

Egyetemi Doktori (Ph. D.) értekezés

**NITROGÉN-MONOXID SZINTETÁZ IZOFORMÁK
VIZSGÁLATA KRÓNIKUS GYULLADÁSOS
BÉLBETEGSÉGEKBEN**

PALATKA KÁROLY

Témavezetők:

Prof. Dr. Udvardy Miklós

Egyetemi tanár

Dr. Altorjay István

Habil. egyetemi docens

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
BELGYÓGYÁSZATI INTÉZET**

DEBRECEN

2006

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	6
3. A gyulladáshoz kapcsolódó bélbetegségekről általában	7
4. A nitrogén monoxid és a nitrogén monoxid szintetáz izoformák	10
5. A NO sejt és szöveti hatásai	12
6. A NO és a gyulladáshoz kapcsolódó bélbetegségek	13
a. Az iNOS vizsgálata klinikai tanulmányokban	13
b. Immunhisztokémiai vizsgálatok	14
c. A NO colitises állatmodellekben	15
d. Az arginin metabolizmus alternatív útvai	16
7. A HUVEC és NO	17
8. Célkitűzések	17
9. Anyagok és módszerek	19
<i>Betegek kiválasztása, kezelése</i>	19
<i>Biopszia mintavétel</i>	20
<i>Vérszérumok gyűjtése</i>	21
<i>Szöveti vizsgálatok</i>	22
<i>Biopsziák előkészítése</i>	22
<i>iNOS immunhisztokémia</i>	22
<i>eNOS immunhisztokémia</i>	23
<i>NADPH-diaforáz hisztokémia</i>	23
Kettős jelölés iNOS tartalmú sejtek azonosítása	24
<i>Az érendothél kimutatása</i>	24
<i>Az immunreakciók mennyiségi értékelése</i>	

<i>iNOS immunblott</i>	25
<u><i>Endothel citológiai vizsgálatok</i></u>	26
<i>HUVEC preparálás és tenyésztés</i>	26
<i>Immunblott</i>	27
<i>Immunfluoreszcencia vizsgálatok</i>	28
<i>Statisztika</i>	29
10. Eredmények	30
<i>Az iNOS+ immunreaktív sejtek megoszlása és jellemzése IBD nyálkahártyában</i>	30
<i>Az eNOS lokalizációja és a vasculáris status összehasonlítása</i>	32
<i>Az eNOS kimutatása immunblott és immunfluorescens vizsgálattal HUVEC-n</i>	33
<i>Az iNOS kimutatása immunblot és immunfluorescens vizsgálattal HUVEC-n</i>	34
<i>A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatása a HUVEC proliferációs aktivitására</i>	35
<i>A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatása a HUVEC viabilitására</i>	35
<i>A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatása a HUVEC kultúra alakjára és szerkezetére</i>	36
11. Megbeszélés	36
12. Következtetések	46
13. Összefoglalás	49
14. Summary	50
15. Irodalomjegyzék	51
Köszönetnyilvánítás	65
Függelék	66

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

NO	nitrogén monoxid
EDRF-NO	endotheliális eredetű relaxáló faktor-nitrogén monoxid
NOS	nitrogén monoxid szintetáz
iNOS	indukálható nitrogén monoxid szintetáz
eNOS	endotheliális nitrogén monoxid szintetáz
nNOS	neuronális nitrogén monoxid szintetáz
IBD	gyulladásos bélbetegségek
CU	colitis ulcerosa
CD	Crohn betegség
HLA	human leukocita antigén
TNF-α	tumor nekrosis faktor alfa
ICAM-1	intercelluláris sejtadhéziós molekula-1
NOD2/CORD15	caspase recruitment domain-gyulladásos bélbetegségekre hajlamosító gén
NF-κB	nukleáris faktor kappa B
INF-γ	interferon gamma
ECAM	endotheliális sejtadhéziós molekula
VCAM	vaszkuláris sejtadhéziós molekula
L-NAME	N^G-nitro-L-arginin
L-NMMA	N^G-monomethyl-L-arginin
TNBS	trinitro-benzolszulfonsav
AG	aminoguanidin
ODC	ornithin-dekarboxiláz
DSS	dextrán nátrium szulfát
HUVEC	humán köldökzsínór véna endotheliális sejt

PFA	paraformaldehid
DAB	diaminobenzidin
PBS	foszfát puffer
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
NBT	nitroblue-tetrazolium klorid
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
PECAM	trombocita-endothel adhéziós molekula

2. Bevezetés

A gyulladássos bélbetegségek körébe sorolt Crohn betegség és colitis ulcerosa az elmúlt évtizedekben „titokzatos” kórképeknek számítottak melyek gyakorlatilag a szervezet egészét érinthetik, és pathogenezisükben több különböző kórfolyamat vesz részt. Bár a pontos etiológia és a teljes pathogenetikai rendszer továbbra sem ismert, az elmúlt években jelentős előrelépés történt ezen a téren mely alapvetően változtatta meg e kórképekről alkotott elképzeléseinket, alapul szolgált az úgynevezett biológiai kezelés bevezetésére és előrevetíti a további kutatási utakat és előrelépési lehetőségeket. Új eredmények születtek az intesztinális epithel működéséről, permeabilitásáról, a bél baktérium mikróflóra és a nyálkahártya immunrendszerének kölcsönhatásáról, az orális immuntolerancia természetéről. Az epidemiológiai vizsgálatok egész sora segítette a környezeti tényezők és a Crohn betegség, valamint a colitis ulcerosa kapcsolatának jobb megismerését. Az experimentális, genetikailag manipulált modelleken, „in vitro” sejt kultúrákon végzett vizsgálatok alapvető adatokat szolgáltatottak a bélgyulladás természetére vonatkozóan. Mára jelentős ismeretanyag halmozódott fel a gyulladást fokozó és a gyulladást csökkentő citokineknek, növekedési faktoroknak és más bioaktív molekuláknak a bélnyálkahártya homeosztázisában játszott szerepére vonatkozóan. Jelenleg a genetikai és immunológiai, illetve immunogenetikai tényezők tekinthetők dominánsnak a gyulladássos bélbetegségek etiopathogenezisében és ezen a téren gyarapodó ismeretektől várhatók a betegség további átfogóbb megismerésének lehetőségei.

A gasztrointesztinális rendszer gyulladássos válaszkészsége korlátozott. Az inflammatorikus reakció szövettani és funkcionális jellemzőit elsősorban az anatómiai helyzet és a folyamat időbelisége határozza meg kevésbé a kiváltó tényezők. Mindez egy végső közös gyulladássos utat feltételez hasonló gyulladássos sejtek, citokinek, lipid mediátorok részvételével. A kiterjedt gyulladássos infiltrátum és a szöveti elváltozások hátterében zajló komplex immunológiai folyamatoknak részese az EDRF-NO (endothelial derived relaxing factor-nitrogen oxide) rendszer mely, a szervezet egyik általános és alapvető mediátor és effektor anyagát a NO-t termeli L-

argininből. A nitrogén oxide a szervezet egyik legkisebb biológiailag aktív molekulája, mely vasodilatátor, neurotransmitter és a gyulladásos reakciók fontos tényezője, mint mediátor és effektor molekula.

A nitrogén oxide szerepe a gyulladásos bélbetegségekben, a bélnyálkahártya szintjén zajló gyulladásban nem tisztázott. Az epithelium, a nyálkahártyát infiltráló gyulladásos sejtek valamint az endothel termelte különböző nitrogén oxide szintetáz izoformák által létrehozott - nitrogén oxide jelenléte és koncentrációja a gyulladás különböző fázisaiban proinflammatorikus illetve antiinflammatorikus hatást fejt ki és valószínűleg más, más módon érvényesül a Crohn betegségként, valamint colitis ulcerosaként jellemzett gyulladásban.

Munkánk során a nitrogén oxide szintetáz izoformák expressziójának minőségi és mennyiségi vizsgálatát végeztük Crohnos és colitis ulcerosás nyálkahártyában valamint a gyulladásos bélbetegek szérumával kezelt human köldökzsínór endotheliális sejtekben a gyulladásos folyamat különböző fázisaiban. Célunk az NO szerepének megvilágítása, a különbségek regisztrálása a gyulladásos bélbetegségek különböző formáiban, és ennek esetleg gyakorlati, differenciáldiagnosztikai szempontból való értékelése.

3. A gyulladásos bélbetegségekről általában

A gyulladásos bélbetegségek (IBD) ismeretlen eredetű, visszatérő, sajátos krónikus hullámzó lefolyást mutató, változatos intesztinális és extraintesztinális tünetekkel járó kórképek, melyek előfordulási gyakorisága világszerte növekszik. Bár egyértelmű, precíz átfogó epidemiológiai adatok Magyarországon nem állnak rendelkezésre, az eddigi eredmények colitis ulcerosában 8, Crohn betegségben 3-4 közötti incidenciát mutatnak, folyamatosan növekvő tendenciával az elmúlt három évtizedben. Az USA-ban és a Nyugat-Európai országokban ennél enyhén gyakoribb előfordulás észlelhető, míg Ázsia, Afrika, Dél-Amerika országaiban sokkal ritkábban fordul elő. Elsősorban a fiatal korosztályokat érinti, a betegség kezdete túlnyomórészt az első és második évtizedre tehető. A pontos etiológia ismeretének hiányában a mai kezelési

lehetőségek a betegség gyógyítására nem alkalmasak, így mindössze a tünetek kezelésére, a szövődmények elkerülésére és kezelésére irányuló törekvések maradnak, a beteg megfelelő életminőségének biztosítása érdekében.

Az IBD jelen elképzelés szerint genetikai, környezeti és immunológiai tényezők komplex együttthatása eredményeként alakul ki. A két fő klinikai entitás, a colitis ulcerosa (CU) és Crohn betegség (CD) kiváltásában és fenntartásában a fenti tényezők különböző mértékben vesznek részt. IBD-ben az immunsejtek valamint a gyulladásos cytokinek száma és aránya is különbözik **(1)**. Ennek ellenére a diagnózis és a differenciál diagnózis továbbra is alapvetően a klinikai tüneteken, a radiológiai és endoszkópos eltéréseken alapul, melyek colitis ulcerosában a vastagbél nyálkahártya fekélyes elváltozásaira, Crohn betegségben a gasztrointesztinális traktus bármely részén előforduló szakaszos transmurális gyulladásos, fekélyes eltérésekre és ezek következményeire vezethetők vissza. A szövettani lelet, a gazdag leukocytá infiltráció, granulocyták, monocyták, lymphocyták megjelenése a bélfalban, nem diagnosztikus. Az esetek jelentős részében a patológiai vizsgálat nem perdöntő a diagnózis felállításában.

Az IBD gyakoribb családi előfordulása valamint más genetikai eltérésekkel való társulása évek óta felveti a genetikai tényezők fontosságát a betegség előfordulásában. A genetikai háttér tisztázására irányuló vizsgálatok során az immunológiailag releváns gén produktumok (HLA-DR, HLA-DQ, IL-1RA, TNF, ICAM-1) génjei kerültek előtérbe. A NOD2/CARD15 gén mutációja elsősorban Crohn betegségre jellemző. A CARD15 fehérje a perifériás vér monocytáiban a lipopolysaccharidok és bakteriális fehérjék intracelluláris receptoraként szerepel. A nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) aktiválását közvetíti, mely a pro- és anti-inflammatorikus mediátorok termelését eredményezi. A gén mutációja a mononukleáris sejtek funkció károsodása által a gyulladásos cytokin konfiguráció megváltozását eredményezheti. Újabban felmerült a 10q23 kromoszómán a DLG5 gén speciális haplotypus variánsának szerepe IBD előfordulásában. Valószínűleg léteznek Crohn betegség specifikus és colitis ulcerosa specifikus gének valamint

közös IBD gének melyek defectusai a nyálkahártya immunregulációjának egyensúlyát megbontják.

A Crohn betegség kialakulásának hátterében felmerült a veleszületett immunitás elégtelenségének következtében kialakuló tökéletlen intesztinális barrier funkció lehetősége. Az epithelium valamint a lamina propria fagocitáinak, a granulocitáknak és a makrofágoknak a kóros működése következtében a lamina propria sejtjeinek expozíciója fokozott a lumenális baktériumok irányából ami kóros T sejt mediálta gyulladáshoz vezethet **(2,3,4)**.

Függetlenül az elősegítő tényezők együtthatásának mértékétől az immunrendszer központi szerepet játszik a betegség patogenezisében. Az IBD patogenezisében a bél nyálkahártya immunrendszerének kóros működése központi helyet foglal el. A rendszer normális működésének jellemzői az orális tolerancia, krónikus kontrollált (fiziológiás) gyulladás és a helyi IgG termelés, melyek egyensúlyának megbomlása vezet az IBD kialakulásához. Infektív tényezők központi szerepét a gyulladás kiváltásában több indirekt adat felveti, de a feltételezett kórokozók azonosítása nem járt sikerrel. A központi kérdés továbbra is az, hogy mi váltja ki és mi tartja fenn a gyulladást. A T sejtek autoreaktivitására utaló adatok nem adnak teljes magyarázatot. A klinikai és alapkutatói eredmények jelenleg kóros nyálkahártya immunreguláció és elégtelen barrier funkció mellett szólnak. A két eltérés egymással összefügg: a nyálkahártya-gát elsődleges elégtelensége megzavarhatja a normális nyálkahártya immunreguláció kialakulását, másrészt a nyálkahártya immunreguláció defectusa olyan citokin változásokat okoz, melyek károsíthatják az intesztinális barrier funkciót. Az antigének melyek felerősítik a gyulladást, részei lehetnek a normális intesztinális flórának, vagy közös fertőző ágensek lehetnek. A normális nyálkahártya flórával szembeni tolerancia elvesztése a betegség kialakulásához vezethet. A krónikus gyulladás, a bélben levő antigén trigger és a kóros immunreguláció együttes hatásának következménye **(2)**.

A colitis ulcerosában és a Crohn betegségben egyaránt aktivált CD4+ T sejtek találhatóak a lamina propriában és a perifériás sejtekben, melyek gyulladást előidéző citokineket termelnek. A citokinek

vagy direkt módon, a makrofágok és B sejtek aktivációja által, vagy indirekt módon, a mikrokörnyezet megváltoztatása, a perifériás erekből a gyulladáshoz vezető sejtek kiáramlásának elősegítése által hatnak. A Crohn betegségben Th1 típusú túlsúly észlelhető IL-2, TNF- α , és INF- γ termeléssel, míg colitis ulcerosában Th2 túlsúly mellett főleg IL-5 és IL-10 termelődik. A két betegség különböző makroszkópos gyulladáshoz vezető eltérései visszavezethetők ezekre a citokin különbségekre. Úgy tűnik, hogy a gyulladáshoz vezető citokin profil különbségei genetikailag meghatározottak.

A különböző citokinek és a bakteriális lipopoliszacharidok hatására nitrogén monoxid szintetáz (NOS) indukálódik és az általa termelt nitrogén monoxid (NO) vasodilatátor, neurotransmitter és effektor feladatokat lát el **(5)**.

Az etiopatogenetikai különbségek bizonyos részleteinek ismerete, a meghatározó szerepet játszó gyulladáshoz vezető mediátorok, vagy adhezív molekulák szelektív gátlását teheti lehetővé, lehetőséget adva az IBD különböző formáinak specifikus kezelésére.

4. A nitrogén monoxid és nitrogén monoxid szintetáz izoformák

A kiterjedt gyulladáshoz vezető infiltrátum és a szöveti elváltozások hátterében zajló komplex immunológiai folyamatoknak részese az EDRF-NO (endothelial derived relaxing factor-nitrogen oxide) rendszer mely, a szervezet egyik általános és alapvető mediátor és effektor anyagát a NO-t termeli L-argininből. A NO a szervezet egyik legkisebb biológiailag aktív molekulája, mint ubiquiter szabadgyök, mennyiségétől, keletkezési helyétől és idejétől valamint a környezetében zajló reakcióktól és a pH-tól függően pozitív vagy negatív szerepet játszik a gyulladáshoz vezető folyamatok keletkezésében és fenntartásában **(6,7,8)**.

A nitrogén monoxid szintetáz (NOS) három különböző formája ismert. Az I. típusú NOS, vagy neuronális NOS (nNOS), egy citoplazmában lévő szolubilis enzim, mely elsősorban az agyban van jelen, de megtalálható a gerincvelőben, a perifériás idegekben, vázizomzatban, vesében és pancreasban is.**(9)** Konstitutívan expresszálódik az intracelluláris Ca^{++} minimális

emelkedésének hatására az idegsejtekben és idegvégződéseikben. A hatására keletkező NO többek között a tanulási és memória funkciókban, a fájdalom ingerek kialakulásában és a gasztrointesztinális motilitás befolyásolásában vesz részt.

A II. típusú NOS, vagy indukálható NOS (iNOS), szintén szolubilis enzim és neutrofilekben, monocitákban, makrofágokban, T-limfocitákban, endothel, epithelialis valamint egyéb sejt típusokban fordul elő **(10)**. Transzkripciós szinten szabályozható, bakteriális lipopolysaccharidok és gyulladásos citokinek indukálják. Nagy mennyiségben keletkezik az intracelluláris patogének és a tumor sejtek elleni védekezésben. Termelődése független az intracelluláris Ca^{++} átmeneti változásaitól.

A III. típusú NOS vagy endothelialis NOS (eNOS), Ca^{++} -kalmodulin függő és a vascularis tónus valamint az endothelium homeostázisának fenntartásában jelentős. Kismennyiségben termel NO-t, mely aktiválja a szolubilis guanilát-cikláz enzimet és ezzel a másodlagos hírvívő cGMP szintézisét elősegítve, a fiziológiás simaizom tónus fenntartását biztosítja **(11,12,13,14)**.

A Th1 és a makrofag eredetű citokinek, mint a TNF- α , TNF- β (limfotoxin- α , INF- γ) vagy IL-1 β , önmagukban, vagy együttesen iNOS expresszót indukálnak, és egyúttal fenntartanak egy általános gyulladásos választ, más citokinek, endothelialis sejtadhéziós molekulák (ECAM) és enzimek indukálásával. A folyamat részletei nem tisztázottak, de *in vitro* vizsgálatok azt mutatják, hogy ezek a mediátorok aktiválják az NF- κ B-t. Az NF- κ B ubiquiter transzkripciós faktor, az immunfolyamatok és a gyulladásos reakciók pleiotrop szabályozó molekulája **(15)**. Aktiválódását követően az NF- κ B a sejtmagba transzlokálódik és különböző gének promotor régióhoz kötődve aktiválja a gyulladásos és immunválaszban fontos gének transzkripcióját, így pl. az IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), E-selectin, iNOS, ciklooxygenáz-2 képződését indukálja. Az NF- κ B a Rel transzkripciós faktorok családjába tartozó, heterodimer molekula, amely egy p50 és egy p65 alegységből áll és a citoplazmában található az I κ B inhibitor molekulával együtt. Aktiválódása különböző bakteriális és vírus eredetű anyagok hatására történik.

Az NF- κ B aktivációs mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. A különböző aktiváló tényezők több jelátvivő utat aktiválnak, melyek az intracelluláris reaktív oxigén metabolizmus erősítése irányába konvergálnak **(16, 17)**. Az intracelluláris oxidatív stressz hatására egy vagy több redox érzékeny kináz aktiválódik, amelyek specifikusan az I κ B-t foszforilálják. Ez a foszforiláció érzékenyíti az I κ B-t egy nem-lizozomális ATP-függő 26S proteolitikus komplex által történő lebontásra amely lehetővé teszi a p50/p65 heterodimer fehérje transzlokációját a sejtmagba. A 26S proteoszoma fontos része az NF- κ B aktivációjának, szelektív gátlása blokkolja az ICAM, E-selectin, és VCAM citokin aktivációját és a következményes sejt-endothel interakciót.

5. A NO sejt és szöveti hatásai

A NO a gasztrointesztinális hámsejtek funkcióinak fenntartásában fontos és fokozza a gyomor és bélhám szekréciót **(18)**. A szolubilis guanilat-cikláz aktiválásán keresztül a gyomorban a mucin termelődését segíti elő a cholinerg receptorok aktiválásának következtében **(11)**. Potens vasodilatátorként a megfelelő vérellátás biztosítása által a nyálkahártya védekező funkcióit támogatja **(9)**. Ugyanez a hatása érvényesül szepszisben is.

A gyulladással kapcsolatos citokinek befolyásolják és szabályozzák az endotheliális NO szintet, amely az endothel homeosztázisának fontos eleme **(19)**. Az endotheliális sejt apoptózist a gyulladással kapcsolatos citokinek és a reaktív oxigén gyökök fokozzák, míg az eNOS eredetű NO gátolja. Az apoptózis gátlása hozzájárul az endotheliális eredetű NO gyulladáscsökkentő és angiogenetikus aktivitásához **(20)**.

A NO csökkenti az adhéziónak molekulák expresszióját a neutrofileken és az endotheliumon ezáltal csökkenti a leukocita adhéziót, és valószínűleg gátolja a hízósejtek aktivációját **(1,21)**. A NO csökkenti a makrofág citokin termelést ugyanakkor az iNOS eredetű NO a makrofágokban meghatározó jelentőségű a baktériumok elleni védekezésben. Oxidatív stressz körülményei között gyökfogóként csökkenti a sejtkárosodást. Az iNOS aktivitás bizonyítottan proliferáció gátlással,

fokozott apoptozissal és cytotoxikus aktivitással társul. A NO sejtkárosító hatásának pontos mechanizmusa nem ismert. Az egyik elképzelés szerint, az iNOS eredetű NO oxigén szabadgyökökkel, pl. szuperoxiddal reagálva peroxinitritet képez, amely elősegíti a tirozin oldalláncok nitrotirozinná történő átalakítását **(22)**. Magas NO szintek esetén fokozódik a DNS károsodás, romlik a vas-kén tartalmú enzimek működése és a mitokondriális légzés.**(23,24,25,26)**

6. A NO és a gyulladásos bélbetegségek

a. Az iNOS vizsgálata klinikai tanulmányokban

A NO-nak mint gyulladásos mediátornak a vizsgálata colitis ulcerosában és Crohn betegségben gyakran ellentmondó eredményekhez vezetett. A citrullin szint alkalmas lehet az iNOS aktivitás meghatározására, miután az NO-val equimoláris mennyiségben keletkezik az argininből NOS hatására. A citrullin szintet magasnak találták aktív colitis ulcerosás betegek rectális biopsziás mintájában **(27)**. NOS gátló N^G-monomethyl-L-arginin (L-NMMA) hozzáadása a biopsziás mintákhoz csökkentette a citrullin szintet **(27)**. Más vizsgálatokban az iNOS aktivitás szignifikánsan magasabb volt colitis ulcerosás nyálkahártyában, mint a kontrollban de nem volt magasabb Crohn betegekben a kontrollhoz viszonyítva **(28,29)**.

A NO meghatározás más módjai a lumenális gáz közvetlen kimutatása, a nyálkahártya NO szintjének elektródokkal való mérése, valamint a NO metabolitok követése. A vastagbél gázok chemiluminescenciás technikával történő vizsgálata jelentősen magasabb NO tartalmat mutatott colitis ulcerosás betegekben a kontrollhoz képest **(30)**. Hasonló technikát alkalmazva aktív colitis ulcerosás betegekhez hasonlóan magas NO szintek voltak detektálhatók Crohn betegség különböző klinikai formáiban **(31)**. Ugyanakkor jelentősen nagyobb NO gáz mennyiség volt észlelhető collagen colitisben mint colitis ulcerosában ami kérdéssé teszi az NO jelentőségét mediátorként gyulladásos bélbetegségekben **(32)**.

A nyálkahártya NO, colonoscopon át bevezetett elektródokkal történő közvetlen mérése colitis ulcerosában, a makroszoposan ép és fekélyes területeken is szignifikánsan magasabb

értékeket mutatott, mint a kontroll csoportban **(33)**. A steroid kezelés mintegy felére csökkentette a nyálkahártya NO tartalmát **(33)**. A nitrit mint a NO stabil metabolitja, a vizeletben - standard körülmények között és fertőzés hiányában - jelezheti a NO aktivitás mértékét. Az aktív colitis ulcerosás betegek 12 órás illetve 24 órás gyűjtött vizeletének nitrit tartalma jelentősen magasabbnak mutatkozott az inaktív colitises és a kontroll csoporthoz képest **(34)**.

Összességében tehát az iNOS expresszió és aktivitás, illetve a NO termelés általában magasabb IBD-ben. Ez az összefüggés erősebb colitis ulcerosában és bizonytalan Crohn betegségben. Tisztázatlan tehát, hogy a NO nonspecifikus markere-e a bélgyulladásnak, vagy közvetlen mediátora a gyulladásos válasznak. A magas szöveti iNOS aktivitás és NO szint jól korrelált a colitis ulcerosa klinikai és endoscopy aktivitásával **(35)**. A NO, illetve a szérumban és vizelet nitrit szintje, jó megfelelést mutatott a C-reaktív proteinnel, az erythrocyta süllyedés, a fehérvérsejt és a thrombocita szint értékével **(34, 36)**. A iNOS expresszió korrelációja a betegség aktivitásával Crohn betegségben kevésbé egyértelmű **(37,38)**.

b. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az iNOS fehérje expresszió fokozott volt colitis ulcerosás betegek lamina propriajában, valamint az epitheliális sejtek citoplazmájában a kontroll mintákhoz képest **(39)**. Hasonló eloszlást észleltek Crohn betegségben is **(40)**. Fokozott iNOS expresszió és az iNOS+ keringő monociták magasabb aránya volt megfigyelhető IBD betegeken **(41)**.

