

MTA Doktori Értekezés tézisei

Az ér-endothel működési zavarai, vasculáris agresszív tényezők és a keringés rendellenességei tápcsatornai betegségekben.

Dr. Altorjay István



2013

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségügyi Centrum

Belgyógyászati Intézet

Gasztroenterológiai Tanszék

TARTALOMJEGYZÉK

Preambulum	3
Bevezetés	4
I. Kísérletes vizsgálatok	5
Az érendothel működési zavarai gyulladásos bélbetegségekben	5
A kísérletes, laboratóriumi vizsgálatok célkitűzései	6
Anyag és módszerek	7
Szövettani vizsgálatok	8
Endothel-sejteken végzett vizsgálatok	11
Eredmények	15
II. Klinikai vizsgálatok	21
A haptoglobin polymorphismus klinikai jelentőségének vizsgálata	21
A haptoglobin polymorphismus vizsgálata Crohn betegségben	24
Módszerek	24
Eredmények	25
Haptoglobin polymorphismus vizsgálata májbeteggekben	26
Eredmények	27
A mannóz-kötő lektin klinikai jelentőségének vizsgálata	28
Módszerek	31
Eredmények	32
Tápcsatornai vérzések korszerű ellátása	32
Haematológiai paraméterek változása TIPS beültetés során	34
Országos felmérés a peptikus fekélyvérző betegek ellátásával kapcsolatos tapasztalatokról	35
III. Új megállapítások	37
Az eredmények hasznosíthatósága	41
IV. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	42
V. Scientometriai összegzés	46
Köszönetnyilvánítás	47

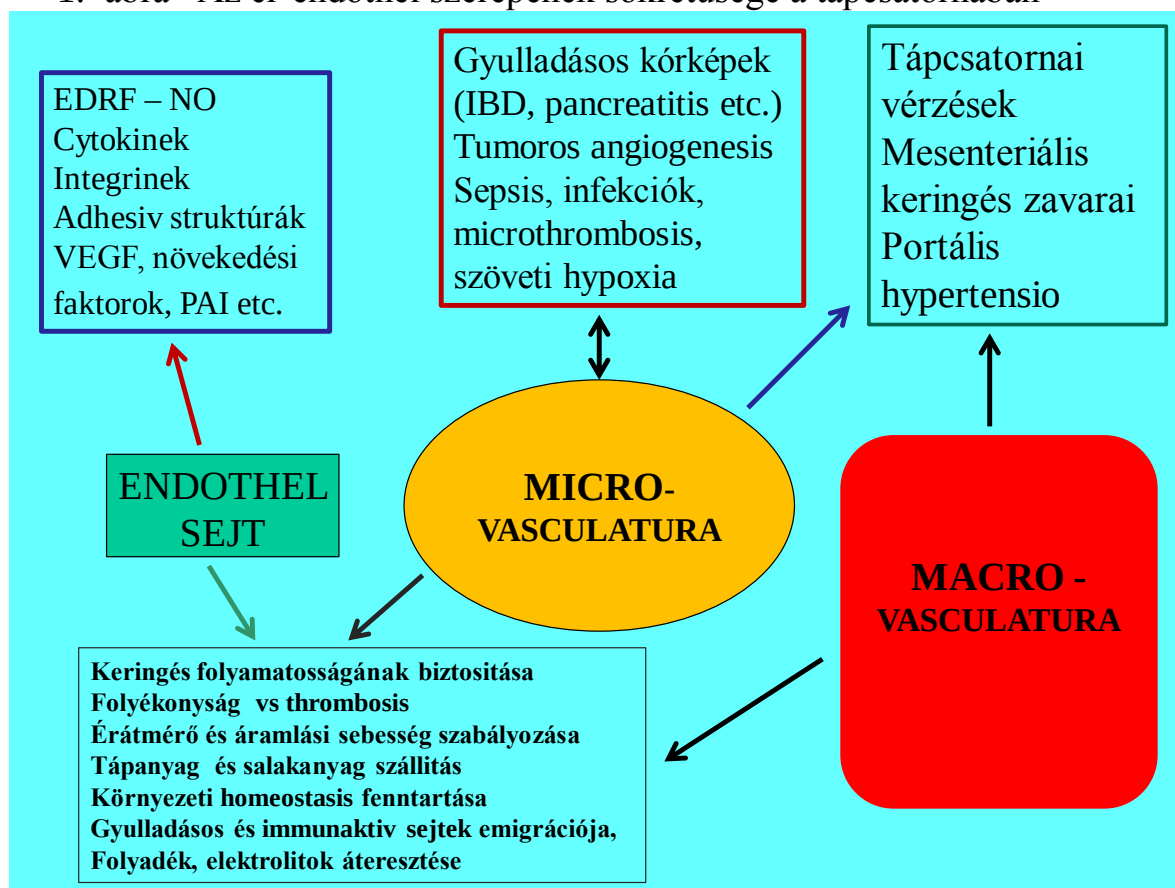
Preambulum

A mikrocirkuláció épsége alapvető fontosságú a tápcsatorna területén, különösen azokban a kórképekben, ahol krónikus gyulladásos folyamatokkal kell megbirkóznunk. Ebben a vonatkozásban a gyulladásos bélbetegségek az egyik legfontosabb entitás, hiszen előfordulási gyakorisága folyamatosan emelkedik, másrészt komplex pathomechanismusa folytán számos olyan területet találhatunk, ahol akad felderíteni való. Klinikánk munkacsoportja 20 éve foglalkozik az ér-endothel kísérletes, laboratóriumi vizsgálatával, korábban HUVEC tenyészetben tanulmányoztuk a vérlemezkék és az endothel interakcióit, majd kiterjedt vizsgálatok folytak a mikrocirkuláció épségét biztosító, egyik legérdekesebb és legfontosabb szabályozó mechanizmus, az EDRF-NO rendszerrel kapcsolatban. Az NO-szintetáznak két alapvető formája fedezhető föl a bélfal szöveteiben is, nevezetesen az endotheliális, konstitutív e-NOS és az indukált, gyulladásos milieuban megjelenő ún. indukálható i-NOS. Az értekezés első része ezeket a vizsgálatokat demonstrálja, amelyek részben 2005-ben, 2006-ban jelentek meg angolul, részben a legfrissebb vizsgálatok eredményei közelmúltban álltak össze egy nagyobb ivű közleménnyé, ami 2011-ben látott napvilágot. A kapillárisok, a mikrocirkuláció épségét számos tényező, például a szabadabbá váló agresszív haemoglobin, szabad gyökök, vagy a fertőzést kísérő bakteriaemia veszélyeztetheti, az endothel épségét védő intraluminális tényezők között olyan kiemelkedő jelentőségűek vannak, mint a haptoglobin, másrészt a bakteriális invázióval szembeni ellenálló képességet befolyásoló mannóz kötő lektin. Ezeket a komponenseket több, igen jelentős létszámú beteganyagon vizsgáltuk – részben Crohn betegségben, részben krónikus májbetegségekben, részben coeliákiában is. Az igen érdekes megállapítások 2007 és 2011 között kerültek közlésre, szintén döntően angol nyelven. A makrocirkuláció egyik legizgalmasabb problémája a gastrointestinalis vérzések kérdésköre. Klinikánkon 1996 óta működik a mára már országosan elfogadott és elismert vérzőbeteg szubintenzív részleg. A disszertáció harmadik részében ennek a 15 éves tevékenységnek számos érdekes tapasztalatát szeretném összefoglalni. Ezidő alatt 2015 alkalommal 1794 beteget kezeltünk (1059 férfi és 735 nő). Ez a követett és feldolgozott beteganyag nemcsak országosan, de nemzetközi mértékkel mérve is imponáló. Az életkorok, a társbetegségek, megelőző gyógyszerek, vérzéstípusok, relapsusok, kezelési módok, transzfúziós igények, mortalitási adatok etc. feldolgozása igen érdekes tanulságokat rejt. Az idevonatkozó közlések részben magyarul jelentek meg, részben angol nyelvű kongresszusi kiadványokban szerepelnek, több izgalmas esetről számoltunk be angol közleményekben, valamint 2012-ben publikált angol nyelvű tanulmányunk, Rácz professzorral (Győr) közösen, egy kiterjedt, országos felmérés tanulságait dolgozza fel.

Bevezetés

Az ér-endothel az emberi szervezet működésének biztosításában és homeostasisának fenntartásában az egyik legfontosabb tényező. A mikrocirkuláció épsége meghatározó jelentőségű minden szervünk működésében, a sejtek táplálásában, a tápanyagok szállításában, a különféle anyagcseretermékek elszállításában, a sejtes és humorális immunvédekezés elősegítésében, a vér folyékonyságának biztosításában, az érsérülések utáni rekonstrukcióban, a szöveti regeneráció, vagy éppen a tumorprogresszió során létrejövő érújdonképződésben etc. A keringés rendszerét mérete alapján célszerű két fontos formára szétosztanunk, így külön beszélhetünk a mikrocirkulációról, valamint a makrocirkulációról. A tápcsatorna vonatkozásában a mikrocirkuláció működése különösen olyan krónikus gyulladásos kórképekben döntő jelentőségű, mint például a Crohn betegség és a colitis ulcerosa. A makrocirkuláció egyik legfontosabb károsodása, sérülése a tápcsatornai vérzések során észlelhető, egy másik jelentős terület a zsigeri keringés zavarainak témaköre, mesenterialis ischaemia, portális thrombosis, vagy a Budd-Chiari syndroma esetén. Mindkét betegségecsoportnak óriási klinikai jelentősége van, amire valamivel később térünk ki.

1. ábra Az ér-endothel szerepének sokrétűsége a tápcsatornában



I. Kísérletes vizsgálatok

Az ér-endothel működési zavarai gyulladásos bélbetegségekben

A gyulladásos bélbetegségek körébe sorolt Crohn betegség és colitis ulcerosa az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb klinikai jelentőségre tettek szert, mert számuk, főleg az un. fejlettebb világrészekben folyamatos emelkedést mutat. Bár a diagnózishoz vezető tünetek a bélhuzammal kapcsolatosak, mindkét kórkép gyakorlatilag a szervezet egészét érintheti. Az elmúlt 3-4 évtized intenzív kutatásai ellenére a pontos etiológia és a teljes pathogenetikai rendszer továbbra sem ismert, mégis az elmúlt 10 évben jelentős előrelépés történt ezen a téren mely alapvetően változtatta meg e kórképekről alkotott elképzeléseinket, alapul szolgált az úgynevezett biológiai kezelés különböző formáinak bevezetésére és előrevetíti a további kutatási utakat és előrelépési lehetőségeket. Új eredmények születtek az intestinális epithel működéséről, permeabilitásáról, a bél baktérium mikróflóra és a nyálkahártya immunrendszerének kölcsönhatásairól, 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 állatmodelleken, „in vitro” sejtkultúrákon végzett vizsgálatok alapvető adatokat szolgáltatottak a bélgyulladás természetére vonatkozóan. A kiterjedt gyulladásos 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 oxid 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 gyulladásos folyamatok keletkezésében és fenntartásában. Hatékony vasodilatátor, gátolja a vérlemezkék aggregációját, neurotransmitter és a gyulladásos reakciók fontos tényezője, mint mediátor és effektor molekula.

A nitrogén oxid szerepe a gyulladásos bélbetegségekben, a bélnyálkahártya szintjén zajló gyulladásban nem tisztázott. Az epithelium, a nyálkahártyát infiltráló gyulladásos sejtek, valamint a bélfal microkeringésének endothelje által termelt NO különböző nitrogén oxid szintetáz izoformák működésének az eredménye, melyek indukciója, aktivitása a gyulladás különböző fázisaiban eltérő, a képződő nitrogén oxid pedig bizonyos körülmények között proinflammatorikus, máskor pedig antiinflammatorikus hatást fejt ki és valószínűleg eltérő módon érvényesül a Crohn betegségben, illetve a colitis ulcerosa-ban.

