

Egyetemi Doktori (Ph. D.) értekezés

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

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

1. Bevezetés

A gyulladássos 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.

Bár a pontos etiológia és a teljes patogenetikai 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 mikroflóra 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*” sejtkultúrákon végzett vizsgálatok alapvető adatokat szolgáltattak 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 immungenetikai tényezők tekinthetők dominánsnak a gyulladós bélbetegségek etiopatogenezisében és ezen a téren gyarapodó ismeretektől várhatók a betegség további átfogóbb megismerésének lehetőségei.

Az IBD jelen elképzelés szerint genetikai, környezeti és immunológiai tényezők komplex együtthatása 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 gyulladós citokinek száma és aránya is különbözik.

A gasztrointesztinális rendszer gyulladós 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 gyulladós utat feltételez hasonló gyulladós sejtek, citokinek, lipid mediátorok részvételével. A kiterjedt gyulladós infiltrátum és a szöveti elváltozások háttérében zajló komplex immunológiai folyamatoknak részese a nitrogén-monoxid (NO), mely a szervezet egyik általános és alapvető mediátora és effektora. A NO a szervezet egyik legkisebb biológiailag aktív molekulája, mint ubikviter szabadgyök, mennyiségétől, keletkezési helyétől és idejétől, valamint a környezetében zajló reakcióktól és a pH-tól függően pozitív vagy negatív szerepet játszik a gyulladós folyamatok keletkezésében és fenntartásában.

Széleskörű vizsgálatok ellenére a NO-nak a krónikus gyulladós bélbetegségekben játszott szerepe nem tisztázott: colitis ulcerosában és Crohn betegségben gyakran ellentmondásos eredmények születtek. Az epithelium, a nyálkahártyát infiltráló gyulladós sejtek valamint az endothel termelte különböző NO szintetáz (NOS) izoformák által létrehozott NO jelenléte és koncentrációja a gyulladás különböző fázisaiban proinflammatorikus illetve

anti-inflamatorikus hatást fejt ki, és valószínűleg más-más módon érvényesül a Crohn betegségként, valamint colitis ulcerosaként jellemzett gyulladásban. Colitis ulcerosában inkább a rendszer fokozott aktivitását észlelték, míg Crohn betegségben, bizonyos esetekben magas, máskor alacsony szintek voltak mérhetőek. Crohn betegségben ismert a nyálkahártya mikrovaszkuláris rendszerének strukturális változása és valószínűleg ezzel kapcsolatos a vazodilatátor kapacitás diszfunkciója. A NO szintje valamint a NOS expressziója jelezhetik a gyulladással kapcsolatos aktivitást és valószínűleg összefüggés van a NOS szintek változása valamint az észlelt morfológiai eltérések között.

A humán köldökzsínór 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. A NO hozzájárul az endotheliális sejtek apoptózisának, proliferációjának, valamint sejtdifferenciációjának (angiogenezis) szabályozásához.

2. Célkitűzések

Munkánk során a NOS izoformák expressziójának minőségi és mennyiségi vizsgálatát végeztük Crohnos és colitis ulcerosás nyálkahártyában, valamint a gyulladással járó bélbetegségek szérumával kezelt humán köldökzsínór endotheliális sejtekben (HUVEC) a gyulladással járó folyamat különböző fázisaiban. Először a gyulladással érintett és megkímélt területekből aktív és inaktív klinikai állapotban nyert biopsziás anyagok szisztémás hisztológiai és immunhisztológiai vizsgálatára került sor. Majd kísérletes körülmények között az eNOS és iNOS expresszióját és lokalizációját konfluens és semi-konfluens HUVEC tenyészeteken tanulmányoztuk. Követtük a sejtek viabilitási mutatóinak, az apoptotikus és nekrotikus aktivitásnak valamint a proliferációnak

a változásait a NOS izoformák expressziójának függvényében gyulladássos és kontroll szérumokkal történt kezelés során.

Célunk a NO szerepének megvilágítása, a különbségek regisztrálása, a gyulladássos bélbetegségek különböző formáiban, és ennek esetleg gyakorlati, differenciáldiagnosztikai szempontból való értékelése.