A konstitutív NOS izoformák expressziója is megváltozik colitis ulcerosában. Az nNOS csökkent a muscularis mucosában, míg az eNOS fokozott volt a lamina propria területén **(42)**. A magas iNOS szint nem specifikus IBD-re mivel fokozott expressziót találtak infektív colitisben is az epitheliális sejtekben, amely a gyógyulás során csökkent **(43)**. Az intenzív iNOS festődés mellett, nitrotirozin pozitivitás is kimutatható colitis ulcerosás és Crohn betegek nyálkahártya epithel sejteiben, jelezve a NO – peroxinitrit - nitrotirozin folyamatsort, amely a celluláris fehérjéket károsítja **(44)**.

c. A NO colitises állatmodellekben

Trinitro-benzolszulfonsav (TNBS) által indukált tengerimalac ileitisben N^G-nitro-L-arginin (L-NAME), egy nem szelektív NOS inhibitor hatására, a gyulladós eltérések csökkentek **(45)**. Szelektív iNOS gátló aminoguanidin (AG) szintén csökkentette a gyulladás intenzitását hasonló modellen **(46)**. Peptidoglican/polysaccharid indukálta patkány colitisben az L-NAME és AG egyaránt csökkentette a NO termelődését, a vizeletben és szérumban mért nitrit/nitrát szintek alapján **(47)**. Hasonlóan csökkent a myeloperoxidase aktivitás, a colitisre jellemző bélfal megvastagodás és az intesztinális izom hiperplázia **(48,49)**. Más vizsgálatokban azt találták, hogy a NOS gátlás ideje meghatározó lehet, TNBS előtt adott L-NAME rontja a colitist, míg fordítva a colitis javult. Valószínű, hogy a korai gátlás a constitutív NOS kiesésével a védő hatás elmaradásához vezet **(50)**.

Az iNOS káros hatását bizonyító vizsgálatok mellett több kísérlet számolt be gyulladáscsökkentő védő hatásról. TNBS indukált patkány colitis modellen az L-NAME-val történő gátlás fokozta a gyulladós eltéréseket **(51)**. Patkányon indukált DSS colitisben az L-NAME és az AG kezelés is károsnak bizonyult **(52)**.

Az iNOS hiányos genetikai modelleken indukált colitisekben egymásnak ellentmondó elváltozásokat észleltek az iNOS szerepére vonatkozóan **(53, 54)**.

Az állatkísérletek ellentmondásos eredményei részben a modellek különbözőségéből, részben a vizsgálati különbségekből adódnak. Úgy tűnik, fontos szerepet játszik a NOS gátlás ideje valamint különbözik az NO szerepe a sejttípustól és a koncentrációtól függően is.

Széleskörű vizsgálatok ellenére a NO-nak a krónikus gyulladós bélbetegségekben játszott szerepe nem tisztázott. A legtöbb vizsgálatban magas NO szintet és fokozott NOS expressziót találtak colitis ulcerosás vastagbél nyálkahártyában, ugyanakkor a Crohn betegségben mért értékek ellentmondásosak **(37)**. Újabban az IBD különböző formáiban mért eltérő szérumban és vizeletben mért nitrit szintek **(6, 36, 55)** alapján felmerült, hogy az NO mennyiségek a gyulladás mértékét illetve

különböző formáit jellemzik, és magyarázatot nyújthatnak az észlelt microvasculáris szerkezeti változásokra és bélmotilitásbeli különbségekre **(10, 20, 56)**.

d. Az arginin metabolizmus alternatív útjai

Az arginin metabolizmus kompetitív útja az argináz által történő bontás melynek eredményeként L-ornithin és urea keletkezik, az előbbi az ornithin-dekarboxiláz (ODC) szubsztrátumjaként poliaminokká alakulhat. A poliaminok a vastagbél hámsejtek növekedését serkentik és befolyásolják a nyálkahártya apoptózist pro-apoptotikus vagy anti-apoptotikus irányba, egyúttal csökkentik a mononukleáris sejtek veleszületett immunválasz potenciálját **(57, 58, 59, 60, 61)**. Az argináz hatása tehát a bélgyulladásban két módon érvényesül: egyrészt az iNOS kompetitív gátlásával, másrészt a poliaminok termelésével, melyek a bél patofiziológiáját modulálják. Két argináz forma különíthető el, az I. típus, amely elsősorban a májsejtekben található és a II. típus, mely a legtöbb szövetben előfordul a mitokondriumokhoz társultan **(62)**.

Fokozott argináz aktivitást észleltek colon tumorban és colitisekben **(63)**. Ellentmondó eredmények születtek az ODC decarboxiláz aktivitásáról IBD szövetben **(64, 65,66)**.

Az állatkísérletek során arginin adása egyes esetekben enyhítette a gyulladást, más esetekben fokozta a szöveti károsodást a magas iNOS aktivitás és NO szint által **(67,68,69)**. Más állatmodellekben az argináz-ODC rendszer erősítésével és a NOS gátlásával sikerült védő hatást elérni. Az ellentmondások magyarázatául szolgálhat, hogy a NOS gátlók nem teljesen szelektívek és potenciális argináz gátló hatásuk lehet. **(70, 71)**.

7. A HUVEC és NO

A humán köldökzsinór véna endotheliális sejtek (HUVEC) tenyésztését gyakran használják, mint specifikus modellt az endothelium működésének vizsgálatára. A HUVEC rendkívül érzékeny azokra a gyulladáskeltő ágensekre, melyeket a különböző citokinek önmagukban vagy együttesen különböző összetételben képviselnek. A NO-t a HUVEC-ben konstitutívan az eNOS termeli, míg

bizonyos stimulusok hatására az iNOS. (72-73). A termelt NO hozzájárul az endotheliális sejtek apoptózisának, proliferációjának, valamint sejt differenciációjának (angiogenezis) szabályozásához (74,75,76).

8. Célkitűzések

A NO krónikus gyulladásos bélbetegségeken játszott szerepe a nagyszámú humán szöveten végzett vizsgálat, valamint állatmodellen és sejtvonalakon végzett kísérletek ellenére sem tekinthető tisztázottnak. Egymásnak ellentmondó eredmények születtek a NO és a NOS izoformák megjelenéséről és aktivitásáról colitis ulcerosában és Crohn betegségben. Valószínűnek tűnik, hogy az NO fontos mediátora a szöveti gyulladásnak és szerepe a termelés helyének, a NO-t termelő és/vagy célsejt típusának, az oxigén szabadgyökök koncentrációjának, valamint a gyulladás fennállási idejének és súlyosságának függvénye. Colitis ulcerosában inkább a rendszer fokozott aktivitását észlelték, míg Crohn betegségben, bizonyos esetekben magas, máskor alacsony szintek voltak mérhetőek. Crohn betegségben ismert a nyálkahártya microvasculáris rendszerének strukturális változása és valószínűleg ezzel kapcsolatos a vasodilatator kapacitás dysfunctioja. A NO szintje valamint a NOS expressziója jelezhetik a gyulladásos aktivitást és valószínűleg összefüggés van a NOS szintek változása valamint az észlelt morfológiai eltérések között.

Vizsgálataink során az iNOS és eNOS expresszióját és lokalizációját vizsgáltuk colitis ulcerosás és Crohn betegek vastagbél nyálkahártya endoszkópos biopsziáiban. A gyulladás által érintett és megkímélt területekből aktív és inaktív klinikai állapotban nyert biopsziás anyagok szisztémás hisztológiai és immunhisztológiai vizsgálatára került sor. Az első, közvetlenül klinikai jellegű vizsgálatot követően, a munka második részében laboratóriumi kiegészítő vizsgálatokra került sor. Aktív colitis ulcerosás és Crohn betegek szérumának hatását vizsgáltuk HUVEC tenyészetekben. Az eNOS és iNOS expressziójának és lokalizációjának kimutatására konfluens és semi-konfluens HUVEC tenyészetekben került sor. Szintén követtük a sejtek viabilitási

mutatóinak, az apoptotikus és nekrotikus aktivitásnak valamint a proliferációnak a változásait a NOS izoformák expressziójának függvényében gyulladásos és kontroll szérumokkal történt kezelés során.

A NO szerepének tisztázása segítheti a gyulladásos bélbetegségek pathogenezisének részletes feltárását, és ezáltal a jövőben diagnosztikus és esetleg therápiás haszna is lehet.

A felvetett kérdések alapján a klinikai és kísérletes munka fő célkitűzései az alábbiak voltak:

1. A iNOS és eNOS expressziójának és lokalizációjának vizsgálata colitis ulcerosás és Crohn betegek nyálkahártya biopsziás mintájában.

2. A NOS expressziót mutató sejtek és szövetstrukturák azonosítása (kettős jelölésű immunhisztokémiai technikákkal) és összehasonlítása a különböző betegségformákban, valamint azon belül a vastagbél makroszkóposan gyulladt vagy gyulladásmentes szakaszai között.

3. A minőségi vizsgálatok mellett (hisztokémia, immunhisztokémia), a különböző betegcsoportokból nyert kolonoszkópos biopsziás minták NOS protein mennyiségi meghatározása Western blott technikával.

4. A vaszkuláris státusz összehasonlítása colitis ulcerosás és Crohnos vastagbél biopsziás mintákban különös tekintettel a neovaskularizációs jelenségekre.

5. A klinikai kép, aktivitási tünetek, és a NOS izomérek expressziója közötti összefüggés vizsgálata.

6. A NADPH-diaforáz expressziójának és lokalizációjának vizsgálata colitis ulcerosás és Crohnos vastagbél biopsziás mintákon.

7. A NADPH-diaforáz és a NOS izoformák co-lokalizációjának vizsgálata IBD-s vastagbél biopsziákban.

8. Az eNOS és iNOS expressziójának, lokalizációjának és változásainak regisztrálása colitises és Crohnos szérummal kezelt konfluens és semi-konfluens HUVEC tenyészetekben. A különböző típusú gyulladásos szérumok által kiváltott változások összehasonlítása.

9. A sejtek viabilitási mutatóinak, az apoptotikus és nekrotikus aktivitásnak valamint a sejt proliferáció változásainak a vizsgálata IBD-s szérummal kezelt HUVEC-n a NOS izoformák expressziójának függvényében.

9. Anyagok és módszerek

Betegek kiválasztása, kezelése

A vizsgálatban résztvevő IBD betegek évek óta ismert colitis ulcerosában vagy Crohn betegségben szenvedtek. A vizsgálatba történő bevonás előtt legalább hat hónapig nyugalmi fázisban voltak, illetve a vizsgálat előtti négy hétben nem kaptak szisztémás vagy lokális kortikoszteroidot és az alkalmazott gyógyszeres kezelés (5-ASA) dózisa stabil volt. A vizsgálatba történő bevonás kritériuma a tünetek fellángolása volt, enyhe-közepes aktivitási forma megjelenése (UC-DAI, CDAI). A colitis ulcerosás betegeknek proctosigmoiditise vagy bal oldali colitise volt. A Crohn-betegekben a gyulladás a vastagbélre lokalizálódott. Az endoszkópos eltéréseket az ismert endoszkópos aktivitási indexek szerint értékeltük. (I. táblázat) Nem-stenotizáló és nem-penetráló gyulladásos formákat vizsgáltunk, melyet a bécsi Crohn-betegség osztályozás kritériumai (Vienna classification, 1998) alapján határoztunk meg. A vizsgált betegcsoportok nem és kor szerint eloszlás alapján összehasonlíthatók. A Crohn-betegeknek magas C-reaktív fehérje szintjük (CRP>10 mg/l) volt, tályog és fertőzés jele nélkül. A betegek sennoside B-t (X-PREP, Mundipharma) kaptak a kolonoszkópia előtt 16 órával.

I. Táblázat Colitis ulcerosás (CU) és Crohn betegek (CD) adatai

Dg.	No	Életkor (év) Átlag	Nem F/N Átlag	Endoszkópos aktivitási index	Klinikai aktivitási index	Kezelés
CU	24	28 (19-36)	13/11	G ₁ : 4 G ₂ : 12 G ₃ : 8	4≤UC-DAI	5-ASA
CD	20	30 (21-45)	13/7	8≤CDEIS≤14	150≤CDAI≤450	5-ASA
Kontroll	16	31 (25-38)	8/8			

G₀₋₃: A colitis ulcerosa endoszkópos gyulladási foka (Lennard-Jones, Br Med J, 1964, 1:89)
CDEIS: A Crohn betegség endoszkópos súlyossági indexe (Modigliani, Gut, 1989, 30:983-89)
UC-DAI: Colitis ulcerosa aktivitási index (Truelowe-Witts, Br Med J, 1955, 2:1041)
CDAI: Crohn betegség aktivitási index (Best, Gastroenterol, 1979, 77:843)
5-ASA: 5-amino-salicyl sav

Biopszia mintavétel

A vastagbél biopszia mintákat IBD betegekből a gyulladt és makroszkóposan a gyulladás által megkímélt sigma és jobb oldali colon területekről vettük. (1. táblázat). A kontroll mintákat colorectalis carcinoma szűrésen résztvevő, egészséges egyének kolonoszkópiás vizsgálatokor vettük. Az utóbbi mintavételből származó biopsziákat csak akkor használtuk vizsgálatainkban, ha a patológiai-szövetani elemzés során a nyálkahártya nem mutatott gyulladós tüneteket. Mindenik, a vizsgálatban részt vevő egyén nyilatkozatban fejezte ki hozzájárulását a kísérletekben való részvételre.

Vérszérumok gyűjtése

A kísérletben résztvevő betegektől 5-5 ml vért vettünk citrátos vákuumcsövekbe, majd 2000 rpm fordulattal 10 percig centrifugáltuk. A szérumokat (felülúszó) elkülönítettük és felhasználásig fagyasztoóban (-80C°) tároltuk.

Szövetteni vizsgálatok

Biopsziák előkészítése

A 4%-os paraformaldehidben (PFA) vagy acetonban rögzített fagyasztott biopsziákból 10 µm vastag metszeteket készítettünk. A PFA-ben rögzített minták egy részét paraffinba ágyasztuk, a metszeteket pedig a maximális nyomás kialakulásától számítva 3 percig főztük kuktában antigén feltárás céljából 0.1 M Na-citrát pufferben.

iNOS immunhisztokémia

iNOS kimutatására anti-iNOS poliklonális nyúlban termeltetett antitestet (OXIS, Portland, Oregon USA; Calbiochem, Darmstadt, Németország) használtunk 1:1000 hígításban PFA-ben fixált paraffinos vagy fagyasztott metszeteken. A metszeteket 4% normál kecske szérummal való 1 órás blokkolás után egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk az iNOS antitesttel. Az immunreakció előhívására Universal avidin-biotin-peroxidáz kit-et (Vector Laboratories, Peterborough, Egyesült Királyság) használtunk, melyhez a festék 3,3'-diaminobenzidin (DAB) volt. A DAB reakciót 0.005% H₂O₂ jelenlétében, a jelet esetenként 1% Ni(NH₄)₂SO₄ hozzáadásával erősítve, 0.05 M Tris-HCl (pH 7.6) inkubációs pufferben végeztük. Az eljárásban minden antitestet 0.1% marha szérum albumint (BSA), 0.1% Na-azidot és 0.1% Triton-X 100-at tartalmazó fiziológiás NaCl-t (0,15 N) tartalmazó 0.1 M foszfát pufferben (PBS)-ben hígítottuk. Minden inkubációs lépést követően a metszeteket 4 x 10 percig mostuk. Kontroll kísérletekben a primer antitestet kihagytuk az inkubálás során. Az antitest specificitásának ellenőrzésére a primer antitestet, a reakciónál alkalmazott hígításban, előinkubáltuk 250 µg/ml iNOS blokkolópeptiddel (az iNOS szekvencia 1131-1144 aminosavszekvenciájának alapján készült szintetikus peptid, Calbiochem, Darmstadt, Németország). A kontroll kísérletekben nem tapasztaltunk pozitív immunreakciót.

eNOS immunhisztokémia

Az acetonban szárított fagyasztott metszeteket inkubáltuk eNOS antitesttel (nyúl, 1:100, Calbiochem, Darmstadt, Németország) egy éjszakán át 4 °C-on, hasonló módon, mint azt az iNOS immunreakciónál tettük. Következő lépésként biotinnal jelölt második antitesttel inkubáltunk (1:200, Vector Laboratories, Peterborough, Egyesült Királyság), a reakciót, pedig avidinhez kötött FITC-tal (1:200, Boehringer Mannheim, Németország) tettük láthatóvá. Mindkét inkubációs lépés 2-2 óráig tartott. A mintákat háromszor mostuk a lépések között és végül a metszetet glicerin-PBS 1:1 tartalmú oldattal fedtük le. Az eNOS antitest specificitását az antitest megfelelően kihígított oldatának és 250 µg/ml eNOS blokkolópeptidnek (az eNOS szekvencia 599-613 alapján készített szintetikus peptid, Calbiochem, Darmstadt, Németország) előinkubálása után végzett immunreakcióval ellenőriztük. A kontroll kísérletekben nem tapasztaltunk pozitív immunreakciót.

NADPH-diaforáz hisztokémia

A NADPH-diaforáz reakciót (NADPH-d), a NOS izoformák gyors hisztokémiai kimutatására használják (77, 78, 79) 12, 13, 14). A PFA-ben rögzített fagyasztott metszeteket 1 óráig sötétben inkubáltuk szobahőmérsékleten az 1 mM β -NADPH-t, 0.2 mM nitrokék-tetrazóliumot és 0.3% Triton-X-100-at tartalmazó Tris-HCl pufferben (0.1 M, pH 8.1) (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország). A metszeteket, alapos PBS-sel való mosást követően, eozinnal festettük és glicerin-PBS 1:1 tartalmú oldattal fedtük le. Kontroll reakciókban a β -NADPH-t kihagytuk az inkubációs oldatból, vagy helyettesítettük α -NADPH-val vagy β -NADH-val. A kontroll kísérletekben specifikus festődést nem tapasztaltunk. A reakció elegyben 1 mM difenilén-jodonium-ot, a NADPH/NADH-oxidáz enzim gátlószerét alkalmazva, az eredeti reakcióhoz képest változást nem tapasztaltunk az aldehid-rezisztens NADPH-d reaktivitásban, mely alapján a NADPH-d reakciót jó közelítéssel a NOS-nak feleltethetjük meg. A nyálkahártya alkalikus

foszfatázának aktivitása enyhe háttérreakciót váltott ki néhány mintán, melyet 5 mg/ml levamizol hozzáadásával szüntettünk meg.

Kettős jelölés iNOS tartalmú sejtek azonosítása

A szövetek iNOS immunreaktív (iNOS-IR) sejtjeinek azonosítására az iNOS-ra előhívott paraffin metszeteket egér anti-CD68 (makrofág azonosítás) és anti-CD15 (neutrofil granulocita azonosítás) antitestekkel inkubáltuk. Második lépésben, a gyulladással sejt megjelenítésére DAKO LSAB2 kit-et (Dako, Glostrup, Dánia) használtunk, ahol sztreptavidinhez kötött alkalikus-foszfatáz volt a jelölő anyag és „Új Fukszin” volt a festék. Az iNOS immunreakció lilás-fekete színe [Ni(NH₄)₂(SO₄)₂-al felerősített DAB reakció] és a sejt azonosításra használt immunreakció rózsaszínes piros színe (fukszin) a metszeten jól elkülöníthető volt.

A PFA-del rögzített biopsziákból fagyasztott sorozat metszetek készültek annak eldöntésére, hogy a NADPH-d hisztokémiai és iNOS immunhisztokémiai reakciók milyen mértékben feleltethetők meg egymásnak.

Az érendothél kimutatása

A biopsziákban lévő erek kimutatására monoklonális anti-PECAM-1 (CD31) antitestet használtunk. Az antigén-feltárás céljából főzött paraffin metszeteket a primer antitesttel inkubáltuk (1:100 hígításban) 1 órán át 4 °C-on, majd anti-egér IgG-hez kötött alkalikus foszfatázzal (1:100 hígításban) 1 órán át szobahőn reagáltattuk. Az immunreakciót az iNOS kimutatására használt módszerhez hasonlóan végeztük. A színreakciót „Új Fukszin” festékkel, a háttér magfestést metilzölddel jelenítettük meg.

Az immunreakciók mennyiségi értékelése

A metszeteket *Olympus Provis AX/70A* mikroszkóppal vizsgáltuk, és *Olympus Camedia C4040* digitális kamerával fényképeztük. A minták mennyiségi kiértékelése számítógépes képelemző

Olympus analysis 2.11 szoftver segítségével (Olympus, Tokió, Japán) történt. Az iNOS-IR sejtek számát átlagfelületre vonatkoztattuk (sejtszám/mm²). A mintaelemzéskor, eltekintve néhány optikailag nem tökéletes képtől, a szoftver paramétereit egyféle beállítással használtuk. A paramétereiket úgy állítottuk be, hogy a szövetsérülések ne befolyásolják a tényleges eredményt.

iNOS immunblott

Öt-hat darab endoszkópiásan gyulladt CU és Crohn-beteg valamint kontroll vastagbélből vett biopsziákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd dörzscsészében nitrogén alatt porrá őröltük és a mintákat – 70 °C-os fagyasztóban tároltuk felhasználásig. A mintákat RIPA lízis puffer-ben (0.01 M NaH₂PO₄, 1% Nonident P-40, 1% Na-deoxycholate, 0.1% Na-dodecil szulfát (SDS), 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, 100 U/μl proteáz inhibitor keveréket (Sigma-Aldrich) használva homogenizáltuk. Az összfehérje tartalmat BCA módszerrel határoztuk meg, kontrollként BSA-t használva. ELISA leolvasóban 540 nm-en. A kapott értékeket GraphPad Prism szoftverrel, lineáris regressziós függvény alkalmazásával határoztuk meg mg/ml-ben. A teljes homogenizátum 100 μl-éhez 80 μl mintapuffert (100 mM Tris pH 6.8, 0.2% bromfenol kék, 20% glicerin) és 20 μl β-merkaptotetanolt adtunk és az oldatot 5 percig főztük 100 °C-on. Mindenik mintából 20 μl fehérje-oldatot (1 mg/ml) vittünk fel 10% SDS-poliakrilamid gélre, és a fehérjéket elektroforetikusan szétválasztottuk 120V feszültség mellett 1 órán keresztül. A fehérjéket a gélről nitrocellulóz membránra (Pharmacia, Bécs, Ausztria) blottoltuk (100 V-on 90 perc) transzfer pufferben (192 mM glycine, 25 mM Tris-base, 20% methanol) folyamatos kevertetése és hűtése mellett. A membránt kétszer mostuk 0,1% Twen 20-at (PBS-Twen) tartalmazó 0.1 M PBS-ben (pH 7.6), majd 1 órán át blokkoltuk 5% zsírszegény turista tejporthoz tartalmazó PBS-Tween oldatban. Ezt követően, 3 x 5 perc PBS-Tween-es mosás után, a membránt 1:500-ra hígított anti-iNOS antitesttel (Calbiochem, Darmstadt, Németország), inkubáltuk 2 órán át PBS-Tween-ben, amely 0.1% nem zsírszegény tejporthoz is tartalmazott. Újabb 3 x 5 perces PBS-Tween-nel való mosás után, a

membránt 30 percig inkubáltuk a másodlagos antitesttel (1:5000-re hígított anti-nyúl IgG-hez kötött torma-peroxidáz (Vector, Bulingam, CA, USA) PBS-Tween-ben. A membrán ismételt 3 x 5 perces PBS-Tween-ben, majd egyszer PBS-ben történő mosása után, a blottokon kifejlődő immunreakciókat kemilumineszcens reagenst tartalmazó kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA) segítségével hívtuk elő röntgen filmen. Mennyiségi analízis céljából, azonos betegségből származó, három különböző homogenizátumból készült immunreaktív sáv intenzitásainak átlagát számítottuk a sávok denzitometriás analízise alapján (Molekuláris Analízis Szoftver térfogat elemzésre, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A denzitometriás analízishez kontrollként BSA-t vagy miozin-foszfataz regulátor alegység különböző koncentrációi alapján készült kalibrációs görbét használtunk.

Endothel citológiai vizsgálatok

HUVEC preparálás és tenyésztés

A frissen izolált köldökzsínórokat a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrumának Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájáról szereztük be. A köldökzsínórokat steril edényben lévő sejttenyésztő folyadékban (50% normál humán szérum, 2% HEPES, 1% L-glutamin, 1% amfotericin, 1% penicillin, 45% sterilre szűrt M199-oldat, Sigma-Aldrich) szállítottuk a sejttenyésztő laboratóriumba. A köldökzsínór mindkét végét elkötöttük és a köldökvéna mindkét végébe kanült helyeztünk. A vénát a kanülök segítségével átmostuk steril PBS-sel, majd Hank egyensúlyi só-oldattal (HBSS, Sigma-Aldrich) és M199 folyadékkal. Ezután a vénát feltöltöttük 1 mg/ml kollagenázt tartalmazó M199 oldattal és CO₂ inkubátorba helyeztük 12 percre 37 C°-on. A véna endothel sejteket 2 x 20 ml M199-oldattal való kimosás után steril edénybe vettük le. A sejtszuspenziót 1000 rpm fordulattal 15 percig centrifugáltuk, a felülúszót eldobtuk és a sejteket újra szuszpendáltuk tenyésztő folyadékban.