A nitrogén monoxid szintetáz (NOS) három különböző formája ismert. Az I. típusú NOS, vagy neuronális NOS (nNOS), egy cytoplasmában lévő

szolubilis enzim, mely elsősorban az agyban van jelen, de megtalálható a gerincvelőben, a perifériás idegekben, vázizomzatban, vesében és pancreasban is. Konstitutívan expresszálódik az intracelluláris Ca^{++} minimális emelkedésének hatására az idegsejtekben és idegvégződésekkben. A hatására keletkező NO többek között a tanulási és memória funkciókban, a fájdalom ingerek kialakulásában és a gastrointestinális motilitás befolyásolásában vesz részt.

A II. típusú NOS, vagy indukálható NOS (iNOS), szintén szolubilis enzim és neutrophil granulocytákban, monocytákban, macrophagokban, T-lymphocytákban, endothel, epithelialis valamint egyéb sejttípusokban fordul elő. Transzkripciós szinten szabályozható, bakteriális lipopolysaccharidok és gyulladásos cytokinek indukálják. Nagy mennyiségben keletkezik az intracelluláris pathogének és a tumor sejtek elleni védekezésben. Termelődése független az intracelluláris Ca^{++} átmeneti változásaitól.

A III. típusú NOS vagy endothelialis NOS (eNOS), Ca^{++} - calmodulin függő és a vascularis tónus valamint az endothelium homeostázisának fenntartásában játszik jelentős szerepet. Konstitutívnak tekinthető, kismennyiségben termel NO-t, mely aktiválja a solubilis guanilát-cikláz enzimet és ezzel a másodlagos hírvívő cGMP szintézisét elősegítve, a fiziológias simaizom tónus fenntartását biztosítja.

A kísérletes laboratóriumi munkák célkitűzései

Munkánk során a nitrogén oxid szintetáz izoformák expressziójának minőségi és mennyiségi vizsgálatát kívántuk elvégezni Crohn-os és colitis ulcerosás betegek bélnyálkahártyájából vett mintákban, valamint a bélgyulladás különböző fázisaiban lévő betegek szérumával kiegészített tápfolyadékkal kezelt, tenyésztett human köldökzsínór véna endotheliális sejtekben (HUVEC). A továbbiakban tanulmányozni kívántuk az újabb, ún. biológiai kezeléshez alkalmazott infliximab hatását is részben a tenyésztett sejteken, részben az infliximabbal kezelt betegek szérumainak felhasználásával. Célunk az NO szerepének megvilágítása, a különbségek regisztrálása a gyulladásos bélbetegségek különböző formáiban, és ezeknek a felismeréseknek esetleg gyakorlati, differenciáldiagnosztikai szempontból való értékelése, továbbá az újabb kezelési mód endothel szintű hatásainak kiderítése volt.

Anyagok és módszerek

Betegek kiválasztása, kezelése

A vizsgálatban résztvevő IBD-s betegek tartósan fennálló colitis ulcerosában (CU) vagy Crohn-betegségben szenvedtek, a colonoscopiás 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 gyulladásos 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 colonoscopia előtt 16 órával.

Biopszia mintavétel

A vastagbél biopszia mintákat IBD-s betegekből a gyulladt és makroszkóposan a gyulladás által megkímélt sigma és jobb oldali colon területekről vettük. A kontroll mintákat colorectalis carcinoma szűrésen résztvevő, egészséges egyének colonoscopiás vizsgálatakor vettük. Az utóbbi mintavételből származó biopsziákat csak akkor használtuk vizsgálatainkban, ha a patológiai-szövettani elemzés során a nyálkahártya nem mutatott gyulladásos tüneteket. Mindegyik, a vizsgálatban részt vevő egyén nyilatkozatban fejezte ki hozzájárulását a kísérletekben való részvételhez.

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 glicerín-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. 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 glicerín-PBS 1:1 tartalmú oldattal fedtük le. 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 ér-endothel 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 foszfátazzal (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 metil-zölddel 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 paramétereket úgy állítottuk be, hogy a szövetsérülések ne befolyásolják a tényleges eredményt.

iNOS immunblott

Öt-hat darab endoscoposan 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% glicerol) és 20 μl β-merkaptoetanol 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 elektroforetikus 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% Tween 20-at (PBS-Tween) tartalmazó 0.1 M PBS-ben (pH 7.6), majd 1 órán át blokkoltuk 5% zsírszegény turista tejport 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 tejport 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 torna-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 térfogató elemzésre, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A denzitometriás analízishez kontrollként BSA-t vagy miozin-foszfátáz regulátor alegység különböző koncentrációi alapján készült kalibrációs görbét használtunk.

Endothel-sejteken végzett 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 kanülok 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 Greiner 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 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 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 denzitometrálas alapján és ezen kontrollhoz képest az eltérést százalékban fejeztük ki.

Immunfluoreszcencia vizsgálatok

A sejteket sterilre szűrt 10%-os zselatinnal bevont fedőlemezekre 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 vizsgálatakor 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/nekrotikus 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 CaCl_2 -ot és 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ avidin-fluoreszcein-nel inkubáltuk szintén 15 percig. Mosás után a fedőlemezen lévő sejteket tárgylemezre csöppentett PBS-glicerín 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 sejtváz alakjának és épségének vizsgálatát az aktin rostok 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 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.

Sejtenyészetek fenottípusos vizsgálata

Az *in vitro* tenyésztett HUVEC sejteket 0.025% trypsin/1 mM EDTA (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) segítségével felvettük majd kétszer mostuk FACS pufferben (0.9% NaCl, 5 mM EDTA és 5% BSA) 3×10^5 sejtet szuszpendáltunk 40 μ l FACS pufferben és jégen 30 percig inkubáltuk őket a fluorokrómmal jelzett ellenanyagokkal. A jelölést követően a sejteket kétszer mostuk FACS pufferben, majd a méréshez 400 μ l FACS pufferbe szuszpendáltuk őket. A fenotipizáláshoz az alábbi ellenanyagokat használtuk: anti-CD29-FITC, anti-CD31-FITC/PECAM-1, anti-CD105, anti-CD144/VE-Cadherin, anti-VEGFR2/KDR-FITC (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-CD45, anti-CD90, anti-CD106 (BD Biosciences, San Jose, CA), CD133-APC (Miltenyi Biotech, University Park, PA) és a megfelelő fluorokrómmal jelölt izotípus kontrollokat. A méréseket FACSCalibur áramlási citométerrel végeztük (BD Biosciences, San Jose, CA). Az eredményeket CellQuest Pro v5.2 (BD Biosciences) segítségével értékeltük ki. Minden mintában 200.000 sejtet mértünk és csak azokat az eredményeket tekintettük elfogadhatónak, ahol a mért eseményszám meghaladta a 100- at.

RNS izolálás

AZ RNS izolálása előtt a HUVEC sejtenyészeteket kétszer mostuk PBS-sel, majd TRISOL reagensben vettük fel őket, az RNS izolálása a gyártó által megadott protokoll szerint történt (Invitrogen/Gibco, London, UK) Az izolált RNS mennyiségét és minőségét spektrofotométer segítségével ellenőriztük (Nanodrop, ND1000; Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE).

eNOS génexpresszió mérése RT-Q PCR segítségével

100 ng RNS-t írtunk át High Capacity cDNA archive Kit segítségével, a reakció 1 órán át 42 °C-on, majd 5 perig 72 °C-on zajlott (Applied Biosystems, Foster City, CA). A RT Q-PCR reakciót ABI SDS 5700 műszeren végeztük el (Applied Biosystems, Foster City, CA) Mintánként 25 μ l reakcióelegyet használtunk az alábbi reakcióban: 40 ciklusszámon keresztül 94°C, 12 másodpercig, majd 60 °C-n 1 percig. Minden PCR reakció triplikátumokban került elvégzésre, a kontroll reakcióban nem használtunk reverz transzkriptázt. Az eredmények kiértékeléséhez a ΔC_t módszert alkalmaztuk, az eNOS mRNS expressziós

szintjét a *h36B4 háztartási génhez normalizáltuk*. Minden mérést a SDS 2.1 szoftver segítségével értékeltünk ki (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A mérésekhez az eNOS/nos3 ABI-TaqMan Gene Expression assay-t használtuk (Hs00167166_m1. Applied Biosystems, Foster City, CA)

Cytokinek mérése

A betegek szérumában lévő TNF- α szintet OptEIA Human TNF Set (BD Pharmingen, BD Biosciences, San Jose, CA) segítségével határoztuk meg. A szekretált angiogenezisben szerepet játszó cytokineket CBA Cytokine Flex bead –ekkel mértük meg a sejtenyészetek felülszójából, a gyártó által ajánlott protokollnak megfelelően. (BD Biosciences, San Jose, California) A módszer detektálási határai az alábbiak voltak: 2.0 pg/ml a TNF- α , 4.5 pg/ml a VEGF, 4.6 pg/ml az angiogenin és 3.4 pg/ml a bFGF esetében.

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 a $p < 0.01$.

Eredmények

Aktív colitis ulcerosa gyulladt területein jelentős mennyiségű, hisztokémiaailag NADPH-diaforáz reakciót adó sejtet észleltünk. A NADPH-diaforáz pozitív sejtek főként a Lieberkühn kripták mélyén és falai 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. A colitis ulcerosás mintákkal ellentétben Crohnos mintákban szembetűnően kevesebb volt a NADPH-diaforáz pozitív és az iNOS immunreaktív sejtek előfordulása.

Kettős jelölésű immunhisztokémiai vizsgálatok során gyulladt IBD nyálkahártya iNOS-IR gyulladásos sejtjeinek CD68 és CD15 felszíni membrán antigén pozitivitása a macrophagokat (CD68-IR sejtek) valamint a neutrophil granulocytákat azonosította. Colitis ulcerosa nyálkahártyában a CD15-IR sejtek túlnyomó többsége iNOS-IR volt. Crohn betegségben a domináns gyulladásos sejt típus a macrophag 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 Crohn-os gyulladt területeken (CD_i 4 ± 2 sejt/ mm^2). Szignifikáns különbséget találtunk 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 neutrophilek (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 Crohn-os gyulladásos 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 sejtszámra (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 részekben (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 colonoscopos 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 Crohn-os biopsziák között.

Szintén jelentősen különbözött az érstruktúrák NADPH-diaforáz festődése is a colitis ulcerosás és Crohn-os mintákban. Colitis ulcerosában általában tág érképleteket 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.

Colitis ulcerosás metszetek lamina propriájában a kapillárisok és a kis erek eNOS immunreaktivitása kifejezett volt, ezzel szemben a Crohn betegek mintáiban eNOS-IR endothelium alig volt detektálható. Ugyanakkor, a kripták körüli myoepithelialis sejtek eNOS immunreaktivitása minden vizsgált csoportban megfigyelhető volt.

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

A HUVEC lizátum Western-blott vizsgálata a humán eNOS-nak megfelelő molekulatömegű 160 kDa IR csíkot mutatott ki. Ötven százalék normál humán szérumot tartalmazó médiummal kezelt HUVEC sejtkultúrában az eNOS mennyisége nem változott szignifikánsan a 48 órás vizsgálati idő alatt. Az 50% colitis ulcerosás szérumot tartalmazó sejtenyészto folyadékban az

eNOS szint 8 óra után kezdett emelkedni és 12 óránál érte el a csúcserőértéket. A tizenkettedik órában az eNOS szint duplája volt a második órában mért normál szinthez képest. Tizenkét órán túl 50% colitis ulcerosás szérumot tartalmazó médiumban történt inkubáció során az eNOS szintje csökkent és a kontroll szintjét 48 óránál érte el. Ötven százaléknál Crohn-os szérumot tartalmazó sejttenyésztő folyadékban történt inkubálás során az eNOS nem változott számottevően 8 óráig, majd csökkenni kezdett 12 óra után, 20-24 óra között érve el a legalacsonyabb szintet. Ezt követően lassan növekedni kezdett és 48 óránál a kontrollal közel megegyező szintet detektáltunk.

Az eNOS immunfluoreszcens vizsgálata HUVEC-ben az enzimet főleg a cytoplasma nukleáris régiójában azonosította, de kimutatható volt a perifériás területeken is. A normál humán szérum nem befolyásolta az eNOS immunreaktivitás intenzitását és eloszlását. Colitis ulcerosás szérummal történt 12 órás kezelést követően az eNOS immunreaktív terület kiszélesedése és az immunfluoreszcens aktivitás élénkítése volt észlelhető. Crohn-os 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 Crohn-os szérum között a HUVEC eNOS immunfluoreszcens aktivitásában 48 óra után.

