E Arnold, L (1922) The activities of the intestinal mucosal motor mechanism. *Am J Physiol.* 59; 97–121.

King, C E, Glass, L C Townsend, S E (1947) The circular components of the muscularis mucosae of the small intestine of the dog. *Am. J. Physiol.* 148; 667–674.

King, C.E, Arnold, L Church, J G (1922). The physiological role of the intestinal mucosal movements. *Am. J Physiol* 61; 80–92.

Kirkegaard T, Hansen A, Bruun E, Brynskov J (2004) Expression and localization of matrix metalloproteinases and their natural inhibitor sin fistulae of patients with Crohn's disease. *Gut* 53; 701-709.

Kirsner, J B (2000) Inflammatory Bowel Disease. 5th ed., W.B.Saunders, Philadelphia.

Koukoulis G, Ke Y, Henley JD, Cummings OW (2001) Obliterative muscularization of the small bowel submucosa in Crohn disease: a possible mechanism of small bowel obstruction. Arch Pathol Lab Med. 125(10); 1331-1334.

Lakhan SE, Kirchgessner A (2010) Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. J Neuroinflamm. 7; 37 (DOI: 10.1186/1742-2094-7-37.)

Lawrance IC, West G, Willis J, Fiocchi C, Chakravarti S (2000) A novel murine method of chronic inflammation induced intestinal fibrosis. (Abstract) Gastroenterology 118; 575

Lembo A, Camilleri, M (2003) Chronic constipation. N Engl J Med. 349;1360–1368.

Linden DR, Couvrette JM, Ciolino A, McQuoid C, Blaszyk H, Sharkey KA, Mawe GM (2005) Indiscriminate loss of myenteric neurones in the TNBS-inflamed guinea-pig distal colon. Neurogastroenterol Motil. 17; 751-760.

Loftus Ev Jr. (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology 126; 1504-1517.

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

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

Louis E (2012) Epidemiology of the transition from early to late Crohn's disease. Dig Dis. DOI: 10.1159/000338129

Madea S, Hsu LC, Liu H et. al. (2005) NOD2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- κ B activity and IL-1 β processing. Science 307; 734-738.

Marlow SL, Blennerhassett MG (2006) Deficient innervation characterizes intestinal strictures in a rat model of colitis. Exp Mol Pathol. 80 (1); 54-66.

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.

Matthes H, Herbst H, Schuppan D, Stallmach A, Milani S, Stein H (1992) Cellular localization of procollagen gene transcripts in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology 102; 431-442.

Mawe GM, Strong DS, Sharkey KA (2009) Plasticity of enteric nerve functions in the inflamed and postinflamed gut. Neurogastroenterol Motil. 21(5); 481-491.

McCarthy JV, Cotter TG (1997) Cell shrinkage and apoptosis: a role for potassium and sodium ion efflux. Cell Death Differ. 4(8); 756-770.

McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ et al. (2002) Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Cell Physiol.* 282; 172-182.

Medina C, Santana A, Paz MC, Diaz-Gonzales F, Farre E, Salas A, Radomski MW, Quintero E (2006) Matrix metalloproteinase-9 modulates intestinal injury in rats with transmural colitis. *J Leucoc Biol.* 79(5); 954-962.

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

Mertz, H R (2003) Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med.* 349; 2136–2146.

Monsen U, Sorstad J, Hellers G, Johansson C (1990) Extracolonic diagnose in ulcerative colitis: an epidemiological study. *Am J Gastroenterol.* 85; 711-716.

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, DePew WT, Szewczuk MR, Wallace JL (1989) Hapten-induced model of colonic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 96; 795-803.

Nagase H, Woessner F (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274; 21491-21494.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N és mtsai. (2001) A frameshift mutation in Nod2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411; 603-606.

Ohlsson B, Veress B, Lindgren S, Sundkvist G (2007) Enteric ganglioneuritis and abnormal interstitial cells of Cajal: Features of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 13; 721-726.

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

Otte JM Rosenberg IM, Podolsky DK (2003) Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology* 124; 1866-1878.