A sejteket (2×10^6 sejt/ml koncentrációban) oltottuk műanyag tenyésztőedénybe. Egy nappal a leoltás után az edényeket mostuk 37°C-os HBSS-sel, majd ismét tenyésztőfolyadékot adtunk a sejtekhez. Négy-öt nap tenyésztés után, miközben a sejtek intenzív növekedésnek indultak és a tenyésztőedényt benőtték, a sejteket HBSS-sel mostuk, majd 1 ml tripszin-EDTA (tripszin:/EDTA = 1:25) oldattal leemésztettük az edény faláról. A sejteket 1 ml tenyésztő oldatban felfuszpendáltuk és egy steril edényben összeráztuk. A sejteket ezután ismét leoltottuk, növesztettük és összegyűjtöttük a fentiekhez hasonlóan. A sejteket kísérlet céljából tenyésztőlapokra helyeztük 2×10^6 sejt/ml koncentrációban és szaporítottuk. Amikor az egyrétegű sejttenyészet 20-30%-os vagy 70-80%-os fedettséget mutatott a sejteket 50% normál, CU vagy Crohn-beteg szérumát tartalmazó tenyésztő oldatba helyeztük és különböző ideig (2, 4, 8, 12, 20, 24, 36, 48 óra) inkubáltuk.

Immunblott

A tenyésztő oldat eltávolítása után a sejteket jéghideg PBS-ben mostuk, majd sejtkaparóval 50 µl RIPA lízis pufferben hígított, 100 U/ml proteáz inhibitor mixet tartalmazó oldatban összegyűjtöttük. A sejtek lizálását folyamatos rázással gyorsítottuk. Öt µl lizátumhoz 45 µl RIPA puffert adtunk, melyből fehérjét mértünk hasonlóan a biopszia mintákhoz. A fehérje oldatokat lefagyasztottuk és -80 °C-on tartottuk. A mintákból immunoblottot a biopsziákhoz hasonlóan végeztük. Minden mintából 30 µg fehérjét tartalmazó oldatot vittünk fel a géltre. Primer antitestként anti-eNOS (1: 5000, kat. szám: 482726, Merck-Calbiochem, Darmstadt, Németország) és anti-iNOS (1:2000, kat. szám: AB5384, Chemicon, Temecula, CA, USA) nyúlban termeltetett poliklonális antitesteket használtunk. A NOS reaktív sávokat mindenegyes blotton a 2 órás normál szérummal kezelt mintákra normalizáltuk denzitometráls alapján és ezen kontrollhoz képest az eltérést százalékban fejeztük ki.

Immunfluoreszcencia vizsgálatok

A sejteket sterilre szűrt 10%-os zselatinnal bevont fedőlemezekben tenyésztettük. Azon tenyészeteket, melyeket a sejtosztódás, eloszlás és sejthalál (apoptózis/nekrózis) követése céljából vizsgáltunk 20-30%-os lefedettség mellett rögzítettük, míg a NOS izoformák kimutatásához 70-80%-ban fedett tenyészeteket használtunk. A különböző szérumokkal történt kezelések után a sejteket felszálló alkohol sorban (50, 70, 96%) rögzítettük, majd rehidráltuk PBS-sel. A NOS izoformák kimutatását a biopszia metszeteken végzett immunhisztokémiai eljáráshoz hasonlóan végeztük. Második antitestként 1:40 hígításban FITC-el kapcsolt anti-nyúl IgG-t használtunk 30 percig szobahőn.

Az osztódási intenzitás vizsgálatokor az 50%-os beteg és egészséges szérumok mellett 50% normál szérumban oldott NOS gátlót, 10^{-4} M nitro-L-arginin metil-észtert (L-NAME, Sigma-Aldrich) is alkalmaztunk.

A sejteket a proliferációs marker Ki-67 (klón szám: MIB-1, Dako, Dánia) ellen készült monoklonális antitesttel reagáltattuk (1:100 hígításban) 2 óráig szobahőn. Második antitestnek FITC-cel konjugált anti-egér IgG-t (1:40, Dako) használtunk.

A kezelések következtében változó HUVEC életképesség mértékét, az apoptotikus/nekrótikus sejtek mennyiségét kimutató annexin-V-biotin kit-tel (Boehringer-Mannheim, Németország, kat. szám: 1828690) végeztük. A sejtek rögzítése előtt a tenyésztő oldat propidium-jodid oldattal (1:50 annexin-V-biotin törzsoldat hígítva 0.01M HEPES pufferben, eltávolítása és szobahőmérsékletű PBS-el való mosást követően a sejteket annexin-V-biotin/pH 7.4, amely 0.14 M NaCl-ot, 0.005 M CaCl₂-ot és 1 µg/ml propidium-jodidot tartalmazott) jelöltük 15 percig. Ezután HEPES-sel való alapos mosást követően a sejteket rögzítettük metanol-etanol (1:1) keverékében 1 percig, és 5 µg/ml avidin-fluoreszcein-nel inkubáltuk szintén 15 percig. Mosás után a fedőlemezen lévő sejteket tárgylemezre csöppentett PBS-glicerin 1:1 oldatra fektettük. A sejtosztódás aktivitásának valamint az apoptózis/nekrózis vizsgálatára jelölt sejteket a lefedés előtt 1% toluidin-kékkel festettük, mely a sejtmagok festődésén keresztül a teljes sejtszám

meghatározására adott lehetőséget. A sejtvázas alakjának és épségének vizsgálatát az aktin rostok 0.2 $\mu\text{g/ml}$ falloidin-FITC-cel (Sigma-Aldrich) 1 óra inkubálás után történő festésével végeztük.

A sejtekről készült digitális felvételeken a fényerőt és a kontrasztot azonosan állítottuk be Jasc Paintshop Pro 7.0 szoftverrel. A fluoreszcens felvételekkel azonos területekről látható fényel is készítettünk felvételeket (toluidin-kék festés) mennyiségi elemzés céljából. Minden egyes adatpontban legalább 10^3 sejtet számoltunk meg; az osztódó, apoptotikus és nekrotikus sejtek számát az összes sejtszámhoz viszonyítva százalékban adtuk meg.

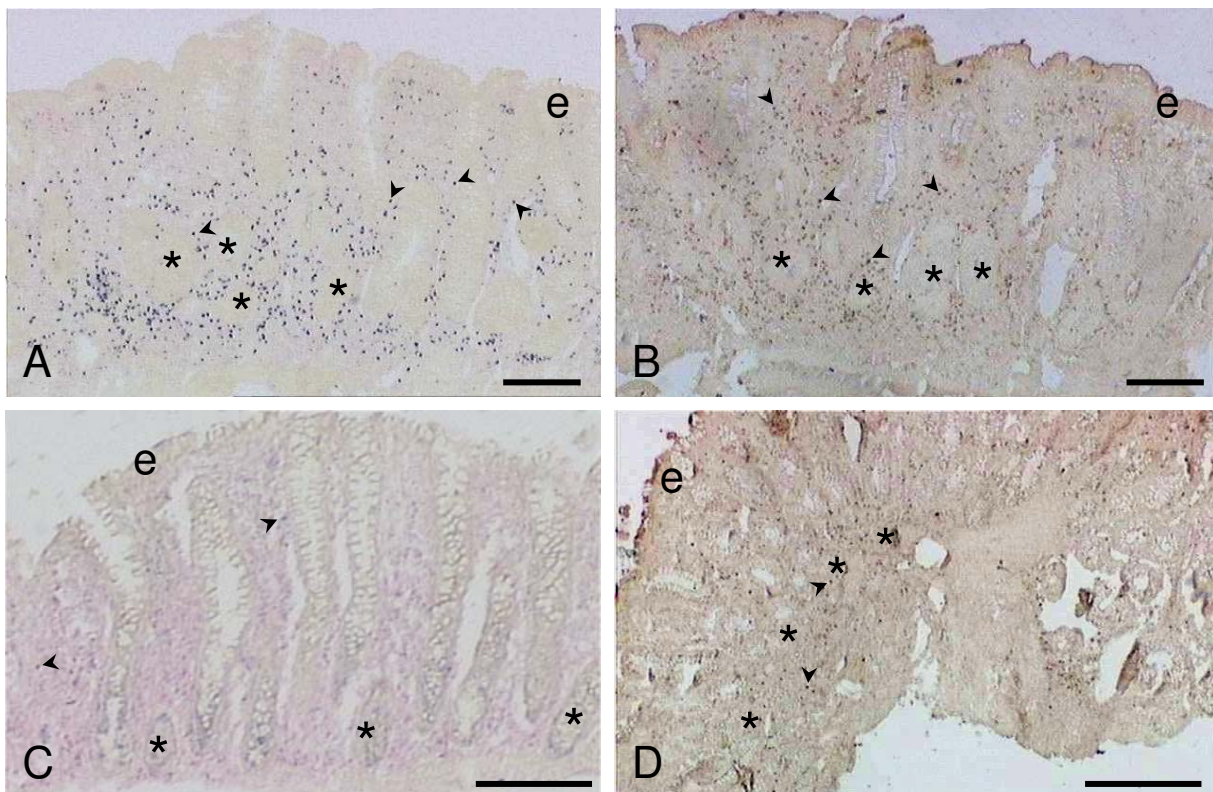
Statisztika

A mennyiségi adatokat átlag \pm átlagtól mért közepes eltérés értékeként adtuk meg. Az eredmények szignifikanciáját páratlan Student *t*-teszttel, a csoportok (gyulladt illetve nem gyulladt, CU illetve Crohn-beteg biopsziái és szérumszintek) közötti különbségek szignifikáns voltát pedig variancia analízissel (ANOVA) becsültük meg. A *P* értékeket az ábrákon illetve az ábramagyarázatoknál tüntettük fel. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, a $p < 0.01$.

10. Eredmények

Az iNOS+ immunreaktív sejtek megoszlása és jellemzése IBD nyálkahártyában

Aktív colitis ulcerosa gyulladt területein jelentős mennyiségű, hisztokémiailag NADPH-diaforáz reakciót adó sejtet észleltünk.(1.1A ábra). A NADPH-diaforáz pozitív sejtek főként a Lieberkühn kripták mélyén és falaik mentén helyezkedtek el. Párhuzamos metszeteken iNOS ellenes antitestekkel végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az iNOS immunreaktív sejtek és a NADPH-diaforáz pozitív sejtek eloszlása és morfológiai jellemzői azonosak voltak.(1.1B ábra) A colitis ulcerosás mintákkal ellentétben Crohn betegekből származó mintákban szembetűnően kevesebb volt a NADPH-diaforáz pozitív (1.2A) és az iNOS (1.2B) immunreaktív sejtek előfordulása.



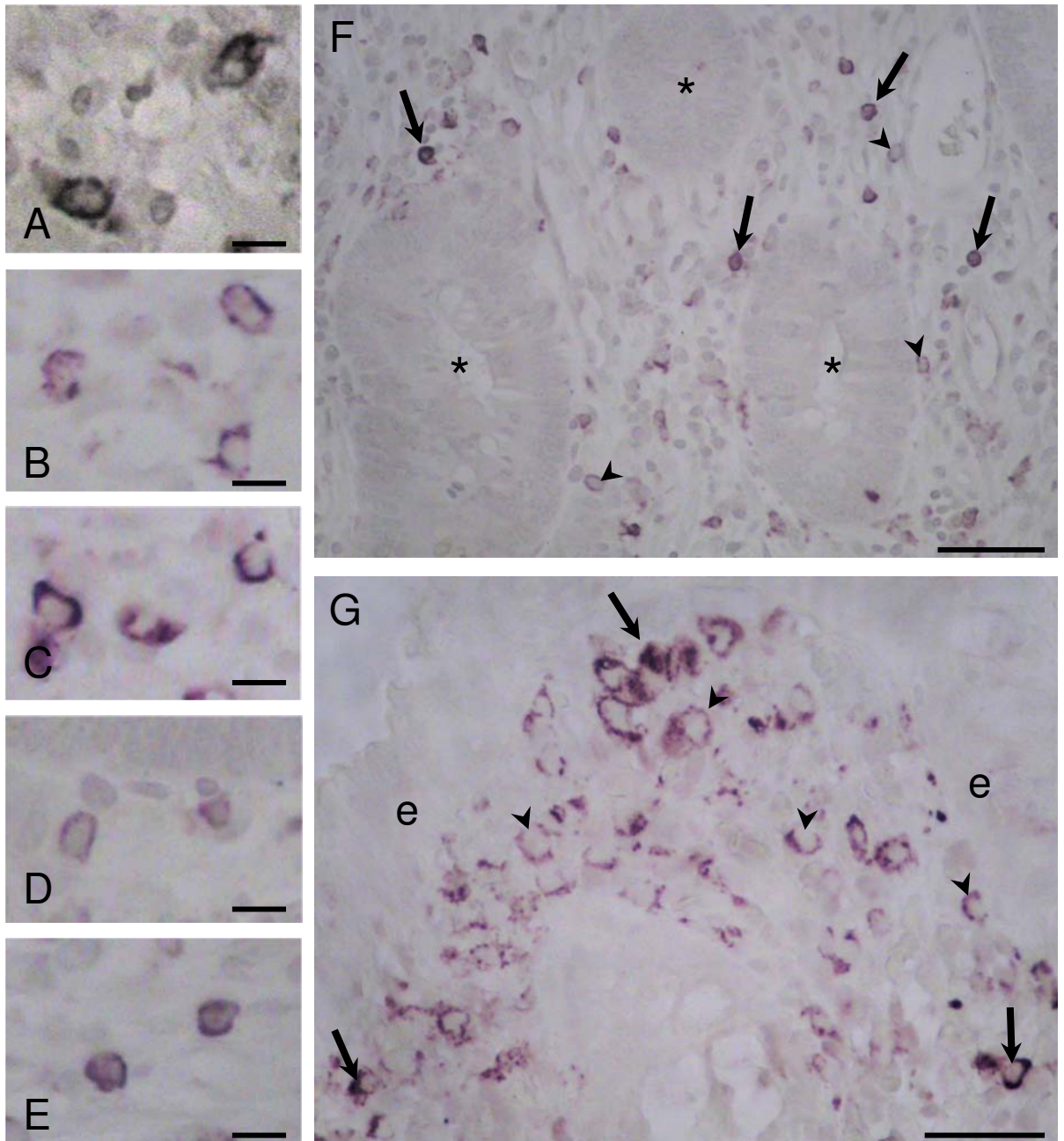
1. Ábra iNOS-t tartalmazó sejtek IBD betegek colon biopsziáiból készített horizontális metszetében, teljes nézetben. // **A-B.** Az UC mucosában az immunsejtek NADPH-diaforáz hisztokémiai reakcióval (A) detektálhatók A NADPH-diaforáz reaktív sejtek (nyílhegyek) főként a Lieberkühn-kripták bazális részén és a fala mentén akumulálódnak. Csillag: a kripták alja; e: a mucosa epitheliális felszíne. A metszeteken iNOS kimutatást (B) is végeztünk immunreakció segítségével, számos iNOS-IR sejt mutatható ki a kripták oszlopa mentén és bazális részén. A. Megjegyzendő, hogy az iNOS-IR sejtek eloszlása és jellemzői hasonlóak az A ábrán látható NADPH-diaforáz reaktív sejtekére. Csillag: a kripták alja; e: a mucosa epitheliális felszíne. **C-D.** CD mucosából készített metszetek. Ezekben a biopsziákban csak kevés NADPH-d reaktív (C) és iNOS-IR sejt (nyíl) található a lamina propriában. Csillag: a kripta alja; e: a mucosa epitheliális felszíne.. A 3. ábrán látható az IBD-ben kimutatható iNOS-IR sejtek kvantitatív kiértékelése és statisztikai analízise. // A skála egy beosztása 400 μm . //

Kettős jelölésű immunhisztokémiai vizsgálatok során gyulladt IBD nyálkahártya iNOS pozitív gyulladásosejtjeinek CD68 és CD15 felszíni membrán antigén pozitivitása a makrofágokat (CD68-IR sejtek) valamint a neutrofilek azonosította. (2. ábra) Colitis ulcerosa nyálkahártyában a CD15 pozitív sejtek túlnyomó többsége iNOS pozitivitást mutatott. (2F ábra) Ezzel ellentétben Crohn betegségben a domináns gyulladásosejt típus a makrofág volt, ugyanakkor a CD68 immunreaktív sejtek kisebb hányada mutatott iNOS immunreaktivitást. (2G ábra)

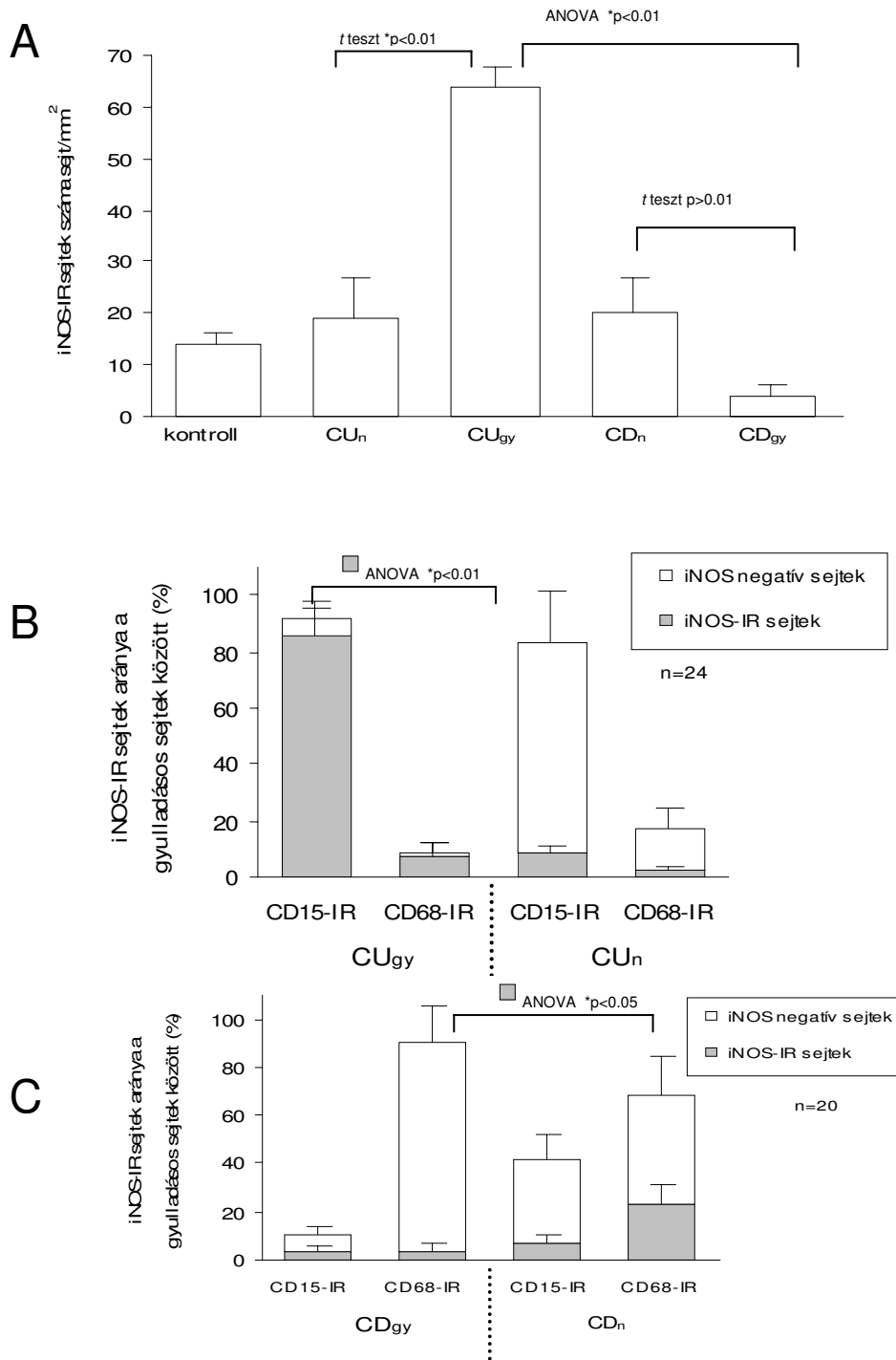
Számítógépes képanalízissel végzett mennyiségi vizsgálat szignifikánsan több iNOS immunreaktív sejtet mutatott colitis ulcerosa gyulladt területeiről származó nyálkahártyában (UC_i 64 ± 4 sejt/ mm^2) mint a Crohnos gyulladt területeken (CD_i 4 ± 2 sejt/ mm^2). (3.A ábra) Ugyancsak szignifikáns különbség jelentkezett a colitis ulcerosás gyulladt és nem gyulladt területek iNOS immunreaktivitása között (UC_u 19 ± 8 sejt/ mm^2). (3.A ábra)

A CD15 immunreaktív sejtek száma messze meghaladta a CD68 pozitív sejtek számát aktív colitis ulcerosában, az eloszlási arányt tekintve 92% illetve 8%-t találtunk. (3B ábra) A CD15 immunreaktív sejtek 92,4%-a iNOS pozitív volt ($85 \pm 10\%$ -a a CD15+ és CD68+ sejtek összegének) míg CD68+ sejtek 87,5%-a mutatott iNOS immunreaktivitást is ($7 \pm 5\%$ a teljes festődő sejtszámnak). (3.B ábra) A colitis ulcerosás nem gyulladt területeken az iNOS pozitív sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt, 9,6% a CD15+ sejtek között és 11,8% a CD68+ sejtek között. Az összes CD15 és CD68 festődést mutató sejten belül, csak az iNOS pozitív neutrofilek (CD15+ sejtek) aránya mutatott szignifikáns különbséget a gyulladt és nem gyulladt területek között (UC_u $8 \pm 3\%$, UC_i $85 \pm 10\%$)

Aktív Crohnos gyulladásosejt területeken jellemzőbb volt a CD68+ sejtek jelenléte (90%), szemben CD15+ sejtekkel (10,0%). (3.C ábra) A sejtek alacsony hányada mutatott iNOS pozitivitást, a CD15+ sejtek esetében 14,3%, a CD68+ sejtek között pedig csak 4,4%.



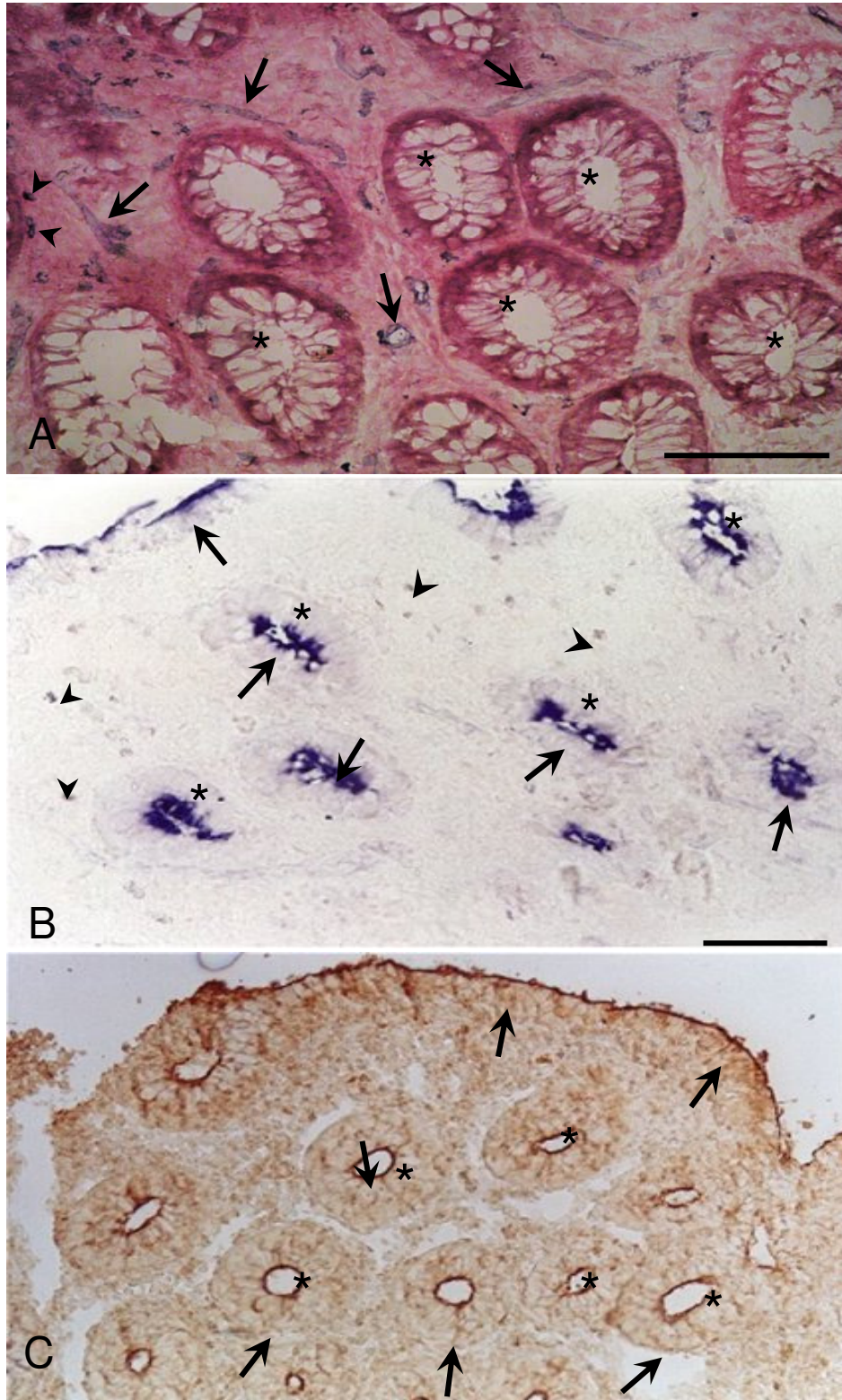
2. Ábra. Az iNOS-IR sejtek sejtípusának meghatározása paraffinba ágyazott IBD biopsziákon. // **A.** Az UC kötőszövetében fekete színű iNOS-IR sejtek ABC-Ni/DAB módszerrel detektálhatók. // **B.** Az UC-ben lévő anti-CD68 ellenanyaggal megjelölt makrofágokat kromogénként New Fuchstint (rózsaszín) használó AP reakcióval detektáltuk. // **C** Azok a sejtek, amelyek iNOS-ra és CD68-ra egyaránt pozitívak voltak, lilásfekete színűek, ami a fekete (lásd A) és a rózsaszín (lásd B) immunreaktív anyagok átfedéséből adódik. // **D.** Az UC-ben jelenlévő CD15-IR immunsejtek (neutrofil granulociták) megjelölése New Fuchstinnal (rózsaszín) történt az AP reakció kifejlődése közben. // **E** Egy UC metszet két sejtje anti-iNOS és anti-CD15 kettős jelöléssel. // The A lilásfekete szín az iNOS-IR (fekete, lásd A) és a CD15-IR (lásd D) színének az átfedése miatt alakul ki. // **F.** Számos sejt mutat mind iNOS, mind CD15 (neutrofil granulocita) immunpozitivitást (lilásfekete szín, nyíl) UC esetében a colon kötőszövetében. Néhány sejt csupán CD15 immunreaktivitást (nyílhegy) mutat. // Kersztmetszet. // Csillag: Lieberkühn kripta. // **G.** CD esetben egy boholy apikális részének nagyított képe számos CD68-IR (makrofág) sejtrel (nyíl, nyílhegy). // Ezen CD68-IR sejteknek csak némelyike mutat iNOS immunreaktivitást (kékesfekete szín, nyilak), többségük csak anti-CD68 ellenanyaggal jelölt (rózsaszín, nyílhegy). // Horizontális metszet. // E: a boholy epitéliuma; lu: a colon lumene. // A skála egy beosztása: 10 µm az A, B, C, D, E képen, 40 µm az F képen és 25 µm a G képen.