3. Anyagok és módszerek

Betegek kiválasztása, kezelése

A vizsgálatban résztvevő IBD betegek tartósan fennálló CU vagy Crohn-ban szenvedtek, a kolonoszkópiás mintavétel előtti négy hétben nem kaptak szisztémás vagy lokális kortikoszteroid kezelést, illetve az alkalmazott gyógyszerek dózisát nem változtattuk. A CU betegeknek proctosigmoiditise vagy bal oldali colitise volt. A Crohn-betegekben a gyulladás a vastagbélre lokalizálódott, nem-stenotizáló és nem-penetráló gyulladássos formákat vizsgáltunk, melyet a bécsi Crohn-betegség osztályozás (Vienna classification, 1998) alapján határoztunk meg. 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.

Biopszia mintavétel

A vastagbél biopszia mintákat IBD betegekből a gyulladt és makroszkóposan a gyulladás által megkímélt sigma és jobb oldali colon területekről, míg a kontroll mintákat colorectalis carcinoma szűrésen résztvevő, egészséges egyének kolonoszkópiás vizsgálatakor vettük.

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 fagyaszttóban (-80C°) tároltuk.

Biopszia vizsgálatok

Biopsziák előkészítése

A 4%-os paraformaldehidben (PFA) vagy acetoneban rögzített fagyasztott biopsziákból 10 μm vastag metszeteket készítettünk. A PFA-ben rögzített minták egy részét paraffinba ágyasztuk.

iNOS immunhisztokémia

iNOS kimutatására anti-iNOS poliklonális nyúlban termeltetett antitestet használtunk 1:1000 hígításban PFA-ben fixált paraffinos vagy fagyasztott metszeteken. Az immunreakció előhívására Universal avidin-biotin-peroxidáz kit-et használtunk, melyhez a festék 3,3'-diaminobenzidin (DAB) volt. Kontroll kísérletekben a primer antitestet kihagytuk az inkubálás során. A kontroll kísérletekben nem tapasztaltunk pozitív immunreakciót.

eNOS immunhisztokémia

Az acetoneban szárított fagyasztott metszeteket inkubáltuk eNOS antitesttel (nyúl, 1:100) egy éjszakán át 4 °C-on, hasonló módon, mint azt az iNOS immunreakciónál tettük. Következő lépésként biotinnal jelölt másodikk antitesttel inkubáltunk (1:200), a reakciót, pedig avidinhez kötött FITC-tal (1:200) tettük láthatóvá. Az eNOS antitest specificitását az antitest megfelelően kihígított oldatának és 250 $\mu\text{g/ml}$ eNOS blokkolópeptidnek 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. 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). Kontroll reakciókban a β -NADPH-t kihagytuk az inkubációs oldatból, vagy helyettesítettük 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.

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 gyulladásos sejtek megjelenítésére DAKO LSAB2 kit-et használtunk, ahol sztreptavidinhez kötött alkalikus-foszfátáz 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 metszeteken jól elkülöníthető volt.

A PFA-del rögzített biopsziákból fagyasztott sorozatmetszetek 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 foszfátázzal (1:100 hígításban) 1 órán át szobahőn reagáltattuk. 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 történt. Az iNOS-IR sejtek számát átlagfelületre vonatkoztattuk (sejtszám/mm²).

iNOS immunblott

Öt-hat darab endoszkópiásan gyulladt CU és Crohn-beteg valamint kontroll vastagbélből vett biopsziákat folyékony nitrogénben lefagyasztottunk, majd dörzscsészében nitrogén alatt porrá őröltük és a mintákat 70 °C-os fagyasztoóban tároltuk felhasználásig. A mintákat RIPA lízis puffer-ben 100 U/μl proteáz inhibitor keveréket használva homogenizáltuk. A teljes fehérje tartalmat BCA módszerrel határoztuk meg. A 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. 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).

