

**A hasüregi gyulladákos megbetegedések és ezek sebészeti szövődményeként  
jelentkező motilitási zavarok, transluminaris gyulladások, peritonealis adhesiok  
megelőzésének lehetőségei**

2002-2005

ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEK:

**1. Toxicus anyagok bejuttatásának és különböző kórállapotok (appendicitis, endotoxaemia, diabetes, cytostaticus kezelés) kiváltotta változások a bélfal beidegzésére**

Előzmények: Munkacsoportunk a kutatási periódus elején patkány, egér, kutya, majd human anyagon elsajátította és biztos szintre emelte az úgynevezett *whole-mount* (azaz teljes vastagságú) preparálási technikát, amellyel jól áttekinthető három-dimenziós képet kaphatunk a bélfalról illetve a bélfal beidegzéséről. E módszer segítségével a bél beidegzését kettős festéssel vizsgáltuk a myentericus és a submucosus plexusban. Nevezetesen a nitricus beidegzést az nNOS kimutatására szolgáló NADPH-diaphorase technika alkalmazásával, míg a cholinerg beidegzést acetilkolinesteráz hisztokémiával mutattuk ki. Computer image analizátorral meghatároztuk a plexusok idegtörzseinek számát, nagyságát, vastagságát, illetve az adott területben elfoglalt lefedettséget.

Appendicitis: A hasüregi gyulladákos megbetegedések egyik leggyakoribb, még ma is sok szövődményt és időnként fatális kimenetelt is okozó kórképe az appendicitis. A betegség kóreredetének tisztázására prospektív módon human műtéti anyagot gyűjtöttünk, feljegyezve a betegség kezdetét, tüneteit, laboratóriumi adatait. Az

eltávolított appendixeket a műtőben Zamboni oldatban rögzítettük. A gyulladás stádiumát két független pathológus hagyományos szövettani vizsgálattal állapította meg. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy az appendicitis a bél motilitásában kritikus szerepet játszó nitrikus beidegzés neuronális hypertrophiájával társul az esetek túlnyomó többségében. Meglepő módon sokszor olyan esetben is találtunk neuronális hypertrophiát, amikor a beteg tünetei egyértelműen appendicitisre utaltak, de a klasszikus szövettani vizsgálat nem mutatott klasszikus gyulladást. Mivel a műtét a beteg panaszait ez esetben is megszüntette ezért joggal feltételezhetjük, hogy valamilyen az appendicitis kialakulásában szerepet játszó krónikus behatás (például a krónikus lumen obstrukció vagy az ismételt gyulladós epizódok) válthat ki neuronális hypertrophiát, ami az appendix funkciójában idéz elő feltételezhető változást. A vakon végződő appendixben specialis beidegzés kell működjön a kellő ürülés biztosítására. A hypertrophiasan módosult beidegzés talán nem képes a féregnyúlvány funkciók biztosítására, és ez szerepelhet az appendicitis aetiológiájaként.

Endotoxemia: Balb/c egereken ismételt intraperitonealis LPS injektóval (10 mg/kg, *Salmonella typhimurium*, Sigma) sepsist váltottunk ki és több szervrendszerben –egyebek közt a bélrendszerben és a központi idegrendszerben - meghatároztuk a vaszkuláris permeabilitást nátrium fluoresceinnel és Evans-kékkel jelölt albuminnal. Az LPS kezelés szignifikánsan fokozta a bélfal permeabilitását mindkét markerre nézve a jejunumban és az ileumban, s az albumin permeabilitás fokozódását pentozán poliszulfáttal történő előkezelés mérsékelte. A vékonybél morfológiai vizsgálatával a nitrierg és cholinerg beidegzés zavara volt észlelhető LPS kezelés után. A két

idegrendszer egymástól független változásai magyarázatot adhatnak a bélgyulladások okozta motilitási zavarok kialakulására.