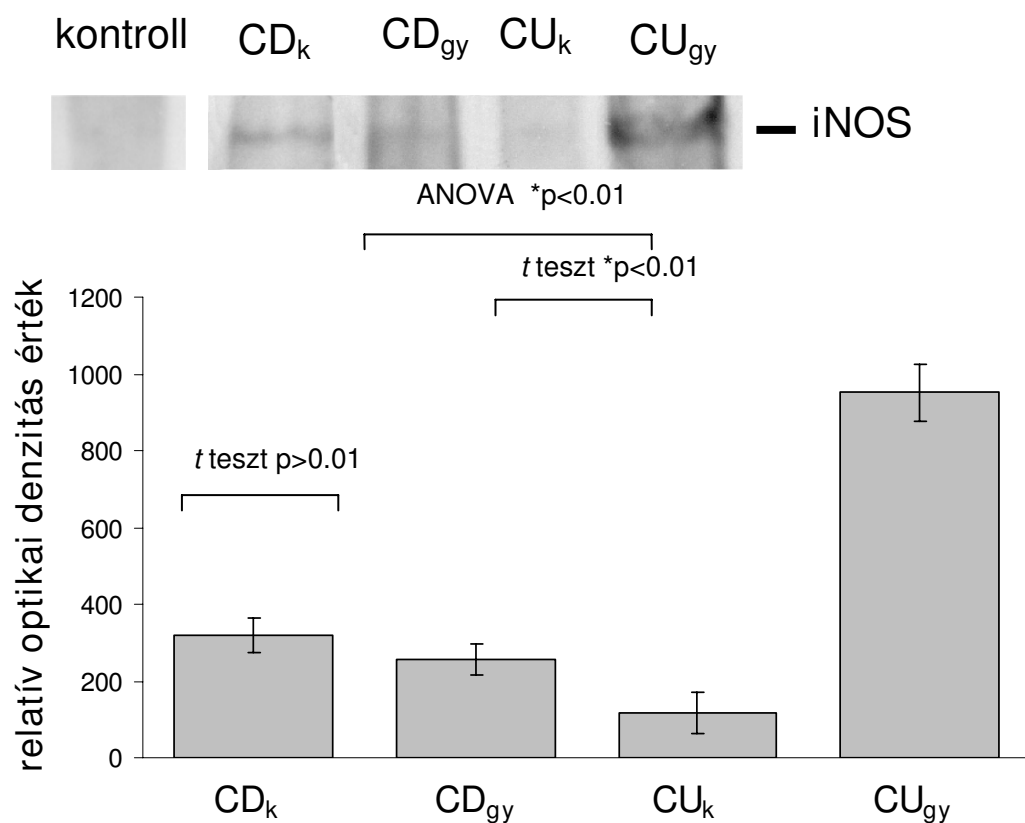
3. Ábra Az iNOS-IR sejtek kvantitatív értékelése (A) és sejttípusának meghatározása UC (B) és CD (C) esetében. // **A.** Az iNOS-IR sejtek száma szignifikánsan magas az UC-ből (UC_i), alacsonyabb CD-ből származó gyulladt mucosa biopsziákban (CD_i) az IBD colon nem gyulladt részeiből (UC_u, CD_u) valamint egészséges páciensekből vett biopszia mintákhoz képest. // **B-C.** Az IBD mucosa szöveti metszeteiben az iNOS-IR együtt fordul elő a CD15-IR-rel vagy a CD68-IR-rel (lásd 2. ábra). // Számítógépes képanalízis segítségével meghatároztuk a CD15-IR és a CD68-IR sejtek számát. A sejteket iNOS-IR és iNOS immunonegatív csoportokra osztottuk. // Mind a gyulladásoz (UC_i, CD_i), mind a nem gyulladásoz (UC_u, CD_u) esetekben az oszlopok mutatják a CD15-IR és a CD68-IR sejtek számát százalékban kifejezve. A részletes számadatak a szövegben található. UC_i és UC_u esetén kiugróan magas a CD15-IR / CD68-IR sejtek aránya (B), CD esetében viszont fordított az arány (C), magasabb értékkel CD_i, és alacsonyabb értékkel CD_u esetén. // UC_i esetén a CD15-IR és a CD68-IR sejteknek igen nagy százaléka volt iNOS-IR, míg UC_u esetén csak néhány sejt mutatott iNOS immunreaktivitást (B). CD_u-ban az immunsejtek között magasabb az iNOS-IR sejtek aránya, mint CD_i-ben, ahol a CD15-IR és a CD68-IR sejtek nagy része nem mutatott iNOS immunreaktivitást. // Minden biopsziából (UC=24, CD=20) húsz metszetet vizsgáltunk. //

A makroszkóposan nem érintett területeken (CD_u) az iNOS immunreaktív sejtek aránya a CD_{15}^+ sejtek között nem változott jelentősen (16,7%), míg a CD_{68}^+ sejtek között magasabb volt, mint a gyulladt területeken (33,8%). A teljes sejtszámra (CD_{15}^+ és CD_{68}^+) vonatkoztatva, az iNOS immunreaktív CD_{68}^+ sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a gyulladt területeken (CD_i $4\pm 3\%$) mint a gyulladás által nem érintett területeken (CD_u $23\pm 8\%$). A metszetek jelentős részén, elsősorban azokon, ahol az iNOS immunreaktív sejtek száma alacsonyabb volt, a gyulladt területeken az epithelium apicalis része erős NADPH-diaforáz (4.B ábra) és iNOS (4.C ábra) festődést mutatott mind colitis ulcerosában mind Crohn betegségben. A kontroll vizsgálatokon NADPH-diaforáz reaktív vagy iNOS immunreaktív epithelium nem volt kimutatható. (4.A ábra)

Az IBD betegek kolonoszkópos biopsziás mintáinak homogenizátumából végzett immunblot vizsgálat egy 130 kD molekulatömegű iNOS immunreaktív fehérje sávot mutatott, mely a human iNOS molekulatömegének megfelel. (5. ábra) A sáv intenzitása szignifikánsan nagyobb volt a gyulladt colitises anyagban, mint a nem gyulladt mintákban, ezzel szemben a Crohn betegekből származó anyagban nem jelentkezett szignifikáns intenzitásbeli különbség az érintett és ép területek között, valamint a kontroll csoportokhoz viszonyítva. (5 ábra) Az immunblot denzitometriás szemikvantitatív vizsgálata bizonyította az iNOS szignifikáns mennyiségi különbségeit a colitis ulcerosás és a Crohnos biopsziák között. (5 ábra)



4 Ábra. iNOS expresszió IBD-ben a colon epitheliális sejtjeiben. // **A.** Kontroll páciensből származó colon mucosa keresztmetszet, ahol nem látható NADPH-diaforáz reaktivitás a kripták (csillag) epitheliális sejtjeiben. Különböző átmérőjű erek endothelsejtjei (nyíl) és a lamina propria néhány sejtje (nyílhegy) NADPH-diaforáz reaktivitást mutat. // A metszet **rozinnal** festett. // **B.** Néhány UC esetben a colon gyulladásos helyein az epithelium apikális része NADPH-diaforázra erősen pozitív (nyíl). // NADPH-diaforáz reaktív sejtek a lamina propriában is láthatók (nyílhegy). // Csillag: Lieberkühn kripták. // **C.** Néhány CD biopsziában az iNOS-IR (nyíl) a mucosa epithelsejtjeinek apikális részén található. / Csillag: Lieberkühn kripták. // iNOS-t ABC-DAB módszerrel mutattuk ki. Skálabeosztás: 100 µm.



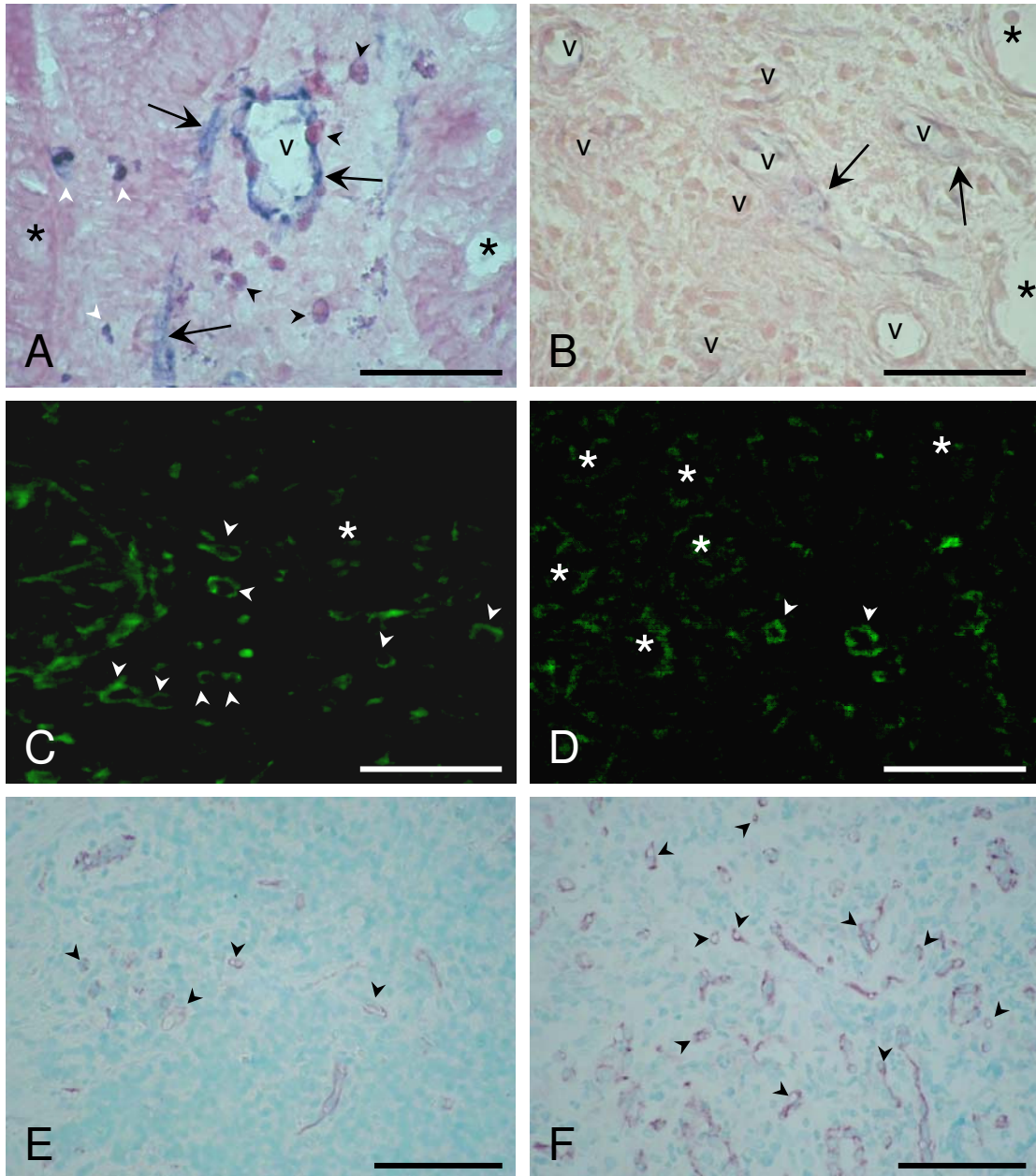
5. Ábra IBD colon mucosa biopszia homogenizátum immunoblot anti iNOS-sal. // Az egyes sávok a kontroll, valamint UC-ben és CD-ben szenvedő páciensek intakt (nem gyulladt, u alsó index), és gyulladt (i alsó index) colon szakaszaiból származó 5-6 biopsziamintából nyert fehérjét tartalmaznak azonos mennyiségben (20 µg/ml). Az anti-iNOS sávok egy 130 kDa fehérjét jelölnek, ami a humán iNOS molekulatömegének felel meg SDS-PAGE-en. // Megjegyzendő, hogy UC-ben gyulladt mucosa esetén sokkal nagyobb a sávok intenzitása, mint az intakt mucosánál. Ezzel szemben CD esetén az iNOS-nak megfelelő sávok mind az intakt, mind a gyulladt szakaszoknál halványak, ami a mucosa alacsony iNOS szintjére utal. // Három sáv denzitometriás vizsgálatát végeztük el az egyes biopsziaminták különböző homogenizátumaiból.

Az eNOS lokalizációja és a vasculáris status összehasonlítása

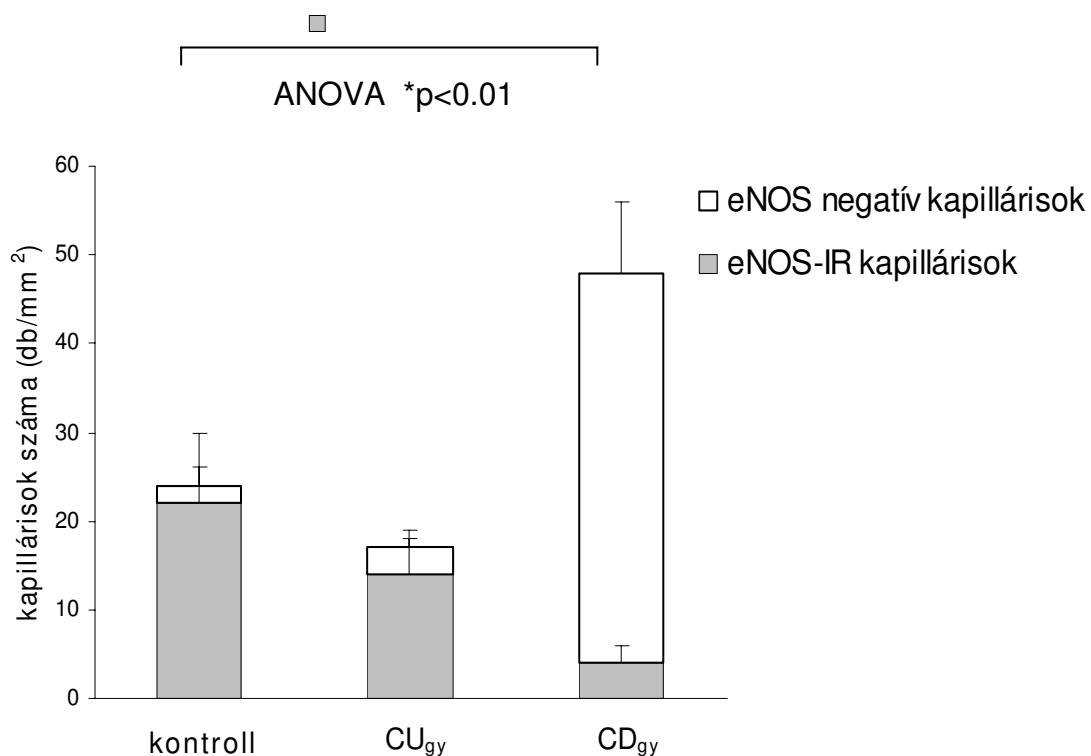
Jelentősen különbözött az érstruktúrák NADPH-diaforáz festődése a colitis ulcerosus és Crohnos mintákban. Colitis ulcerosusban általában tág érképleteket találtunk, melyek endotheliuma intenzív NADPH-diaforáz reaktivitást mutatott.(6.A ábra) Ezzel szemben Crohn betegekből származó mintákon relatíve sok, kis átmérőjű ér volt kimutatható, melyek endotheliuma gyakorlatilag nem mutatott NADPH-diaforáz pozitivitást. (6.B ábra) Az erek fala a lamina propria területén megvastagodott és lumenük szűkebb volt.(6.B ábra) A kontroll csoportból származó mintákban a kapillárisok NADPH-diaforáz reaktivitása mérsékelt volt. (4.A ábra) Hasonló mintázatot találtunk a nem gyulladt colitises és Crohnos anyagban is.

A kapillárisok és a kis erek eNOS immunreaktivitása kifejezett volt a colitis ulcerosus metszetek lamina propriájában, ezzel szemben eNOS immunreaktív endothelium alig volt detektálható a Crohn betegek mintáiban. (6.C, 6.D ábra) Ugyanakkor, a kripták körüli myoepithelialis sejtek eNOS immunreaktivitása megfigyelhető volt minden vizsgált csoportban (6.C, 6.D ábra)

A colon biopsziás minták vaszkuláris statusának elemzésére a PECAM-1 (CD31) endothelialis markert használtuk. (6.E ábra) A CD31 és az eNOS immunreaktivitás között észlelt minőségi különbségeket (6.C, 6.F ábra) megerősítette a számítógépes képanalízissel végzett mennyiségi vizsgálat eredménye. A colitis ulcerosus mintákban 17 ± 6 ér/mm², Crohnos mintákban 48 ± 12 ér/mm², míg kontrollban 24 ± 8 ér/mm² volt a CD31 pozitívitás mértéke. (7. ábra) Míg a kontroll és a colitis ulcerosus metszeteken az eNOS/CD31 immunreaktív kapillárisok aránya 92,0% illetve 82,3% volt, addig a Crohnos anyagban ez az arány szignifikánsan alacsonynak bizonyult (8,3%)



6. ábra Az eNOS megoszlása és az erek morfológiája a colonban UC (A, C, E) és CD (B, D, F) esetén. // **A.** NADPH-diaforáz reaktivitás a mucosában UC esetén. // A kapillárisok és egy nagyobb ér (v) endothelsejtjei NADPH-diaforáz reaktivitást mutatnak (kék, nyíl), ami NOS jelenlétére utal az érrendszerben. // Eozin festéssel immunsejtek (nyílhegy) mutathatók ki az érfalban és a lamina propriában. // Ezen sejtek némelyike, főként a kötőszövetben és az epithelium közelében lévők NADPH-diaforáz reaktivitást mutatnak (fehér, nyílhegy). // Csillag: Lieberkühn kripták keresztmetszetben. // **B.** Számos vérér (v) található CD mucosában, a NADPH-diaforáz reakció kék csapadék azonban csak ritkán látható az endotheliumban (nyíl). // A kapillárisok és a kis átmérőjű vérerek eNOS immunreaktivitása igen nagymértékű a lamina propriában UC esetén (nyílhegy). A kripták (csillag) körül mioepithel sejtek mutatnak háttérfestést. // **D.** eNOS-IR ritkán látható a mucosa ereiben (nyíl) CD esetén. // A kripták (csillag) körül mioepithel sejtek mutatnak háttérfestést. // C-D acetonnal fixált metszetek, ahol az eNOS megjelölése ABC-FITC-cel történt. // **E.** , Az anti-CD31 ellenanyag endothelsejtjeiket jelöl UC lamina propriában, néhány sejt kis átmérőjű éret képez (nyílhegy). CD31-IR-t AP-New Fuchssinnal jelöltük, a sejtmagok festése metilzölddel történt. // **F.** CD esetén több, anti- CD31 ellenanyaggal detektálható kis átmérőjű ér (nyílhegy) található a lamina propriában. A CD31-IR-t AP-New Fuchssinnal jelöltük, a sejtmagok festése metilzölddel történt. A, B, C és D fagyasztva készített metszetek, E és F pedig paraffinba ágyazott metszet. A 7. ábra tartalmaz számszerű adatokat a NOS (NADPH-d reaktív) eloszlásáról IBD mucosa kapillárisaiban. // , Egészséges mucosában NADPH-diaforáz reaktivitást mutató elemek láthatók a 4A. ábrán. // , Skálabeosztás: 100 µm A, B, C és D képen, 200 µm E és F képen.

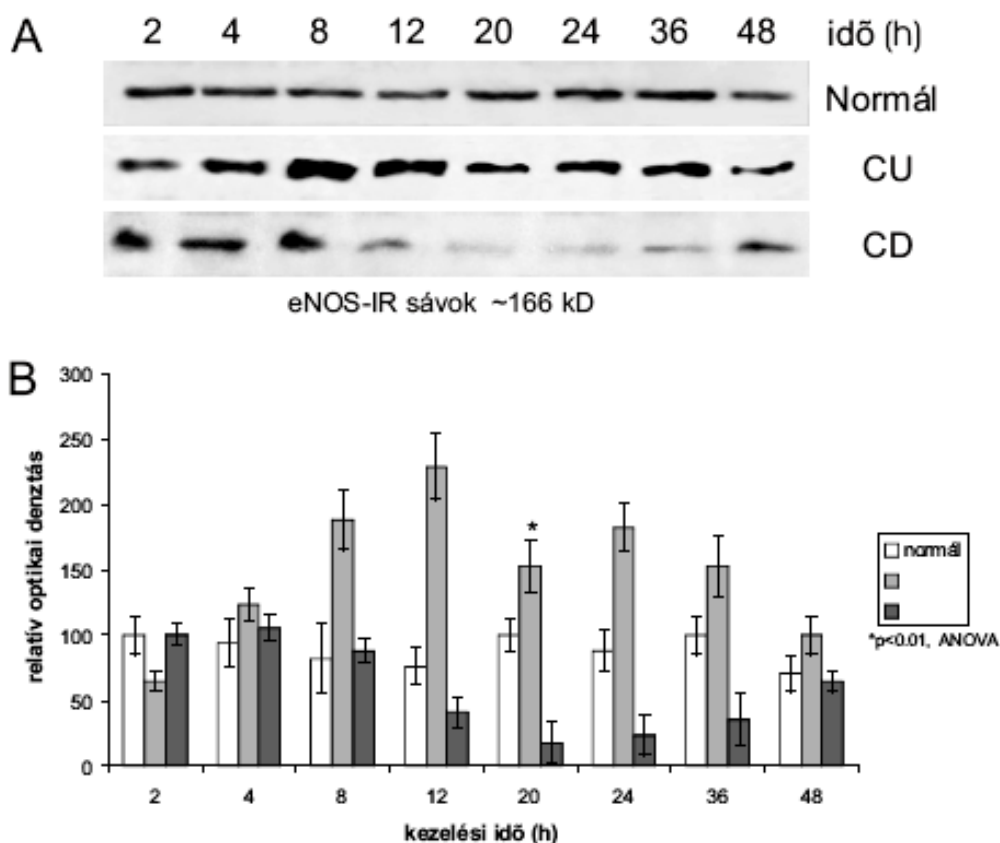


7. Ábra A lamina propriában előforduló eNOS-IR és nem immunreaktív kiserek (kapillárisok) számának becslése gyulladt IBD biopsziák (UC_i, CD_i) esetén. // A kapillárisok számát a CD31-IR mennyiségének számítógépes elmozdításával határoztuk meg. // , Az adatok azt mutatják, hogy CD esetén sokkal több kapilláris van a lamina propriában, mint UC esetén. // CD_i-ben az eNOS-IR kapillárisok aránya kicsi, ezzel szemben UC_i esetén és a kontroll pácienseknél a kapillárisok többsége eNOS immunreaktivitást mutatott. // Az egyes biopsziákból (kontroll=16, UC_i=24, CD_i=20) húsz metszete vizsgáltunk.