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%-nyi normál humán szérumot tartalmazó médiumban 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% Crohn-os szérumot tartalmazó médiummal 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 Crohn-os szérum szignifikánsan fokozta az iNOS immunfluoreszcenciát a 4-12 órás periódusban. A kezelést követő első négy óra alatt, valamint a 12 óra utáni mintákban az iNOS nem volt kimutatható a sejttenyészetben.

A vizsgálatok kezdetén a Ki-67 immunfestés szerint a HUVEC 10-50 %-a a sejtosztódás valamelyik állapotában volt, a sejtkultúra 20-30%-os konfluenciája mellett. A 2-48 órás periódusban nem észleltünk különbséget a Ki-67-IR/toluidin kék festődést mutató sejtmagok arányában 50%-nyi normál és 50%-nyi colitis ulcerosás szérumot tartalmazó médiumban történt kezelés mellett. Ezzel szemben, 50%-s Crohn-os 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 tenyészetéhez történő hozzáadásával; a proliferációs aktivitás szignifikánsan emelkedett 24 órától kezdve.

Annexin-V-biotin módszerrel mutattuk ki a korai apoptotikus sejteket, amelyek membránján azonosítható a fluoreszcens jel, míg a propidium-jodid a sejtmag DNS-éhez kapcsolódó, úgynevezett nukleáris fluoreszcens jelet adva mutatta a nekrotikus sejteket. 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 Crohn-os szérummal történt inkubáció során. Colitis ulcerosás szérum mellett az apoptotikus index nem mutatott jelentős különbséget a kontrollhoz viszonyítva. Mind a normál, mind a Crohn-os szérummal kezelt HUVEC tenyészetben enyhén emelkedett a nekrotikus sejtek száma, 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 gyulladásos bélbetegek szérumának hatását a HUVEC sejtkultúrák 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 Crohn-os szérum mellett 20 órás inkubációs idő után a sejtek kétdimenziós retikuláris hálózatot alkottak. A sejtkultúrában megjelenő szerkezeti változások, a szöveti vascularizációs jelenségek korai elváltozásaira emlékeztettek.

Infliximab-al kezelt aktív Crohn betegek szérumával inkubált HUVEC tenyészetben az eNOS protein expresszió 100%-ig korrigálható volt a korábbi, aktív Crohn betegből származó szérum okozta, 40-70%-os szignifikáns csökkenéshez képest. Az infliximab (15 ng/mL) hozzáadása hasonló eNOS protein expresszió növekedést mutatott HUVEC tenyészetben *in vitro* 24 órás aktív Crohn szérummal történt előkezelés után. Az eNOS szintje két óra alatt normalizálódott és 48 órán át stabil maradt.

Normál szérummal történt inkubálást követően az infliximab kezelés (15ng/ml) már nem okozott szignifikáns eNOS változást.

Érdekesekek és perspektivikusnak tarthatók azok a vizsgálataink, amelyekben az infliximab kezelés hatását az eNOS expresszióra a HUVEC tenyészetben egyéni beteg szérumokkal vizsgáltuk, amit 5 mg/KG infliximab infúziós kezelésre adott jó klinikai válasz (2 hét után) mellett gyűjtöttünk. Az ilyen szérumot tartalmazó mediumban történő inkubáció esetén az eNOS szint normalizálódását lehetett regisztrálni 24 óra után. Ugyanakkor infliximab kezelésre refrakter betegből nyert szérum nem módosította az eNOS szintet!

Az eNOS mRNA RT Q-PCR-al meghatározott expressziója HUVEC-n 50%-nyi egészséges kontroll szérum mellett a 48 órás inkubáció alatt alacsony maradt. 50%-nyi Crohn-os szérum nem befolyásolta az eNOS mRNA szintet 12 órán át, ezt követően azonban jelentős eNOS mRNA szint növekedés jelentkezett, 48 óránál érve el a csúcst, 11-szeres emelkedéssel a kontrollhoz képest. Infliximabbal előkezelt Crohn-os szérumot tartalmazó sejtenyésztő médium kettős csúcsú eNOS mRNA upregulatio-t eredményezett 2 és 24 óránál, ahol a mRNA expresszió szintje a kontroll szintjét igen jelentősen, 12x illetve 6-szorosan haladta meg. Crohn-os szérummal történő 24 órás inkubáció és ezt követően 15 ng/ml infliximab hozzáadása után az eNOS mRNA szint hasonló volt, mint Crohn-os szérummal történő kezelés során. Az infliximab hozzáadása tehát önmagában nem befolyásolta az eNOS mRNA expressziót.

A VEGFR2 megjelenése ismert módon függ az eNOS szintézistől. HUVEC tenyészetben történő expresszióját Western-blott technikával vizsgáltuk. Kontroll közegben tartott HUVEC tenyészetben a VEGFR2 egyáltalán nem expresszáldott. 50%-nyi Crohn-os szérummal történő kezelés után azonban azonnal megemelkedett a VEGFR2 expresszió, a legmagasabb szint 6 és 24 óránál volt észlelhető. Infliximab-al kezelt Crohn beteg széruma mellett a VEGFR2 szint szignifikánsan alacsonyabb maradt, mint a nem kezelt esetekben. Crohn szérummal történt 24 órás előkezelés után 15 ng/ml infliximab hozzáadása a rendszerhez a VEGFR2 expressziót minimális mértékben

csökkentette. A TNF- α (20 ng/ml) hozzáadása gyors VEGFR2 emelkedést váltott ki, mely megmaradt a 48 órás vizsgálati periodusban. Ha ehhez a rendszerhez infliximab-ot adtunk, 12 órás inkubációt követően az alacsony VEGFR2 szint visszaállt.

A vastagbél nyálkahártya microvasculáris rendszerének eNOS deficienciája Crohn betegeknél valószínűleg hozzájárul a proliferáció indukálta neovascularizációhoz. Az 50%-nyi egészséges szérumot tartalmazó médiummal inkubált HUVEC tenyészet felülúszója alig tartalmaz angiogén citokint, 24 órás inkubációt követően csupán az angiogén volt detektálható 3.56 ± 0.04 ng/ml koncentrációban. Aktív Crohn beteg szérumával történő kezelés után az angiogén koncentráció csökkent (2.9 ± 0.035 ng/ml), egyidejűleg a VEGF és bFGF nőtt (204.5 ± 12.9 és 166.7 ± 13.9 pg/ml). Infliximabbal kezelt beteg szérumának hatására az angiogén és a bFGF koncentráció a kontroll szintjén maradt (angiogén 3.3 ± 0.1 ng/ml; bFGF a kimutatási szint alatt), míg a VEGF koncentráció (80.1 ± 23.8 pg/ml) szignifikánsan csökkent a kezelés előtti szinthez képest.

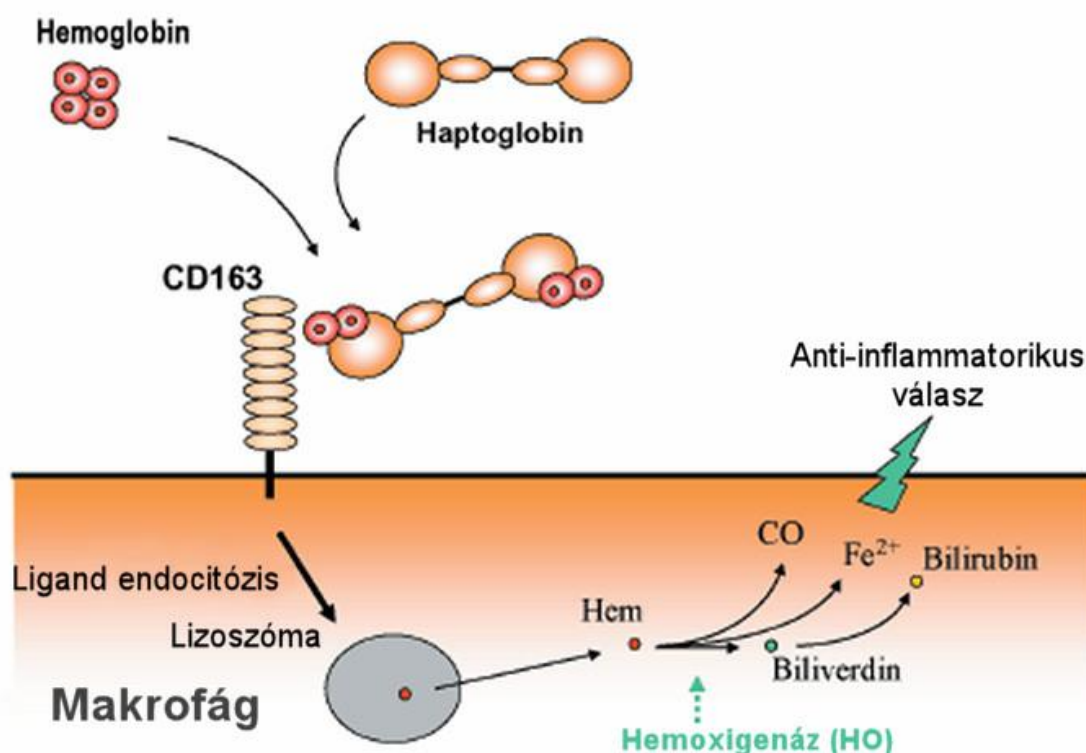
II. KLINIKAI VIZSGÁLATOK

A haptoglobin polymorphismus klinikai jelentőségének vizsgálata

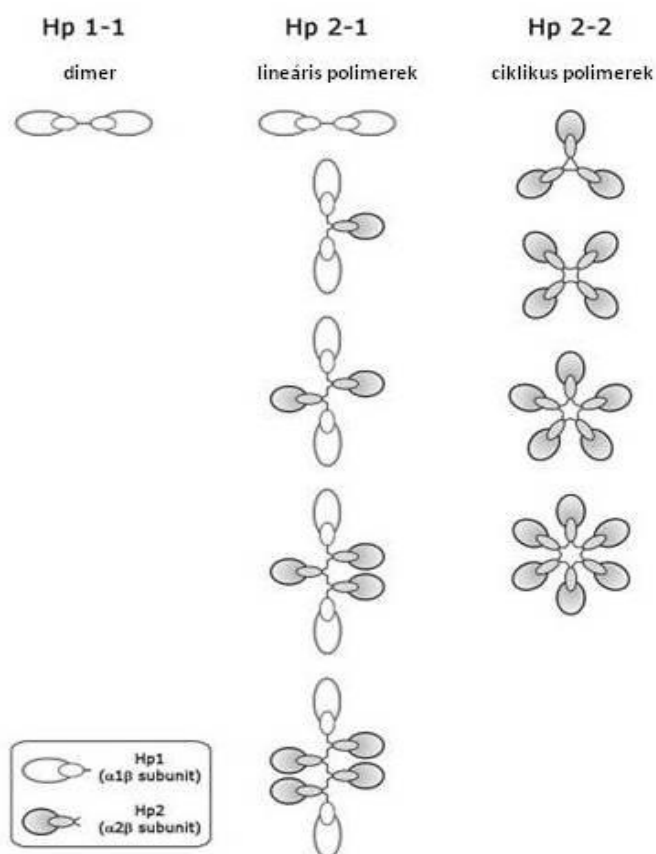
A haptoglobin (Hp) molekula jelentős antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező akut fázis fehérje, melynek fő feladata, hogy intravascularisan a vörösvértestekből kikerülő, a sejtek számára toxikus szabad hemoglobint (Hb) megkösse, és azt a keringésből eltávolítsa. A Hp ugyanakkor az extravascularis szövetekben és testfolyadékokban is aktív: direkt angiogenetikus, anti-inflammatorikus és immunmoduláns hatású. Átjut az érfalon és bizonyos hatásokra különböző szövetekben is expresszálódik. A Hp a neutrophil granulocytákban is megtalálható, a gyulladás helyén lokálisan felszabadulva képes a szövetkárosodás csökkentésére. A Hp receptorai a monocytamakrophag rendszer sejtjein expresszálódó CD163 és a CD11b (CR3), mely a granulocytákon, természetes ölüsejteken és a lymphocyták egy kis csoportjának felszínén található. A Hp a CD4⁺ és CD8⁺ T lymphocyták többségéhez is kötődik, közvetlenül képes gátolni azok proliferációját és módosítja a Th1/Th2 egyensúlyt. Az intravascularis haemolysis során a vörösvérsejtek destrukciójának következtében szabaddá váló haemoglobin (Hb) és haem ér-