Vizsgálatok sejttenyészetén

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) szállítottuk a sejttenyésztő laboratóriumba. A köldökzsínór mindkét végét elkötöttük és a köldökvéna

mindkét végébe kanült helyeztünk. A vénát a kanülok segítségével átmostuk steril PBS-sel, majd Hank egyensúlyi só-oldattal (HBSS) és M199 folyadékkal. A sejtszuszpenziót 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 ezután ismét leoltottuk, növesztettük és összegyűjtöttük a fentiekhez hasonlóan. Amikor az egyrétegű sejtenyészet 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 mintákból immunoblottot a biopsziákhoz hasonlóan végeztük. Minden mintából 30 µg fehérjét tartalmazó oldatot vittünk fel a géltre. Primer antitestként anti-eNOS (1: 5000) és anti-iNOS (1:2000) nyúlban termeltetett poliklonális antitesteket használtunk. A NOS reaktív sávokat mindenegyes blotton a 2 órás normál szérummal kezelt mintákra normalizáltuk denzitometrálas 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 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 vizsgálatokhoz az 50%-os beteg és egészséges szérumok mellett 50% normál szérumban oldott NOS gátlót, 10^{-4} M nitro-L-arginin metil-észtert (L-NAME) is alkalmaztunk.

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

A kezelések következtében változó HUVEC életképesség mértékét, az apoptotikus/nekrotikus sejtek mennyiségét kimutató annexin-V-biotin kit-tel végeztük. A sejtek rögzítése előtt a tenyésztő oldat eltávolítása és szobahőmérsékletű PBS-el való mosást követően a sejteket annexin-V-biotin/propidium-jodid oldattal jelöltük 15 percig. Ezután HEPES-sel való alapos mosást követően a sejteket rögzítettük metanol-etanol (1:1) keverékben 1 percig, és 5 $\mu\text{g/ml}$ avidin-fluoreszcein-nel inkubáltuk szintén 15 percig. 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 sejtváz alakjának és épségének vizsgálatát az aktin rostok 0.2 $\mu\text{g/ml}$ falloidin-FITC-cel 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 fénnel 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 szérum kezelések) 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, ha $p < 0.01$.

4. Eredmények

Az iNOS immunreaktív (IR) sejtek megoszlása és jellemzése IBD nyálkahártyában

Aktív colitis ulcerosa gyulladt területein jelentős mennyiségű, hisztokémiaileg NADPH-diaforáz reakciót adó sejtet észleltünk. 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-IR sejtek és a NADPH-diaforáz pozitív sejtek eloszlása és morfológiai jellemzői azonosak voltak. A colitis ulcerosás mintákkal ellentétben Crohnos mintákban szembetűnően kevesebb volt a NADPH-diaforáz pozitív és az iNOS-IR sejtek előfordulása.

Kettős jelölésű immunhisztokémiai vizsgálatok során gyulladt IBD nyálkahártya iNOS-IR gyulladással sejtjeinek CD68 és CD15 felszíni membrán

antigén pozitívítása a makrofágokat (CD68-IR sejtek) valamint a neutrofileket azonosította. Colitis ulcerosa nyálkahártyában a CD15-IR sejtek túlnyomó többsége iNOS-IR volt. Crohn betegségben a domináns gyulladásosejttípus a makrofág volt, ugyanakkor a CD68-IR sejtek kisebb hányada mutatott iNOS immunreaktivitást.

Számítógépes képanalízissel végzett mennyiségi vizsgálat szignifikánsan több iNOS-IR sejtet mutatott colitis ulcerosás gyulladt nyálkahártyában (UC_i 64 ± 4 sejt/ mm^2) mint a Crohnos gyulladt területeken (CD_i 4 ± 2 sejt/ mm^2). Szignifikáns különbség jelentkezett a colitis ulcerosás gyulladt és nem gyulladt területek iNOS immunreaktivitása között is (UC_u 19 ± 8 sejt/ mm^2).