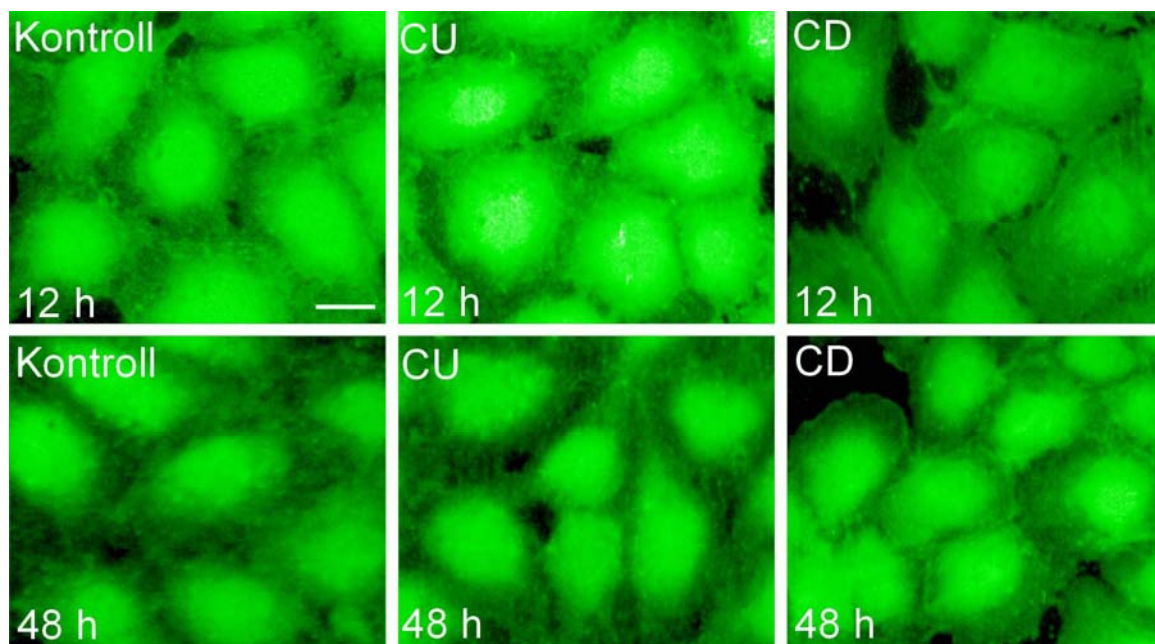
Az eNOS kimutatása immunblott és immunfluorescens vizsgálattal HUVEC-n

A HUVEC lizátum Western-blot vizsgálata a humán eNOS-nak megfelelő molekulatömegű 160 kDa immunreaktív csíkot mutatott ki. (8.A ábra) 50%-s normal humán szérummal kezelt HUVEC sejt kultúrában az eNOS mennyisége nem változott szignifikánsan a 48 órás vizsgálati idő alatt. Ugyanakkor az 50%-s colitis ulcerosás szérum hatására az eNOS szint 8 óra után kezdett emelkedni és 12 óránál érte el a csúcértéket (a relatív optikai denzitás értéke $188 \pm 23\%$ és $229 \pm 26\%$, $P < 0,01$). A tizenkettedik órában az eNOS szint duplája volt a második órában mért normál szinthez képest ($100 \pm 15\%$). 12 órán túl 50%-s colitis ulcerosás szérummal történt inkubáció során az eNOS szintje csökkent (36 óránál $153 \pm 23\%$, $P < 0,01$), és a kontroll szintjét 48 óránál érte el ($100 \pm 8\%$). 50%-s Crohnos szérummal történt inkubálás során az eNOS nem változott számottevően 8 óráig, majd csökkenni kezdett 12 óra után ($41 \pm 12\%$, $P < 0,01$) 20-24 óra között érve el a legalacsonyabb szintet ($18 \pm 16\%$ és $23 \pm 15\%$, $P < 0,01$). Ezt követően lassú fokozatos növekedés volt észlelhető és 48 óránál a kontrollhoz közel megegyező szintet detektáltunk ($65 \pm 8\%$, 8.A, 8.B).

Az eNOS immunfluorescens vizsgálata HUVEC-ben az enzimet főleg a sejt citoplazma nukleáris régiójában azonosította, de kimutatható volt a sejt perifériás területein is. (9. ábra) A normál humán szérum nem befolyásolta az eNOS immunreaktivitás intenzitását és eloszlását HUVEC-ben. Colitis ulcerosás szérummal történt 12 órás kezelést követően az eNOS immunreaktív terület kiszélesedése és az immunfluorescens aktivitás enyhe élénkülése volt észlelhető. Ezzel szemben Crohnos szérummal történt kezelés negyedik órájától kezdve az eNOS immunreaktivitás mindinkább a sejtek központi részére koncentrált és az immunfluorescens aktivitás csökkent. (9 ábra) Nem találtunk egyértelmű különbséget a normál, a colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatása között a HUVEC eNOS immunfluorescens aktivitásában a 48 órás periódus végén.



8. Ábra. IBD szérummal kezelt HUVEC eNOS mennyiségének Western blott vizsgálata. Hetven százalékos konfluenciát mutató HUVEC-t inkubáltunk 50%-s normál, 50%-s CU és 50%-s CD szérummal. A. A blottok három különböző kísérletről származnak, melyek során ugyanabból a köldökzsínorból készült sejtenyészeteket egyidejűleg kezeltünk. B. Az immunblotok denzitometriás vizsgálata. Az adatokat az átlag \pm átlagtól mért közepes eltérés alapján ábrázoltuk. (n=3) A relatív eNOS mennyiségeket az eNOS-IR sávok optikai denzitás értékeinek a normál szérummal történt 2 órás kezeléssel kapott eNOS-IR sáv optikai denzitásához viszonyítva (100%) adtuk meg.

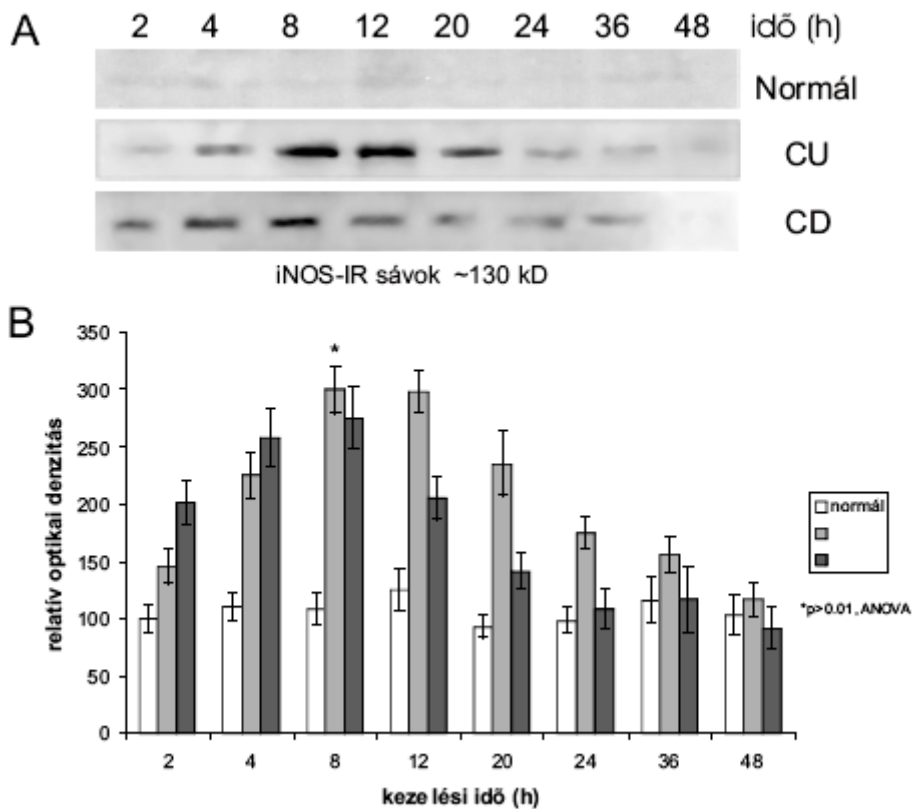


9. Ábra eNOS immunfluoreszcencia HUVEC-ben 50%-s normal, 50%-s UC és 50%-s CD szérummal történt inkubáció mellett. Jelentős különbség észlelhető a fluoreszcens jel intenzitásában a különböző kezelésekből 12 óránál de ez eltűnik 48 órás kezeléssel. Méretarány: 10 μ m

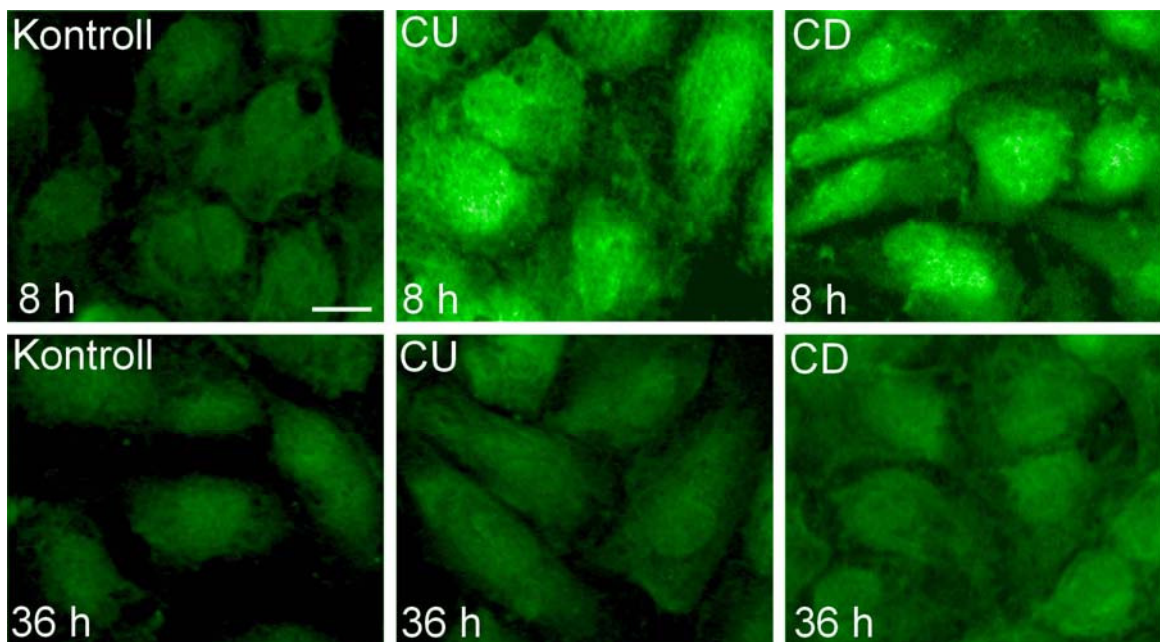
Az iNOS kimutatása immunblot és immunfluorescens vizsgálattal HUVEC-n

A HUVEC lizátum Western blot vizsgálata enyhe iNOS immunreaktív sávot mutatott 130 kDa-nál, amely megfelel a humán iNOS molekulatömegének. (10.A ábra) Az enyhe iNOS expresszió HUVEC tenyészetben 50%-s normál humán szérummal történt 48 órás inkubáció alatt nem mutatott szignifikáns változást. Ötven százalékos colitis ulcerosás szérummal történt inkubálás során az iNOS négy óra után kezdett emelkedni (a relatív optikai denzitás értéke $225 \pm 20\%$, $P < 0,01$), a legmagasabb értéket 8 óránál érte el ($300 \pm 21\%$, $P < 0,01$), majd ezt követően fokozatosan csökkent és 48 óra után a normál értékhez közelített ($117 \pm 15\%$). A HUVEC 50% Crohnos szérummal történt inkubációja során az iNOS szintje 2 óra után kezdett nőni ($201 \pm 19\%$, $P < 0,01$) és 8 óránál érte el a maximális értéket. ($275 \pm 27\%$, $P < 0,01$) Fokozatos csökkenés volt észlelhető 12 órától és a 24-48 órás időszakban a kontrollal közel azonos szintet mutatott. (48 óránál $92 \pm 18\%$, 10.A, 10.B ábra)

Ötvenszázalékos normál szérummal történt inkubáció mellett a HUVEC enyhe immunfluorescens aktivitást mutatott. (11. ábra) Az iNOS megjelenése HUVEC-n immunfluorescens módszerrel IBD-s szérum mellette 4-12 órás periódusban volt a legkifejezettebb. Szétszórtan a citoplazmában, helyenként granuláris elrendezésben, intenzív fluorescens jel volt észlelhető. Mind a colitis ulcerosás, mind a Crohnos szérum szignifikánsan fokozta az iNOS immunfluorescenciát a 4-12 órás periódusban. A kezelést követő négy óra alatt valamint 12 óra utáni mintákban az iNOS immunfluoreszcens módszerrel nem volt egyértelműen kimutatható a sejtenyészetben.(11. ábra).



10. Ábra. IBD szérummal kezelt HUVEC iNOS mennyiségének Western blott vizsgálata. Hetven százalékos konfluenciát mutató HUVEC-t inkubáltunk 50%-s normál, 50%-s CU és 50% CD szérummal. A. A blottok három különböző kísérletről származnak, melyek során ugyanabból a köldökzsínorból készült sejtenyészeteket egyidejűleg kezeltünk. B. Az immunblottok denzitometriás vizsgálata. Az adatokat az átlag \pm átlagtól mért közepes eltérés alapján ábrázoltuk. (n=3) A relatív iNOS mennyiségeket az iNOS-IR sávok optikai denzitás értékeinek a normál szérummal történt 2 órás kezelésnél kapott eNOS-IR sáv optikai denzitásához viszonyítva (100%) adtuk meg.



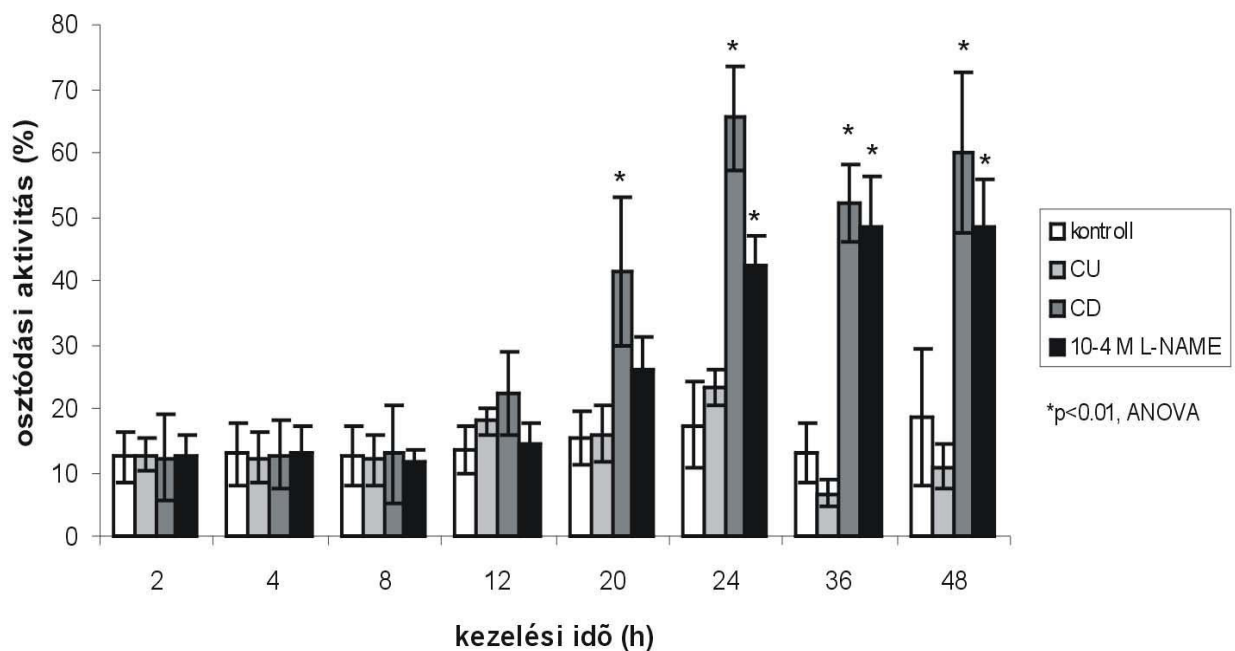
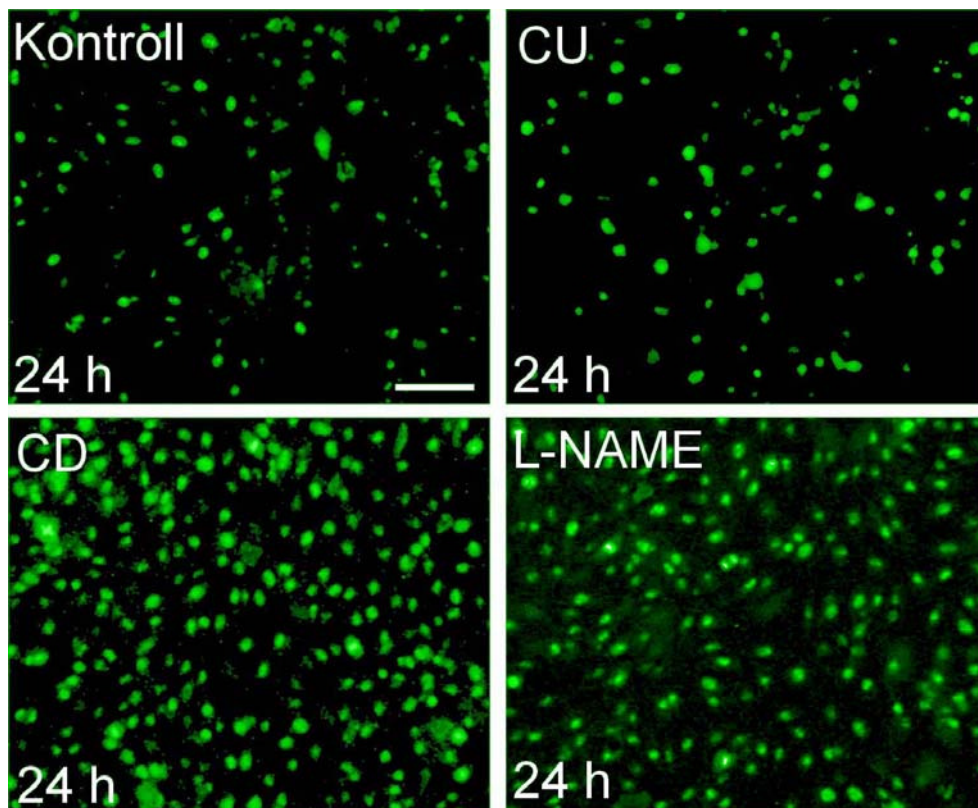
11. Ábra iNOS immunfluoreszcencia HUVEC-ben 50%-s normal, 50%-s UC és 50%-s CD szérummal. A HUVEC iNOS expressziója az IBD szérummal történt kezelés 8 órája után észlelhető Méretarány: 10 μ m

A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatása a HUVEC proliferációs aktivitására

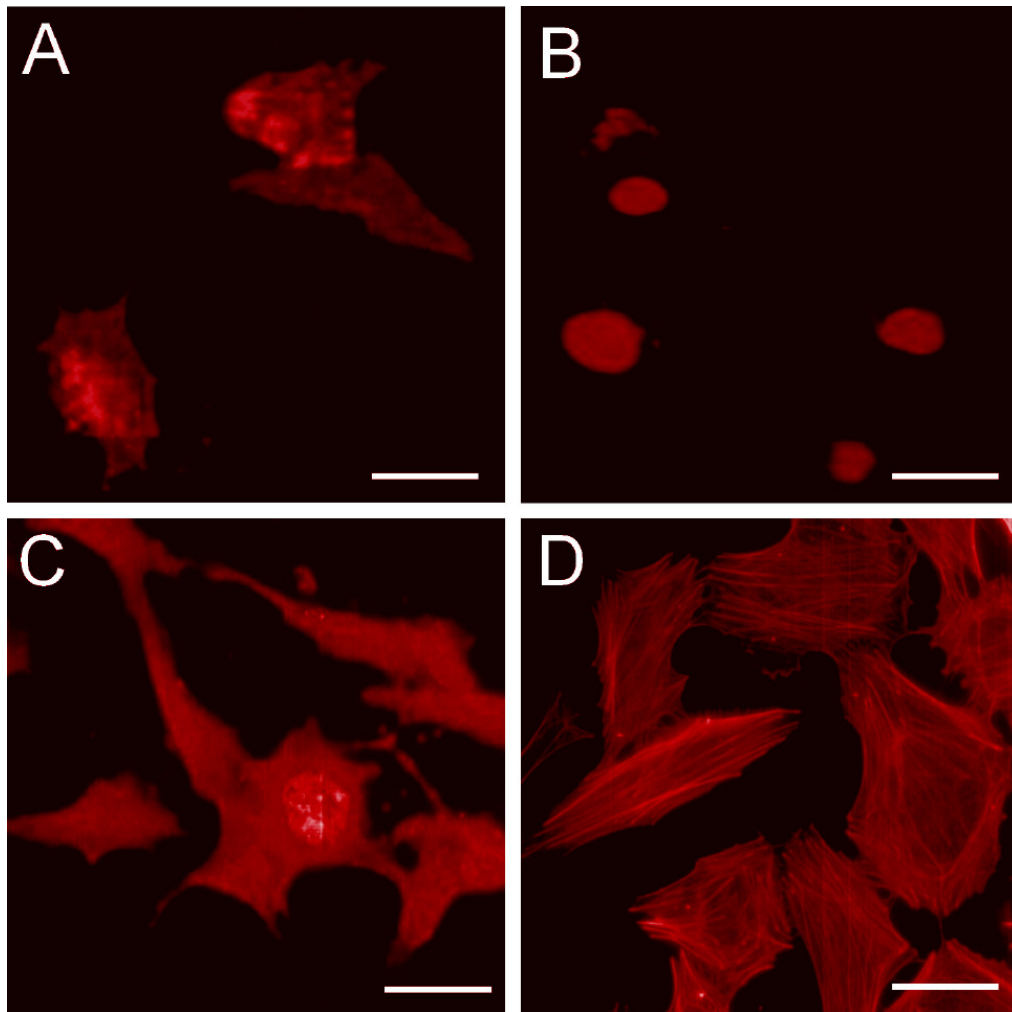
A vizsgálatok kezdetén a Ki-67 immunfestés szerint a HUVEC 10-50 %-a a sejtsztódás valamelyik állapotában volt, a sejt-kultúra 20-30%-os konfluenciája mellett (12. ábra). A 2-48 órás periódusban nem észleltünk különbséget a Ki-67 immunreaktív/toluidin kék festődést mutató sejtmagok arányában 50%-s normál (48 óránál $19 \pm 10\%$) és 50%-s colitis ulcerosás (48 óránál $10 \pm 3\%$) szérummal történt kezelés mellett. Ezzel szemben 50%-s Crohnos szérum hatására a proliferáló sejtek szignifikáns emelkedését lehetett észlelni 20 óra után ($41 \pm 12\%$, $P < 0,01$). A HUVEC magok 50-65%-a Ki-67 immunfluoreszcenciát mutatott CD szérummal történt 24-48 órás kezelés alatt (12. ábra). Hasonló mértékű változást észleltünk 10^{-4} M L-NAME 50%-s normál szérumot tartalmazó HUVEC-hez történő hozzáadásával; a proliferációs aktivitás szignifikánsan emelkedett 24 órától kezdve ($42 \pm 5\%$, $P < 0,01$) 48 óráig ($48 \pm 7\%$, $P < 0,01$).

