

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**STRUKTURÁLIS ÉS MOLEKULÁRIS VÁLTOZÁSOK
CROHN-BETEG PATKÁNYOK BÉLIDEGRENDSZERÉBEN**

Talapka Petra

Témavezetők:

Prof. Dr. Fekete Éva
professzor emerita

Dr. Bódi Nikolett
egyetemi adjunktus

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék



Szeged

2014

Bevezetés

A bélcsatorna 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 gyulladós bélbetegségek száma. A Crohn-betegség a bélfal ismeretlen eredetű, annak minden rétegére kiterjedő, bélszakaszonként eltérő mértékű gyulladása. A betegeknél a súlyosabb vagy enyhébb gyulladós folyamatok tünetmentes periódusokkal váltakozhatnak. A Crohn-betegség szövődményeként a korábban gyulladáson átesett területeken a bélfal megvastagszik, szűkületek (striktúrák) alakulhatnak ki, mely bélelzáródáshoz vagy akár halálhoz is vezethet. Bár a striktúrák a Crohn-betegség legsúlyosabb és leggyakoribb szövődményei, kialakulásuk oka még nem ismert.

A gyulladós bélbetegségek patogenezisével kapcsolatos ismereteink jelentős része állatkísérletes eredményekből származik. A betegség kémiai indukálása széles körben elterjedt, ilyenkor egészséges állatokat kezelnek a bélfalat károsító anyaggal, melynek hatására a nyálkahártya integritása sérül. Kísérleteink során mi is a kémiai indukciót választottuk a Crohn-betegség modellezésére. A colitist egy haptén molekulával, a 2-,4-,6-trinitrobenzén-szulfonsavval (TNBS) váltottuk ki. A TNBS-at általában etanolban oldva adják be, mely önmagában is károsítja a nyálkahártyát és megkönnyíti az anyag bejutását a sejtek közé. Az epiteliális gát sérülését követően beinduló gyulladós kaszkád mechanizmusok kiesnek az immunrendszer ellenőrzése alól, így a TNBS kovalens kötődése a fehérjékhez egy hosszan elnyúlt, Th1-típusú immunválaszt generál. Általában ezeket az állatmodelleket a bélgyulladás akut hatásainak vizsgálatára használják, a krónikus bélgyulladás szövődményeinek tanulmányozására azonban nem áll rendelkezésünkre megfelelő kísérletes modell.

Irodalmi adatokból tudjuk, hogy a myenterikus neuronok száma már a bélgyulladás akut fázisában drasztikusan lecsökken. Korábbi tanulmányokban már a

colitis kiváltását követő 4. napon 50%-os denzitás csökkenést írtak le, sőt a bélszűkületek területén a myenterikus neuronok teljes hiányát figyelték meg. Bár a Crohn-beteg páciensek gasztrointesztinális panaszainak, úgymint az erős hasi fájdalom, hasmenés, székrekedés jelentős részét a myenterikus neuropátia okozza, a bélidegrendszerben az ismétlődő gyulladásos folyamatok következtében kialakuló strukturális és molekuláris elváltozások a mai napig nem ismertek.

A bélgyulladás kiváltását követően az immunválasz kialakításáért felelős sejtek, így a T-limfociták, az antigén prezentáló dendritikus sejtek valamint a makrofágok különböző citokineket termelnek. A gyulladásgátló transzformáló növekedési faktorbetát (TGF-beta) a szuppresszor T-sejtek termelik. A TGF-beta 2 elősegíti az extracelluláris mátrix elemek felhalmozódását, s így a hegesevést a sérült szövetekben. A TGF-beta 3 ellentétes hatású, ugyan segíti az epitélium regenerációját, de eközben nem indít el fibrotikus folyamatokat. Korábbi kísérletek során kimutatták, hogy Crohn-betegségben a TGF-beta 2-es izoformájának génje indukálódott, míg a 3-as izoforma génje represszált állapotban volt.

A szöveti sérüléskor keletkező reaktív oxigéngyökök semlegesítésében kulcsszerepet tölt be az endogén antioxidáns rendszer indukálható tagja, a hemoxigenáz-1 (HO-1). A sebgyógyulás során felhalmozódó extracelluláris mátrix elemeket a mátrix metalloproteinázok (MMP) bontják le. A MMP9 a IV. és V. típusú kollagén molekulák degradációját okozza, működését saját szöveti gátlója (TIMP1) szabályozza.