Paul G, Bataille F, Obermeier F, Bock J, Klebl F, Strauch U, Lochbaum D, Rummele P, Farkas S, Scholmerich J, Fleck M, Rogler G, Herfarth H (2005) Analysis of intestinal haem-oxygenase-1 (HO-1) in clinical and experimental colitis. *Clin Exp Immunol.* 140; 547-555.

Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB (2002) Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med.* 33; 311-322.

Peeters M, Geypens B, Claus D, Nevens H, Ghooys Y, Verbeke G, Baert F, Vermeire S, Vlietinck R, Rutgeerts P (1997) Clustering of increased small intestinal permeability in families with Crohn's disease. *Gastroenterology* 113; 802-807.

Phillips RJ, Powley TL (2001) As the gut ages: timetables for aging of innervation vary by organ in the Fisher 344 rat. *J Comp Neurol.* 434; 358-377.

Pineton de Chambrun G, Peyrin-Biroulet L, Lémann M, Colombel JF (2010) Clinical implications of mucosal healing for the management of IBD-EK. *Nat. Rev. Gastroenterol Hepatol.* 7;15-29.

Pluja L, Alberti E, Fernandez E, Mikkelsen HB, Thuneberg L, Jimenez M (2001) Evidence supporting presence of two pacemaker sin rat colon. *Am J Physiol.* 281; 255-266.

Poli E, Lazzaretti M, Grandi D, Pozzoli C, Coruzzi G (2001) Morphological and functional alterations of the myenteric plexus in rats with TNBS-induced colitis. *Neurochem Res.* 26; 1085-1093.

Powel DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999) Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 277; 183-201.

Pravda J (2005) Radical induction theory of ulcerative colitis. *World Journal Gastroenterol.* 11; 2371-2384.

Pucilowska JB, McNaughton KK, Mohapatra NK, Hoyt EC, Zimmermann EM, Sartor RB, Lund PK (2000a) IGF-1 and procollagen $\alpha 1(I)$ are co-expressed in a subset of mesenchymal cells in active Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(6); 1307-1322.

Pucilowska JB, Williams KL, Lund PK (2000b) Fibrogenesis IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279; 653-659.

Quan TE, Cowper SE, Bucala R (2006) The role of circulating fibrocytes in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep.* 8; 145-150.

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

Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Schölmerich J, Rogler G (2007) Wound healing and fibrosis in inteatnal disease. *Gut* 56; 130-139.

Rieder F, Zimmermann EM Remzi FH, Sandborn WJ (2013) Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. *Gut* 62; 1072-1084.

Rogler G (2011) Pathogenesis of strictures in ulcerative colitis: a field to explore. *Digestion* 84; 10-11.

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

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

Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG (1999) Damage to the enteric nervous system in expreimental colitis. *Am J Pathol.* 155(4); 1051-1057.

Sarnelli G, De Giorgio R, Gentile F, Call G, Grandone I, Rocco A, Consenza V, Cuomo R, D' Argenio G (2009) Myenteric neuronal loss in rats with experimental colitis: role of tissue-transglutaminase-induced apoptosis. *Dig Liver Dis.* 41; 185-193.

Shah M, Foreman DM, Ferguson MJ (1994) Neutralising antibody to TGF- β 1, 2 reduces cutaneous scarring in adult rodents. *J Cell Sci.* 107; 1137-1157.

Shah M, Foreman DM, Ferguson MJ (1995) Neutralisation of TGF- β 1 and TGF- β 2 or exogenous addition of TGF- β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci.* 108; 985-1002.

Shen L, Weber CR, Turner JR (2008) The tight junction protein complex undergoes rapid and continuous molecular remodeling at steady state. *J Cell Biol.* 181; 683-695.

Shi XZ, Lindholm PF, Sarna SK (2003) NF-kappa B activation by oxidative stress and inflammation suppresses contractility in colonic circular smooth muscle cells. *Gastroenterologica* 124; 1369-1380.

Simmons JG, Pucilowska JB, Keku TO et al. (2002) IGF-1 and TGF-beta 1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283; 809-818.

Sokol H, Polin V, Lavergne-Slove A, Panis Y, Treton X, Dray X, Bouhnik Y, Valleur P, Marteau P (2009) Plexitis as a predictive factor of early postoperative clinical recurrence in Crohn's disease. *Gut* 58; 1218-1225.

Sorokin L (2010) The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol.* 10(10); 712-723.