A CD15-IR sejtek száma messze meghaladta a CD68 pozitív sejtek számát aktív colitis ulcerosában, az eloszlási arányt tekintve 92% illetve 8%-t találtunk. A CD15-IR sejtek 92.4%-a iNOS pozitív volt ($85 \pm 10\%$ -a a CD15-IR és CD68-IR sejtek összegének) míg CD68-IR sejtek 87.5%-a mutatott iNOS immunreaktivitást is ($7 \pm 5\%$ a teljes festődő sejtszámnak). A colitis ulcerosás nem gyulladt területeken az iNOS pozitív sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt, 9.6% a CD15-IR sejtek között és 11.8% a CD68-IR sejtek között. Az összes CD15 és CD68 festődést mutató sejten belül, csak az iNOS pozitív neutrofilek (CD15-IR sejtek) aránya mutatott szignifikáns különbséget a gyulladt és nem gyulladt területek között (UC_u $8 \pm 3\%$, UC_i $85 \pm 10\%$).

Aktív Crohnos gyulladásose területeken jellemzőbb volt a CD68-IR sejtek jelenléte (90%), szemben CD15-IR sejtekkel (10.0%). A sejtek alacsony hányada mutatott iNOS immunreaktivitást, a CD15-IR sejtek esetében 14.3%, a CD68-IR sejtek között pedig csak 4.4%. A makroszkóposan ép területeken (CD_u) az iNOS immunreaktív sejtek aránya a CD15-IR sejtek között nem változott jelentősen (16.7%), míg a CD68-IR sejtek között magasabb volt, mint a gyulladt területeken (33.8%). A teljes sejtszámmra (CD15-IR és CD68-IR) vonatkoztatva, az iNOS-IR CD68-IR sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb

volt a gyulladt területeken (CD_i $4\pm 3\%$) mint a nem gyulladt részeken (CD_u $23\pm 8\%$).

A metszetek jelentős részén, ahol az iNOS-IR sejtek száma alacsonyabb volt, a gyulladt területeken az epithelium apicalis része erős NADPH-diaforáz és iNOS festődést mutatott mindkét kórképben. A kontroll vizsgálatokon NADPH-diaforáz reaktív vagy iNOS-IR epithelium nem volt kimutatható.

Az IBD betegek kolonoszkópos biopsziás mintáinak homogenizátumából végzett immunblott vizsgálat egy 130 kD molekulatömegű iNOS-IR fehérje sávot mutatott, mely a humán iNOS molekulatömegének megfelel. A sáv intenzitása szignifikánsan nagyobb volt a gyulladt colitises anyagban, mint a nem gyulladt mintákban. A Crohn betegek anyagában nem jelentkezett szignifikáns intenzitásbeli különbség az érintett és ép területek között, valamint a kontroll csoportokhoz viszonyítva. Az immunblott denzitometriás szemikvantitatív vizsgálata bizonyította az iNOS szignifikáns mennyiségi különbségeit a colitis ulcerosás és a Crohnos biopsziák között.

Az eNOS lokalizációja és a vaszkuláris státusz összehasonlítása

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

A kapillárisok és a kis erek eNOS immunreaktivitása kifejezett volt a colitis ulcerosás metszetek lamina propriájában, ezzel szemben eNOS-IR endothelium alig volt detektálható a Crohn betegek mintáiban. Ugyanakkor, a

kripták körüli myoepithelialis sejtek eNOS immunreaktivitása megfigyelhető volt minden vizsgált csoportban.

A colon biopsziás minták vaszkuláris státuszának elemzésére a PECAM-1 (CD31) endothelialis markert használtuk. A CD31 és az eNOS immunreaktivitás közötti minőségi különbségeket megerősítette a számítógépes képanalízis mennyiségi vizsgálat is. A colitis ulcerosus mintákban 17 ± 6 ér/mm², Crohnos mintákban 48 ± 12 ér/mm², míg kontrollban 24 ± 8 ér/mm² volt a CD31 pozitivitás mértéke. Míg a kontroll és a colitis ulcerosus metszeteken az eNOS/CD31-IR kapillárisok aránya 92.0% illetve 82.3% volt, addig a Crohnos anyagban ez az arány szignifikánsan alacsonynak bizonyult (8.3%).

