

EGYETEMI DOKTORI (PhD) TÉZISEK

**NITROGÉN-MONOXID TARTALMÚ IDEGELEMEK
A GYOMOR-BÉLCSATORNÁBAN**

Dr. Altdorfer Károly



Programvezető: Dr. Fehér János, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Fehér Erzsébet, egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem
Budapest
2003

Bevezetés

A béltraktus működésének fontos szabályozó mechanizmusa a leszálló gátló beidegzés, mely lokális idegi reflexeken keresztül történik. A simaizomzat relaxációjáért döntően a non-adrenerg, non-kolinerg (NANC) idegelemek a felelősek, ezen idegrostok esetében a vazoaktív intesztinális polipeptid (VIP) és az adenosin-trifoszfát (ATP) ingerületátvivő szerepe feltételezhető, de sok esetben más anyagok, ún. *non-purinerg, non-peptiderg* neurotranszmitterek, pl. a nitrogén-monoxid (NO) játszhatnak szerepet.

A normál bélmotilitás koordinálásában a bélfali idegelemekén kívül fontos szerepük van a *Cajal-féle intersticiális sejtek*nek is. Erre vonatkozó indirekt bizonyítéknak tekinthető, hogy több motilitás-zavarokkal járó kórkép patogenezisében kimutatható a Cajal-sejtek fiziológiai funkciózavara vagy számszerű megfoghatósága, esetleg eltűnése is.

Célkitűzések

A tápcsatorna egyes területein -az előzetes irodalmi adatok alapján- feltételezhető a NANC gátló idegelemek jelenléte. Ez a gátló hatás különösen a sphincter régióknál lehet jelentős a zsiger működése szempontjából. Munkánk során ezért a következő kérdésekre kerestük a választ:

- 1) Milyen **lokalizációban és megoszlásban** található a **nitrogén-monoxid tartalmú idegelemek** (idegsejtek, idegrostok) a tápcsatornában?
 - a) A tápcsatorna *mely területein* fordulnak elő jelentős mértékben nitrerg idegelemek?
 - b) Egy-egy területen belül a tápcsatorna *melyik rétegében*, milyen struktúrákban lehet kimutatni nitrerg idegelemeket?
 - c) Mivel az irodalmi adatok szerint a perifériás idegrendszer idegelemeiben a nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát-diaforáz (NADPH-d) enzim-aktivitás a neurális nitrogén-monoxid szintáz (nNOS) markere, ezért összehasonlítottuk a gyomor-bélcsatorna NADPH-d és nNOS jelölt idegelemeinek megoszlását.
 - d) Kimutatható-e eloszlásbeli és mennyiségbeli különbség a *sphincter és nem-sphincter területek* NO-tartalmú idegelemei között?
- 2) A *pylorus*, mint kitüntetett fontosságú sphincter-régió területén a nitrerg idegelemek fény- és elektronmikroszkópos megjelenésének, eloszlásának tanulmányozása.

Kimutatható-e VIP a pylorus idegelemeiben, milyen megoszlásban és lokalizációban? Hogyan viszonyul a NO és a VIP tartalmú idegelemek megoszlása és lokalizációja egymáshoz?

- 3) Kimutathatóak-e közvetlen morfológiai kapcsolatok fény- és elektronmikroszkóposan macska pylorusának nitrogén-monoxid tartalmú idegelemei és a feltételezhető **célsejtjeik** (simaizom, érfal sejtjei, mirigyek, felszíni hám, más idegsejtek illetve az immunrendszer sejtjes elemei) között?
- 4) Kimutatható-e változás **gyulladásos körülmények** (*experimentális, indukált colitis ulcerosa*) hatására a vastagbélben a nNOS lokalizációjában? Hogyan változnak gyulladás hatására a nitrogén idegelemek és a simaizom motilitásának szabályozásában kulcsszerepet játszó *Cajal-féle interstitiális sejtek* jellemzői, illetve egymással való kapcsolataik?