endothel károsító hatása jól ismert. A vascularis homeosztázis fenntartásában kulcsfontosságú nitrogén-oxid (NO) mennyisége az oxihemoglobinnal történő, prompt és irreverzibilis reakcióba lépése miatt jelentősen lecsökken (NO scavenging), melyet a fokozott NO szintetáz (NOS) aktivitás sem tud ellensúlyozni, ugyanis a vörösvértestekből kiszabaduló argináz az enzim szubsztrátját, az L-arginint, ornitinné alakítja. Az NO hiánya a guanilát cikláz csökkent működését és így a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) mennyiségének csökkenését eredményezi. A cGMP hiánya a simaizom tónus szabályozásának zavarához, lokális vasoconstrictióhoz, thrombocytá aktivációhoz, valamint aggregációhoz vezet. A szabadabbá váló haem a protoporfirin gyűrűbe zárt ferro vas(II) miatt is veszélyt jelent: a Fenton-reakció során keletkező hydroxil gyökök direkt módon károsíthatják az érfalat, valamint jelentős szerepet játszanak a low-density lipoprotein (LDL) oxidációban is. Az extravascularisan szabadabbá váló Hb, pl. szöveti gyulladás vagy érsérülés során, hasonló módon oxidatív stresszt, NO hiányt eredményez, mely macrophag aktivációhoz és következményes proinflammatorikus cytokin felszabaduláshoz vezet.

1. ábra A haemoglobin haptoglobinhoz való kötődése és a komplexnek a macrophagok CD163 scavenger receptorán keresztül történő metabolizmusa (Moestrup SK, Moller HJ. Ann Med 2004,36,347-354 nyomán).



A Hp molekula polymorphismusát az α -láncot kódoló gén két kodomináns allélja – Hp1 és Hp2 – határozza meg, mely a 16q22 kromoszómán helyezkedik el. A Hp polymorphismus következtében létrejövő három, eltérő szerkezetű és tulajdonságú Hp molekula (Hp1-1, 2-1, 2-2) számos gyulladásos és autoimmun kórkép lefolyását módosíthatják.



2. ábra A haptoglobin polimerek kialakulása a genotípus függvényében

A Hp fenotípusok szérumból gél elektroforézissel biztonsággal meghatározhatóak, és egyértelműen azonosítják az egyén genotípusát is. *Koch és mtsai* DNS mintákból PCR vizsgálat segítségével meghatározott genotípusokat összevetve a szérummintákból gél elektroforézissel történt fenotípus analízis eredményekkel teljes egyezést találtak.

Nagyszámú *in vitro* és *in vivo* adat támasztja alá, hogy a Hp molekula 3 fő fenotípusa között nemcsak szerkezeti, hanem jelentős funkcionális különbségek is kimutathatóak: különböző mértékű antioxidáns, scavenger és immunmoduláns

tulajdonsággal rendelkeznek, és ezek kapcsolatot mutatnak egyes gyulladásos betegségek – fertőzések, atherosclerosis, autoimmun betegségek – lefolyásával.

A haptoglobin polymorphismus vizsgálata Crohn betegeken

Célunk volt, hogy a haptoglobin polimorfizmusát nagy betegszámú IBD-s populáción és májbetegeken tanulmányozzuk.

A Crohn-betegség növekvő incidenciájával párhuzamosan a betegség klinikai megjelenésében, lefolyásában, valamint az extraintestinalis tünetek kialakulásában kifejezett heterogenitás észlelhető, melyet elsősorban a változatos genetikai háttér magyarázhat. Az irodalomban a Hp polymorphismus szerepét a betegségre való fogékonyság és a klinikai fenotípus kialakításában vizsgáló, nagy esetszámú tanulmány nem ismert. Választ kerestünk ezért arra a kérdésre, hogy a Hp polimorfizmusok kapcsolatba hozhatók-e a Crohn-betegség kialakulásával, annak extraintestinalis manifesztációival, a betegség klinikai megjelenési formájával és a kezelésre adott válasszal.

Módszerek

Haptoglobin fenotípus/genotípus analízis

A Hp fenotípusok szérumból gél elektroforézissel biztonsággal meghatározhatóak, és egyértelműen azonosítják az egyén genotípusát is. A különböző betegcsoportok és kontroll egyének esetén a Hp fenotípus meghatározás szérum mintákból – a Yang és mtsai (178) által korábban ismertetett módszert laboratóriumunkban módosítva (179)– történt röviden az alábbiak szerint: nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid 5-10%-os lineáris gradiens gél elektroforézist (SDS-PAGE) követően Millipore polivinilidén-difluorid (PVDF) immobilion-P transfer membrán (Millipore, Bedford, MA), Hp ellenes antitestet (Polyclonal Rabbit Anti-Human Haptoglobin [Dako, Glostrup, Denmark]; 1:1000) és második antitest (Goat Anti-Rabbit-HRP, Dako; 1:2000) tartalmazó oldatok felhasználásával immunoblottot végeztünk. A genotípusokat minden vizsgálat során 1-1 és 2-2 típusú gyári Hp standardok (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) felhasználásával állapítottuk meg.

Betegek:

Összesen 511 egymással rokonságban nem álló IBD beteget (Crohn-betegség: 468, életkor: $36,5 \pm 12,7$, férfi/női arány: 233/235, betegségstartam: $8,2 \pm 6,7$ év és colitis ulcerosa: 43, életkor: $38,7 \pm 15,7$ év, ffi/nő: 22/21, betegségstartam: $9,6 \pm 10,6$ év) vizsgáltunk.

Statisztikai analízis

A Hp polymorphismus vizsgálatok esetén a normalitás vizsgálatot Shapiro Wilk's W teszt segítségével végeztük. A különböző beteg és kontroll csoportok, valamint az adott betegség esetén az alcsoportok adatainak összehasonlítására T-próbát különböző varianciájú csoportokra Fischer-exact-tesztet, illetőleg χ^2 -próbát alkalmaztunk helyenként Yates-korrekciónal.

A folyamatos változókat eloszlástól függően átlagértékkel jellemeztük, megadva a standard deviációt (SD), vagy kvartilisekre bontva azok mediánját adtuk meg (IQR). A folyamatos változókat Mann-Whitney U teszt vagy Student T teszt segítségével vetettük össze. Kaplan-Meier túlélési görbén ábrázoltuk és a különbségeket LogRank és Breslow analíziseket alkalmazva hasonlítottuk össze. Logisztikus regressziós és lépcsőzetes Cox-regressziós analíziseket alkalmazva vizsgáltuk meg az esetleges összefüggéseket a klinikai és laboratóriumi értékek valamint a klinikailag szignifikáns bakteriális infekciók kialakulásának kockázata illetőleg az első infekcióig eltelt időhossz között. Esélyhányadost (odds ratiót [OR]) határoztunk meg 95% konfidencia intervallummal (95% CI). A $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. Az adatokat SPSS13.0 programmal (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) értékeltük.

Eredmények:

Crohn-betegségben a Hp1 allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő a kontroll egyénekhez képest ($0,395$ vs. $0,345$; OR: 1,24, 95% CI: 1,02-1,51, $p=0,03$), a Hp fenotípus megoszlás azonban nem különbözött a vizsgált IBD csoportokban a kontroll populációtól. A Crohn-beteg csoportban egyetlen ahaptoglobinaemias (Hp 0-0) esetet észleltünk.

A Hp polymorphismus nem mutatott összefüggést Crohn-betegségben sem a betegség kezdete kori életkorral, sem a betegség fennállásának időtartamával, sem pedig a családi IBD gyakorisággal. Nem volt hatással a betegség lokalizációjára. A Hp fenotípusok és a perianalis manifesztáció között sem volt összefüggés kimutatható.

A betegség viselkedése azonban kapcsolatban állt a Hp polymorphismussal: a 2-1 fenotípus esetén a gyulladásos forma (B1) előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt (44,9%) a másik két Hp fenotípushoz viszonyítva (1-1: 36,6%, 2-2: 34,3%) ($OR_{B1Hp2-1 \text{ vs. egyéb}}: 2.06, 95\%CI: 1.29-3.28$), míg a strikturáló forma (B2) előfordulása ritkább (2-1: 20,3%, 1-1: 32,4%, 2-2: 32,5%; $p=0.04$). A penetráló (B3) forma előfordulása mindhárom fenotípus esetén azonos volt (1-1: 29,6%, 2-1: 34,8% 2-2: 32,5%). A relapszusok gyakorisága nem különbözött a fenotípusok alapján.

Az extraintestinalis manifesztációk közül PSC vonatkozásában jelentős különbséget találtunk a különféle Hp fenotípusok esetén. A 18 PSC-s betegből egyetlen esetben sem fordult elő 1-1 Hp fenotípus. Ezen megfigyelésünket egy nagyobb számú PSC betegcsoportban is meg tudtuk erősíteni ($n=63$) (Hp1-1: 0%, Hp2-1: 52,4%, Hp2-2: 47,6%, $OR_{Hp1-1 \text{ vs. egyéb}}: 0,06, 95\%CI: 0,003-0,99, p=0,0012$).

Crohn-betegségben a Hp polymorphismus nem mutatott kapcsolatot, a steroid- és az azathioprin-kezelés sajátosságaival illetőleg a sebészeti beavatkozásokkal.

Haptoglobin polymorphismus vizsgálata májbetegekben, különös tekintettel az infekciókra

A bakteriális infekciók a mortalitás és a morbiditás jelentős tényezői májcirrhosisos betegekben, köszönhetően az immunkomprimált állapotuknak. Májzsugorban jól ismertek az innate (veleszületett) immunitás zavarát okozó változások, de bizonyos adatok alapján az adaptív immunitás zavarai is valószínűsíthetők. A haptoglobinnak (Hp) és a mannóz kötő lektinnek (MBL) a lokális immunválaszt befolyásoló hatása alapján szerepe lehet a májcirrhosisos betegek infekcióinak kialakulásában.

Betegek kiválasztása

2006. május-2008. április között a DEOEC II. Belklinika Gasztroenterológiai tanszékén gondozott 336 különböző etiológiájú májcirrhotikus betegből (férfi/nő: 188/148, a májzsugor fennállásának ideje $3,9\pm 4,2$, kor: 56.5 ± 10.8 év) történt mintavétel. Betegeink között 220 esetben (65,5%) az alkoholfogyasztás volt az etiológiai faktor, 96 betegünknek (28,6%) C-vírus hepatitis talaján alakult ki a májzsugor, 20-nak (5,9%) egyéb eredetű májbetegsége volt. A májzsugor diagnózisát a klinikai, a biokémiai és az ultrahangos leletek, illetve ahol elérhető volt, a májbiopszia eredménye alapján állítottuk fel. Beválasztás során kizárási kritériumnak tekintettük, ha a betegnek a megelőző 6 hétben gasztrointesztinális vérzése, vagy bakteriális infekciója volt, vagy profilaktikus antibiotikum terápiában részesült a megelőző 6 hónap alatt.

Társbetegségként figyelembe vettük a megelőző szívinfarktust, pangásos szívelégtelenséget, perifériás artériás érbetegséget, cerebrovasculáris betegséget, krónikus tüdőbetegséget, krónikus veseelégtelenséget, fekélybetegséget, diabetes mellitust és nem metasztatizáló, valamint metasztatizáló malignus daganatokat, ideértve a hepatocelluláris carcinoma-t. A májcirrhotis súlyosságát a Child-Pugh klasszifikáció, és a model for end-stage liver disease (MELD) score alapján kalkuláltuk. A bevont betegeket 2009. április 1-ig vagy a halálukig követtük, illetve néhány beteget, akik a későbbiekben nem jelentkeztek az utolsó megjelenésükig. Az átlagos követési idő 420 nap volt (IQR: 88-742). Ez alatt jegyeztük a klinikailag szignifikáns bakteriális infekciók előfordulását.