Diabetes: Alloxán diabeteses kutyák és streptozotocin diabeteses patkányok gyomor- és vékonybélmintáiból *whole-mount* preparátumokat készítettünk és meghatároztuk a Cajal sejtek gyakoriságát és kapcsolatrendszerét, valamint a nitrikus és cholinerg beidegződés változásait. Az alábbi elváltozásokat tapasztaltuk: A Cajal sejtek alkotta hálózat a diabeteses egyedekben szignifikánsan ritkább lett. Ez a változás a diabetes fennállásának hosszától függött jobban mint a diabetes súlyosságától. A nitrikus és cholinerg beidegzésben a myentericus ganglionokban a ganglionsejtek száma a nitrikus irányba tolódott el, amely magyarázhatja a a diabeteses enteropathia eredetét.

Cytostaticus kezelés: Doxorubicin-paclitaxel kombinált citosztaticus kezelés (napi 5,6 mg/tskg intraperitonealis injection mindkét vegyületből) után egy héttel feldolgozott vékonybél-mintákban a nitrikus és cholinerg beidegződés súlyos károsodását észleltük. Mindkét beidegződésben csökkent a festődő ganglionsejtek száma amely a sejtek pusztulására utal.

## **2. Peritonealis adhaesiók sebészi úton történő kiváltása**

Vizsgálataink során reprodukáltuk a Bakkum és mtsai (1994 *Gynecol Obstetr Invest* **37:99-105**) által kifejlesztett szemikvantitatív postoperatív adhesiós modellt patkányokon. Ennek során nőstény Wistar patkányon a parietalis peritoneum felszínén mindkét oldalon mintegy 1,5x1 cm nagyságú kimetszést végeztünk, amit három Vicryl (5-0, Ethicon) öltéssel zártunk és az uterus szarvakat lazán a peritoneum sérüléshez öltöttük, majd az uterus-szarvakat háromszor érfogóval 10 másodpercig leszorítottuk, s az

esetleges vérömlenyt eltávolítottuk. A peritonealis adhaesio mértékét 2 hét múlva értékeltük ki és az összterület százalékával jellemeztük. Ringer-laktáttal kezelt állatokban (n=6 minden csoportban, átlag±standard hiba) az adhesio foka  $72\pm 3$  % volt, míg a műtét után adott szöveti típusú plazminogén activátor (tPA, Yamanouchi, 1 µg/ml) ezt szignifikánsan mérsékelte  $58\pm 6$  %-ra. Ezzel szemben az egyszeri pentozán poliszulfát oldattal (10 µM) történő átmosásnak jelentős védő hatása nem volt ( $66\pm 3$  %) kísérleti rendszerünkben. A peritonealis adhesiókat arteficialis surfactant adásával is sikerült szignifikánsan csökkenteni ( $56\pm 5$  %), azonban az esetek egy részében a kísérleti állatok anaphylaxiás reakcióját észleltük.

### **3. Vizsgálatok a necrotizáló enterocolitis állatkísérletes modelljén**

A hasüregi gyulladásos megbetegedések másik nagy csoportját a necrotizáló típusú bélgyulladások okozzák. Ezek különösen újszülöttkorban okoznak súlyos, életveszélyes szövődeményeket. Munkánk során kialakítottuk és jól reprodukálhatóvá tettük a necrotizáló enterocolitis állatkísérletes modelljét asphyxián átesett újszülött sertéseken. A hypoxemia és a mesenterialis erek vérátfolyásának csökkenése bélfali oedemát és hemorrhágiás bélnecrosist eredményezett. Igazoltuk, hogy a mesenterialis erek endothelsejtjeinek corticalis F-actin citoszeletalis szerkezetének átrendeződése, stressz rostok kialakulása szerepet játszhat a vascularis károsodások kialakulásában. Kimutattuk, hogy az asphyxia-indukálta necrotizáló enterocolitis kialakulásában a nitrogén monoxidnak és a citokineknek pathogenetikai szerepe van. A bél plexusaiban megfigyelt morfológiai elváltozások hozzájárulhattak a bélmotilitási zavarok kialakulásához. A bélnyálkahártya barrier funkciójának romlását a bélfal-vizenyő és a permeabilitási

markerek fokozott extravazációja jellemezte, a sejt-sejt zárókapcsolatok romlása pedig bacterium translocatiót eredményezett. A nyirokereket a whole-mount technikával sikerült láthatóvá tenni és ebben az enterocolitises egyedeknél a baktériumok kimutathatóak voltak. Ezek alapján feltételezzük, hogy a sejt-sejt zárókapcsolaton transzlokálódott kórokozók elsődleges útja a bélfal nyirokútjában vezet.