Anyag és módszer

Állatkísérletes mintákat az alábbi területekből vettünk:

- Macska: pylorus, ampulla hepatopancreatica (sphincter Oddi), ileum, ileocecalis szájadék, colon.
- Patkány: colon

Módszerek:

- **NADPH-diaforáz enzimhisztokémia, nNOS immunhisztokémia:** Az immunhisztokémia során avidin-biotinilált peroxidáz komplex segítségével (ABC módszer) mutattuk ki a nNOS enzim elhelyezkedését.
- **nNOS immuncitokémia:** A Vibratómmal készített metszeteken immunreakció, majd ozmiumos utófixálás és beágyazás történt. Ultravékony metszeteket (45-80 nm) készítettünk, majd azokat uranilacetáttal és ólomcitráttal festettük és Jeol 100 elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.
Kontroll: normál szérummal inkubált, illetve primer antitest + feleslegben adott antigénnel inkubált metszetekben immunjelölés nem volt megfigyelhető.
- **Experimentális trinitrobenzol szulfonsav (TNBS)-indukált colitis**
Vizsgálatainkhoz patkányokat használtunk. 48 órás éheztetés után az elaltatott patkányok *colon descendensének lumenébe* rectális szondán keresztül TNBS-t injiciáltunk, majd 1, illetve 2 nap múlva vizsgáltuk az érintett vastagbél-területet (nNOS és VIP immunhisztokémia és -citokémia).

Az állatkísérletes munkát az előírásokat (243/1998 állatvédelmi törvény, a Magyar Tudományos Akadémia Egészségügyi Tudományos Tanácsának állatkísérletekre vonatkozó etikai kódexe) betartva végeztük.

Kvantitatív értékelés: a jelzett idegsejteket illetve idegrostokat 2,000-3,000 μm^2 területen megszámláltuk s számukat 100 μm^2 -re átlagolva adtuk meg.

Eredmények

Az emésztőcsatorna különböző szakaszainak vizsgálata - különös tekintettel a pylorusra

NADPH-d és NOS jelölt idegsejteket minden vizsgált területen találtunk, főleg a *myentericus fonatokban*. Egy-egy nagy multipoláris idegsejtet a plexus submucosusban is megfigyeltünk. Elvértve magában a belső körkörös izomrétegben és a nyálkahártyában is találtunk néhány pozitív idegsejtet. A plexus myentericus pozitív sejtjei szignifikánsan magasabb százalékban fordultak elő a **sphincter-régiókban** – így a pylorus, a m. sphincter Oddi és az ileocecalis szájadék területén –, mint az emésztőcsatorna többi részén.

A jelölt *idegrostok* mindkét módszerrel megegyező megoszlásban és lokalizációban fordultak elő az emésztőcsatorna vizsgált területein. Jelölt idegrostok legnagyobb mennyiségben a belső körkörös izomrétegben, főleg a tela submucosa felé eső területen helyezkedtek el, míg a külső hosszanti izomrétegben egyáltalán nem, vagy csak elvértve figyelhettünk meg pozitív reakciót mutató idegrostokat. A tela submucosában futó erek mellett is láttunk egy-egy enzim- illetve immunreaktív idegsejtet és idegrostot. A tunica mucosában az erek mellett és a mirigyek, illetve a Lieberkühn-kripták szomszédságában is megfigyeltünk pozitív idegrostokat.

A pylorus idegelemeiben a NOS és VIP immunreaktív idegelemek lokalizációja és megoszlása hasonló volt.

A NOS immuncitokémiával jelölt idegvégződésekből egy-egy mitokondrium és számos nagy szemcsés (átmérő: 80-120 nm) és kis üres (átmérő: 30-40 nm) vezikulum volt megfigyelhető. Kimutattuk, hogy a nagyszámú szinaptikus vezikulát tartalmazó NOS immunreaktív idegterminálisok mindkét intramurális *fonatban valódi interneuronális szinapszisokat* alkottak az ott elhelyezkedő nem jelölt idegsejtekkel. Találtunk NOS negatív idegrostok és NOS pozitív idegsejtek közötti szinapszisokat is. Számos immunreaktív idegterminális a belső körkörös izomrétegben, a simaizomsejtek közvetlen közelében

helyezkedett el. Jelölt idegvégződéseket találtunk kapillárisok endothelsejtjeinek közvetlen közelében, az arteriolák adventiciájában, a tunica media simaizomsejtjeihez közel. Néhány immunjelölt idegvégződés a nyálkahártyában a felszíni hámsejtek alatt, immunkompetens sejtek (lymphocyták, plazmasejtek) közvetlen közelében is megfigyelhető volt. Az immunjelzett idegterminálisok és feltételezett célsejtjeik sejtmembránja közötti távolság 20-250 nm volt. (Az irodalmi adatok szerint a *distant synapsis* esetében akkor lehet fiziológias hatással számolni, ha a szinaptikus távolság maximum 1 μm .)