Eredmények

Nem találtunk különbséget a kórokozókat és az infekciók lokalizációit tekintve az egyes Hp fenotípusok között. Nem volt különbség az egyes fenotípusok között sem a nemek megoszlását, sem a cirrhosis súlyosságát, sem a társbetegségek előfordulását tekintve, a csoportokon belül az átlagéletkor is hasonlóan bizonyult. Univariációs analízist (χ^2 -teszt vagy χ^2 -teszt Yates szerinti korrekcióval) alkalmazva a klinikai tényezők közül a májzsugor Child-Pugh stádium alapján jellemzett súlyossága ($p=0,035$), az ascites jelenléte (OR: 2,45; 95% CI: 1,52-4,00; $p<0,001$) és a társbetegségek (OR: 2,70; 95%CI: 1,70-

4,30; $p < 0,001$) bizonyultak a klinikailag szignifikáns bakteriális fertőzések rizikó faktorainak.

A Hp fenotípus szoros összefüggést mutatott a bakteriális infekciók megjelenésének gyakoriságával. Univariációs analízis alapján (χ^2 -teszt Yates szerinti korrekcióval) az Hp1-1-s fenotípusú betegekben szignifikánsan gyakrabban fordultak elő fertőzések, mint egyéb fenotípusok esetén ($OR_{Hp1-1 \text{ vs. egyéb}}: 2,16, 95\% \text{ CI: } 1,07-4,33$). Ráadásul Hp1-1-s fenotípus esetén az infekciók egyértelműen súlyosabb formában zajlottak ($p=0,03$).

A vizsgált 336 cirrhotikus betegben összesen 248 infekciós epizódot észleltünk a hospitalizációk során. A betegeknek 33,6%-ban fordult elő valamilyen fertőzés a követési idő alatt, és ezen betegek 54,9%-ában több mint egy fertőzőes epizód zajlott. Az infekciók 32,5%-a húgyúti fertőzés volt, 20,4%-ban SBP, 15,5%-ban pneumonia, 8,7%-ban bőr vagy lágyrész infekciók, 3,4%-ban bakteremia, 2,4%-ban epeúti fertőzés, 0,5%-ban osteomyelitis volt igazolható. A fertőzés lokalizációját 16,5%-ban nem tudtuk meghatározni.

Pozitív tenyésztési eredmény 138 esetben állt rendelkezésre, ami a fertőzőes epizódok 55,6%-t jelentette. A kórokozók 57,2%-ban Gram-negatív, 42,8%-ban Gram- pozitív baktériumok voltak, gyakoriságuk sorrendjében a következők: *Escherichia coli* (23,2%), *Enterococcus faecalis* (15,9%), *Klebsiella pneumoniae* (15,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (13,8%), *Staphylococcus aureus* (11,6%), *Streptococcus pneumoniae* (8,7%), *Proteus mirabilis* (2,9%), *Staphylococcus epidermis* (1,4%), egyéb (7,2%).

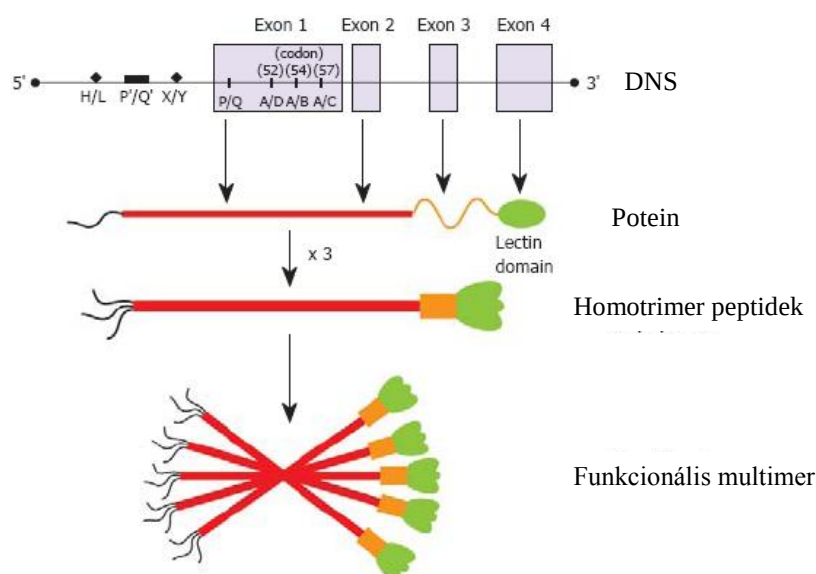
Univariációs analízist (χ^2 -teszt vagy χ^2 -teszt Yates szerinti korrekcióval) alkalmazva a klinikai tényezők közül a májsugor Child-Pugh stádium alapján jellemzett súlyossága ($p=0,035$), az ascites jelenléte ($OR: 2,45; 95\% \text{ CI: } 1,52-4,00; p < 0,001$) és a társbetegségek ($OR: 2,70; 95\% \text{ CI: } 1,70-4,30; p < 0,001$) bizonyultak a klinikailag szignifikáns bakteriális fertőzések rizikó faktorainak.

A mannóz-kötő lektin vizsgálatának klinikai jelentősége

Az MBL a C-típusú lektin receptorok közé tartozó mintázatfelismerő molekula. Egy proteinlánc többszörös összekapcsolódásaként kialakuló multimer szerkezettel bír. A protein lánc N-terminális vége ciszteinben gazdag, mellette egy kollagén kötő domén található, amit egy rövid helikális szerkezetű úgynevezett nyak követ. A C terminális végén a szénhidrát felismerő domén (lektin domén vagy CRD) helyezkedik el. Három protein lánc triplahélixet

alkotva összekapcsolódik és adja az MBL alegységét. 2-6 alegység kapcsolódása révén jön létre a multimer molekula. **(3. ábra)** A multimer formának az MBL funkciójában jelentősége van. Egyetlen CRD-nek a felismert szénhidrát molekulához való kötődése gyenge, az erős kötődéshez sok CRD együttes kapcsolódása kell, mely a multimer és a bakteriális fal szabályosan ismétlődő szénhidrát csoportjainak illeszkedésekor jön létre.

3. ábra A mannóz kötő lektint kódoló gén és a molekula szerkezete (Worthley DL et al. Intern Med J 2005,35,548-555 nyomán)



Az innate, vagy veleszületett immunitás jelenti az elsődleges védelmi vonalat a behatoló kórokozókkal szemben. Ennek az elsődleges védelmi rendszernek a résztvevői az ép epitel mellett szolúbilis molekulák (antimikrobiális peptidek, komplement, citokinek, természetes antitestek), a phagocyták és a mintázat felismerő receptorok (PRR). Ez utóbbiak közé tartoznak a toll-like receptorok (TLR), a scavenger receptorok a NOD-like receptorok, valamint a C-típusú lektinek. Az innate immunitás biztosítja a baktériumok többségének elpusztítását a hosszabb időt igénylő adaptív válasz megjelenése előtt. Beindítja a gyulladásos reakciót és az adaptív immunválaszt. PRR-k feladata, hogy felismerjék, érzékeljék a patogénhez asszociált molekuláris mintázatot (PAMP), illetve a megváltozott saját felszíni mintázatot (DAMP), beindítsák a phagocytosis útján történő eltávolításukat.

Az MBL a mikroorganizmusok széles skáláját képes felismerni (Gram-pozitív és negatív baktériumok, vírusok, gombák, protozoonok), vizsgálatok

szerint a CRD-vel történő kapcsolódás alapján. Szerkezetéből adódóan képes felismerni a prokarióta sejtre jellemző szabályosan ismétlődő szénhidrát csoportokat. Ca-függő módon kötődik a cukrok 3-hydroxi és 4-hydroxi csoportjaihoz (N-acetil-D-glükozamin, mannóz, N-acetil-mannózamin, fukóz, glükóz, de affinitása van a teikoinsavhoz is. Az MBL-lel egyidőben az egyéb innate receptorok is felismerik ugyanezeket a ligandokat, együttes hatásuk szükséges a megfelelő válasz kialakulásához.

Az MBL deficiencia 10-15%-ban fordul elő a normál populációban. Viszonylagos gyakoriságát az magyarázhatja, hogy bár számos baktériummal szemben a védetség némileg csökkent lesz, intracelluláris kórokozókkal (*mycobacteriumok*) szemben bizonyos rezisztenciát jelent. Klinikai vizsgálatok során úgy tűnik, hogy az MBL deficienciának akkor van jelentősége, ha az immunrendszer működése valamilyen más oldalról is gyengül. Kis gyermekkorban, amikor az immunaparátus még éretlen, gyakran találtak az infekciók, elsősorban a légúti fertőzések előfordulását. Gyakrabban fordultak elő súlyos infekciók haematológiai tumorok kemoterápiáját követően MBL deficiensekben, valamint nagyobb valószínűséggel alakult ki fertőzések kapcsán szeptikus shock. Májtranszplantációt követően szintén gyakoribb volt az életet veszélyeztető súlyos fertőzések megjelenése a donor MBL deficienciája esetén. Ez egyúttal azt is bizonyította, hogy az MBL fő forrása a máj. Kisebb tanulmányban azt találták, hogy B hepatitis talaján kialakult cirrhotikus betegekben gyakrabban volt észlelhető spontán bakteriális peritonitis MBL hiányosokban, mint az MBL kompetens csoportban. Találtak összefüggést az MBL polymorphismus és különböző autoimmun betegségek között is (szisztémás lupus erythematosus). Ezekben az esetekben a tünetek megjelenését azzal magyarázták, hogy a patogének és az apoptotikus testek eltávolításának késése teret enged a keresztreakciók és az autoreaktivitás kialakulásának.

Célkitűzés

Az MBL szint meghatározása gyulladásos bélbetegségben szenvedőkben és nagy létszámú májbetegség csoportján, a különböző csoportok összevetése és az MBL deficiencia jelentőségének vizsgálata az infekciók létrejöttében.

Módszerek

MBL-szint meghatározás

Minchinton és mtsai által közölt módszert követve, az MBL szinteket két monoklonális antitest felhasználásával szendvics ELISA rendszerrel határoztuk meg. Röviden, mikrotiter lemezekre (lapos alapú, magas kötőképességű, Greiner Bio-One, Mosonmagyaróvár, Hungary) 1 µg/ml koncentrációban monoklonális egér antihumán MBL antitesteket (clone 131-1; BioPorto Diagnostics A/S, Gentofte, Denmark) vittünk fel, egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk tris puffer oldatban (TBS). Ezt követően három különböző hígítású szérummintát (1/5, 1/25, 1/125) és MBL standard sorozat hígítást (BioPorto Diagnostics A/S) nedves kamrában 90 percen át 37°C-on inkubáltunk.

A standard oldat 1000 AU-t tartalmazott, melyet a gyártó által megjelölt 3200 ng/ml koncentrációjú oligomerizált MBL-nek fogadtunk el. Háromszori mosást követően pH 7,5-re állított TBS és 0,05%-os Tween-20 és 0,25 µM EDTA (TBS-T-EDTA)-ban 1:8000-re hígított biotinilált Mab 131-1 oldatot adtunk hozzá és 90 percig 37°C-on nedves kamrában inkubáltuk. Újabb mosást követően 1:1000-hez hígítású Avidin-biotinilált-peroxidáz-konjugátumot (Vectastain, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) tettünk hozzá, majd ismét inkubáció történt 30 percig nedves kamrában, szobahőmérsékleten. A szín előhívását tetrametil-benzidin dihidrokloriddal (TMB, Sigma Aldrich, Schnelldorf, Germany) végeztük, a leállítást 2M-os H₂SO₄-vel történt. 450 nm-en Infinite200 lemez leolvasó (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Austria) segítségével azonnal leolvastuk.