A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatása a HUVEC viabilitására

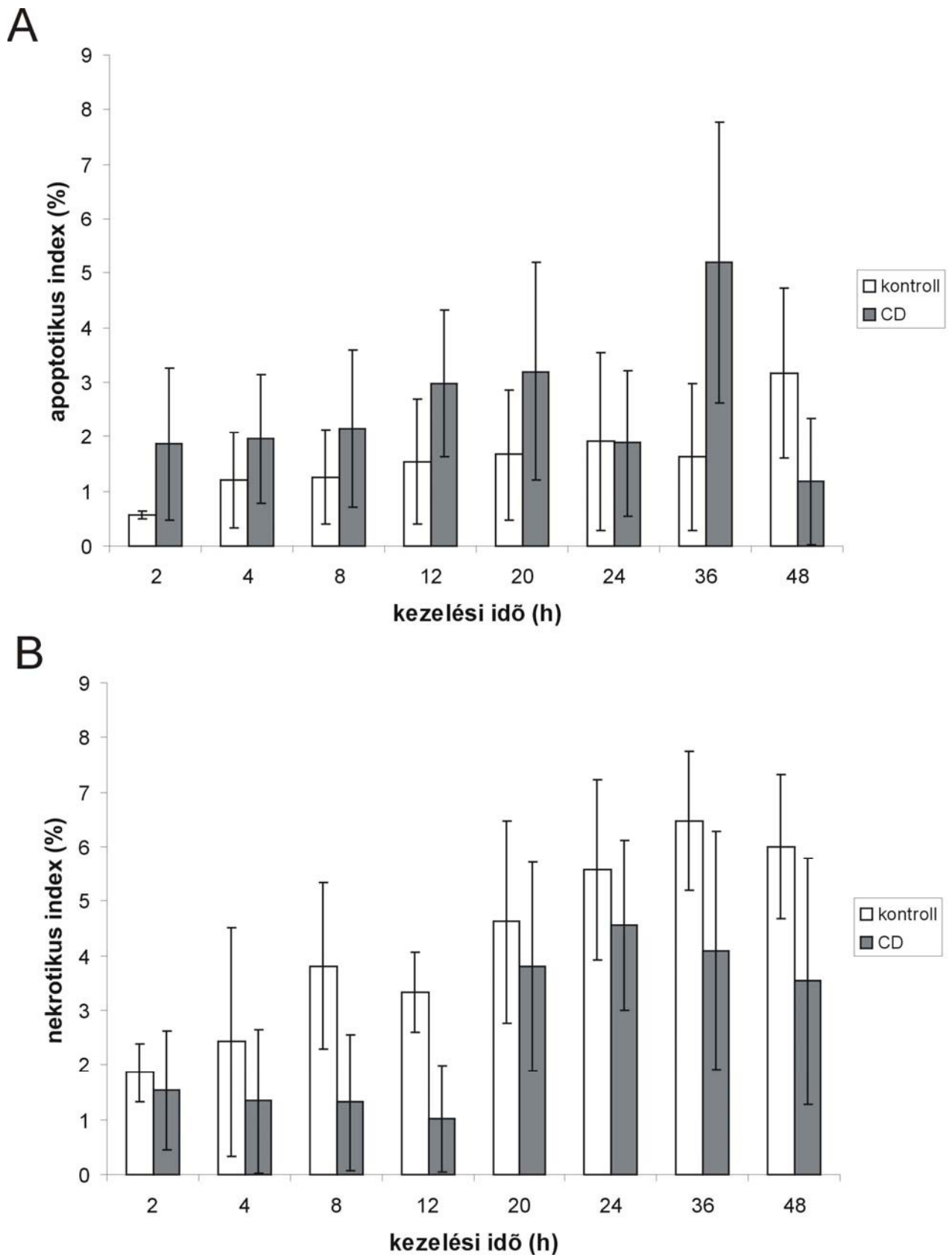
Annexin-V-biotin módszer használatával a korai apoptotikus sejtek voltak kimutathatók, amelyek membránján azonosítható a fluorescens jel (13.A ábra), míg a propidium-jodid a sejtmag DNS-hez kapcsolódó, úgynevezett nukleáris fluorescens jelet adva a nekrotikus sejteket jelölte (13.B ábra). Mindkét festés észlelhető a késői apoptotikus sejteken egyaránt jelölve a sejtek membránját és magját (13.C ábra). A 48 órás vizsgálati idő alatt 50% normál szérummal történt inkubáció során az apoptotikus sejtek aránya alacsony maradt (1-3%), ezzel szemben folyamatos, de nem szignifikáns, növekedés volt észlelhető az apoptotikus sejtek számában 50%-s Crohnos szérummal történt inkubáció során (2-5% maximális szinttel 36 óránál). (14.A ábra). Colitis ulcerosás szérum mellett az apoptotikus index nem mutatott jelentős különbséget a kontrollhoz viszonyítva. Mind a normál, mind a Crohnos szérummal kezelt HUVEC-ben enyhén emelkedett a nekrotikus sejtek száma a vizsgálati periódus alatt, de a nekrotikus index nem mutatott szignifikáns változást. (14.B ábra) A falloidin-FITC-el megjelenített actin filamentumok azonos intenzitással festődtek, jelezve a sejtek szerkezeti stabilitását, függetlenül az inkubáló oldattól vagy az inkubáció idejétől. (13.D ábra)



12. Ábra. A HUVEC osztódási aktivitásának vizsgálata. A sejtenyészeteket 20-30%-s konfluencia állapotában kezeltük 50%-s normál, 50%-s CU vagy 50%-s CD szérummal, vagy olyan szérummal mely 10^{-4} L-NAME- tartalmazott. Az osztódási aktivitást Ki-67 immunfluoreszcens jelöléssel követtük. A Ki-67-IR sejtmagok száma 24 óra kezelés után magasabb volt CD szérum és L-NAME kezelés mellett. Méretarány: $50\mu\text{m}$. Az osztódási indexet a Ki-67-IR sejtmagok / toluidin-kék festett sejtmagok (teljes sejtszám) arányából becsültük, legalább 103 sejtet számolva. Az adatokat átlag \pm átlagtól mért közepes eltérés értékében adtuk meg. (n=3)



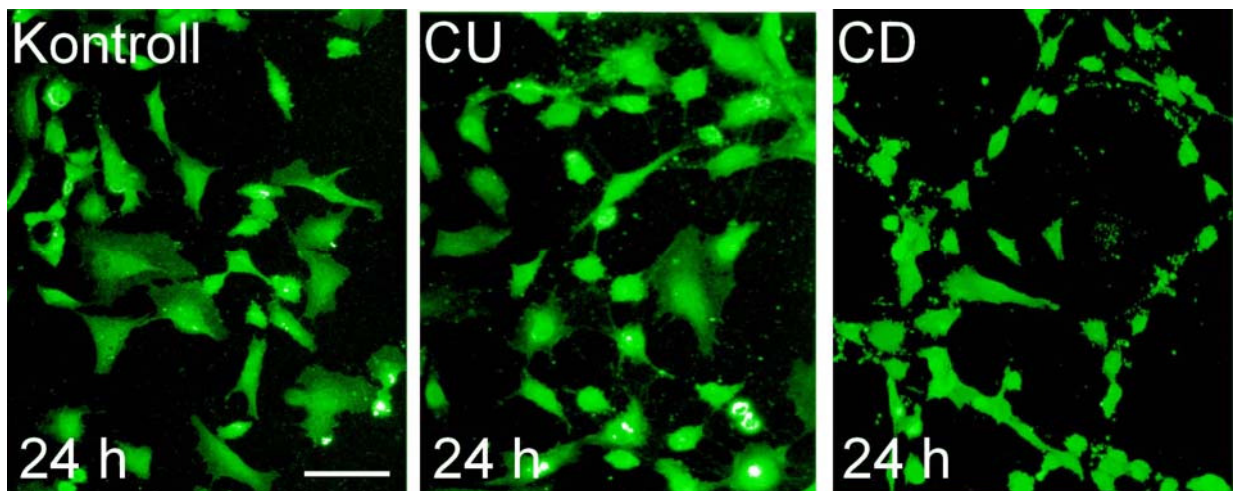
13. Ábra HUVEC életképességének vizsgálata. Minden képet 24 órás CD szérummal való kezelés után készítettük. A. Korai apoptotikus sejtek, melyek annexin-V-biotinhoz kötött avidin-FITC-el jelölik a membrán külső falán megjelenő foszfátidil szerint. B. A nekrotikus sejtek magja festődik propidium-jodiddal, mely a permeabilis membránon keresztül jut a maghoz. C. Késői apoptotikus sejt, mind az apoptotikus, mind a nekrotikus jelet mutatja. D. A falloidin kötött TRITC aktin filamentumokat jelöl, mely a sejtvázas integritását mutatja. Méretarány: 10 μ m.



14. Ábra A HUVEC apoptotikus (A) és nekrotikus (B) indexe normál és CD szérummal történő 48 órás inkubáció során. Az apoptotikus indexet az annexin festődést mutató sejtek és a toluidin-kék magfestést mutató sejtek arányából számoltuk. A nekrotikus index a propidium-jodiddal festődő magok és a toluidin-kék festődést mutató magok aránya. Az index legalább 10^3 sejt számlálásából készültek. Az adatok az átlagot \pm SEM ($n=3$) mutatják.

A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatása a HUVEC kultúra alakjára és szerkezetére

A gyulladáscsökkentő bélbetegségek szérumának hatását a HUVEC sejtkultúrák szerkezetére és alakjára 20-30% konfluencia szint mellett vizsgáltuk. Az eNOS immunfluoreszcencia sejtek részben szigetekben helyezkedtek el, poligonális alakzatot véve fel egymáshoz kapcsolódva. A sejtek többségén megnyúlt, álláb szerű nyúlványok láthatóak. Ötven százalékos normál és 50%-s colitis ulcerosás szérum jelenlétében a sejtek formája és eloszlása nem változott szembetűnően a 48 órás vizsgálati periódus alatt. Ezzel szemben az azonos koncentrációjú Crohnos szérum mellett 20 órás inkubációs idő után a sejtek kétdimenziós retikuláris hálózatot alkottak. A sejtkultúrában megjelenő szerkezeti változások, a szövetszerű vascularizációs jelensége korai elváltozásaira emlékeztetnek (15. ábra).



15. Ábra A HUVEC tenyészetek alaki változása, 50%-s normál, 50%-s CU és 50%-s CD szérummal történő 24 órás inkubáció után. A vizsgálatban 20-30%-s konfluenciát mutató sejtenyészeteket használtunk. A sejteket eNOS immunfluoreszcenciával jelenítettük meg. Méretarány: 50 μ m.

11. Megbeszélés

A vizsgálatban két NOS izoforma, az iNOS és az eNOS megjelenését és eloszlását tanulmányoztuk a gyulladásos bélbetegségek különböző formáiban, colitis ulcerosában és Crohn colitisben hisztokémiai, immunhisztokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel, részletes minőségi és mennyiségi kimutatásra törekedve. Colitis ulcerosában intenzív iNOS immunreaktivitást találtunk a felszíni hámsejtekben, a nyálkahártya gyulladásos sejtjeiben, ugyanakkor az eNOS szint az érképletek endotheliumában gyakorlatilag nem különbözött a kontrolltól. Crohn betegségben, mind az iNOS mind az eNOS szint alacsonyabb volt a nyálkahártya leukocita típusú sejtjeiben, illetve az endothelben. Megelőző vizsgálatainkban különböző antitesteket használtunk a gyulladásos bélbetegek nyálkahártyáját infiltráló gyulladásos sejtek jellemzésére. Azt találtuk, hogy csak a makrofágok és a neutrofilek mutatnak iNOS immunreaktivitást. Az immunreakciók során a sejtek megfelelő elkülönítését és mennyiségi értékelését teszik lehetővé a rózsaszín-vörös Új-Fuchsin és a vörös-fekete nikkél-DAB chromogének, mind az egyes, mind a kettős festési technikákkal. Az iNOS immunreaktív sejtek colitis ulcerosában főleg neutrofilek, míg Crohn betegségben ezek makrofágok. Crohn betegségben. A kontroll csoportból származó mintákban is több volt az iNOS immunreaktív sejtek száma, mint Crohnos mucosában, továbbá a gyulladt és makroszkóposan épek tűnő területek sem mutattak jelentős különbséget a Western blot iNOS immunreaktív sávjai tekintetében.

Az iNOS és eNOS eloszlása a colitis ulcerosus nyálkahártyában

Aktív colitis ulcerosában fokozott NOS aktivitás volt észlelhető a hisztokémiai, immunhisztokémiai és immunblot adatok alapján. A NOS szint magasabb volt a gyulladt colitis ulcerosus területeken az immunsejtekben, az endotheliumban és az epithelialis sejtekben a kontrollhoz és a makroszkóposan ép területekhez képest. Ezek az eredmények egybecsengnek korábbi adatokkal (8, 35, 80, 81) amelyek az iNOS fokozott expresszióját és a NO magas szintjét

mutatják állatmodelleken előidézett colitises és humán colitises mintákban. Magas nitrit-nitrát szinteket mértek rectalis dializátumban, vastagbél gázokban, és emelkedett citrullin szintet találtak colitis ulcerosás biopsziás mintákban. **(29, 82, 83)** A colitis ulcerosában magas koncentrációban előforduló NO, mely a gyulladásos folyamatok egyik kulcselemének számít, nagyobb részt iNOS eredetű, kisebb részben pedig az eNOS aktivitásának eredménye. Dextrán nátrium-szulfát indukálta experimentális colitisben iNOS vagy eNOS hiánya esetén a gyulladás mértéke csökken **(10)**. A NO védő szerepéről számoltak be iNOS és eNOS génhiányos egereken, ahol gyorsan, súlyos experimentalis colitis váltható ki és a nyálkahártya gyógyulása lassú, elhúzódó. **(18,84)** Fokozva a nyálkahártya vérellátását és egyidejűleg csökkentve a thrombocytá aggregációt és a leukocytá adhéziót a NO kedvezően befolyásolja a nyálkahártya homeostázisának fenntartását. **(1)** Úgy tűnik, hogy a NOS aktivitás kettős hatású a colitis ulcerosa pathophysiológiájában. Egyrészt protektív hatást fejt ki, a nyálkahártya védekező mechanizmusait elősegítve, másrészt közvetlen és közvetett módon hozzájárul a nyálkahártya károsodás kialakulásához.

Az iNOS és eNOS megjelenése a Crohn colitises nyálkahártyában

A CD68 pozitív sejtek (makrofagok) jelentős számban fordultak elő Crohn betegek vastagbél nyálkahártya biopsziájában, de mind a gyulladt, mind a makroszkóposan ép területeken az iNOS immunreaktivitása alacsony volt. Az iNOS csökkent expressziója a Crohnos nyálkahártyán az antibakterialis védekezés gyengülését eredményezheti. Az alacsony iNOS háttere nehezen magyarázható. Újabb adatok a CORD15/NOD2 gén funkció változását és a nukleáris faktor- κ B (az iNOS expresszió iniciátora) kóros aktivációját jelzik Crohn betegségben a makrophagok és epithelialis **(85, 86)** sejtek szintjén, melynek eredményeként csökkenhet az iNOS szintje és aktivitása. A fehérjék nitrálását, amely magas szöveti NO szint mellett alakul ki, jelentősnek találtak colitis ulcerosás mintákban a kripták sejtjeiben, neutrophilekben és mononuclearis sejtekben szemben a Crohn betegséggel, ahol hasonló eltérést nem észleltek **(87)**. Egy korábbi vizsgálatunkban alacsony vizelet nitrit szintet mértünk Crohn betegekben colitis ulcerosás és

kontroll betegcsoporthoz viszonyítva, mely indirekt módon szintén jelezheti a Crohn betegségben felmerülő NO hiányt **(55)**.

A csökkent NADPH-diaphoráz aktivitás és az alacsony eNOS immunreaktivitás Crohnos biopsziás minták endothelialis sejtjeiben, egyidejű jelentős kapilláris szám növekedéssel, a microvasculáris rendszer változásainak jelentőségét támogatja Crohn betegségben. A colon ereinek szerkezeti károsodásai, mint pl. a lumen obstrukció, az intima megvastagodása, a simaizom sejt hyperplasia, és fibrosis kialakulása, az erek falának destrukciójához vezethet és ezek Crohn betegségben ismert eltérések **(9, 83)**. Újabban a microvasculáris endothelialis rendszer működési zavaráról számoltak be, mely a NO dependens dilatáció károsodásával jár Crohn betegek intesztinális ereiben és a nyálkahártya gyógyulásának elégtelenségéhez vezet **(56, 88, 89, 90)**. Microvasculáris dysfunctio kialakulásának egyik sajátos tényezője Crohn betegségben a fokozott szuperoxid termelődés. Szuperoxid gyökfogók, valamint NO donorok alkalmazása, a human microvascularis endothelialis sejtek aktivációjának normalizációjához vezethet IBD-ben **(91)**. A fokozott szuperoxid generációban enzimikus folyamatoknak, így az eNOS-nak is szerepe lehet **(92)**. A microvasculáris endothelialis dysfunctio lokális előfordulása, a krónikusan gyulladt területeken való megjelenése, valószínűleg egy szerzett defektus, mely a szöveti „remodelling” következménye a gyulladás által érintett szakaszon **(6)**. A szöveti „remodelling” része a neovascularizáció, amit vizsgálatunkban markánsan jelzett a CD31 immunreaktív kapillárisok jelenléte a csökkent eNOS pozitivitást mutató endothel sejtek mellett. Korábbi adatok arra utalnak, hogy ezek az eltérések a gyengült eNOS aktivitásra vezethetők vissza **(93)**. A NO az endothelium homeostásisában kulcsszerepet játszó tényező, gátolja az apoptózist és fokozza az endothelialis sejtek proliferációját **(94, 95)**. Egyértelmű bizonyítékok vannak arra vonatkozóan, hogy a hatékony angiogenezishez bioaktív endothelium-eredetű NO szükséges **(95)**. Krónikus gyulladásban a szerzett endothelialis működési zavar az eNOS szintézis gátlásával és következményes kóros angiogenezissel járhat, amit a vizsgálati adatok is bizonyítani látszanak.

A NADPH-diaforáz reakció és a NOS immunhisztokémia kapcsolata

Vizsgálatainkban sikerrel alkalmaztuk a NADPH-diaforáz hisztokémiát az iNOS és eNOS szöveti lokalizációjának kimutatására. Elfogadott, hogy idegszövetben aldehides fixálást követően a NADPH-diaforáz reaktív sejtek azonosak az nNOS immunreaktív sejtekkel (77). A NADPH-diaforáz pozitivitás kimutatott iNOS immunreaktív makrofágokban és neutrophilekben és eNOS tartalmú nem idegszövetben is (78, 79). Gyulladás során, mikor mind az eNOS, mind az iNOS megjelenik az endothelialis sejtekben, a NADPH-diaforáz reakció intenzitása az erek funkcionális állapotát jelezheti. Miután a NADPH-diaforáz és az iNOS reakciók megjelenése és intenzitása azonos volt, viszont jelentős különbséget lehetett észlelni a colitis ulcerosás és Crohnos minták között. Ezért a NADPH-diaforáz festés egy egyszerű, olcsó és könnyen kivitelezhető módszer lehet az IBD két fő típusának elkülönítésében. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy ezek a szövettani adatok nem mutattak korrelációt az aktuális klinikai és endoscopos aktivitási indexekkel, tehát nem tekinthetők a gyulladás aktuális állapotát pontosan jelző adatnak.

A gyulladásos bélbetegségek kezelésében jelenleg használt gyógyszerek valószínűleg nem befolyásolják alapvetően az intesztinális NO szintézist (81). A szelektív iNOS gátlók lehetséges terápiás alkalmazása vizsgálat tárgyát képezi, azonban egyelőre ilyen irányú klinikai adat nem áll rendelkezésre (96).

A vizsgálat eredményei azt sugallják, hogy az iNOS expresszió és valószínűleg a konstitutív eNOS aktivitás szabályozása különböző colitis ulcerosában és Crohn betegségben. Ezért a NO különböző szerepet játszhat a gyulladás kiváltásában és szabályozásában krónikus gyulladásos bélbetegségekben. A NOS izoformák megjelenésében és szöveti eloszlásában észlelt különbségeknek szerepe lehet a colitis ulcerosa és a Crohn betegség szöveti elkülönítésében.

A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatása HUVEC-re

A HUVEC sejt kultúrákban végzett vizsgálatok során aktív colitis ulcerosás és Crohn betegek szérumának hatását vizsgáltuk a tenyésztett endothel sejtek eNOS és iNOS expressziójára és

lokalizációjára, valamint a tenyészet viabilitására. Colitis ulcerosás szérum hatására az iNOS és az eNOS indukciója és jelentős expressziója volt észlelhető. Ezzel szemben aktív Crohnos szérummal történt kezelés mellett az iNOS expresszió átmeneti emelkedése és párhuzamosan az eNOS expresszió határozott csökkenése volt megfigyelhető. Az apoptotikus és nekrotikus sejtek száma jelentős változást nem mutatott, az aktin filamentumok festésével vizsgált citoskeleton megőrizte strukturális integritását a vizsgálat alatt. Ez utóbbi adatok azt bizonyítják, hogy a Crohnos szérum hatására bekövetkezett eNOS fehérje szint csökkenés nem a sejtek degradációjából adódik.

Ellentmondásos adatok léteznek a különböző cytokineknek az eNOS vaszkuláris expressziójára gyakorolt hatásáról **(97)**. Úgyszintén bizonytalan az eNOS eredetű NO szerepe a gyulladós folyamatok kiváltásában és fenntartásában **(98, 99)**. Korábbi állatkísérleti modellek valamint humán vizsgálatok eredményei egymásnak ellentmondó eredményeket adtak, az NO fokozhatja, más esetekben csökkentheti a gyulladós kaszkád intenzitását és kiterjedését krónikus gyulladós folyamatokban **(99, 100)**. Jelenleg elfogadott, hogy a microvasculáris endothelium konstitutív eNOS expressziója alapvetően fontos a szisztémás és helyi vaszkuláris homeostázis fenntartásában és az érrendszer integritásának biztosításában. Az aktív colitis ulcerosás, valamint Crohnos szérum hatásának kitett HUVEC-n az eNOS expresszió ellentétes változását észleltük. Az eNOS fehérje szintje a colitis ulcerosás szérummal történt kezelést követően markáns, de átmeneti emelkedést mutatott a HUVEC sejt kultúrákban, 12 óránál lehetett regisztrálni a legmagasabb szintet majd fokozatosan csökkent 36-48 óránál érve el a normál szintet. Ezzel szemben Crohnos szérum jelenlétében az eNOS szintje csökkent. Az indukciós idő colitis ulcerosás szérum hatására, valamint a gátlásig eltelt idő Crohnos szérum jelenlétében hozzávetőleg hasonló volt, a maximális illetve minimális szint eléréséhez 8-12 órára volt szükség. Az eNOS termelődését befolyásolják a magas cytokin szintek (Crohn betegségben a magas Th₁ indukálta cytokin konfiguráció), valamint a cytokin szint és összetétel által befolyásolt endotheliális sejtadhéziós molekulák expressziója és prezentációja **(37)**. A colitis ulcerosás, valamint a Crohnos szérum ismertén különböző cytokin és pro-inflammatorikus molekula összetétellel és koncentrációval rendelkezik. A különböző

cytokinek, illetve cytokin keverékek NOS expresszióra gyakorolt hatása széleskörű vizsgálatok tárgyát képezik. Korábban kimutatták, hogy a TNF- α időfüggően csökkenti az eNOS fehérje expresszióját humán endotheliális sejtekben **(101, 102)**. A TNF- α hatásmechanizmusa, mellyel az intracelluláris NOS expressziót befolyásolja, nem ismert. Kimutatták, hogy a TNF- α gátolja az eNOS mRNA aktivitását azáltal, hogy csökkenti stabilitását **(103)**. Vizsgálatunkban a Crohnos szérummal történt inkubáció alatt jelentkező alacsony eNOS szintet magyarázhatja a magas TNF- α koncentráció, amely a Crohnos gyulladásra jellemző Th₁ dominancia és az általa mediált gyulladás egyik legfontosabb mediátora. A gyulladásos folyamatok az endothelium funkcionális változásait és az antigén státus megváltozását eredményezhetik. Ezeknek a változásoknak része az eNOS alacsony expressziója és a leukocita adhézións molekulák, mint pl. az ICAM, VCAM, E-selectin magas számban való megjelenése az endothel felszínén **(54, 104, 105, 106, 107)**. Ugyanakkor az enzim aktivitás késleltetett csökkenése volt észlelhető a vizsgálat során, ami az eNOS fehérjének az mRNS-hez viszonyított nagyobb stabilitását jelzi, vagy poszttranszlációs változásokat jelez, amelyek az enzim aktivitásának fokozódását eredményezheti **(74)**. Kísérletes colitisekben az eNOS úgy tűnik protektív szereppel bír a károsító tényezőkkel szemben. Endothelialis NOS hiányos egereken végzett vizsgálatok azt sugallják, hogy a vérben levő NO legalább 50%-a eNOS eredetű lehet **(76)**. A leukocita-endothelialis kötődés fokozott és az ischemia-reperfúzió utáni károsodás súlyosabb eNOS hiányos állapotban **(42, 108)**.

Colitises állatmodellekben jelentős mennyiségű iNOS keletkezik a gyulladás során, mely különböző módon válhat károssá, és összességében rontja a betegség lefolyását **(109)**. Crohn colitisben a humán intesztinális microvascularis endothelialis sejtek iNOS termelő képessége csökkenhet, és ez érzékennyé teszi a sejteket a leukocita-mediált károsodásra **(110, 111)**. Colitis ulcerosában kimutatták, hogy az iNOS szint gyorsan emelkedik és ez jól aránylik a betegség aktivitásával **(112)**. Magas iNOS aktivitást találtak a mesenterialis microvascularis endothelialis sejtekben colitis ulcerosában, mely a vasculáris endotheliális aktiváció és a colitis ulcerosa pathogenezise közötti szoros kapcsolatra utal **(113)**. A HUVEC stimulációja pro-inflammatorikus

cytokinekkal (IL-1 β , TNF- α) vagy hormonokkal (pl. relaxin, östrogén) iNOS expressziót indukál és a termelő NO fokozza a prostaglandinok és más mediátorok bioszintézisét **(114,115,116)**. Primer sejttenyészetben észlelt maximális iNOS szint nem függött a lipopolysaccharid kontaminációtól, és nem befolyásolta a sejtproliferációt, csökkenése a konfluens tenyészetben indult meg **(117)**. A NOS izoformák expressziójának kettős modulációja volt észlelhető különböző koncentrációjú östradiollal történt kezelés során. Nanomoláris koncentrációban az östradiol eNOS termelést indukált, míg mikromoláris koncentrációban iNOS expressziójára volt képes **(118)**. Korábbi vizsgálatokban az INF- γ és TNF- α együttesen, valamint IL-1 β -t is tartalmazó citokin koktél fokozta a NOS aktivitást, míg ezek a cytokinek egyenként különböző módon hatottak a NOS expresszióra **(74, 119, 120)**. A vizsgálatban használt szérumok közepes aktivitást mutató Crohn betegekből ($150 \leq \text{CDAI} \leq 450$) és colitis ulcerosás betegekből ($4 \leq \text{UC-DAI}$) származtak. Ezek olyan citokin és gyulladáshoz adheziós molekulákat tartalmazó keveréknek tekinthetők, melyek nem-specifikus gyulladáshoz hatással rendelkeznek. Az iNOS fokozott expressziója gyulladáshoz bélbetegekből származó szérum hatására a HUVEC adaptív válaszát jelentheti.