Célkitűzések

Doktori munkám elsődleges célja egy olyan krónikus bélgyulladásos patkánymodell előállítása volt, amely alkalmas a Crohn-betegségre jellemző gyulladásos és tünetmentes periódusok váltakozását kísérő patológias folyamatok tanulmányozására. Különös hangsúlyt fektettünk a Crohn-betegség legsúlyosabb krónikus szövődményeként megjelenő bélszűkületek kiváltó okainak vizsgálatára. Az állatmodell előállításakor a fellángoló bélgyulladásokat ismételt TNBS kezelésekkel modelleztük. A kezeléseket követő második és nyolcadik nap között a bélgyulladás akut, míg a hatvanadik és százhuszadik nap között annak krónikus következményeit vizsgáltuk fény- és elektronmikroszkópos morфомetriai, immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Melyek azok a paraméterek, amelyeknek meg kell felelnie a krónikus bélgyulladás, és speciálisan a Crohn-betegség krónikus szövődményeként megjelenő striktúrák vizsgálatára alkalmas patkánymodellnek?
- Hogyan változnak a myenterikus neuronok kvantitatív paraméterei a gyulladás akut fázisában?
- Milyen változások történnek a myenterikus neuronok kvantitatív paramétereiben a gyulladás krónikus fázisában?
- Van-e a bélfalnak olyan strukturális eleme, amelynek kitüntetett szerepe lehet a striktúrák kialakulásában?
- Hogyan változik a Crohn-betegségre jellemző gyulladásos jelmolekulák expressziós mintázata?

Anyagok és vizsgálati módszerek

Kísérleteinkhez 200-220 g-os felnőtt, hím patkányokat használtunk. A vastagbélgyulladást lokálisan a colonban egy 8 cm-es polietilén kanül segítségével, TNBS-val indukáltuk. A gyulladásos és tünetmentes periódusok fellángolását a TNBS kezelések ismétlésével, két hetes időeltolódással idéztük elő, így kontroll, egyszer, kétszer és háromszor kezelt kísérleti csoportokat alakítottunk ki. A kontroll állatokat fiziológiás sóoldattal kezeltük. A patkányok testtömegét és állapotát hetente mértük és ellenőriztük. Az egyes kísérleti csoportokba tartozó állatokat a kezeléseket követően meghatározott időpontokban áldoztuk fel a bélgyulladás akut (2., 4. és 8. nap) és krónikus (60., 90. és 120. nap) fázisában. A makroszkópos vizsgálatokhoz a colon aborális részéről közvetlenül a kiboncolás után digitális felvételeket készítettünk, majd mértük a nyálkahártyában kialakult fekélyek kiterjedését.

A fénymikroszkópos és molekuláris biológiai vizsgálatokhoz a bélgyulladás akut fázisában a colon fekélyes részéről, illetve az ahhoz proximálisan és disztálisan kapcsolódó épnek tűnő területekről vettünk mintákat. Bár a krónikus fázisban fekélyeket már nem láttunk, a sebgyógyulást kísérő hegesedés miatt a korábbi fekélyes területet el tudtuk különíteni a vastagbél makroszkóposan épnek tűnő szakaszaitól, így ezekben az időpontokban is tudtunk mintákat venni mindhárom colon területről. A bélszakaszokból bélnyúzat preparátumokat készítettünk, melyeken HuC/HuD pán-neuronális markerrel jelöltük a myenterikus neuronokat. A neuronok denzitását a laboratóriumunkban korábban kifejlesztett Plexus Pattern Analysis szoftver segítségével határoztuk meg. Ezt követően az Image J morfometriai szoftver segítségével mértük a sejtek területét is. A kontroll és colitises állatokból származó szövethomogenizátumokban kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció segítségével meghatároztuk a TGF-beta 2 és 3, a HO-1, valamint a MMP9 és TIMP1 mRNS expresszióját.