Az eredményeket Magellan software program segítségével, Marquardt görbe illesztésével értékeltük. A 1/5, 1/25 és 1/125-ös hígításokkal végzett mérések közötti variációs koefficiens (CV) 11,3%, 12,3% és 11,6% voltak rendre. A detektálhatósági küszöb 4,86 ng/ml-nek adódott. Az MBL mérések a Debreceni Egyetem Klinikai Kutató Központjában vakon történtek, a betegek klinikai adatainak ismerete nélkül.

Eredmények

MBL szintek és deficiencia májbetegségekben

Sem az MBL szintek, sem az MBL deficiencia gyakorisága nem különbözött az alkoholos májbeteg, krónikus HCV fertőzésben szenvedők és májzsugor esetén a kontrol csoportban talált értékektől. Az abszolút MBL hiány ($MBL < 100 \text{ ng/ml}$) 10,7-15,6%-ban fordult elő az egyes csoportokban, az alacsony MBL ($MBL < 500 \text{ ng/ml}$) előfordulása 31,1%-41,3% volt. Előrehaladott májcirrhosis esetén alacsonyabb MBL szintek voltak mérhetők /Child-Pugh stádium vagy MELD score/, de az MBL deficiensek aránya nem különbözött a Child-Pugh stádiumoktól (Child A: 11.8%, Child B: 8.0%, Child C: 13.8%), vagy a MELD score-tól függően.

Az abszolút MBL deficiencia ($< 100 \text{ ng/ml}$) ugyanakkor szoros összefüggést mutatott az infekciók kialakulásának valószínűségével (OR: 2,15; 95%CI: 1,07-4,31, $p=0,039$) cirrhotikus betegekben. Nem találtunk összefüggést, ha az MBL szint cut-off-ját 500 ng/ml -nél adtuk meg, vagy ha az MBL szint kvartilisek szerint értékeltük az adatokat. (Q1: < 337 , Q2: 338-1118, Q3: 1119-2454, Q4: $> 2455 \text{ ng/ml}$). Logisztikus regresszió során a cirrhosis súlyossága Child-Pugh szerinti értékelésben, a társbetegségek, és az abszolút MBL deficiencia voltak a bakteriális infekció bekövetkeztének független előrejelzői.

A követési idő alatt bekövetkezett kórházi halálozás 15% volt, 51 esetben olyan betegben következett be, akinek fertőzése volt, 57 esetben pedig infekciótól független volt a halálozás (20.3% vs. 12.1%, OR: 1.84, 95%CI: 1.22-2.78, $p < 0.005$). Az MBL deficiencia egyértelmű összefüggést mutatott az infekcióhoz kötődő mortalitással. Univariációs analízissel értékelve a fertőzés során bekövetkezett halálozás rizikója jóval nagyobb volt az MBL hiányos betegekben, mint az MBL kompetensekben (OR: 3.84, 95%CI: 1.29-11.37, $p=0.013$).

A tápcsatornai vérzések korszerű ellátása

A Debreceni Egyetem II. Belklinikáján 1996 szeptemberében kezdte meg működését a tápcsatornai vérzőbeteg részleg, az un. „vérző szubintenzív” osztály, amelynek fokozatosan egyre nagyobb regionális felvevőköre alakult ki. Időben ez lényegében egybeesett a TIPS hazai bevezetésével, szintén a Debreceni Egyetemen, és az ehhez szükséges ágy háttérrel is mi biztosítottuk.

1. táblázat Felső GI vérzések súlyosságának osztályozása kórházi szempontból

Paraméterek	score érték		
	1	2	3
életkor felvételi állapot	40 év alatt rendezett	40-60 évig orthostatikus instabilitás	60 év felett shockos állapot
felvételi Hb (g/l) felvételi haemostasis	>120 norm. PI, APTI	80 – 120 között 10 sec alatti APTI megnyúlás és/vagy ASA, NSAID szedés, jól beállított cumarin ulcus/erosioból	80 alatt 10 sec-nél hosszabb APTI megnyúlás, és/vagy cumarin túlادagolás varixből
anamnesisben GI vérzés	nem volt		
társbetegségek	nincs komolyabb	rendszeres gyógyszer szedést igénylő	több, súlyosabb
első endoscopos lelet:	Forrest II.c.,III nem vérző varix	Forrest II.A, II.B varix fibrindugóval	Forrest I.A, I.B aktív varixvérzés

2. táblázat A kockázati score alkalmazása beteganyagunkban

Score érték	Esetszám	Exitus/sebészeti
7	2	- / -
8	3	- / -
9	9	- / -
10	21	- / -
11	29	- / 1
12	29	1 / 5
13	24	2 / 1
14	31	2 / 4
15	19	- / 2
16	20	- / 1
17	21	3 / -
18	10	2 / -
19	23	7 / -
20	7	1 / -
21	2	2 / -

Az általunk kidolgozott és alkalmazott score rendszer hatékonyabbnak bizonyult, mint az alapul szolgáló Rockall score, mert több tényezőt vettünk figyelembe – haemostasis paraméterek, endoscopos kép - és árnyaltabban végeztük a besorolást. A 2. táblázat adatai az első 250 beteg alapján készültek és jól demonstrálják, hogy az enyhe kategóriában nem fordult elő sem halálozás, sem pedig sebészeti beavatkozás, míg a középsúlyos kategóriában fordultak elő a sebészetre került esetek.

3. táblázat A beteganyag fő számai 1997 – 2011.

évszám	esetszám	betegszám	férfiak	nők	exitus	sebészet
1997	117	104	54	50	10	6
1998	123	109	74	35	12	7
1999	134	119	74	45	8	8
2000	140	127	78	49	5	5
2001	126	117	75	42	15	6
2002	130	119	68	51	10	5
2003	148	135	84	51	7	2
2004	133	119	67	52	11	9
2005	135	118	67	51	11	6
2006	140	123	70	53	15	3
2007	128	115	69	46	21	7
2008	133	118	68	50	9	4
2009	140	121	70	51	14	8
2010	146	131	72	59	10	7
2011	142	119	69	50	13	10

Haematológiai paraméterek változása transjuguláris intrahepatikus portosystemás shunt (TIPS) behelyezését követően

A májcirrhosis egyik legrettegettebb szövődményének tekinthető nyelőcső varixvérzés kivédésének egyik hatékony eszköze a TIPS, amely a gyakorlatban a májtranszplantációig terjedő idő vérzésmentességét hivatott biztosítani. A TIPS nyitvamaradásának előrejelzése a kezdeti időkben, amikor még nem alkalmaztak fedett stenteket, megoldatlan volt. Az irodalmi adatok a TIPS után általában a vérlemezkeszám mérsékelt emelkedéséről számoltak be, ami logikus következménye is lehet a lép pangás csökkenésének, ugyanakkor látványos

emelkedés már csak azért sem következik be, mert a beteg máj thrombopoetin termelése is csökkent mértékű. Magunk szorosan követtük a nálunk gondozott TIPS betegeket, ennek során többek között a vérkép és a haemostasis paraméterek ellenőrzésére is sor került. A betegeket a kiindulási thrombocytaszám alapján két csoportra osztottuk és az adatokat így követtük, de szignifikáns változás az egyes csoportokon belül nem volt. Ha viszont úgy képeztünk két csoportot, hogy a TIPS behelyezés után a nyomásgradiens a kritikus 12 Hgmm alá csökkent-e, vagy sem, akkor már szignifikáns különbségek jelentek meg, nevezetesen azon betegeken, ahol a portoszisztémás nyomásgradiens 12 Hgmm alatt volt, azok átlagos vérlemezke száma szignifikánsan magasabbnak adódott és az idő előrehaladásával további javulást mutatott, átlagosan 21 G/l-el emelkedett. A másik csoportban, ahol a nyomásgradiens 12 Hgmm-nél magasabb maradt, az első három hónapban volt némi javulás, azonban ezt követően a thrombocytaszám a kiindulási szintre esett vissza, sőt esetenként még ennél alacsonyabbra is. Az első csoportban az átlagos kiindulási thrc szám 144 G/l volt, szemben a második csoporttal, ahol 112 G/l maradt. A 18 hónapos követés során a betegek 58 %-ában észleltünk egy év után shuntműködési zavart, kétharmaduknál újabb varixvérzés is jelentkezett. Ezeket a betegeket külön értékelve azt láttuk, hogy nálunk a shunt beültetését követően 3 hónap alatt a thrombocytaszám átlagosan 34 G/l-lel csökkent, 137-ről 103 G/l-re. A 6. hónapig a vérlemezke szám még valamelyest tovább csökkent (85-92 G/l tartományban volt), azonban innen már nem változott. A jó shuntműködésű betegek esetében 3 hónap után a vérlemezkeszám szignifikánsan magasabbnak bizonyult (átlagos emelkedés 32 G/l volt), de a továbbiakban már nem változott. Megfigyelésünk szerint tehát a TIPS beültetés után a thrombocytaszám gondos követése prognosztikus jelentőségűnek bizonyult a későbbi shunt működési zavar, color-Doppler vizsgálattal kimutatható áramlás-csökkenés, ill. elzáródás, valamint a varix újravérzés előrejelzésében.

Országos felmérés a peptikus fekélyvérző betegek ellátásával kapcsolatos tapasztalatokról.

Amint az jól ismert, a vérző peptikus fekély a tápcsatornai vérzések között az egyik legfontosabb kórkép, a felső vérzések mintegy felét képezi és az elmúlt két évtized látványos terápiás és diagnosztikus fejlődése ellenére, még mindig 5-10 % körüli mortalitás és 10-30 % közötti újravérzés jellemző erre a betegcsoportra. A gyakorlati tapasztalatok minél teljesebb megismerése

érdekében országos kérdőíves felmérést szerveztünk Rácz István professzorral (Győr), ennek során 2009 őszétől 2010 nyaráig 6 hónapon keresztül gyűjtöttük havonta az adatokat 62 endoscopos munkahelyről, 39 városból, ami a magyarországi endoscopos szervezeti egységek 71 %-át jelentette és ez a magas részvételi arány nemzetközi viszonylatokban is a legnagyobb hatékonyságúak közé sorolja a végzett vizsgálatot. Összesen 3033 vérző fekély ellátási adatait dolgoztuk föl, a munkahelyeket az ellátott esetek száma alapján két csoportra osztottuk, a 39 alacsonyabb esetszámú munkahelyen (LCV: low case volume) átlagosan 5,3 vérző fekély ellátására került sor havonta, míg a 23 nagyobb esetszámú (HCV: high case volume) munkahelyen 12,9 fekélyvérzés történt átlagosan. A Forrest klasszifikáció szerint nem volt lényeges különbség az alacsony és magas esetszámú központok között. Az endoscopos vérzéscsillapító eljárás alkalmazásában az említett nagyobb rizikójú csoportban már volt bizonyos eltérés, a HCV centrumokban 85,4%-ban került sor aktív vérzéscsillapításra, míg az LCV centrumokban csak 68,2%-ban. Az alkalmazott módszerek közül a hígított epinephrin injekció fordult elő leggyakrabban (864 esetben), ezt vagy önmagában, vagy kombinációban – clippel, vagy thermocoagulációval – alkalmazták, a kombináció szignifikánsan gyakrabban történt a HCV centrumokban (34% vs. 19% $p < 0,01$). A fekélyvérző betegek ellátása során a betegek 83 %-ában került sor savgátló kezelés alkalmazására, ami 79,9%-ban, 2425 esetben parenterális proton pumpa gátló kezelést jelentett, viszont ez csak 1303 esetben (53,7%) történt i.v. bóluszt követő 8mg/óra infúziós pumpa kezelés formájában. A kockázatosabbnak tekinthető betegcsoportokban a korszerűbb kezelési formát szignifikánsan gyakrabban alkalmazták a HCV centrumokban (49,6% vs. 33,2% $p < 0,01$). Az endoscopos ellátás eredménytelenségét az LCV centrumokban 6,4%-ban (79 beteg), míg a HCV centrumokban csak 5,1%-ban (92 beteg) követte sebészeti kezelés és ez a különbség a Forrest I.a. típusú fekélyek esetében még szembetűnőbb volt, az LCV centrumokban 29 esetben, 49,2%-ban, míg a HCV centrumokban 36 esetben, ami 32,1% volt, kellett műteni a beteget ($p < 0,05$). Az összes, fekélyvérzéssel összefüggő halálozás 3,3% volt (101 eset), viszont a HCV centrumokban szignifikánsan kevesebben haltak meg (48 fő= 2,7% vs. 53 fő=4,3% $p=0,023$).

III. ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Colitis ulcerosában intenzív indukált NOS immunreaktivitás észlelhető a hámsejtekben és a nyálkahártya gyulladásos sejtjeiben hisztokémiai, immunhisztokémiai és immunoblott vizsgálatokkal. A konstitutív eNOS szint a colitises bélbetegek szövettani mintáinak endotheliumában nem különbözik a kontrolltól. Az iNOS-IR sejtek főleg neutrophil granulocyták.
2. Crohn betegségben, mind az iNOS mind az eNOS szint alacsonyabb a nyálkahártya leukocyta típusú sejtjeiben, illetve az endothelben. Alacsony iNOS immunreaktivitású CD68 pozitív macrophagok viszont jelentős számban fordultak elő Crohn betegek vastagbél nyálkahártyájában.
3. A Crohn betegek mintáinak microvascularis endothel sejtjeiben észlelt csökkent NADPH-diaforáz aktivitás és az alacsony eNOS immunreaktivitás, az egyidejűleg észlelt jelentős kapilláris szám növekedéssel együtt, alátámasztja a betegség pathogenezisében a microvasculáris rendszer változásainak jelentőségét. A csökkent eNOS pozitivitást mutató endothel sejtek és a jelentős CD31 immunreaktív kapillárisok által jelzett neovascularizáció a szöveti „remodelling” részjelensége. Eredményeink szerint a krónikus gyulladásban a szerzett endothelialis működési zavar az eNOS szintézis gátlásával és következményes kóros angiogenezissel járhat.
4. Nem találtunk szoros korrelációt a szövettani elváltozások és a klinikai, valamint endoszkópos aktivitási indexek között, ami azt támasztja alá, hogy ezek az eltérések semmiképpen sem egy aktuális akut gyulladás következményeinek tekinthetők, hanem a krónikus gyulladásos folyamat jellemzői.
5. Eredményeink arra utalnak, hogy az iNOS expresszió és valószínűleg az eNOS aktivitás szabályozása is különbözik colitis ulcerosában és Crohn betegségben. Ezért a NO eltérő szerepet játszhat az IBD különböző formáinak kialakulásában és a lefolyás változásaiban.
6. A NOS izoformák megjelenésében és szöveti eloszlásában észlelt különbségek újabb, fontos segítséget adhatnak a colitis ulcerosa és a Crohn betegség szöveti elkülönítésében, főleg olyan esetekben, ahol ez a hagyományos kórszövettani feldolgozás során nehézséget okoz.

7. Bemutattuk, hogy a NADPH-diaforáz hisztokémia sikerrel alkalmazható 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 indukált HUVEC tenyészetben, ezzel szemben Crohn-os szérum az iNOS expresszió átmeneti emelkedését és párhuzamosan az eNOS határozott csökkenését idézte 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 Crohn-os szérum csökkenti az eNOS szintjét az endotheliumban, és fokozza a leukocita adhéziós molekulák, pl. az E-selectin expresszióját, változásokat okozva a gyulladt szövet érrendszerében. A colitis ulcerosás és Crohn-os szérum hatásának vizsgálata a HUVEC tenyészet eNOS expressziójára rávilágít a két betegség különböző pathophysiológiai történéseire és az eltérő morfológiai képre.

10. A Crohn-os szérum hatására a HUVEC tenyészetben vasculáris formációkra emlékeztető alakzatok jönnek létre, melyek a szérum angiogenetikus aktivitása mellett szólnak. Hasonló elváltozásokat colitis ulcerosás szérum nem okozott.

11. A HUVEC tenyészetben végzett vizsgálati eredményeink egybevágnak a vastagbél biopszia immunhisztokémiai eredményeivel, és olyan citokin komplexum jelenlétére utalnak a IBD-s betegek vérében, mely az eNOS/iNOS expressziós arány megváltozását eredményezi az endothelsejtekben. Az eNOS expresszió csökkenése az iNOS aktivitás egyidejű emelkedésével, valamint a sejt proliferációs aktivitás fokozódásával, csökkentheti az endotheliális sejtek gyulladásgátló kapacitását.

12. Egy összetett vizsgálati sorozatban modelleztük az infliximab kezelés hatását az endothel funkció helyreállítására a gyulladásos Crohn nyálkahártyában, ennek során kimutattuk, hogy az infliximab kezelés és a következményes TNF- α szint csökkenés képes helyreállítani az endothelsejtek kedvezőtlenül alacsony eNOS expresszióját.

13. A HUVEC tenyészetben észlelt eNOS expresszió mértékének helyreállása egyéni kísérletekben párhuzamos volt a későbbiekben észlelt klinikai javulás mértékével, ami további gyakorlati hasznosíthatóság lehetőségét veti fel.

14. Nagy betegszámú anyagon végzett elemzés során megállapítottuk, hogy az MBL hiány és Hp polymorphismus nem játszik közvetlenül szerepet a májcirrhosis etiopatogenezisében és a betegség-specifikus szövődmények kialakulásában. Hasonló felmérés korábban nem történt.

15. Vizsgáltuk a májzsugorban szenvedő betegekben a bakteriális infekciók kialakulásának és a Hp fenotípusának összefüggését. Azt találtuk, hogy *Hp1-1* fenotípus esetén nagyobb valószínűséggel alakul ki fertőzés, és az első infekcióig eltelt idő is rövidebb, mint a *Hp2-2* fenotípus esetén. A *Hp1-1* fenotípus esetén a betegek fogékonyabbak a bakteriális fertőzésekre. A *Hp1-1* fenotípus összefüggése a fertőzésre való fogékonysággal korábban nem volt ismert. Hp polymorphismus és a cirrhotikus betegek infekciós kockázatának összefüggését sem vizsgálták korábban.

16. Nagyobb valószínűséggel alakul ki fertőzés akkor is, ha a májzsugorban szenvedő betegnek súlyos társbetegsége van. Erre korábbi adat nincsen.

17. Nagyszámú krónikus májbetegben vizsgáltuk az MBL hiány előfordulását és megállapítottuk, hogy nincs különbség az egészséges populációban, a cirrhotikus és nem cirrhotikus krónikus májbeteg esetén mérhető arányok között. Az MBL deficiencia ezek kialakulásában nem jelentős tényező. Krónikus májbetegségekben kisebb tanulmányokban értékelték az MBL státusz szerepét, de az eredmények ellentmondóak voltak. A korábbiaknál jóval nagyobb betegpopulációban végeztük a felmérést.

18. Májcirrhotikus betegekben az abszolút MBL deficiencia a bakteriális infekciók független kockázati tényezőjének bizonyult mind keresztmetszeti, mind időfüggő modellben. Korábbi tanulmányok egyéb immunszuprimált állapotokban felvetették az MBL hiány és a bakteriális infekciók kapcsolatát. Cirrhotikus beteganyagban ilyen felmérés nem történt.

19. Az általunk vizsgált nagy esetszámú magyar Crohn-beteg populációban a *Hp1* allél előfordulását szignifikánsan gyakoribbnak találtuk, a Hp fenotípus

megoszlás azonban nem tért el a kontroll populációban észlelttől. Crohn-betegekben a polymorphismus viszont kapcsolatba volt hozható a betegség lefolyásával: a Hp2-1 fenotípus esetén gyakoribbnak találtuk a betegség enyhébb tünetekkel járó gyulladásos formáját és ritkébbnek a szövődményes, stenozizáló formát.

20. Újszerű megfigyelésünk, hogy primer sclerotizáló cholangitisben a Hp1-1 fenotípus egyáltalán nem fordult elő, ez természetesen még további vizsgálatokat igényel.

21. A tápcsatornai vérzések ellátásával kapcsolatban először közöltünk és alkalmaztunk a hazai irodalomban olyan kockázat értékelő rendszert, amely a vérzőbetegek kórjóslatára megfelelő információt ad.

22. Először mutattunk rá, hogy a vérlemezke szám alakulásának követése alkalmas lehet a transjugularis intrahepatikus portosystemás shunt működési zavarának előrejelzésében.

23. A világirodalomban először közöltünk olyan esetet, ahol műbillentyűvel rendelkező beteg súlyos tápcsatornai vérzésének megállítására recombináns aktivált VII faktor adására került sor, és sikerült a vérzést megállítani, miközben a műbillentyű épsége is megmaradt.

24. A vérző peptikus fekélyek hazai ellátási sajátosságait felmérő, több régiót érintő, adatgyűjtés eredményeinek elemzése során megállapítottuk, hogy a hazai, nagy esetszámú centrumok eredményei összhangban állnak más, nagy adatbázisú tanulmányokkal. Az újrávérzési ráta 9,8% volt, sebészi beavatkozásra 5,6%-ban volt szükség. az általános kórházon belüli mortalitás 3,3% volt, ami kevesebb a kanadai RUGBE tanulmány 5,4%-ánál.

25. A felmérés eredményei – a magas és az alacsony esetszámú centrumok eredményeiben mutatkozó, helyenként szignifikáns különbségek egyértelműen alátámasztják, hogy **megfelelő** méretű, aktivitású, esetszámú, felszereltségű és finanszírozású központok oldhatják meg hazánkban is a tápcsatornai vérzőbetegek nemzetközi standardoknak megfelelő, a jelenleginél hatékonyabb és kiegyensúlyozottabb ellátását!

Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

Eredményeink egyrészt újabb adalékokat adnak az IBD két klinikai formája közötti különbségek pontosabb értelmezéséhez a microvasculatura szintjén, ami különösen a nehezebben megítélhető kóresetek tökéletesebb jövőbeli kezeléséhez nyújthat segítséget. Az infliximabbal végzett vizsgálatok jól demonstrálták ennek a hatékony, új, anti-TNF- α kezelésnek az endothelium működését is befolyásoló, adott esetben korrigáló hatását. Ez a vizsgálati mód a jövőben megteremtheti a biológiai kezelések érzékeny prognosztikai elemzésének lehetőségét, ami adott esetben költséghatékony terápiás módosítások előmozdítója lehet az adott beteg esetében.

Az Hp polimorfizmus és az MBL szint meghatározásával a májcirrhotikus betegek közül kiválasztható egy, a bakteriális fertőzésekre különösen fogékony csoport. Ezen betegek szorosabb követése indokolt az esetleges infekciók korai észlelése szempontjából, tekintve, hogy Hp1-1 fenotípus és MBL deficiencia esetén az infekciók súlyosabb lefolyása várható. Továbbá ezen szerológiai markerek eredménye az antibiotikum profilaxis bevezetésekor a haszon-kockázat értékelés új szempontja lehet.

A tápcsatornai vérzések általunk kidolgozott kockázati értékelésének széleskörű alkalmazása racionálisabbá teheti a vérzőbetegek ellátási stratégiáját és jelentős megtakarítást eredményezhet az egészségpénztár számára.

A peptikus fekélyvérzések ellátásával kapcsolatos országos felmérés adatai egyértelműen rávilágítanak, hogy mielőbb célszerű lenne a vérzőbetegek ellátását megfelelő méretű, tapasztalatú és felszereltségű centrumok hálózatára alapozni, mindehhez azonban elengedhetetlenül szükséges a finanszírozás racionalizálása.

