

Bevezetés

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

A bélidegrendszer felépítésére jellemző, hogy a neuronhálózatok a bélfal különböző szöveti rétegeiben, vagy azok között helyezkednek el. A neuronhálózatok (plexusok) közül kettőben a neuronok ganglionokba tömörülnek és a ganglionok közötti kapcsolatot az ún. internodális szegmensek biztosítják. A myentericus plexus a bélfal simaizomrétegei között helyezkedik el és a bélperisztaltika összehangolt működéséért felelős. A submucosus plexus a nyálkahártya szekrécióját, a felszívást és az endokrin funkciókat szabályozza.

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

A bélidegrendszerben a NO a fő gátló neurotranszmitter, kulcsszerepet játszik a perisztaltikus reflex leszálló gátlásának kiváltásában, a myentericus plexus által termelt NO szabályozza a bélmotilitás relaxációs komponensét. Farmakológiai és génkiütés kísérletek bizonyították a nNOS által termelt NO szerepét a bélcsatorna simaizmának ún. nem-adrenerg nem-kolinerg (NANC) relaxációjában. Specifikus nNOS gátlókkal a bélfal simaizomrelaxáció csökkenthető. A NO rendkívül fontos szerepet játszik a bélcsatorna patológiás elváltozásaiban is. A tápcsatorna motilitásának finoman szabályozott folyamatában beálló rendellenességeknek hátterében gyakran a bélidegrendszer nitrerg neuronjainak pusztulása és/vagy elégtelen működése áll. Ilyen betegség például a nyelésképtelenség (achalasia). Ezen túl a cukorbetegség kísérő tüneteként megfigyelhető motilitási rendellenesség hátterében is kimutatták a nNOS fehérje expressziójának csökkenését és a nitrerg neuronok szelektív pusztulását.

Irodalmi adatok alapján már régóta ismert, hogy a szeszes italokban található alkohol vagy etanol (etil-alkohol, C_2H_5OH) gátolja a tápanyagok, köztük sok vitamin felszívódását, valamint károsítja a vékonybél nyálkahártyáját és így az alkoholistákra jellemző hiányos tápláltsághoz vezet. Az alkoholfogyasztás káros hatással van a bélcsatorna immunrendszerére is, immunhiányos állapotot eredményez és így növeli a fertőzés esélyét. Általában elmondható, hogy az alkohol egészségre káros hatása férfiaknál $>40g$ etanol/testtömegkg/nap, nőknél >20 etanol/testtömegkg/nap alkoholfogyasztás esetén következik be. Az elfogyasztott alkohol 20%-a a gyomorban, míg a maradék 80%-a a duodenum és a jejunum területén szívódik fel egyszerű diffúzióval. A bevitt etanolhoz hasonló magas koncentráció csak a vékonybél gyomorhoz közeli szakaszaiban, a duodenumban és a jejunumban fordul elő. A bélcsatorna további szakaszaiban a bél lumenében lévő alkoholkoncentráció megegyezik a vér alkoholkoncentrációjával, amiből arra lehet következtetni, hogy a lumenbe az alkohol a véráramból lép be.

Az alkohol igen jelentős hatással van a bélcsatorna motilitására, ennek pontos mechanizmusa azonban ezidáig nem ismert. A perisztaltika megváltozása igen komoly bélrendszeri problémákhoz vezet, többek között kedvez a baktériumok felszaporodásának és így az endotoxinok és egyéb toxinok felhalmozódásának. A tranzit lassulása bélpangáshoz és a tápanyagok elégtelen felszívásához vezet, ezek a tünetek pedig nagymértékben hozzájárulnak a betegek életminőségének romlásához.

Célkitűzések

Mivel a NO szabályozza a perisztaltikus reflex leszálló gátlását, feltételeztük, hogy a NO és szintetizáló enzimeik szerepet játszanak a krónikus alkoholfogyasztást követő megváltozott motorikus funkciókban.

Kísérleteink során a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Hogyan változik meg az egér bélcsatorna motilitása *in vivo*, krónikus alkoholfogyasztást követően?
- Változik-e a nitrerg neuronok által szabályozott simaizom-relaxáció krónikus alkoholfogyasztás után egér jejunumból készült myentericus plexus-simaizom preparátumban?
- Változik-e a nNOS-immunpozitív myentericus neuronok száma és az összneuronszám alkoholfogyasztást követően?
- Változik-e a myentericus neuronok által termelt NO mennyisége alkoholfogyasztás után?
- A NO-t szintetizáló neuronok és a nNOS-immunreaktív neuronok ugyanazok-e?
- Változik-e, és ha igen, milyen mértékben a cNOS és iNOS enzimek aktivitása krónikus alkoholfogyasztást követően a patkány bélcsatorna különböző szakaszain?
- Változik-e az eNOS és nNOS enzimek mennyisége alkoholfogyasztás után a patkány bélcsatorna különböző szakaszaiból készített homogenizátumokban?