Steinhoff MM, Kodner IJ, DeSchryver-Kecskemeti K (1988) Axonal degeneration/necrosis: a possible ultrastructural markers for Crohn's disease. *Mod Pathol.* 1; 182-187.

Strober W, Lúdvíksson BR, Fuss IJ (1998) The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. *Ann Intern Med.* 128(10); 848-856.

Suekane T, Ikura Y, Watanabe K, Arimoto J, Iwasa Y, Sugama Y, Kayo S, Sugioka K, Naruko T, Maeda K, Hirakawa K, Arakawa T, Ueda M (2010) Phenotypic change and accumulation of smooth muscle cells in strictures in Crohn's disease: relevance to local angiotensin II system. *J Gastroenterol.* 45; 821-830.

Talapka P, Bódi N, Battonyai I, Fekete E, Bagyánszki M (2011) Subcellular distribution of nitric oxide synthase isoforms in the rat duodenum. *World J Gastroenterol.* 17(8); 1026-1029.

Tamion F, Richard V, Lacoume Y, Thuillez C (2002) Intestinal preconditioning prevents systemic inflammatory response in hemorrhagic shock. Role of HO-[1]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283; 408-414.

Tanida S, Mizoshita T, Mizushima T, Sasaki M, Shimura T, Kamiya T, Kataoka H, Joh T (2011) Involvement of oxidative stress and mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in inflammatory bowel disease. *J Clin Biochem Nutr.* 48; 112-116.

te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW (2006) Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 12; 995-999.

Tremaine WJ (2011) Diagnosis and treatment of indeterminate colitis. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 12; 826-828.

Turksen K, Troy TC (2004) Barriers built on claudins. *J Cell Sci.* 117; 2435-2447.

Vaday GG, Lider O (2000) Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J Leukoc Biol* 67; 149-159.

Vallance BA, Gunawan MI, Hewlett B et al. (2005) TGF-beta 1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 289; 116-128.

Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P (2004) Medical therapy for Crohn's disease strictures. *Inflamm Bowel Dis.* 10; 55-60.

Van Montfrans, C, Peppelenbosch, M, Te Velde, A A, and Van Deventer, S (2002). Inflammatory signal transduction in Crohn's disease and novel therapeutic approaches. *Biochem Pharmacol.* 64; 789-795.

Van Muijen GN, Ruiter DJ, Warnaar SO (1987) Coexpression of intermediate filament polypeptides in human fetal and adult tissues. *Lab Invest.* 57; 359-369.

Vetrano S, Danese S (2009) The role of JAM-A in inflammatory bowel disease: unveiling the ties that bind. *Ann N Y Acad Sci.* 1165; 308-313.

Vijayan V, Mueller S, Baumgart-Vogt E, Immenschuh S (2010) Heme oxygenase as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol.* 16(25); 3112-3119.

Villanacci V, Bassotti G, Nascimbeni R, Antonelli E, Cadei M, Fisogni S, Salerni B, Geboes K (2008) Enteric nervous system abnormalities in inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterol Motil.* 20; 1009-1016.

Von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, Riecken EO, Rosewicz S (2000) Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 47; 63-73.

Wade P (2002) Age-related changes in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 283; 489-495.

Wallace JL, Le T, Carter L, Appleyard CB, Beck PL (1995) Hapten-induced chronic colitis in the rat: alternatives to trinitrobenzene sulfonic acid. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 33(4); 237-239.

Wang WP, Guo X, Koo MW (2001) Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281; 586-594.

Warwick R, Williams PL (1985) *Gray's Anatomy*. Longman Group Ltd. London p. 1251-1255.

Wells JM, Rossi O, Meijerink M, Baarlen P (2011) Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(1); 4607-4614.

Wells RW, Blennerhassett MG (2004) Persistent and selective effects of inflammation on smooth muscle cell contractility in rat colitis. *Eur J Physiol.* 448; 515-524.

Wester T, O'Briain DS, Puri P (1998) Morphometric aspects of the submucosus plexus in whole-mount preparations of normal human distal colon. *J Pediatr Surg.* 33; 619-622.

Wester T, O'Briain DS, Puri P (1999) Notable postnatal alterations in the myentericus of normal human bowel. *Gut* 44; 666-674.