#### IN VITRO KÍSÉRLETES VIZSGÁLATOK:

##### **1. Epithelialis sejtek egysejtrétegű tenyésztése, toxicitási vizsgálatok**

Sejttenyésztő laboratóriumunkban rutinszerű lehetőség volt bél epithelialis sejtek tenyésztésére. Toxicitási vizsgálataink Caco-2 intestinalis sejtvonal (ATCC) valamint HT29 human colon adenocarcinoma sejtvonal (ATCC) szoros zárókapcsolatokat létrehozó egysejtrétegein történtek MTT assay segítségével. A sejteket 96-lyukú edényekben tenyésztve (37°C; 5% CO<sub>2</sub>; DMEM, 10% FBS, streptomycin, penicillin, L-Glu, piroszólósav) kimutattuk, hogy különböző citosztatikus gyógyszerek (pl. doxorubicin, paclitaxel), a bakteriális endotoxin (*E.coli* O111:B4, 1-1000 ng/ml, Sigma), valamint a tumor nekrosis factor- $\alpha$  (rh TNF- $\alpha$ ; Sigma, 10 ng/ml) dózis-függő módon gátolják a bél epithelialis sejtek proliferációját. Pentozán poliszulfát (Arthroparm Ltd.; 10-30-100  $\mu$ M) hozzáadása mérsékelt, de szignifikáns módon csökkentette a bakteriális LPS kiváltotta sejtpusztulást, míg a citosztatikus szerek és a citokin kiváltotta proliferáció-csökkenést szignifikáns módon nem befolyásolta.

## **2. Permeabilitási vizsgálatok Caco-2 bél epithelialis sejtvonalon**

A monolayer permeabilitási vizsgálatokhoz a Caco-2 sejteket permeábilis filtereken (Transwell, 0,4  $\mu\text{m}$  pórusméret, 1  $\text{cm}^2$  felszín, Costar-Corning) tenyésztettük, s ellenállásmérő műszer (EVOM, WPI) segítségével meghatároztuk a transepithelialis elektromos rezisztenciát (TEER). A kísérletek a tenyésztés 11-16. napja között kezdődtek, amikor az egysejtréteg permeabilitása meghaladta a 400  $\Omega \times \text{cm}^2$  értéket. Ekkor az epithelsejtek tápoldatát basolateralis oldalon bakteriális LPS (1-1000 ng/ml) vagy TNF- $\alpha$  (Sigma, 10 ng/ml) hozzáadásával 48 órán át kezeltük, miközben követtük a TEER változását. Pentozán poliszulfát 100  $\mu\text{M}$ -os dózisa szignifikánsan mérsékelte a rezisztencia mintegy kétharmados csökkenését a vizsgált monolayereken. A kísérlet végén nátrium fluorescein (ms: 376 Da) és Evans késsel jelölt albumin (67 kDa) markerek segítségével permeabilitási vizsgálat is történt, amelynek során a pentozánnak hasonlóan jótékony hatása volt: gátolta az epithelialis permeabilitási koefficiens emelkedését mindkét permeabilitási markerre nézve.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy LPS hozzáadása jelentősen megváltoztatja az F-actin cytoskeletalis fehérje disztribúcióját a tenyésztett Caco-2 epithelialis sejtvonal monolayerében. Emellett a zonula occludens-1 (ZO-1) tight junction marker festődésének kifejezett megváltozása, a szoros zárókapcsolatok hiánya volt észlelhető.