Experimentális colitis vizsgálata

A *kísérletes colitis* indukciója után 1 nappal a kezelt állatokban fénymikroszkóposan enyhe gyulladást jeleket észleltünk. 2 nappal a TNBS-kezelést követően mérsékelt colitis szöveti jeleit láttuk (diffúz gyulladást sejtbeszűrődés). A plexus myentericus és submucosus, valamint a tunica muscularis simaizomzata morfológiailag épnek látszott. A colitis által érintett területeken a NOS és VIP *pozitív idegrostok* száma csökkent a kontroll mintákhoz, illetve a nem gyulladást területekhez képest.

A **Cajal-féle intersticiális sejtek** egy része a colitises mintákban viszont NOS immunreaktívává vált, míg a kontroll állatok vastagbélében és a gyulladást jeleket nem mutató vastagbél-szakaszokban ezek a sejtek egyáltalán nem mutattak immunreaktivást. A NOS pozitív intersticiális sejtek száma magasabb volt a gyulladást területéhez közel, a belső körkörös simaizomréteg területén, annak a tela submucosa felé eső területein (*plexus submuscularis*).

Megfigyelhető volt az immunreaktív Cajal-féle sejtek közvetlen kapcsolata simaizomsejtekkel (a két sejt sejtártyájának távolsága 20-30 nm volt). Az immunpozitív Cajal-féle sejtek több esetben közeli kapcsolatban voltak a NOS jelölt idegterminálisokkal is.

Megbeszélés

Ismereteink szerint a béltraktus NO tartalmú idegrostjai alapvető szerepet játszanak a perisztaltikus működés során létrejövő *aborális relaxáció* kiváltásában. A korábbi irodalom a NADPH-d pozitív idegsejteket csak a plexus myentericusban írta le, saját vizsgálatainkban viszont pozitív sejteket találtunk a submucosus fonatban és a belső, körkörös simaizomrétegen belül és a nyálkahártyában is. Valószínű, hogy ezen NO-tartalmú sejtek funkciója – eltérően a myentericus fonat idegsejtjeinek működésétől – nem elsősorban a

perisztaltika során történő relaxáció megvalósítása, hanem a falon átfolyó vérmennyiségnek, esetleg a mirigyek szekréciójának és a belső milliók szabályozása.

A NO tartalmú idegelemek emésztőrendszeri záróizmok tónusának szabályozásában betöltött szerepére utal lényegesen magasabb számuk a pylorus, a m. sphincter Oddi és az ileocecalis szájadék területén. Ezt saját eredményeink is alátámasztják.

A nitreg idegelemek ultrastrukturális vizsgálatai megerősítették a neuronális NOS döntően *solubilis* elhelyezkedését, egy kisebb frakciója viszont membránhoz, valószínűleg az endoplazmatikus retikulumhoz kötött. Elképzelhető, hogy az enzim itt történő *de novo* szintézise miatt észlelhető ez a – miáltalunk is kimutatott – frakció.

A NOS immunreaktív idegrostok mindkét idegfonatban észlelhető interneuronális szinapszisai a NO valószínű posztzinaptikus neurális hatására utalnak; ezen nitreg idegelemek a lokális idegreflexekben játszhatnak szerepet.

A NOS aktivitásának, megoszlásának *colitis*ben bekövetkezett változásaira kevés irodalmi adat található. Colitis ulcerosás mintákon a lamina muscularis mucosae NO tartalmú idegrostjainak erős megfogyatkozását vagy teljes eltűnését tapasztalták, patkány experimentális colitisében is hasonló eredményeket közöltek. Két valószínű mechanizmus gyanítható a nitreg idegrostok számának csökkenése mögött: valóban degenerálódnak ezen idegrostok vagy csupán a NOS-expresszió csökken bennük a gyulladás hatására.

Fertőzéses eredetű colitis esetén a mérsékelt gyulladásos területeken az idegelemekben (submucosus, myentericus fonatok) a NOS és a NADPH-d aktivitás fokozódását figyelték meg, de az igen súlyos gyulladást mutató területeken a NO tartalmú idegelemek számának csökkenését írták le; ez a tény valószínűleg a fokális regeneráció illetve degeneráció eredménye.