Különös érdeklődésre tarthat számot a colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatásának vizsgálata a HUVEC eNOS expressziójára és rávilágíthat a két betegség különböző pathophysiológiai történéseire, valamint az eltérő morfológiai képre. A NO meghatározó szerepet játszik a vasculáris endotheliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor: VEGF) által indukált angiogenezisben és a vasculáris hyperpermeabilitás kialakulásában. *In vivo* vizsgálatokban a NO termelés gátlása a VEGF indukálta angiogenezis, és a vasculáris permeabilitás csökkenéséhez vezetett **(121)**. Korábbi vizsgálatok eredményei azt bizonyítják, hogy a Crohnos szérum fontos elemét képező bázikus fibroblast növekedési faktor (basic fibroblast growth factor-bFGF) különböző mechanizmusokkal indukálhat angiogenezist **(122)**. Csökkent VEGF aktivitásra utaló adatokat közöltek Crohn betegségben a VEGF receptor (VEGF-Ets-1) és a neovascularizációs kaskád „down-regulációjával”, amely a betegség vasculáris hypothézise mellett szól **(123, 124, 125, 126)**. Az eNOS nem megfelelő expressziója és ezzel együttesen a

VEGF indukálta angiogenezis és vasculáris permeabilitás károsodása fontos lépés lehet a Crohn betegség pathomechanizmusában. Ugyanakkor a bFGF amely a neovascularizációs folyamatok legaktívabb molekulája Crohn betegségben, NO független aktivitást mutat **(122, 127)**. A colitis ulcerosa pathomechanizmusa a VEGF aktivitásától függetlennek tűnik **(122, 127)**. A gyulladással kapcsolatos cytokinek és angiogén molekulák együttes hatása az eNOS és iNOS expressziójának megváltozásához vezet, ezáltal megbomlik az egyensúly a két NOS izoforma között, aminek valószínűleg szerepe van az angiogenezis károsodásában, amely a tökéletlen szöveti restitutio fontos eleme.

Az angiogenezis a krónikus gyulladással kapcsolatos folyamatok egyik alapvető pathophysiológiai folyamata, melynek fontos lépései az endothelialis sejtek proliferációja, migrációja és tubuláris elrendeződése. Ez a folyamat bizonyos angiogenetikus faktorok szoros ellenőrzése alatt áll, melyek egyike a NO pro-angiogenetikus hatással **(19, 20)**. A Crohnos szérummal történt kezelés során a HUVEC olyan morfológiai változásokat és átrendeződést mutatott melyek vasculáris formációk kialakulására emlékeztetnek. Hasonló szerkezeti elváltozások colitis ulcerosás szérummal történt kezelés alatt nem voltak észlelhetők. A sajátos sorba rendeződés és hurokszerű formációk kialakulása a Crohnos szérum angiogenetikus aktivitása mellett szól. A sejtek érszerű struktúrába rendeződése a Crohnos szérummal történő kezelés 24. órája után volt megfigyelhető, amikor az iNOS szintje csökkent az eNOS expresszió pedig kifejezettebbé vált. Korábbi adatok szerint, a reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species: ROS) potenciális pro-angiogenetikus aktivitással rendelkeznek, *in vivo*, valószínűleg az iNOS „up-regulatio” által **(128)**. A ROS szintén jelentős szerepet játszik a sejt proliferációban az eNOS aktivitás szabályozása által, ugyanakkor az antioxidánsok gátolják a HUVEC NO termelését és a proliferációt **(129)**. Ezzel szemben más vizsgálatokban azt találták, hogy az antioxidánsok fokozhatják a NOS aktivitását **(130, 131)**. A gyulladással kapcsolatos cytokinek mint a TNF- α , IL-1 β és a növekedési faktorok indirekt módon fokozzák az eNOS expressziót és egyidejűleg elősegítik a ROS generációját, következményes NO szint

változásokat okozva **(132)**. Ez a kettős hatás szerepet játszhat a HUVEC pro-angiogenetikus és proliferációs aktivitásában.

Endotheliális stresszt okozó különböző stimulusok az apoptózis szabályozási rendszerének befolyásolása révén hatnak **(133)**. Újabb kísérleti adatok szerint a NO a mitokondriális légzési folyamatok szabályozása és a citokrom-C felszabadítása révén a pro-apoptotikus folyamatok által stimulált sejthalál elleni védekezési mechanizmusokat triggerel **(134, 135, 136)**. Jelen vizsgálatban, a Crohnos gyulladással inkubált HUVEC eNOS expressziója alacsony volt, ami magyarázatot adhat a minimálisan emelkedett apoptotikus aktivitásra. Mindez egy károsodott anti-apoptotikus mechanizmus mellett szól. A Crohnos szérumban magas TNF- α szint károsítja a sejtek életképességét apoptozist indukálva, NO független mechanizmus által. **(137)** Ezzel szemben a colitis ulcerosus és kontroll szérumokkal kezelt sejtekben észlelt magasabb eNOS szintek a fokozott apoptozis ellen jelenthetnek védelmet.

A HUVEC-en végzett vizsgálati eredmények egybevágóak a korábbi vastagbél biopszián alkalmazott immunhisztokémiai eredményekkel, és olyan citokin komplexum jelenlétére utalnak a gyulladással betegek vérében mely az eNOS/iNOS arány megváltoztatásához járul hozzá endotheliális sejteken. Az egyidejűleg végbemenő változások az eNOS szint csökkenésével és az iNOS mennyiség emelkedésével, valamint a sejt proliferációs aktivitás fokozódásával, csökkenthetik az endotheliális sejtek anti-inflammatorikus kapacitását. Ezáltal olyan gyulladással kaszkád reakciók indulnak el, melyek az endothelium barrier dysfunkciójához vezetnek, majd a nyálkahártya microvasculáris rendszerének strukturális elváltozásait okozzák Crohn betegségben. Eredményeink azt mutatják, hogy a Crohnos szérumban bizonyos komponensei csökkentik az eNOS fehérje szintjét az endotheliumban, ami befolyásolja a betegség pathomechanizmusát kóros változásokat okozva a gyulladt szövet érrendszerében.

12. Következtetések

1. Colitis ulcerosában intenzív iNOS immunreaktivitás észlelhető a hámsejtekben és a nyálkahártya gyulladással járó sejteiben hisztokémiai, immunhisztokémiai és immunoblott vizsgálatokkal. Az eNOS szint az endotheliumában nem különbözik a kontrolltól. Az iNOS-IR sejtek főleg neutrofilek.
2. Crohn betegségben, mind az iNOS mind az eNOS szint alacsonyabb a nyálkahártya leukocita típusú sejteiben, illetve az endothelben. Alacsony iNOS immunreaktivitású CD68-IR sejtek (makrofágok) jelentős számban fordultak elő Crohn betegek vastagbél nyálkahártyájában.
3. A csökkent NADPH-diaforáz aktivitás és az alacsony eNOS immunreaktivitás Crohnos minták endothelialis sejteiben, egyidejű jelentős kapilláris szám növekedéssel, a mikrovaszkuláris rendszer változásainak jelentőségét támogatja. A csökkent eNOS pozitivitást mutató endothel sejtek és a jelentős CD31 immunreaktív kapillárisok által jelzett neovaszkularizáció a szöveti „remodelling” részjelensége. Krónikus gyulladásban a szerzett endothelialis működési zavar az eNOS szintézis gátlásával és következményes kóros angiogenezissel járhat.
4. A szövettani elváltozások nem mutattak korrelációt a klinikai és endoszkópos aktivitási indexekkel, tehát nem tekinthetők a gyulladás aktuális állapotát pontosan jelző adatnak.
5. Az eredmények azt sugallják, hogy az iNOS expresszió és valószínűleg az eNOS aktivitás szabályozása különböző colitis ulcerosában és Crohn betegségben. Ezért a NO különböző szerepet játszhat az IBD kiváltásában és szabályozásában.
6. A NOS izoformák megjelenésében és szöveti eloszlásában észlelt különbségek segíthetnek a colitis ulcerosa és a Crohn betegség szöveti elkülönítésében.

7. Sikerrel alkalmazható a NADPH-diaforáz hisztokémia az iNOS és eNOS szöveti lokalizációjának kimutatására. A NADPH-diaforáz és az iNOS reakciók megjelenésének és intenzitásának azonos volta a NADPH-diaforáz festést egy egyszerű, olcsó és könnyen kivitelezhető módszerré teszi az IBD két fő típusának elkülönítésében.

8. A colitis ulcerosás szérum jelentős iNOS és eNOS expressziót indukál HUVEC-n, ezzel szemben Crohnos szérum az iNOS expresszió átmeneti emelkedését és párhuzamosan az eNOS határozott csökkenését idézi elő. Az apoptotikus és nekrotikus sejtek száma jelentősen nem változik, a citoskeleton megőrzi strukturális integritását.

9. Az IBD-s szérumok olyan citokin és gyulladásos adhéziós molekulákat tartalmazó anyagnak tekinthetők melyek az endothelium funkcionális változásait és az antigén státusz megváltozását eredményezhetik. Az iNOS fokozott expressziója gyulladásos bélbetegek szérumának hatására a HUVEC adaptív válaszát jelenti. A Crohnos szérum csökkenti az eNOS szintjét az endotheliumban, és fokozza a leukocita adhéziós molekulák, pl. az E-szelektin expresszióját, változásokat okozva a gyulladt szövet érrendszerében. A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatásának vizsgálata a HUVEC eNOS expressziójára rávilágít a két betegség különböző patofiziológiai történéseire és az eltérő morfológiai képre.

10. A Crohnos szérum hatására a HUVEC-n vaszkuláris formációkra emlékeztető alakzatok jönnek létre melyek a szérum angiogenetikus aktivitása mellett szólnak. Hasonló elváltozásokat colitis ulcerosás szérum nem okozott.

11. A HUVEC-en végzett vizsgálati eredmények egybevágóak a vastagbél biopszia immunhisztokémiai eredményeivel, és olyan citokin komplexum jelenlétére utalnak a IBD-s

beteg vérében, mely az eNOS/iNOS arány megváltoztatásához járul hozzá endotheliális sejteken. Az eNOS egyidejű csökkenése és az iNOS emelkedésével, valamint a sejt proliferációs aktivitás fokozódásával, csökkenthetik az endotheliális sejtek anti-inflammatorikus kapacitását.

Összefoglalás

Az IBD genetikai, környezeti és immunológiai tényezők együtthatása eredményeként alakul ki. A colitis ulcerosa és Crohn betegség kiváltásában és fenntartásában ezek különböző mértékben vesznek részt, különbözik az immunsejtek valamint a gyulladáshoz szükséges citokinek száma és aránya is.

A gyulladás hátterében zajló komplex immunológiai folyamatoknak részese az EDRF-NO rendszer mely, a szervezet egyik általános és alapvető mediátorát és effektorát az NO-t termeli. A NO az egyik legkisebb biológiailag aktív molekula, mint ubiquiter szabadgyök, mennyiségétől, keletkezési helyétől és idejétől valamint a környezetében zajló reakcióktól és a pH-tól függően pozitív vagy negatív szereppel bír a gyulladáshoz szükséges folyamatokban. A NO-nak a vizsgálata colitis ulcerosában és Crohn betegségben ellentmondó eredményekhez vezetett.

Colitis ulcerosában intenzív iNOS immunreaktivitást találtunk a hámsejtekben, a nyálkahártya gyulladáshoz szükséges sejtjeiben, ugyanakkor az eNOS az erek endotheliumában nem különbözött a kontrolltól. Crohn betegségben, mind az iNOS mind az eNOS szint alacsonyabb volt a nyálkahártya leukocita típusú sejtjeiben, illetve az endothelben. A szöveti „remodelling” része a neovascularizáció, amit markánsan jelzett a CD31 immunreaktív kapillárisok jelenléte a csökkent eNOS pozitivitást mutató endothel sejtek mellett. Az iNOS immunreaktív sejtek colitis ulcerosában főleg neutrofilek, míg Crohn betegségben makrofágok.

A NADPH-diaforáz és az iNOS reakciók megjelenése és intenzitása azonos volt, viszont jelentős különbséget lehetett észlelni a colitis ulcerosás és Crohnos minták között, ezért a NADPH-diaforáz festés egy egyszerű, olcsó és könnyen kivitelezhető módszer lehet az IBD két fő típusának elkülönítésében. Az iNOS és az eNOS expresszió különböző colitis ulcerosában és Crohn betegségben. A NO különböző szerepet játszhat a gyulladáshoz szükséges kiváltásában és szabályozásában IBD-ben. A NOS izoformák megjelenésében és szöveti eloszlásában észlelt különbségeknek szerepe lehet a colitis ulcerosa és a Crohn betegség szöveti elkülönítésében.

Colitis ulcerosás szérum hatására az iNOS és az eNOS indukciója és jelentős expressziója volt észlelhető HUVEC-n. Crohnos szérum az iNOS expresszió átmeneti emelkedését és párhuzamosan az eNOS expresszió határozott csökkenését okozta. Az apoptotikus és nekrotikus sejtek száma jelentős változást nem mutatott, a citoskeleton megőrizte strukturális integritását.

A HUVEC-en végzett vizsgálati eredmények egybevágóak a vastagbél biopszia immunhisztokémiai eredményeivel, és olyan citokin komplexum jelenlétére utalnak a IBD-s szérumban mely az eNOS/iNOS arányt megváltoztatja endotheliális sejtekben. A Crohnos szérum bizonyos komponensei csökkentik az eNOS fehérje szintjét az endotheliumban, ami befolyásolja a betegség pathomechanizmusát kóros változásokat okozva a gyulladt szövet érrendszerében.

Summary

The initiation and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease are multifactorial and involve interactions between genetic, environmental, and immunological factors, but they are distinct in the initial phase of pathogenesis and in the type and the number of mediators involved.

Nitric oxide is a ubiquitous free radical and it plays important roles either as a messenger or a destructive molecule in inflammation. The iNOS expressed in macrophages, neutrophils, endothelial and smooth muscle, is responsible for the cytotoxic effect of these cells. eNOS and iNOS regulate the blood flow and bowel motility.

In UC, intensive iNOS immunoreactivity was present in the epithelial cells, in mucosal inflammatory cells, while the eNOS level was found to be unchanged compared to the control. A lower level of iNOS and eNOS was observed in mucosal leukocyte type cells and endothelium of CD patients, respectively. iNOS-IR cells were mainly neutrophils in UC, and macrophages in CD. Increased number of CD-31-IR capillaries within low eNOS-IR material in Crohn's mucosa was also revealed.

iNOS expression and presumably the constitutive eNOS activity are regulated in a different manner in UC and CD, therefore NO may play different roles in eliciting and maintaining the inflammation in the IBD. Differences observed in expression and distribution of NOS isoforms could be of importance in the histological differentiation of UC and CD.

Since a significant difference was observed in the number of cells showing NADPH-diaphorase reactivity and iNOS immunoreactivity between UC and CD, this simple, cheap and easy to carry out procedure might be useful in the differential-diagnosis of these two types of IBD. However, these histological data do not show correlation with the actual clinical and endoscopic activity index of IBD, therefore this does not reflect strictly the state of inflammation.

Induction of both iNOS and eNOS on HUVEC was observed in the presence of UC serum. In contrast, upon addition of CD serum to HUVEC media a transient increase in the expression of iNOS was observed parallel with a marked decrease in the expression of eNOS. The number of apoptotic and necrotic cells was not altered significantly, and the structural integrity of the cytoskeleton remained intact.

Results on HUVEC correlate well with immunohistochemical findings on biopsies, and suggest the presence of a cytokine composition in the blood of IBD patients which is able to evoke changes in the eNOS/iNOS ratio in endothelial cells. Our findings imply that some components of the Crohn's serum decrease eNOS protein level in the endothelium which may influence the pathomechanism and cause abnormal alterations in the vascular wall of the inflamed tissue.

15. Irodalomjegyzék

1. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leucocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Rad Biol Med* 1998;25:404-33.
2. Powrie F. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity* 1995, 3:171-174
3. Korzenik JR, Brian K, Dieckgraefe BK, Valentine JF, Hausman DF, Gilbert MJ Sargramostim for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005;352:2193-201
4. Korzenik JR, Dieckgraefe MD Is Crohn's disease an immunodeficiency? A hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1121-9
5. Guslandi M. Nitric oxide and inflammatory bowel diseases. *Eur J Clin Invest* 1998;28:904-7.
6. Grisham MB, Pavlick KP, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Wolf RE. Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. *J Invest Med* 2002;50:272-83.
7. Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflam bowel dis* 2003;9:179-89.
8. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Rad Biol Med* 2002;33:311-2.
9. Perner A, Rask-Madsen J. Review article: the potential role of nitric oxide in chronic inflammatory bowel disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;14:135-44.
10. Beck PL, Xavier R, Wong J, Ezedi I, Mashimo H, Mizoguchi A, et al. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:G137-47.

11. Brown JF, Kentes AC, Hanson PJ és mtsi. Nitric oxide generation and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 1993, 265:G418-22
12. Lippe IT, Holzer P. Participation of endothelium-derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperaemia due to acid back-diffusion. *Br J Pharmacol* 1992, 708:708-14
13. Banick PD, Chen Q, Xia YA és mtsai: Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *J Cell Physiol* 1997, 172:12-24
14. Duvenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology* 1994, 107:1050-8
15. Baeuerle PA, Baltimore D, NF- κ B: Ten years after. *Cell* 1996;87:13-20
16. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L Redox regulation of NF- κ B activation. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1115-1126
17. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-2258
18. Vallance BA, Dijkstra G, Qiu B, van der Waaij LA, van Goor H, Jansen PL, et al. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial derived NOS maintains mucosal integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G867-74.
19. Cook JP. NO and angiogenesis. *Atherosclerosis* 2003; (Suppl. 4):53-60
20. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des* 2003; 9:521-530
21. Kanwar S, Wallace JL, Befus D et al. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am J Physiol* . 1994. 266:G222-9
22. Dijkstra G, Moshage H, van Dullemen HM, de Jager-Krikken A, Tiebosch AT, Kleibeuker JH, et al. Expression of nitric oxide synthase and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 1998;186:461-71.

23. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM et al. DA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991;254:1001-3
24. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL at al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3030-4
25. Liu RH, Hotchkiss JH Potencial genotoxicity of chronically elevated nitric oxide : a review. *Mutat Res* 1995;339:73-89
26. Kurose I, Ebinuma H, Higuchi H at al. Nitric oxide mediates mitochondrial dysfunction in hepatoma cells induced by nonactivated Kupffer cells: evidence implicating ICAM-1-dependent process. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:S68-71
27. Middleton SJ, Shortouse M, Hunter JO Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet*1993;341:465-6
28. Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJR, et al. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 1993;342:338-40.
29. Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1995;36:718-23.
30. Lundberg JON, Hellström PM, Lundberg JM, Alving K. Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. *Lancet* 1994;344:1673-4.
31. Ljung T, Herulf M, Beijer E et al. Rectal nitric oxide assessment in children with Crohn disease and ulcerative colitis; indicator of ileocaecal and colorectal affection. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:1073-6
32. Perner A, Nordgaard I, Matzen P et al. Colonic production of nitric oxide gas in ulcerative colitis, collagenous colitis and uninflamed bowel. *Scan J Gastroenterol* 2002;37:183-8
33. Iwashita E, Greatly increased mucosal nitric oxide in ulcerative colitis determined in situ by a novel nitric oxide-selective microelectrode. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:391-5
34. Goggins MG, Shah SA, Goh J et al. Increased urinary nitrite, a marker of nitric oxide, in active inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm* 2001;10:69-73

35. Rachmilewitz D, Eliakim R, Ackerman Z, Karmeli F. Direct determination of colonic nitric oxide level: a sensitive marker of disease activity in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998;93:409-12.
36. Rees DC, Satsangi J, Corenlissen PL et al. Are serum concentrations of nitric oxide metabolites useful for predicting the clinical outcome of severe ulcerative colitis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:227-30
37. Guihot G, Guimbaud R, Bertrand V, Narcy-Lambare B, Couturier D, Duee P, Chaussade S, Blachier F. Inducible nitric oxide activity in colon biopsies from inflammatory areas: correlation with inflammation intensity in patients with ulcerative colitis but not with Crohn's disease. *Amino Acids* 2000; 18:229-237
38. Kimura H, Miura S, Shigematsu T, et al. Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1997;42:1047-54
39. Godkin AJ, De Balder AJ, Villa L, et al. Expression of nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1996;26:867-72
40. Leonard N, Bishop AE, Polak JM, et al. Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment. *J Clin Pathol* 1998;51:750-3
41. Dijkstra G, Zandvoort AJ, Kobold AC, et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in circulating monocytes from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:546-54
42. Vento P, Kiviluoto T, Jarvinen HJ, Soynila S. Changes in distribution of three isoforms of nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:180-189
43. Kolios G, Rooney N, Murphy CT et al. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 1998;43:56-63
44. Kimura H, Hokari R, Miura S, et al. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 1998;42:180-7

45. Miller MJ, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S et al. Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:11-6
46. Miller MJS, Thomson JH, Zhang X-J et al. Role of inducible nitric oxide synthase expression and peroxynitrite formation in guinea pig ileitis. *Gastroenterology* 1995;109:1475-83
47. Grisham MB, Specian RD, Zimmerman TE, Effects of nitric-oxide synthase inhibition on the pathophysiology observed in a model of chronic granulomatous colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;27:1114:21
48. Aiko S, Grisham MB, Spontaneous intestinal inflammation and nitric oxide metabolism in HLA-B27 transgenic mice. *Gastroenterology* 1995;109:142-50
49. Hogaboam CM, Jacobson K, Collins SM et al. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis *Am J Physiol* 1995;268:G673-84
50. Kiss J, Lamarque D, Delchier JC et al. Time-dependent actions of nitric oxide synthase inhibition on colonic inflammation induced by trinitrobenzen sulphonic acid in rats. *Eur J Pharmacol* 1997;336:219-24
51. Hosoi T, Goto H, Arisawa T et al. Role of nitric oxide synthase inhibitor in experimental colitis induced by 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28:9-12
52. Armstrong AM, Campbell GR, Gannon C, et al. Oral administration of inducible nitric oxide synthase inhibitors reduces nitric oxide synthesis but has no effect on the severity of experimental colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:832-8
53. McCafferty DM, Miampamba M, Sihota E, et al. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. *Gut* 1999;45:864-73
54. Kriegelstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001; 194:1207-1218
55. Altorjay I, Palatka K, Huszka M, Györffy Á, Udvardy M. Urine nitrate level as marker of activity in inflammatory bowel diseases. *Gut* 1997;41 (Suppl 3):18.

56. Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, Gutterman DD. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: loss of nitric oxide-mediated vasodilatation. *Gastroenterol* 2003;125:58-69.
57. Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:244-58
58. Ray RM, McCormack SA, Johnson LR. Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G37-43
59. Li L, Rao JN, Bass BL, et al. NF- κ B activation and susceptibility to apoptosis after polyamines depletion in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G992-1004
60. Zhang M, Caragine T, Wang H, et al. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 1997;185:1759-68
61. Hasko G, Kuhel DG, Marton A, et al. Spermine differentially regulates the production of interleukin-12 p40 and interleukin-10 and suppresses the release of the T helper 1 cytokine interferon gamma. *Shock* 2000;14:144-9
62. Morris SM Jr, Bhamidipati D, Kepka-Lenhart D, Human type II. Arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* 1997;193:157-61
63. Kocna P, Fric P, Zavoral M, et al. Arginase activity determination: a marker of large bowel mucosa proliferation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:619-23
64. Ricci G, Stabellini G, Bersani G, et al. Ornithine decarboxylase in colonic mucosa from patients with moderate or severe Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:903-4
65. Obayashi M, Matsui-Yuasa I, Matsumoto T, et al. Polyamine metabolism in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1992;87:736-40
66. Pillai RB, Tolia V, Rabah R, et al. Increased ornithine decarboxylase activity in inflammatory bowel disease in children. *Dig Dis Sci* 1999;44:1565-70

67. Raul F, Galluser M, Schleiffer R, et al. Beneficial effects of L-argininon intestinal epithelial restitution after ischemic damage in rats. *Digestion* 1995;56:400-5
68. Akisu M, Ozmen D, Baka M, et al. Protective effect of dietary supplementation with L-arginin and L-carnitine on hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Biol Neonate* 2002;81:260-5
69. Seven A, Seymen O, Inci F, et al. Evaluation of oxidative stress in experimental colitis: effects of L-arginine-nitric oxide pathway manipulation. *J Toxicol Environ Health* 2000;61:167-76
70. Boucher JL, Moali C, Tenu JP, et al. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginin utilization . *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1015-28
71. Moali C, Boucher JL Sari MA, et al. Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginin, homo-L-arginine, their N omega-hydroxy derivatives, and N omega-hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry* 1998;37:10453-60
72. Sasaki M, Gharwani S, Jordan P, Elrod JW, Grisham MB, Jackson TH, Lefer DJ, Alexander JS. Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis. *Free Radical Biol Med* 2003; 35:1679-1687
73. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers CL, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters* 1992; 307:287-293
74. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufmann S, Watson CA, Pober JS. Regulation of nitric-oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical endothelial vein cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *J Clin Invest* 1994; 93:2236-2243
75. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE)-like and cystein protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 1997; 185:601-607

76. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997; 100:3131-3139 [PMID: 9399960]
77. Dawson TM, Brewdt DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH-diaphorase are identical in brain and peripheral tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7797-801.
78. Hon WM, Chatwal M, Khoo HE, Moochhala SM. Histochemical methods for detecting nitric oxide synthase activity in cell cultures. *Biotech Histochem* 1997;1:29-32.
79. Mitchell JA, Kohlhaas KL, Matsumoto T, Pollock JS, Forstermann U, Warner TD, et al. Induction of NADPH-dependent diaphorase and nitric oxide synthase activity in aortic smooth muscle and cultured macrophages. *Mol Pharmacol* 1992;6:1163-68.
80. Ikeda I, Kasajima T, Ishiyama S, Shimojo T, Takeo Y, Nishikawa T, et al. Distribution of inducible nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:1339-41.
81. Iwashita H, Myiahara T, Hino K, Tokunaga T, Wakisaka H, Sawazaki Y. High nitric oxide synthase activity in endothelial cells in ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995;30:551-4.
82. Leonard N, Bishop AE, Polak JM, Talbot IC. Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment. *J Clin Pathol* 1998;51:750-3.
83. McCafferty DM, Mudgett JS, Swain MG, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterol* 1997;112:1022-7.
84. Lundberg JON, Hellström PM, Lundberg JM, Alving K. Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. *Lancet* 1994;344:1673-4.
85. Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamailard M, Chareyre F, De Lagausie P, et al. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* 2003;52:840-6.
86. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:5509-12.

87. Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification localization, and association with mucosal antioxidants. *J Patol* 2003;201:28-38.
88. Herulf M, Ljung T, Hellström PM, Weitzberg E, Lundberg JON. Increased luminal nitric oxide in inflammatory bowel disease as shown with a novel minimally invasive method. *Scan J Gastroenterol* 1998;33:164-9.
89. Tateishi S, Arima S, Futami K. Assessment of blood flow in the small intestine by laser Doppler flowmetry: comparison of healthy small intestine and small intestine in Crohn's disease. *J Gastroenterol* 1997;32:457-63.
90. Wakefield AJ, Dhillon RP, Rowles PM, Sawyerr AM, Pittilo RM, Lewis AAM, Pounder RE. Pathogenesis of Crohn's disease: Multifocal gastrointestinal infarction. *Lancet* 1989;8671:1057-62.
91. Belai A, Boulus PB, Robson T, Burnstock G. Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* 1997;40:767-74.
92. Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999;43:521-31.
93. Ito A, Egashira K, Kadokami T, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nakaike R. Chronic inhibition of endothelium-derived nitric oxide synthesis causes coronary microvascular structural and hyperreactivity to serotonin in pigs. *Circulation* 1995;9:2636-44.
94. Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zeiher AM. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arteriosc Thromb Vasc Bio* 1999;19:656-64.
95. Ziche M, Parenti A, Ledda F, Dell'Era P, Granger HJ, Maggi CA, et al. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res* 1997;80:845-52.
96. Deventer SJH. Small therapeutic molecules for the treatment of inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;50 (Suppl III):iii47-iii53.
97. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufmann S, Watson CA, Pober JS. Regulation of nitric-oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical

- endothelial vein cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *J Clin Invest* 1994; 93:2236-2243
98. Heller R, Polack T, Grabner R, Till U. Nitric oxide inhibits proliferation of human endothelial cells via a mechanism independent of cGMP. *Atherosclerosis* 1999; 144:49-54
 99. Garcia-Gonzalez MA, Pena AS. Nitric oxide and inflammatory bowel disease. *Rev Esp Enferm Dig* 1998; 90:870-876
 100. Guslandi M. Nitric oxide and inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:904-907
 101. Agnoletti L, Curello S, Bachetti T, Malacarne F, Gaia G, Comini L, et al: Serum from patient with severe heart failure downregulates eNOS and is proapoptotic. Role of tumor necrosis factor- α . *Circulation* 1999; 100:1983-1991
 102. Bachetti T, Comini L, Curello S, Bastianon D, Palmieri M, Bresciani G, Callea F, Ferrari R. Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37:939-945
 103. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993; 73:205-209
 104. Grisham M, Johnson GG, Lancaster JR. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol* 1996; 268:237-246
 105. Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS. eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: preservation by hTERT immortalization. *Circ Res* 2001; 89:793-798 [PMID: 11679409]
 106. Sharp BR, Jones SP, Rimmer DM, Lefer DJ. Differential response to myocardial injury reperfusion injury in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282:H2422-H2426 [PMID: 12003854]
 107. Binion DG, Fu S, Ramanujam KS, Chai YS, Dweik PA, Drazba JA, Wade JG, Ziats NP, Erzurum SC, Wilson KT. iNOS expression in human intestinal microvascular endothelial cells inhibits leukocyte adhesion. *Am J Physiol* 1998; 275:G592-G603 [PMID: 9724273]

108. Binion DG, Rafiee P, Ramanujam KS, Fu S, Fisher PJ, Rivera MT, Johnson CP, Otterson MF, Telford GL, Wilson KT. Deficient iNOS in inflammatory bowel disease intestinal microvascular endothelial cells results in increased leucocyte adhesion. *Free Radic Biol Med* 2000; 29:881-888 [PMID: 11063913]
109. Iwashita E, Iwai A, Sawazaki Y, Matsuda K, Miyahara T, Itoh K. Activation of microvascular endothelial cells in active ulcerative colitis and detection of inducible nitric oxide synthase. *J Clin Gastroenterol* 1998; 27:S74-79 [PMID: 9872501]
110. Tsukahara H, Gordienko DV, Goligorsky MS. Continuous monitoring of nitric oxide release from human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193:722-729 [PMID: 8512571]
111. Jugdutt BI. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Fail Rev* 2002, 7:391-405 [PMID: 12379824]
112. Williams IL, Wheatcroft SB, Shah AM, Kerney MT. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *Int J Obes* 2002; 26:754-764 [PMID: 12037644]
113. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *Am J Med* 1999; 107:85-89 [PMID: 10403357]
114. Zadeh MS, Kolb JP, Geromin D, D'Anna R, Boulmerka A, Marconi A, Gugas B, Marsac C, D'Alessio P. Regulation of ICAM-1/CD54 expression on human endothelial cells by hydrogen peroxide involves inducible NO synthase. *J Leukoc Biol* 2000; 67:327-334 [PMID: 10733092]
115. Miceli F, Tringali G, Tropea A, Minici F, Orlando MT, Lanzone A, Navarra P, Apa R. The effect of nitric oxide on prostanoid production and release by human umbilical vein endothelial cells. *Life Sciences* 2003; 73:2533-2542 [PMID: 12967678]
116. Kroll J, Waltenberger J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252:743-746 [PMID: 9837777]

117. De Assis C, Plotkowski C, Fierro IM, Barja-Fidalgo C, Freitas MS. Expression of inducible nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells during primary culture. *Nitric Oxide* 2002; 7:254-261 [PMID: 12446174]
118. Quatrone S, Chiappini L, Scapagnini G, Bigazzi B, Bani D. Relaxin potentiates the expression of inducible nitric oxide synthase by endothelial cells from human umbilical vein in *in vitro* culture. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:325-330 [PMID: 15026539]
119. Cho MM, Ziats NP, Pal D, Utian WH, Gorodeski GI. Estrogen modulates paracellular permeability of human endothelial cells by eNOS- and iNOS-related mechanisms. *Am J Physiol* 1999; 276:C337-C349 [PMID: 9950769]
120. Lamas S, Michel T, Collins T, Brenner BM, Marsden PA. Effects of interferon- γ on nitric oxide synthase activity and endothelin-1 production by vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1992; 90:879-887 [PMID: 1381725]
121. Radomski MW, Vallance P, Whitley G, Foxwell N, Moncada S. Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide. *Cardiovasc Res* 1993; 27:1380-1382 [PMID: 7504587]
122. Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998; 97:99-107 [PMID: 9443437]
123. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99:2625-2634 [PMID: 9169492]
124. Konno S, Iizuka M, Yukawa M, Sasaki K, Sato A, Horie Y, Nanjo H, Fukushima T, Watanabe S. Altered expression of angiogenic factors in the VEGF-Ets-1 cascades in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2004; 39:931-939 [PMID: 15549445]
125. Kapsoritakis A, Sfiridaki A, Maltezos E, Simopoulos K, Giatramanolaki A, Sivridis E, Koukourakis M. Vascular endothelial growth factor in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 2003; 18:418-422 [PMID: 12761641]

126. Giatromanolaki A, Sivridis E, Maltezos E, Athanassou N, Papazoglou D, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI. Hypoxia 1 α and 2 α overexpression in inflammatory bowel disease. *J Clin Pathol* 2003; 56:209-213 [PMID: 12610101]
127. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk D, Huang P, Jain R. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability *PNAS* 2001; 98:2604-2609 [PMID: 11226286]
128. Polytarchou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit angiogenesis in vivo through downregulation of nitric oxide synthase expression and activity. *Free Radic Res* 2004; 38:501-508 [PMID: 15293558]
129. Polytarchou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit human endothelial cell function through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol* 2005; 510:31-38 [PMID: 15740722]
130. Tomasian D, Keaney JF, Vita JA Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovascular Res* 2000; 47:426-435 [PMID: 10963719]
131. Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertension Rep* 2003; 6:473-480 [PMID: 14594566]
132. Li H, Junk P, Huwiler A, Burkhardt C, Wallerath T, Pfeilschifter J, Förstermann U. Dual effect of ceramid on human endothelial cells. Induction of oxidative stress and transcriptional upregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2002; 106: 2250-2256 [PMID: 12390956]
133. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91:3527-3561 [PMID: 9572988]
134. Beltran B, Mathur A, Duchon MR, Erusalimsky JD, Moncada S. The effect of nitric oxide on cell respiration: a key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sc. USA* 2000; 97:14602-14607 [PMID: 11121062]

135. Brookes PS, Salinas EP, Darley-Usmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-Usmar VM, Anderson PG. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome *c* release. *J Biol Chem* 2000; 275: 20474-20479 [PMID: 10791954]
136. Shiva S, Brookes PS, Patel RP, Anderson PG, Darley-Usmar VM. Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome *c* oxidase. *Proc Natl Acad Sc. USA* 2001; 98:7212-7217 [PMID: 11416204]
137. Kim YM, Chung HT, Simmons RL, Billiar TR. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J Biol Chem* 2000; 275:10954-10961 [PMID: 10753895]

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani Dr. Údvardy Miklós Professzor úrnak, bizalmáért, szakmai tanácsaiért, mindenkori támogatásáért. Köszömön Dr. Altorjay István Tanár úr messzemenő támogatását, elméleti és gyakorlati téren nyújtott segítségét.

Hálával tartozom Dr. Serfőző Zoltánnak aki a munka minden részében alapvető és elengedhetetlen segítséget nyújtott. Köszönöm Veréb Zoltán az Immunológiai Intézet munkatársának a laboratóriumi munkákban való értékes segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Erdődi Ferenc Professzor úrnak értékes tanácsaiért, valamint munkatársainak Lontay Beátának és Bátori Róbertnek pontos laboratóriumi munkájáért.

Köszönöm Galáth Béláné, Évikének a sejttenyésztő laboratóriumban végzett precíz, megbízható munkáját.

Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Palatka K**, Altorjay I, Huszka M, Udvardy M: Nitrogén-monoxid (NO) a gyomor bélsatorna és a máj működésében. *Orvosi Hetilap*, 1997, 24: 1555-1559
2. **Palatka K**, Serfőző Z, Veréb Z, Hargitay Z, Lontay B, Erdődi F, Bánfalvi G, Nemes Z, Udvardy M, Altorjay I: Changes in the expression and distribution of the inducible and endothelial nitric-oxide synthase in mucosal biopsy specimens of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2005, 40: 670-680 (IF 1,82)
3. **Palatka K**, Zoltán S, Veréb Z, Bátori R, Lontay B, Hargitay Z, Nemes Z, Udvardy M, Erdődy F, Altorjay I: Effect of IBD sera on expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol*, 2006, 12: 1730-1738 (IF 3,318)

Egyéb közlemények:

1. **Palatka K**, Kiss A, Telek B, Kozlowszky B, Rák K: Egyidejű splenectomia és cholecystectomy hereditær spherocytosisban. *Magyar Belorvosi Archivum*, 1994, 47: 487-489
2. **Palatka K**, Altorjay I, Szakáll Sz, Györffy Á, Udvardy M: A *Helicobacter pylori* szerepe gyomor carcinomás szöveti mintákban. *Orvosi Hetilap*, 1999. 36: 1985-1989
3. Pfliegler G, **Palatka K**: Attempted Suicid with Pilocarpine eyedrops. *American Journal of Ophthalmology*, 1995, 120: 399-340 (IF 1,95)
4. Udvardy M, Pósan E, **Palatka K**, Hársfalvi J: Az L-arginin hatása az in vitro plasmin generációra és fibrinogenolysisre. *Magyar Belorvosi Archivum*, 1996. 49: 9-12
5. Huszka M, Káplár M, Rejtő L, Tornai I, **Palatka K**, László P, Udvardy M: The association of reduced endothelial derived relaxing factor-NO production with endothelial damage and increased in vivo platelet activation in patients with diabetes mellitus. *Thrombosis Research*, 1997, 87:173-180 (IF 1,46)
6. Udvardy M, Pósan E, **Palatka K**, Altorjay I, Hársfalvi J: Effect of L-arginine on in vitro plasmin generation and fibrinogenolysis. *Thrombosis Research*, 1997, 87: 75-82 (IF 1,46)
7. Udvardy M, Kaplar M, Rejtő L, Tornai I, **Palatka K**, Laszló P, Huszka M: Increased in vivo platelet activation and reduced intravascular endothelium-derived relaxing factor and nitrate/nitrite production in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Platelets*, 1998, 57:260-267 (IF 0,73)
8. Altorjay I, **Palatka K**, Vitalis ZS, Rejtő L, Györffy Á, Udvardy M: Up-to-date management of patients with upper gastrointestinal bleeding in specialized unit. *Orvosi Hetilap*, 1998, 139: 2121-2126

9. Pásztor É, Décsy J, Dévényi K, Sikula J, Altorjay I, Mikita J, **Palatka K**, Reményi Gy, Péter M: A gyomor leiomyomájának diagnosztikai lehetőségeiről két esetünk kapcsán. *Ovosi Hetilap*, 1999, 45: 2525-2527

10 Huszka M, Káplár M, Rejtő L, **Palatka K**, Udvardy M: Csökkent intravasculáris endothel eredetű NO (nitrát/nitrit)-termelés összefüggése az endothelkárosodással és a fokozott thrombocyta-aktivációval diabetes mellitusos betegekben. *Diab. Hung*, 1999, 7:31-36

11. Udvardy M, **Palatka K**, Tornai I, Altorjay I: Antitrombotikus kezelés heveny felső gastrointestinális vérzés esetén. *Orvosi Hetilap*, 2002, 4:183-187

12. Udvardy M, Altorjay I, **Palatka K**: A gyulladáshoz kapcsolódó bélbetegségek haematológiai vonatkozásai. *Orv Hetilap* 2001, 2:78-82

13. **Palatka K**, Altorjay I: Argonplazmás koaguláció a gastrointestinális endoszkópiában. *Magyar Belorvosi Archivum*, 2003; 56: 113-117

14. **Palatka K**, Udvardy M, Altorjay I: A vékonybél-lymphoma és a coeliakia, valamint a Crohn betegség kapcsolata. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2004, 4: 121-124 (IF 1,84)

15. Peter Laszló Lakatos and al., Hungarian IBD Study Group
Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11:1489-1495 (IF 3,318)

16. Peter Laszló Lakatos and al, Hungarian IBD Study Group, Clinical presentation of Crohn's disease. Association between Familial Disease, Smoking, Disease Phenotype, Extraintestinal Manifestations and Need for Surgery. *Hepato-Gastroenterology*, 2005, 52:817-822 (IF 0,69)

17. Peter Laszlo Lakatos^{1*}, Simon Fischer^{1*}, Karolien Claes², Agota Kovacs³, Tamas Molnar⁴, Istvan Altorjay⁵, Pal Demeter⁶, Zsolt Tulassay⁷, Karoly Palatka⁵, Maria Papp⁵, Paul Rutgeerts², Ferenc Szalay¹, Janos Papp¹, Hungarian IBD Study Group#, Severine Vermeire², Laszlo Lakatos.⁸
DLG5 R30Q is not associated with inflammatory bowel disease, in Hungarian IBD patients, but predicts clinical response to steroids in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease*, 2006 (in press) (IF 3,54)

A tézisekhez kapcsolódó nemzetközi folyóiratokban megjelent idézhető absztraktot:

Palatka K, Serfőző Z., Altorjay I., Varga V., Udvardy M: Altered nitric-oxide synthase activities in intestinal inflammatory disease. *Immunology letters*, 1999, 69:166 (IF 1,49)

Serfőző Z, **Palatka K**, Varga V, Oja S, Udvardy M: Altered nitric oxide synthase activities in intestinal inflammatory diseases. *Pathophysiology*, 1998, 5: 55

Altorjay I, **Palatka K**, Huszka M, Györffy Á., Udvardy M: Urine nitrate level as marker of activity in inflammatory diseases. *Gut*, 1997, 41: A118 (IF 4,54)

Palatka K, Huszka M, Altorjay I, Györffy Á, Udvardy M: Measurement of serum and urine nitrate levels in inflammatory bowel diseases. *Z Gastroenterology*, 1997, 35: 106 (IF 1,02)

Palatka K, Serfőző Z, Veréb Z, Altorjay I., Hargita Z, Nemes Z, Udvardy M: Immunohistochemical studies on endothelial nitric oxide synthase activity in IBD colonic mucosa: Gut, 2001, 49: A1632 (IF 6,17)

Palatka K, Serfőző Z, Veréb Z, Hargitay Z, Nemes Z. Altorjay I: Crohn's serum changes the 2NOS/iNOS level in cultured human endothelial cells. Z Gastroenterology, 2002. 40:350. (IF 0,83)

Palatka K, Serfőző Z, veréb Z, Hargitay Z, Nemes Z, Altorjay I: Effects of Crohn's serum on the expression of nitric oxide synthase isoforms, e-selectin immunoreactivity and proliferation of cultured human endothelial cells Gut. 2002, 51: A298 (IF 6,32)

Palatka K., Veréb Z, Serfőző Z, Erdődi F, Lontay B, Altorjay I: Crohn's serum decrease the eNOS protein level in endothelial cell culture. Gut, 2003, S2. a156 (IF 5,88)

Palatka K, Serfőző Z, Veréb Z, Bátori R, Lontay B, Udvardy M, Erdődi F, Altorjay I: Different expression of the inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells treated with blood serum of inflammatory bowel disease. Gut, 2005, 54: S7. A163 (IF 6,60)

Nemzetközi folyóiratokban megjelent idézhető absztraktok:

Huszka M, Rejtő L, Káplár M, **Palatka K**, Tornai I, Udvardy M: Monitoring the EDRF-NO system in different diseases using new methods for determination NO₂/NO₃ of body fluids. Z Gastroenterol, 1997, 35:380 (IF 1,02)

Eiben Gy, Huszka M, Rejtő L, Káplár M, **Palatka K**, Tornai I, Udvardy M: Monitoring the antioxidant status in liver diseases and patients with diabetes mellitus. Z Gastroenterol, 1997, 35:374 (IF 1,02)

Udvardy M, **Palatka K**, Vitalis Zs, Rejtő L, Altorjay I: Complex endoscopic and medical therapy of acute upper gastrointestinal bleeding in patients with antithrombotic treatment. Digestion, 1998, 59: 635 (IF 1,25)

Altorjay I, **Palatka K**, Vitalis Zs., Gyórfy Á., Udvardy M: Predictive value of a risk-score system for the outcome of patients with upper gastrointestinal bleeding. Z Gastroenterology, 1998, 36, 415-156 (IF 0,89)

Huszka M, **Palatka K**, Rejtő L, Udvardy M: The of the L-arginin: nitric oxide (NO) pathway and antioxidant status in inflammatory bowel disease. Fundamental and Clinical Pharmacology, 1999, 13:310 (IF 0,81)

Tornai I, Pósn E., **Palatka Károly**: Markers of fibrogenesis in chronic hepatitis C. J Hepatol 2000, S2 32:150 (IF 3,76)

Altorjay I, **Palatka K**, Mezei G, Papp M, Tornai I: Efficacy of mini-loop ligation in comparison to sclerotherapy in the treatment of esophageal varicosity. Gastrointestinal Endosc, 2002, 55: AB196-AB196 T1896 (3,037)

Tornai I, **Palatka K**: Lamivudin treatment of chronic B virus hepatitis in patients with renal transplantation. Gut, 2002; 51 S 3, A116 (IF 6,32)

Altörjay I, Papp M, **Palatka K**, Mezei G, Tornai I: Additional, continuous proton pump inhibitor treatment prolonged survival in cirrhotic patients following sclerotherapy because of variceal bleeding. Gut, 2002, 51:A175 (IF 6,32)

Altörjay I, Papp M, **Palatka K**, Mezei G, Tornai I: Additional PPI treatment significantly prolonged survival in cirrhotic patients following sclerotherapy because of variceal bleeding. Gastroenterology and Hepatol, 2003, 124: A734-A734

Palatka K., Pfliegler Gy, Tornai I, Várvolgyi Cs, Altörjay I: 5-aminosalicylic acid induced cholangiohepatitis in a patient with Crohn's disease. Z. Gastroenterol 2003, 63, S4 (IF 1,07)

Palatka K., Papp. M Udvardy M, Altörjay I: Assesement of rutine laboratory and clinical data for activity os Crohn's disease in correlation with myeloperoxidase and matrix metalloproteinase activity. Gut, 2004, 53, S 4 (IF 6,60)

Papp. M, Udvardy M, **Palatka K**, Altörjay I: Inflammation and agressive proteolytic enzymes: myeloperoxidase and matrix metalloproteinase-9 – do they play a role in acute variceal bleeding? Gut, 2004, 53, S4 (IF 6,6)

Palatka K, Szimuly B, Várvolgyi Cs, Klekner A, Dezső B, Tornai I, Altörjay I., Horváth A, Pliiegler Gy: Esophageal primitive neuroectodermal tumor, a case history, World Congress of Gastroenterology Montreal 2005. sep.

Egyéb absztraktok:

Palatka K, Altörjay I, Huszka M, Serföző Z, Varga V, Udvardy M: A NO szerepe a gyomor-bél rendszerben különös tekintettel a vastagbél betegségekre. Magyar Belorvosi Archivum, 1998. S.3. 286-287

Palatka K, Rejtő L, Tornai I, Altörjay I, Udvardy M: A nyelőcső vérzés ellátása specializált részlegen. Magyar belorvosi Archivum 2000, S2

Palatka K., Altörjay I: Az argon plazma coaguláció (APC) szerepe gastrointestinális malignomákban, Magyar Belorvosi Archivum, 2002. S3

Könyvrészletek:

1. A gyulladós bélbetegségek haematológiai vonatkozásai
Az IBD extraintesztinális manifesztációi. Szerkesztette: Dr. Kovács Ágota
Medicom Budapest, 2000

2. A belek betegségei, A pancreas betegségei
Klinikai alapismeretek fogorvos és gyógyszerészhallgatóknak. Szerkesztette: Dr. Boda Zoltán
Medicina Budapest, 2001

3. A hasnyálmirigy rosszindulatú daganatai

Klinikai onkológia a gyakorlatban. Szerkesztette: Dr. Szántó János
Medicina Budapest, 2005

Előadások:

Magyar Gasztroenterológiai Társaság Endoszkópos Szekciójának 2002. évi Vándogyűlése
Debrecen 2002. szeptember
Az Argon plazma coaguláció lehetőségei rectum tumorokban

Ritka Kórképek Szimpózium
Debrecen, 2003. május, 29
Crohn betegséghez társuló súlyos májenzim eltérések

II. Granum, Családorvos Továbbképző Konferencia
Hajdúszoboszló, 2003. szept 20.
A reflux betegség differenciál diagnosztikája és extraoesophagealis manifesztációi

Belgyógyászati Szakvizsga előkészítő előadássorozat
Debrecen 2003. okt. 31
Gyógyszer okozta toxikus májártalmak

Semmelweis Egyetem IV Gasztroenterológiai Továbbképző Konferencia, Budapest 2004. február 7., Coeliakia, vékonybél lymphoma, Crohn betegség együttes előfordulása.

Regionális Gasztroenterológiai Találkozó
2004. Bodrogkisfalud
Gyakorlati teendők Infliximab kezelés kapcsán

III. Granum, Családorvos Továbbképző Konferencia
Hajdúszoboszló, 2004. április 24.-25.
A gyulladós bélbetegségek diagnosztikája és kezelése

I. Debreceni Belgyógyászati Napok, 2004. április: Az IBD modern kezelési elvei

A Magyar Gasztroenterológiai Társaság 46. Nagygyűlése
Balatonaliga 2004. június 4.
Rutin laboratóriumi és klinikai adatok a Crohn betegség aktivitásának felmérésére

I. Debreceni Gasztro Immun Konferencia, 2004. nov 19-20: Primaer sclerotizáló cholangitis és IBD

A Magyar Gasztroenterológia Társaság Colon Szekció 2005. éves Tudományos Ülése
Gyula 2005. január 20.
A vastagbél vizsgálatok előkészítése

A Magyar Gasztroenterológiai Társaság 47. Nagygyűlése Balatonaliga
2005. június 7.-11.
Chronicus infliximab kezelés Crohn betegségben

Családorvosi tanszék Továbbképző tanfolyam
Debrecen, 2005. június 15.
Funkcionális és chronikus gyulladáso bélbetegségek

Kiemelt fejezetek a klinikai Onkológiából, Háziiorvosi Alaptanfolyam
Debrecen 2005 szept 1-3.
A colorectális carcinoma diagnosztikájának lehetőségei

A magyar Belgyógyász Társaság Északkelet-Magyarországi Szakcsoportjának Tudományos Ülése
Debrecen 2005. szeptember 22.-24.
Fenntartó infliximab kezelés