Fény- és elektronmikroszkópos kvantitatív és morfometriai módszerekkel vizsgáltuk a bélfal szövettani szerkezetét a harmadik TNBS kezelést követő bélgyulladás krónikus fázisában kialakult striktúrák területén. Mértük a szomszédos enterociták közötti szoros sejtkapcsolatok szélességét, a nyálkahártya saját

izomrétegének, valamint a bélfal külső hosszanti és belső körkörös simaizomrétegeinek vastagságát. Meghatároztuk a bélfal simaizomsejtjeinek távolságát, melyből következtetni tudunk az extracelluláris mátrix mennyiségére is. Kaszpáz-9 proapoptotikus marker segítségével posztembedding immunhisztokémiai festést végeztünk, melynek segítségével azt vizsgáltuk, hogy beindulnak-e az apoptotikus folyamatok a myenterikus ganglionokban és azok mikrokörnyezetében.

A TNBS kezelt állatokból származó mintákat minden esetben az azonos korú kontroll állatokból nyert mintákkal hasonlítottuk össze. Az adatokat egyfaktoros varianciaanalízisnek és Newman-Keuls tesztnek vetettük alá.

Eredmények

Colitises kísérleti állatainkban kialakultak az akut bélgyulladást kísérő gasztrointesztinális tünetek, de a mortalitás gyakorlatilag elhanyagolható volt és 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 bélszűkületek alakultak ki, melyek száma és kiterjedése a gyulladós periódusok fellángolásával növekedett.

A myenterikus neuronok denzitása a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően már az első TNBS kezelést követő 4. napon a vastagbél fekélyes, illetve ahhoz kapcsolódó épnek tűnő területeken is lecsökkent, és 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, s a sejtek száma a 4. és 8. nap között nem csökkent tovább. A myenterikus neuronok méretének szignifikáns csökkenését minden állatcsoportban közvetlenül az intenzív sejtpusztulás befejeződése után, az első TNBS kezelést követő 8. napon, és az ismételt kezeléseket követő 4. napon figyeltük meg.

A bélgyulladás krónikus fázisában a neuronok száma egyik kísérletes csoportban sem tért el szignifikánsan az azonos korú kontroll csoportokban mért értékektől. A fekélyes colon szakaszon a neuronok területe az első TNBS kezelést követően a gyulladás krónikus fázisban is szignifikánsan kisebb volt a kontroll mintákban mért értékeknél, azonban a kétszer és háromszor kezelt állatokból származó mintákban már a kontrollhoz hasonló értékeket mértünk.

A szomszédos enterociták közötti szoros sejtkapcsolatok szélessége a bélszűkületek területén a 90. és 120. napon is a kontrollhoz hasonló volt. A 90. napon mind a nyálkahártya saját izomrétege, mind a bélfal külső hosszanti és belső körkörös simaizomrétege megvastagodott. Amíg a nyálkahártya saját izomzatában reverzibilis, addig a bélfal külső izomrétegeiben irreverzibilis szövettani elváltozások történtek. A körkörös izomrétegben a simaizomsejtek távolsága a 90. és 120. napon is a kontroll értékek többszöröse volt. A kaszpáz-9 proapoptotikus markerrel végzett

posztembedding immunhisztokémiai vizsgálatainkkal a 90. napon a simaizomsejtekben, majd a 120. napon a myenterikus ganglionokban is kimutattuk az apoptotikus kaszkád beindulását.

Kísérleteink során a HO-1 fokozott mRNS expresszióját a colon fekélyes területein már a bélgyulladás kiváltását követő 4. napon kimutattuk. A TNBS kezelések ismétlésével a HO-1 mRNS 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 épnek tűnő bélszakaszokon represszált állapotban volt. A TNBS kezelések ismétlését követően a TGF-beta citokin 2-es és 3-as izoformájának mRNS expressziója a Crohn-betegségre jellemző, klinikai adatokból ismert mintázatot mutatta. A TGF-beta 2-t kódoló gén indukálódott, míg a 3-as izoforma génje represszált állapotban volt. A MMP9-et kódoló mRNS relatív expressziója a harmadik TNBS kezelést követően a fekélyes, valamint az ahhoz kapcsolódó épnek tűnő bélszakaszokon is a kontroll értékek többszöröse volt. A vastagbél fekélyes területein ugyanakkor a TIMP1 represszióját figyeltük meg.