Feltételezhető, hogy a colon Cajal-sejtjeinek legalábbis egy része képes NO-ot szintetizálni, bizonyos (pl. gyulladásos) körülmények között. Ezt támasztják alá vizsgálataink, melyekben az akut colitises mintákban a Cajal-sejtek egy része NOS immunreaktívvá vált, főként a *plexus submuscularis*nak megfelelő területeken. Ez a NO a gátló neurotranszmissziót modulálhatja, így a motilitás befolyásolásában, a kontrakciók gátlásában játszhat szerepet. Így pótolhatja az idegrost-károsodás miatt kieső neurogén eredetű NO hatásait. Végző soron tehát a Cajal-sejtek a gyulladásos folyamatok során plaszticitásukkal hozzájárulhatnak a megbomlott transzmitter-egyensúly helyreállításához, a károsodott motilitás normalizálásához és a regenerációhoz.

Következtetések

1) a nitreg idegelemek feltételezett célsejtjeikhez való igen szoros közelsége miatt a NO fontos *fiziológias* szerepet játszhat

- a bélcsatorna **körkörös simaizomrétegének gátló beidegzésében**, a következményes aborális relaxációban, mely hatás kifejezetten érvényesül a záróizmok, így a **m. sphincter pylori** esetében
- a béltraktus **vérátáramlásának**,
- a bélcsatorna illetve a gyomor **mirigyszekréciójának** szabályozásában
- a **gasztroprotekcióban**, a bélnyálkahártya védelmében, valamint valószínűleg a lokális immunfolyamatok regulálásában.

2) Kimutattuk, hogy a kísérletes, **mérsékelt gyulladással járó colitis ulcerosa során a NOS és VIP-tartalmú idegrostok száma** kismértékben **csökkent**.

3) Kimutattuk, hogy a colon **Cajal-féle intersticiális sejtjeinek egy része gyulladás hatására NOS immunreaktívává vált**, azaz a vastagbél Cajal-sejtjeinek legalább egy része képes NO-ot szintetizálni gyulladós körülmények között. A termelt NO a motilitás befolyásolásában, a kontrakciók gátlásában, esetleg a nyálkahártya védelmében játszhat szerepet. A vastagbél gyulladós állapotában megfigyelhető idegrostpusztulást ellensúlyozó hatás lehet az intersticiális sejtek NOS enzimjének általunk kimutatott aktiválódása (plaszticitás).

Köszönetnyilvánítás

Ezúton mondok köszönetet mindazoknak, akik támogatták kutatómunkámat:

Prof. Dr. Fehér Erzsébet egyetemi tanárnak, fáradhatatlan témavezetőmnek a téma választásához nyújtott javaslatáért, szüntelen biztatásáért, segítségéért a kutatás, az eredmények értékelése, cikkek publikálása és az értekezés megírása, korrekciója terén;

Prof. Dr. Fehér János egyetemi tanárnak programvezetői munkájáért és biztatásáért;

Dr. Blázovics Anna tudományos főmunkatársnak a program során kifejtett szervezői és előadói munkájáért, **Bárkovics Sarolta** mindig jókedvű szervezési háttérmunkájáért;

Dr. Bagaméri Gábor PhD-hallgatónak az állatkísérletes tevékenységhez nyújtott gyakorlati segítségéért;

Dr. Bayarchimeg Batbayar PhD-hallgatónak, a közös munkában nyújtott segítségéért;

Dr. Németh Ágnesnek és **Burka Éva Beatrixnak** asszisztensi- és labormunkájukért;

Kiss József intézeti fotósnak a fény- és elektronmikroszkópos képek kidolgozásáért;

Családomnak a sok-sok támogatásért és a folyamatosan megnyilvánuló szeretetért.

Saját közlemények jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

1. **Aldorfer K**, Fehér E, Fehér J. Nitrogén-monoxid-tartalmú idegelemek megoszlása és lokalizációja a tápcsatornában. Orv Hetil 1996;137:857-861.
2. **Aldorfer K**, Fehér E, Donáth T, Fehér J. Nitric oxide synthase-containing nerve elements in the pylorus of the cat. Neurosci Lett 1996;212:195-198. IF: **2,090**
3. Fehér E, **Aldorfer K**, Donáth T, Fehér J. Electronmicroscopical localization of nitric oxide synthase-containing nerve elements in cat pylorus. Eur J Morphol 2001;39:121-126. IF: **0,622**
4. Fehér E, **Aldorfer K**, Bagaméri G, Fehér J. Neuroimmune interactions in experimental colitis - An immunoelectron microscopic study. Neuroimmunomodulation 2001;9:247-255. IF: **1,989**
5. **Aldorfer K**, Bagaméri G, Donáth T, Fehér E. Nitric oxide synthase immunoreactivity of interstitial cells of Cajal in experimental colitis. Inflamm Res 2002;51:12 569-571. IF: **1,325**