Anyagok és módszerek

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

Felhasznált állatok

Két hónapos felnőtt Swiss egereket a kísérletek kezdetekor három csoportra osztottunk. Két kontroll csoportra, az egyik vizet, a másik az alkohollal megegyező energiatartalmú szacharózoldatot kapott, és egy alkoholkezelt csoportra. Az alkoholkezelt csoport a 10% és 15% etanoltartalmú két hetes adaptációs periódust követően még 3 hétig kapta a 20% etanol vizes oldatát. Az elfogyasztott folyadékot és az állatok súlyát folyamatosan mértük az 5 hét alatt. A napi alkoholfogyasztás átlagosan 7,8 g etanol/testtömeg kg volt. Patkányok esetében a kontroll csoport vizet, míg az alkoholkezelt csoport az első héten 10% (v/v), a második héten 15%-os etanol vizes oldatát kapta. E két hét adaptációs periódust követően az alkoholkezelt csoport még 6 hétig fogyasztott 20%-os etanolt. A napi alkoholbevitel 5 g etanol/testtömeg kg volt.

In vivo tranzitvizsgálat

Az egerektől 12 órával a kísérlet kezdete előtt megvontuk a táplálékot, majd éteres altatásban Evans-kék festéket juttattunk a gyomorba. Tizenöt perc elteltével az állatokat feláldoztuk. Ezután lemértük a pylorus és az Evans-kék legtávolabbi migrációs pontja közötti távolságot és az értéket a Evans-kék migrációjának százalékában fejeztük ki, ahol a 100% a vékonybél teljes hossza.

In vitro simaizom-relaxáció mérés

A kiboncolt jejunumot jéghideg Krebs pufferbe helyeztük, a mezentérium mentén felvágtuk és a nyálkahártyát és az alatta lévő kötőszövetes réteget eltávolítottuk. Az így elkészített preparátumokat szervedényekbe helyeztük ahol a preparátum alsó vége rögzítve volt, a felső végét pedig egy erőátalakítóhoz csatlakoztattuk, amely folyamatosan mérte az izometrikus összehúzódások mértékét. Guanetidint és atropint használtunk az adrenerg és kolinerg válasz gátlására. Az ideg-izom preparátumokat prosztoglandin $F_{2\alpha}$ segítségével prekontraháltattuk és a NANC relaxációt elektromos mező stimuláció, NO és glicerol trinitrát hozzáadásával

váltottuk ki. NOS inhibitorként nitro-L-arginint használtunk. Az ideg-izom preparátumok relaxációjának mértékét a prosztaglandin $F_{2\alpha}$ által kiváltott kontrakcióra adott relaxációs válasz százalékában fejeztük ki.

Neuronális NOS-, PGP9.5- és HuC/D-immunhisztokémia és sejtszámolás

A neuronális NOS izoforma kimutatásához nNOS ellenanyagot, pánneuronális markerként pedig PGP9.5 és HuC/D ellenanyagot használtunk. Egér minták esetében a preparátumokat Zeiss Axiophot mikroszkóppal vizsgáltuk majd 20 random választott látótérben számoltuk az egy látótérbe eső nNOS- és PGP9.5-immunoreaktív sejteket. Patkány mintáknál a wholemountokat Zeiss Axiovert 200M fénymikroszkóppal és a hozzá tartozó Zeiss AxioCam HRc kamerával vizsgáltuk. Wholemounthonként 20 random választott, azonos felbontású, méretű és nagyítású digitális képet készítettünk. A digitális képeken látható immunfestett sejteket a Plexus Pattern Analysis szoftver segítségével számoltuk meg.