Whelan G, Farmer RG, Fazio VW et al. (1985) Recurrence after surgery in Crohn's disease Relationship to location of disease (clinical pattern) and surgical indication. *Gastroenterology* 88; 1826-1833.

Wynn TA (2007) Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest.* 117; 524-529.

Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 214; 199-210.

Yacyshyn BR, Meddings JB (1995) CD45RO expression on circulating CD19+ B cells in Crohn's disease correlates with intestinal permeability. *Gastroenterology* 108; 132-137.

Zhao G, Li J, Wang J, Shen X, Sun J (2013) Aquaporin 3 and 8 are down-regulated in TNBS-induced rat colitis. *Biochem Biophys Res Commun.* DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.067.

Zhu MY, Lu YM, Ou YX, Zhang HZ, Chen WX (2012) Dynamic progress of 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid induced chronic colitis and fibrosis in rat model. *J Dig Dis.* 13; 421-429.

VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

Köszönöm munkatársaimnak, Pál Alexandrának és Giricz Zsófiának a kísérletekben nyújtott segítségüket és a sok vidámságot, ami a mindennapjainkat kísérte.

Köszönöm Dr. Rázga Zsoltnak, Dr. Puskás Lászlónak, Nagy Lajosnak és Németh Erikának az elektronmikroszkópos és molekuláris vizsgálatok során nyújtott segítséget.

Hálával tartozom családomnak, különösen Édesanyámnak a sok szeretetért és biztatásért, amellyel támogattak tanulmányaim során.



A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11/1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

IX. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

Teljes közlemények

1. N. Bódi, I. Battonyai, **P. Talapka**, É. Fekete, M. Bagyánszki (2009) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the myenteric plexus of the duodenum of different mammalian species. *Acta Biologica Hungarica* 60(4): 347-358. **IF: 0,504**
2. **P. Talapka**, N. Bódi, I. Battonyai, É. Fekete, M. Bagyánszki (2011) Subcellular distribution of nitric oxide synthase isoforms in the rat duodenum. *World Journal of Gastroenterology* 17(8):1026-1029. **IF: 2,547**
3. N. Bódi, **P. Talapka**, M. Z. Poles, E. Hermes, Zs. Jancsó, Z. Katarova, F. Izbéki, T. Wittmann, É. Fekete, M. Bagyánszki (2012) Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus. 19(4):316-26. **IF: 2,763**
4. Z. Máté, M. Z. Poles, G. Szabó, M. Bagyánszki, **P. Talapka**, É. Fekete, N. Bódi (2013) Spatiotemporal expression pattern of DsRedT3/CCK gene construct during postnatal development of myenteric plexus in transgenic mice. *Cell and Tissue Research* 352(2):199-206. **IF: 3,677**
5. Zs. Rázga, G. Kovács, N. Bódi, **P. Talapka**, JR. Nyengard (2014) Heterogeneous Downregulation of Angiotensin II AT1-A and AT1-B Receptors in Arterioles in STZ-Induced Diabetic Rat Kidneys. *BioMed Research International* DOI: 10.1155/2014/947506. **IF: 2,88**
6. **P. Talapka**, LI. Nagy, A. Pál, M. Z. Poles, M. Bagyánszki, LG. Puskás, É. Fekete, N. Bódi (2014) Alleviated mucosal and neuronal damage at the acute phase of recurrent inflammation in a rat model of Crohn's disease. (submitted)

Nyomtatásban megjelent előadás kivonatok

Idegen nyelven tartott konferencia előadás

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

Magyar nyelven tartott konferencia előadás

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

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

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

Talapka P., Nagy L. I., Pál A., Poles M. Z., Puskás LG., Bagyánszki M., Fekete É., Bódi N. (2013) Strukturális és molekuláris változások Crohn-beteg patkányok bélidegrendszerében. XIV. Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, Románia

Talapka P., Nagy L. I., Pál A., Puskás LG., Poles M., Bagyánszki M., Fekete É., Bódi N. (2013) Strukturális és molekuláris változások Crohn-beteg patkányok bélidegrendszerében. XVI. Tavaszi Szél Konferencia, Sopron, Magyarország