Idézhető absztraktok

1. **Aldorfer K**, Fehér E, Fehér J. Distribution of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the pylorus of the cat. Z Gastroenterol 1995;5:279. IF: **0,632**
2. Fehér E, **Aldorfer K**, Gallatz K, Donáth T. Nitric oxide synthase containing nerve elements in the pylorus of the cat. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft (91. Versammlung, Jena, Deutschland), Supplementheft zum Anatomischen Anzeigers 1996;235.
3. **Aldorfer K**, Fehér E, Bagaméri G, Fehér J. Distribution and localization of NADPH-diaphorase containing neural elements of the gastrointestinal tract. Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft (91. Versammlung, Jena, Deutschland), Supplementheft zum Anatomischen Anzeigers 1996;235-236.
4. **Aldorfer K**, Fehér E, Fehér J. Distribution pattern and projections of nitrergic neurons in the cat pylorus. A Magyar Gastroenterológiai Társaság 38. Nagygyűlése, Balatonaliga. Z Gastroenterol 1996;5:301. IF: **0,958**
5. **Aldorfer K**, Bagaméri G, Fehér E, Fehér J. Ultrastructural localization of nitrergic nerve elements in cat pylorus. A Magyar Gastroenterológiai Társaság 42. Nagygyűlése, Balatonaliga. Z Gastroenterol 2000;38:398. IF: **0,887**

6. Fehér E, **Aldorfer K**, Bagaméri G, Fehér J. Bidirectional neuroimmune interaction in human colonic mucosa. A Magyar Gastroenterológiai Társaság 42. Nagygyűlése, Balatonaliga. Z Gastroenterol 2000;38:404. IF: **0,887**
7. **Aldorfer K**, Bagaméri G, Fehér E. Localization of nitreergic nerve terminals in the mucosa of the cat pylorus. A Magyar Gastroenterológiai Társaság 43. Nagygyűlése, Balatonaliga. Z Gastroenterol 2001;5:380. IF: **0,803**

Kongresszusi előadások, poszterek

1. Fehér E, Montagnese C, Donáth T, **Aldorfer K**. Distribution of NADPH-diaphorase in neurons of sphincter of Oddi in the cat. IV. Semmelweis Tudományos Fórum, Budapest 1995.
2. **Aldorfer K**, Fehér E, Fehér J. Distribution of nitric oxide-containing neuronal elements of the gastrointestinal tract. Program and Abstracts, Society for Free Radical Research, Summer Meeting, Budapest 1995.
3. **Aldorfer K**, Donáth T, Fehér E. Nitrogén-monoxid tartalmú idegelemek immuncitokémiai lokalizációja. A Magyar Anatómus Társaság IX. kongresszusa, Szeged 1997.
4. Fehér E, **Aldorfer K**, Donáth T, Fehér J. Immunocytochemical localization of nitric oxide-containing nerve elements in the sphincter pylori and Oddi of the cat. A Magyar Gastroenterológiai Társaság 39. Nagygyűlése, Balatonaliga 1997.
5. Ember Zs, **Aldorfer K**. A nitrogén-monoxid kimutatásának morfológiai alapjai. XXVIII. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg 1998.
6. **Aldorfer K**, Ember Zs. A nitrogén-monoxid tartalmú idegelemek lokalizációja a tápcsatorna egyes zsigereiben. Debreceni Egyetemi Szövetség I. Idegtudományi Konferenciája 1998.
7. Fehér E, **Aldorfer K**, Ember Zs. A nitrogén-monoxid tartalmú idegelemek megoszlása és precíz lokalizációja az emésztőrendszerben. A Magyar Anatómus Társaság X. kongresszusa, 1999.
8. Fehér E, Batbayar B, **Aldorfer K**, Somogyi J, Zelles T. Immunohistochemical localization of mast cell - nerve interactions in the tongue of the rat. 1st European Federation of IADR Scientific Meeting, Cardiff 2002.

Egyéb közlemények

1. **Aldorfer K**, Réthelyi M. Hallgatói vélemények az anatómiáról (oktatásstatisztikai felmérés). Orvosegyetem 1996;6:2-3.
2. Inovay J, Marton T, Urbancsek J, Kádár Z, **Aldorfer K** and Papp Z. Spontaneous bilateral cornual uterine dehiscence early in the second trimester after bilateral laparoscopic salpingectomy and in-vitro fertilization. -Case report- Hum Reprod 1999;14:2471-2473. IF: **3,003**