IV. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. Palatka K, **Altörjay I**, Huszka M, Udvardy M: Nitrogén-monoxid (NO) a gyomor bélcsatorna és a máj működésében. Orvosi Hetilap, 1997, 24: 1555-1559
2. **Altörjay István**, Palatka Károly, Vitális Zsuzsanna, Rejtő László, Györffy Árpád, Udvardy Miklós: Felső tápcsatornai vérzések korszerű ellátása erre specializált gastrointestinális részlegen. Orv Hetil, 1998;139:2121-2126,
3. Udvardy M, **Altörjay I**, Palatka K: A gyulladásos bélbetegségek haematológiai vonatkozásai. Orv Hetilap 2001, 2:78-82
4. Udvardy M, Palatka K, Tornai I, **Altörjay I**: Antitrombotikus kezelés heveny felső gastrointestinális vérzés esetén. Orvosi Hetilap, 2002, 4:183-187
Citáció: 8 (független)
5. Palatka K, **Altörjay I**: Argonplazmás koaguláció a gasztrointesztinális endoszkópiában.
Magyar Belorvosi Archivum, 2003; 56: 113-117
6. Papp M, Mezei G, Udvardy M, **Altörjay I**: Hematológiai és haemostasis paraméterek változása transjugularis intrahepaticus portosystemas shunt hatására Orv. Hetil. 2003; 144: 1341-1345
Citáció: 1 (független)
7. Udvardy M, Telek B, Mezey G, Batár P, **Altörjay I**: Successful control of massive coumarol-induced acute upper gastrointestinal bleeding and correction of prothrombin time by recombinant active factor VII (Eptacog-alpha, NovoSeven) in a patient with a prosthetic aortic valve and two malignancies (chronic lymphoid leukaemia and lung cancer)
Blood Coagul Fibrinolysis, 2004; 15, 265-7, 2004
IF.: 1,506 Citáció: 12 (független)

8. Palatka K, Udvardy M, **Altörjay I:** A vékonybél-lymphoma és a coeliakia, valamint a Crohn betegség kapcsolata. European Journal of Gastroenterology and Hepatology (magyar kiadás), 2004; 4: 121-124

9. Altörjay A, Kiss J, Paal B, Tihanyi Z, Luka F, Farsang Z, Asztalos I, **Altörjay I :**The place of gastro-jejuno-duodenal interposition following limited esophageal resection Eur J Cardiothorac. Surg, 2005; 28, 296-300.

IF.: 1,802 Citáció:4; független: 3

10. Palatka K, Serfőző Z, Veréb Z, Hargitay Z, Lontay B, Erdődi F, Bánfalvi G, Nemes Z, Udvardy M, **Altörjay I:** Changes in the expression and distribution of the inducible and endothelial nitric-oxide synthase in mucosal biopsy specimens of inflammatory bowel disease. Scand J Gastroenterol, 2005; 40: 670-680

IF 1,790 Citáció: 18; független: 16

11. Altörjay I: A portális hypertensio patogenezise és a gyógyszeres befolyásolás lehetőségei Motesz Magazin, 2005; 4. 41-44.

12. Papp M, Udvardy M, Vitális Zs, Tornai I, **Altörjay I:** Gastrooesophagealis varixvérzés – Újdonságok a patofiziológia terén. Orv. Hetil, 2006; 147, 309-314. Citáció: 2; független: 0

13. Papp M, Lakatos P.L., Hungarian IBD Study Group, Palatka K, Földi I, Udvardy M, Hársfalvi J, Tornai I, Vitális Zs, Dinya T, Kovács Á, Molnár T, Demeter P, Papp J, Lakatos L, **Altörjay I.:** Haptoglobin polimorfizmus vizsgálata gyulladásos bélbetegségekben Orv Hetil 2006; 147, 1745-1750

Citáció: 2; független: 1

14. Palatka K, Serfőző Z, Vereb Z, Batori R, Lontay B, Hargitay Z, Nemes Z, Udvardy M, Erdodi F, **Altörjay I:** Expression of the inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells in the presence of blood serum of patients with inflammatory bowel disease World J Gastroent. 2006; 12, 1730-1738

Citáció: 10; független: 9

15. Vitális Zs, Papp M, Tornai I, **Altörjay I.** A nyelvőcsővarix-vérzés megelőzése és kezelése Orv Hetil 2006; 147, 2455-2463

Citáció: 7 (független)

16. Papp, M., Lakatos, PL., Palatka, K., Földi, I., Udvardy, M., Hársfalvi, J., Tornai, I., Vitális, Z., Dinya, T., Kovács, Á., Molnár, T., Demeter, P., Papp, J., Lakatos, L., **Altörjay, I.:** Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease, disease behavior and extraintestinal manifestations in Hungarian patients. Dig. Dis. Sci. 2007; 52, 1279-1284,

IF: 1,319 Citáció: 11; független: 7

17. Papp, M., Lakatos, PL., Hársfalvi, J., Farkas, G., Palatka, K., Udvardy, M., Molnár T., Farkas, K., Nagy, F., Veres, G., Lakatos, L., Kovács, Á., Dinya, T., Kocsis, KÁ., Papp, J., **Altörjay, I.**, The Hungarian IBD Study Group: Mannose-binding lectin level and deficiency is not associated with inflammatory bowel diseases, disease phenotype, serology profile and NOD2/CARD15 genotype in a large Hungarian cohort. Hum Immunol 2010; 71, 407- 413,

IF: 2,872 Citáció: 4; független: 2

18. **Altörjay, I.**, Vitális, Z., Tornai, I., Palatka, K., Kacska, S., Farkas, G., Udvardy, M., Hársfalvi, J., Dinya, T., Orosz, P., jr Lombay, B., Pár, G., Pár, A., Csak, T., Osztovits, J., Szalay, F., Csepregi, A., Lakatos, PL., Papp, M.: Mannose-binding lectin deficiency confers risk for bacterial infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis. J. Hepatol, 2010; 53,484-491.

IF: 9,334 Citáció: 4; független: 2

19.**Altörjay I:** A nem varixeredetű felső tápcsatornai vérzések korszerű ellátásának irányelvei LAM, 2010; 20, 375-382.

20.Vitális, Z., **Altörjay, I.**, Tornai, I., Palatka, K., Kacska, S., Pályu, E., Tornai, D., Udvardy, M., Hársfalvi, J., Dinya, T., Veres, G., Lakatos, PL., Papp, M.: Phenotypic polymorphism of haptoglobin: A novel risk factor for the development of infection in liver cirrhosis. Hum Immunol 2011; 72, 348-354.

IF: 2,837 Citáció: 3 (független)

21. Altorjay I, Veréb Z, Serfőző Z, Kovácsné Bácskai I, Bátori R, Erdődi F, Udvardy M, Sipka S, Lányi Á, Rajnavölgyi É, Palatka K: Anti-TNF-alpha antibody (infliximab) therapy supports the recovery of eNOS and VEGFR2 protein expression in endothelial cells. Int J Immunopathol Pharmacol 2011; 24, 323-335.

IF: 2,991 Citáció: 1 (független)

22. Rác, István., Lukács, Krisztina., Rác, Ferenc., Kersák, János., Wacha, Judit., Szalóki, Tibor., Szász, Magdolna., Gyenes, István., Kárász, Tibor., Altorjay, István. :Management and outcome of peptivc ulcer bleeding in different case volume workplaces: results of a nationwide inquiry in Hungary Gastrointestinal Research Practice, 2012

IF: 0,978

Az értekezésben említett, további fontosabb közlemény:

Ilonczai P, Tóth J, Tóth L, **Altorjay I**, Boda Z, Palatka K: Catheter-directed thrombolysis in inflammatory boewel diseases: Report of a case. World J Gastroenterol, 2012; 18,4791-4793

IF: 2,471

V. ÖSSZESÍTETT SCIENTOMETRIAI ADATOK:

<u>Összes:</u>		<u>Kandidatúra után:</u>
Lektorált in extenso közlemények:	77	58
Idegen nyelvű	45	35
hazai idegen nyelvű	2	
első vagy utolsó szerző:	31	22
Tankönyv fejezet:	16	16
Könyvrészlet:	29	22
összesített IF (2012):	120,6	113,5
(kevés szerzős: 72,9 + sok szerzős: 47,7)		(65,8 + 47,7)
Utolsó 10 év publikációinak száma:	48	
Impakt faktor: 63,5 + 47,7, citáció: 614		
Összes citációk száma (2012 dec.):	624 (független 492),	
azt a közleményt hozzáadva, ahol csak kollaborációs szerző vagyok:		
összes citáció: 730 (független 572)		
Hirsch index:	15	

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom korábbi klinika igazgatóimnak, néhai Rák Kálmán, Udvardy Miklós és Boda Zoltán professzoroknak, hogy a gasztroenterológia művelésének feltételeit biztosították, Udvardy Miklósnak külön is köszönettel tartozom, mert az ő vezetése mellett indult a tápcsatornai vérzőbetegek korszerű, intenzív ellátásának megszervezése,

tanítómesteremnek, Györffy Árpád tanár úrnak, aki az endoscopia rejtelseibe bevezetett és aki hatalmas tárgyi tudással és mértéktartó bölcsességgel támogatta törekvéseimet,

Paragh György centrumelnök úrnak, aki támogatta és elősegítette a debreceni egyetemi gasztroenterológia egységes arculatának kialakítását,

Szegedi Gyula és Fésűs László akadémikus uraknak, akik a nem önálló gasztroenterológiai tanszék kialakítását lehetővé tették és támogatták,

Hálával emlékezem meg néhai Boján Ferenc professzorról, akitől a sejtenyésztés első lépéseit tanultam és néhai H.K. Breddin professzorról, aminek frankfurti intézetében az endothelsejtekkel foglalkozni kezdtem,

Köszönöm Rajnavölgyi Éva professzorasszonynak, Erdődi Ferenc professzornak, az Immunológiai Tanszék munkatársának, Veréb Zoltánnak, ill. a korábban az egyetemünkön dolgozó Serfőző Zoltánnak az endothelsejtekkel kapcsolatos munkákban való rendkívül hasznos kollaborációt,

köszönöm egykori laborvezetőnk, Hársfalvi Jolán tanárnő, valamint Hersényi László és Hunyady Béla hasznos gyakorlati tanácsait,

köszönettel tartozom a magyar gasztroenterológus társadalom számos kiválóságának, a teljesség igénye nélkül, Tulassay Zsolt akadémikusnak, Szalay Ferenc, Rácz István, Takács Tamás, Wittmann Tibor, Lonovics János, Pap Ákos, Papp János, Mózsik Gyula és Simon László professzoroknak, hosszú évek óta tapasztalt támogató együttműködésükért, a sok nagyszerű kollega közül kiemelten is Orosz Péter főorvosnak az eredményes szakmai együttműködésért,

kiváló munkatársaimnak, Palatka Károlynak, Vitális Zsuzsának, Kacska Sándornak, Tornai Istvánnak, akikkel gyümölcsöző tudományos műhelymunkát sikerült kialakítani, és akik a betegellátás gigászi feladatainak megoldásában fáradhatatlanul segítettek,

külön és kiemelten mondok köszönetet Papp Mária adjunktusnőnek, aki a klinikára kerülése első napjától a tanszék tudományos munkájának motorja és a diákkörösök tevékenységének legfőbb koordinálója,

kiváló asszisztenseinknek, Nagyné Berecz Margitnak, Pikóné Gabinak, Horváthné Irénkének, Butiné Szilvinek, Smausz Enikőnek, Veresné Komor Mónika adminisztrátorunknak hogy a főnök rigolyáit elviselték, és akiknek áldozatos munkája nélkül a korszerű gastroenterológiai ténykedés megvalósíthatatlan lenne,

hálásan köszönöm néhai Galáth Bélánének és Tömöriné Évának az önzetlen és odaadó, rengeteg túlmunkát és áldozatot igénylő sejttenyésztő laboratóriumi ténykedést!

Hálával tartozom feleségemnek, Dr. Ács Máriának, és gyermekeinknek, Istvánnak, Laurának, Melindának és Szibillának, hogy nagy szeretettel és végtelen türelemmel kibőjtölték, amíg helyettük a klinikai munkával és a tudománnyal foglalkoztam.

Végtelen hálával gondolok Szüleimre, Édesapámra, néhai Altorjay István professzorra, a magyar gyermeksebészet első egyetemi tanárára, Édesanyámra, Dr. Antal Julianna gyermekgyógyász főorvosnőre, akik gyermekkoromtól kezdve személyes példájukkal is erősítették bennem az orvosi hivatás, a gyógyító munka iránti tiszteletet, elkötelezettséget, az emberi tisztesség és erkölcsi tartás rendíthetetlen példájával mutattak minden körülmények között utat és adtak biztató támogatást.