Poszter nemzetközi konferencián

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

R. Á. Nagy, N. Bódi, **P. Talapka**, M. Bagyánszki, É. Fekete, T. Wittmann, F. Izbéki (2011) Effects of acute and chronic quinolinic acid treatment on gastrointestinal motility in mice. 19th United European Gastroenterology Week, Stockholm, Sweden (Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: Gut Supplement No III Vol 60, A313)

N. Bódi, **P. Talapka**, M. Z. Poles, M. Bagyánszki, A. I. Rosztóczy, É. Fekete, F. Izbéki, T. Wittmann (2011) Diabetes-related structural, molecular and functional alterations in capillaries supplying to the myenteric plexus can be responsible for the region-specific nitrergic neuropathy in the gut of streptozotocin-induced diabetic rats. 19th United European Gastroenterology Week, Stockholm, Sweden (Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: Gut Supplement No III Vol 60, A313)

N. Bódi, **P. Talapka**, Zs. Jancsó, M. Z. Poles, E. Hermes, M. Bagyánszki, É. Fekete, F. Izbéki, T. Wittmann (2012) Gut region-specific differences in the cellular and subcellular distribution of nitric oxide synthase isoforms after chronic ethanol exposure in rats. 20th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, The Netherlands (Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: Gut Supplement No III Vol 61, A304)

P. Talapka, L. I. Nagy, M. Poles, L. G. Puskás, É. Fekete, M. Bagyánszki, N. Bódi (2012) Aligned alteration of enteric neurons, smooth muscle cells and inflammatory markers involved in stricture formation in a rat model of Crohn's disease. 20th United European Gastroenterology Week, Amsterdam, The Netherlands (Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: Gut Supplement No III Vol 61, A156)

P. Talapka, L. I. Nagy, M. Poles, L. G. Puskás, É. Fekete, M. Bagyánszki, N. Bódi (2012) Quantitative changes in the density of myenteric neurons and in expression of markers in a rat model of Crohn's disease. International IBRO Workshop, Szeged, Hungary

P. Talapka, L. I. Nagy, M. Poles, L. G. Puskás, É. Fekete, N. Bódi (2012) Aligned alteration of enteric neurons, smooth muscle cells and inflammatory markers involved in stricture formation in a rat model of Crohn's disease. 8th International Conference of PhD Students, Miskolc, Hungary

N. Bódi, **P. Talapka**, G. Varga, T. Tőkés, M. Z. Poles, A. Pál, M. Bagyánszki, J. Kaszaki, É. Fekete, M. Boros (2013) Inhaled methane is preventing an increase in nitrergic myenteric neuron density and enhanced oxidative and nitrosative stress after mesenteric ischemia-reperfusion in rats. 21th United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany (Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: United European Gastroenterology Journal No I A393)

P. Talapka, L. I. Nagy, A. Pál, L. G. Puskás, M. Z. Poles, M. Bagyánszki, É. Fekete, N. Bódi (2013) Experimentally provoked recurrent inflammation improves mucosal healing and restoration of impaired morphology of myenteric neurons in a rat model of Crohn's disease. 21th United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany (Az előadás angol nyelvű kivonata megjelent: United European Gastroenterology Journal No I A205)

P. Talapka, L. I. Nagy, A. Pál, L. G. Puskás, M. Z. Poles, M. Bagyánszki, É. Fekete, N. Bódi (2014) Alleviated mucosal and neuronal damage at the acute phase of recurrent inflammation in a rat model of Crohn's disease. IBRO Workshop, Debrecen, Hungary

N. Bódi, Zs. Jancsó, Zs. Giricz, A. Pál, **P. Talapka**, M. z. Poles, M. Bagyánszki, E. Hermes, É. Fekete (2014) Changes of lysyl-oxidase expression in myenteric ganglia in different gut segments of streptozotocin-induced untreated and insulin-treated diabetic rats. IBRO Workshop, Debrecen, Hungary

Poszter hazai konferencián

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

N. Bódi, Zs. Jancsó, Zs. Giricz, A. Pál, **P. Talapka**, M. Poles, M. Bagyánszki, E. Hermes, É. Fekete (2013) Changes of lysyl-oxidase expression in different gut segments of streptozotocin-induced untreated and insulin-treated diabetic rats. Biomedica Minikonferencia, Szeged, Magyarország