Az eNOS kimutatása Western blott és immunfluoreszcens vizsgálattal HUVEC-n

A HUVEC lizátum Western-blot vizsgálata a humán eNOS-nak megfelelő molekulatömegű 160 kDa IR csíkot mutatott ki. Ötven százalékos normál humán szérummal kezelt HUVEC sejt kultúrában az eNOS mennyisége nem változott szignifikánsan a 48 órás vizsgálati idő alatt. Az 50%-s colitis ulcerosus szérum hatására az eNOS szint 8 óra után kezdett emelkedni és 12 óránál érte el a csúcspontot. A tizenkettedik órában az eNOS szint duplája volt a második órában mért normál szinthez képest. Tizenkét órán túl 50%-s colitis ulcerosus szérummal történt inkubáció során az eNOS szintje csökkent és a kontroll szintjét 48 óránál érte el. Ötven százalékos Crohnos szérummal történt inkubálás során az eNOS nem változott számottevően 8 óráig, majd csökkenni kezdett 12 óra után, 20-24 óra között érte el a legalacsonyabb szintet. Ezt követően lassú növekedett és 48 óránál a kontrollal közel megegyező szintet detektáltunk.

Az eNOS immunfluoreszcens vizsgálata HUVEC-ben az enzimet főleg a citoplazma nukleáris régiójában azonosította, de kimutatható volt a perifériás területeken is. A normál humán szérum nem befolyásolta az eNOS immunreaktivitás intenzitását és eloszlását. Colitis ulcerosus szérummal történt 12 órás kezelést követően az eNOS immunreaktív terület kiszélesedése és az immunfluoreszcens aktivitás élénkítése volt észlelhető. Crohnos szérummal

történt kezelés negyedik órájától az eNOS immunreaktivitás a sejtek központi részére koncentrált és az immunfluoreszcens aktivitás csökkent. Nem találtunk különbséget a normál, a colitis ulcerosás és Crohnos szérum között a HUVEC eNOS immunfluoreszcens aktivitásában 48 óra után.

Az iNOS kimutatása Western blott és immunfluoreszcens vizsgálattal HUVEC-n

A HUVEC lizátum Western blott vizsgálata enyhe iNOS-IR sávot mutatott 130 kDa-nál, amely megfelel a humán iNOS molekulatömegének. 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 4 óra után kezdett emelkedni, a legmagasabb értéket 8 óránál érte el, majd fokozatosan csökkent és 48 óra után a normál értékhez közelített. A HUVEC 50% Crohnos szérummal történt inkubációja során az iNOS szintje 2 óra után kezdett nőni és 8 óránál érte el a maximumát. Fokozatosan csökkent 12 órától és a 24-48 órás időszakban a kontrollal azonos szintet mutatott. Ötven százalékos normál szérummal történt inkubáció mellett a HUVEC enyhe immunfluoreszcens aktivitást mutatott. Az iNOS megjelenése HUVEC-n IBD-s szérum jelenlétében 4-12 órás periódusban volt a legkifejezettebb. Mind a colitis ulcerosás, mind a Crohnos szérum szignifikánsan fokozta az iNOS immunfluoreszcenciát a 4-12 órás periódusban. A kezelést követő négy óra alatt valamint 12 óra utáni mintákban az iNOS nem volt kimutatható a sejtenyészetben.

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 sejtosztódás valamelyik állapotában volt, a sejt kultúra 20-30%-os konfluenciája mellett. A 2-48 órás periódusban nem észleltünk különbséget a Ki-67-IR/toluidin kék festődést mutató sejtmagok arányában 50%-s normál és 50%-s colitis ulcerosás szérummal történt kezelés mellett. Ezzel szemben, 50%-s Crohnos szérum hatására a proliferáló sejtek szignifikáns emelkedését lehetett

észlelni 20 óra után. A HUVEC magok 50-65%-a Ki-67 immunfluoreszcenciát mutatott CD szérummal történt 24-48 órás kezelés alatt. 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.