Eredmények megbeszélése

Szövettani és molekuláris biológiai módszerekkel is bizonyítottuk, hogy sikerült előállítanunk egy olyan TNBS-val indukált colitises patkánymodellt, mely egyaránt alkalmas a Crohn-betegségre jellemző fellángoló bélgyulladás akut és krónikus következményeinek vizsgálatára. A TGF-beta izoformák kifejeződése a Crohn-betegségre jellemző mintázatot mutatta, és a bélgyulladás krónikus fázisában bélszűkületek alakultak ki.

Mivel a fekélyek kiterjedése a TNBS kezelések ismétlésével csökkent, feltételezzük, hogy a Crohn-betegség kialakulásával párhuzamosan érvényesül egy nyálkahártya védő, prekondicionáló hatás. A gyulladásos periódusok fellángolásával a myenterikus neuronok kvantitatív paramétereiben is egyre kisebb mértékű és csak a fekélyes területre koncentrálódó változásokat figyeltünk meg. Feltételezzük, hogy a bélfalban aktiválódó védelmi mechanizmusok hátterében a HO-1 tartósan magasan szintje állhat.

A bélgyulladás krónikus szövődményei a gyulladásos folyamatok ismétlésével mégis egyértelműen súlyosbodtak. Megállapítottuk, hogy a bélfal izomrétegeinek megvastagodását, és így a striktúrák kialakulását nem a bélnyálkahártya integritásának sérülése, és nem a bélgyulladást kísérő myenterikus neuropátia okozta. A MMP9 és a TIMP1 megváltozott expressziója miatt a simaizomsejtek között extracelluláris mátrix elemek halmozódtak fel. Emiatt az izomsejtek és a myenterikus ganglionok közötti távolság nőtt, mely az innerváció sérüléséhez vezetett. Eredményeink szerint a myenterikus ganglionokat és azok mikrokozonyezetét érintő strukturális változások a 90. és 120. nap között fokozódtak, és ez okozhatta először a simaizomsejtek apoptotikus, majd a ganglionok neurodegeneratív folyamatainak beindulását.

Közlemények listája

Az értekezéshez kapcsolódó teljes közlemények

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)

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: 2,574**

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: 0,551**

Az értekezéshez nem kapcsolódó, egyéb teljes közlemények

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. Microcirculation 19(4):316-26. **IF: 2,763**

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**

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**

Összesített impakt faktor: 12,445

Nyomtatásban megjelent, impakt faktorral rendelkező konferencia kivonatok

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. Gut 59 (Suppl III) A91 **IF: 10,732**

N. Bódi, **P. Talapka**, M. Bagyánszki, A. Rosztóczy, É. Fekete, T. Wittmann, F. Izbéki (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. Z Gastroenterol. 48:598-599 **IF: 1,131**

N. Bódi, **P. Talapka**, M. Poles, M. Bagyánszki, A. I. Rosztóczy, É. Fekete, F. Izbéki, T. Wittmann (2011) Diabetes-related structural, molecular and functional alterations in capillaries supplying to the myenteric plexus can be responsible for the region-specific nitrergic neuropathy in the gut of streptozotocin-induced diabetic rats. 19th United European Gastroenterology Week, Stockholm, Sweden. Gut 60 (Suppl 3) A313 **IF: 10,732**

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. Gut 60 (Suppl 3) A313 **IF: 10,732**

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) **IF: 10,732**

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)
IF: 10,732

Mária Bagyánszki, Ph.D.
egyetemi adjunktus



Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai
Kar, Élettani, Szervezettani és
Idegtudományi Tanszék
6722 Szeged, Közép fasor 52.
Tel: 36/62/544-123
Fax: 36/62/544-149
e-mail: bmarcsi@bio.u-szeged.hu

NYILATKOZAT

Kijelentem, hogy Talapka Petra

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**

címmel megjelent közleményekben végzett munkája meghatározó jelentőségű, s ezen közleményeket mindeddig nem használtuk fel doktori fokozat megszerzésére, min ahogyan azt a jövőben sem fogjuk tenni.

Dr. Bagyánszki Mária
felelős szerző

Szeged, 2014. március 5.