NO felszabadulás mérése fluoreszcens festékkel élő szövetben

A myentericus plexus-simaizom preparátumokat DAF-FM fluoreszcens festékben inkubáltuk, majd digitális felvételeket készítettünk Zeiss Axiovert 100M mikroszkóppal Zeiss LSM 510 konfokális mikroszkóp rendszerben. A különböző mintákban lévő fluoreszcens értékek összehasonlíthatóságának érdekében minden felvételt azonos mikroszkóp beállítások mellett készítettünk. A digitális felvételeken a neuronokat körberajzoltuk és a Zeiss LSM 510 V2.53 analízáló szofver segítségével megállapítottuk a neuronok átlag fluoreszcencia értékét.

cNOS és iNOS aktivitásmérés

A krónikus alkoholfogyasztás hatását a cNOS és iNOS enzimek aktivitására a patkány bélcsatorna duodenum, jejunum, ileum és colon szakaszaiban határoztuk meg és az eredményt fmol/mg fehérje/perc mértékegységben tüntettük fel. Az aktivitásmérés [3 H]L-citrullinból átalakult [3 H]L-arginin mennyisége alapján állapítottuk meg.

eNOS és nNOS fehérjemennyiség meghatározása Western blottal

Western blotra SDS-poliakrilamid gél elektroforézist használtunk. Elsődleges ellenanyagok a következők voltak: egér anti-nNOS, anti-eNOS és anti- β -aktin. A kiértékelés három független nNOS-sal illetve eNOS-sal festett bloton történt. Belső kontrollként minden esetben β -aktint használtunk.

Eredmények

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

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

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

megnövekedett FI valószínűleg más NOS izoformák által termelt NO-tól származik, ez a NO azonban nem alkalmas a megfelelő mértékű simaizomrelaxáció kiváltására.

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

Összefoglalás

Két különböző, egymástól független kísérletsorozat alapján kimutattuk a NO-rendszer érintettségét patkány és egér béliidegrendszerben krónikus alkoholfogyasztást követően.

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

Ezek a kísérleti eredmények alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a krónikus alkoholfogyasztás a központi idegrendszerhez hasonlóan a béliidegrendszerben is hatással van a NO szintézisére. A nitrerg rendszerben bekövetkezett változás pedig szerepet játszhat az alkoholisták betegek gasztrointesztinális motilitási rendellenességeinek kialakulásában.

Teljes közlemények:

1. **Krecsmarik M**, Izbéki F, Bagyánszki M, Linke N, Bódi N, Kaszaki J, Katarova Z, Szabó Á, Fekete É, Wittman T (2006) *Chronic ethanol exposure impairs neuronal nitric oxide synthase in the rat intestine*. Alcohol Clin Exp Res, Vol 30, No 6, 967–973 IF:2.63
2. **Krecsmarik M**, Katarova Z, Bagyánszki M, Szabó G, Fekete É (2004) *Gastrointestinal phenotype of GAD67lacZ transgenic mice with early postnatal lethality*. Histol. Histopathol. 20: 75-82 IF:2.02
3. Román V, Bagyánszki M, **Krecsmarik M**, Horváth A, Resch B. Á, Fekete É (2004) *Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the developing myenteric plexus of the human fetal intestine*. Cytometry 57A(2):108-12. IF:2.11
4. Román V, **Krecsmarik M**, Bagyánszki M, Fekete É (2001) *Evaluation of the total number of myenteric neurons in the developing chicken gut using cuproinic blue histochemical staining and neurofilament immunocytochemistry*. Histochem Cell Biol 116:241-246. IF:2.23

Nyomtatásban megjelent kivonatok:

1. **Krecsmarik M**, Winter BY de, Man JG de, Bagyánszki M, Nassauw L Van, Fekete É, Pelckmans PA, Timmermans J-P *Chronic alcohol consumption impairs nitrergic inhibition in the mouse small intestine*. Digestive Disease Week and the 107th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, Los Angeles, USA. Gastroenterology 2006 Apr; 130 (4 suppl 2) A1-911 IF:12.38
2. Izbéki F, **Krecsmarik M**, Szabó S, Kaszaki J, Kuris A, Bagyánszki M, Rosztóczy A, Fekete É, Wittmann T *Decreased number of nitrergic and serotonergic cells in the small intestine of chronic alcohol-treated rats*. 12th European Neurogastroenterology and Motility Meeting. Neurogastroenterol Motil 2004 16(6) 829-873 IF:2.56

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, a tézisekben és a közleményekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, és azokat ilyen célra a jövőben sem fogom felhasználni.

A Jelölt mint társszerző a felsorolt közlemények létrehozásához (Cytometry 2004, 57A(2):108-12; Histochem Cell Biol 116:241-246) jelentős mértékben járult hozzá.

Szeged, 2006. november 03.

Dr. Fekete Éva

.....