A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatása a HUVEC viabilitására

Annexin-V-biotin módszerrel a korai apoptotikus sejtek voltak kimutathatók, amelyek membránján azonosítható a fluoreszcens jel, míg a propidium-jodid a sejtmag DNS-hez kapcsolódó, úgynevezett nukleáris fluoreszcens jelet adva a nekrotikus sejteket jelölte. Mindkét festés észlelhető a késői apoptotikus sejteken, egyaránt jelölve a sejtek membránját és magját. A 48 órás vizsgálati idő alatt 50% normál szérummal történt inkubáció során az apoptotikus sejtek aránya alacsony maradt (1-3%). Folyamatos, de nem szignifikáns növekedés volt észlelhető az apoptotikus sejtek számában 50%-s Crohnos szérummal történt inkubáció során. 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 alatt, de a nekrotikus index nem változott szignifikánsan. A falloidin-FITC-el megjelenített aktin filamentumok azonos intenzitással festődtek, jelezve a sejtek szerkezeti stabilitását, függetlenül az inkubáló oldattól vagy az inkubáció idejétől.

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

A gyulladássos bélbetegek szérumának hatását a HUVEC sejt kultúrák szerkezetére és alakjára 20-30% konfluencia szint mellett vizsgáltuk. Az eNOS immunfluoreszcens sejtek részben szigetekben helyezkedtek el, poligonális alakzatot véve fel egymáshoz kapcsolódva. A sejtek többségén megnyúlt, állászerű nyúlványok láthatók. 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 sejt kultúrában megjelenő szerkezeti változások, a szöveti vaszkularizációs jelenségek korai elváltozásaira emlékeztettek

Megállapítások

1. Colitis ulcerosában intenzív iNOS immunreaktivitás észlelhető a hámsejtekben és a nyálkahártya gyulladáshoz kötött sejteiben hisztokémiai, immunhisztokémiai és immunblott vizsgálatokkal. Az eNOS szint az endotheliumban 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 jelentős számban fordultak elő Crohnos vastagbél nyálkahártyában.

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 immunreaktivitást mutató endothel sejtek és a jelentős CD31-IR 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 citoszkeleton megőrzi strukturális integritását.

9. Az IBD-s szérumok olyan citokin és gyulladásos adhézions molekulákat tartalmazó anyagnak tekinthetők melyek az endothelium funkcionális változásait és az antigén státusz megváltozását eredményezhetik. Az iNOS fokozott expressziója IBD-s betegek szérumának hatására a HUVEC adaptív válaszát jelenti. A Crohnos szérum csökkenti az eNOS szintjét az endotheliumban, és fokozza a leukocita adhézions molekulák, pl. az E-szelektin expresszióját, mely befolyásolja a betegség patomechanizmusát, változásokat okozva a gyulladt szövet érrendszerében. A colitis ulcerosás és Crohnos szérum hatásának

vizsgálata HUVEC eNOS expressziójára rávilágít a két betegség különböző patofiziológiájára és az eltérő morfológiára.

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 egybevágóan a vastagbél biopszia immunhisztokémiai eredményeivel, és olyan citokin komplexum jelenlétére utalnak az IBD-s betegek 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.

Függelék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- 1. Palatka K**, Altorjay I, Huszka M, Udvardy M: Nitrogén-monoxid (NO) a gyomor bélcsatorna 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 Archívum*, 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, Pószán 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, Pószán 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. Orvosi Hetilap, 1999, 45: 2525-2527

- 10** Huszka M, Káplár M, Rejtő L, **Palatka K**, Udvardy M: Csökkent intravasculáris endotheleredetű 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 gasztrointesztinális 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, Győrffy 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, Győrffy 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. Altorajay 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, Altorajy 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 leveli n 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., Győrffy 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 role 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, Pószán 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)

Altorjay 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, Várkölygyi 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, Várkölygyi Cs, Klekner A, Dezső B, Tornai I, Altörjay I., Horváth A, Pliegler Gy: Esophageal primitive neuroectodermal tumor, a case history, World Congress of Gastroenterology Montreal 2005. sep.

Egyéb absztraktok:

Palatka K, Altorjay I, Huszka M, Serfőző 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, Altorjay I, Udvardy M: A nyelőcső vérzés ellátása specializált részlegen. Magyar belorvosi Archivum 2000, S2

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

Könyvrészek:

1. A gyulladásos 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

Hajduszoboszló, 2004. április 24.-25.

A gyulladásoos 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

Csaláadorvosi 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