

dc_562_12

MTA Doktori Értekezés

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

Dr. Altorjay István



2013

Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségügyi Centrum

Belgyógyászati Intézet

Gasztroenterológiai Tanszék

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 ívű 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 gastrointestinális 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.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4
Bevezetés	8
I. Irodalmi áttekintés	9
A. Az ér-endothel működési zavarai a tápcsatornában	9
B. A mikrocirkuláció működési zavarai a tápcsatornában	19
C. A makrocirkuláció működési zavarai tápcsatornai betegségekben, különös tekintettel a tápcsatornai vérzésekre	23
II. Kísérletes vizsgálatok	30
Az ér-endothel működési zavarai gyulladásos bélbetegségekben	30
Az NO és a gyulladásos bélbetegségek	33
A kísérletes, laboratóriumi vizsgálatok célkitűzései	36
Anyag és módszerek	37
Szövettani vizsgálatok	38
Endothel-sejteken végzett vizsgálatok	42
Eredmények	47
III. Klinikai vizsgálatok szervezése	72
IV. Klinikai vizsgálatok	76
A haptoglobin polymorphismus klinikai jelentőségének vizsgálata	76
Módszerek	82
A haptoglobin polymorphismus vizsgálata Crohn betegségben	84
Eredmények	85
Haptoglobin polymorphismus vizsgálata májbeteggekben	87
Eredmények	90
A mannóz-kötő lektin klinikai jelentőségének vizsgálata	96
Betegek és módszerek	99
Eredmények	102
Tápcsatornai vérzések korszerű ellátása	112
Beteganyag és módszerek	122
Eredmények	124
Érdekes esetek és megfigyelések a tápcsatornai vérzések témakörében	128
Országos felmérés a peptikus fekélyvérző betegek ellátásával kapcsolatos tapasztalatokról	135
V. Diskusszió	138
VI. Új megállapítások	158
Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága	162
VII. Irodalomjegyzék	163
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	187
VIII. Scientometriai összegzés	194
Köszönetnyilvánítás	195

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACLF	acute-on-chronic liver failure
AG	aminoguanidin
AIH	autoimmun hepatitis
ALD	autoimmune liver disease (autoimmun májbetegség)
AMA	anti-mitochondriális antitest
ANA	antinukleáris antitest
ANCA	anti-neutrophil cytoplasmic antibody
ASA	acetylsalicyl sav (aspirin)
ASCA	anti-<i>Saccharomyces cerevisiae</i> antitest
bFGF	basic fibroblast growth factor
BPI	natural antibiotic bactericidal permeability increasing protein
BSA	bovin serum albumin
BT	bakteriális transzlokáció
C-ANCA	cytoplasmikus ANCA
CD	Crohn betegség
CDAI	Crohn Betegség Aktivitási Index
C2, C3, C4	komplement 2-es, 3-as, -4-es faktor
CI	konfidencia intervallum
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát
CO	szén-monoxid
COX	cyclo-oxygenase
CRD	carbohydrate recognition domain (az MBL szénhidrát felismerő csoportja)
CSI	clinically significant infection
CU	colitis ulcerosa
DAB	diaminobenzidin
DAMP	damage-associated molecular pattern
DHPLC	denaturing high performance liquid chromatography
DNase	dezoxi-ribonukleáz
DNS	dezoxiribonukleinsav
DSS	dextran sodium (nátrium) sulfate

ECAM	endotheliális sejtadhéziós molekula
EDRF-NO	endothel-eredetű relaxáló faktor- nitrogén monoxid
EDTA	etilén-diamino-tetraecetsav
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	endomysium elleni antitest
ESM-1	endothel specific molecule-1
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FKN	fractalkine
FMD	flow mediated dilatation
Fvs	fehérvérsejt
gASCA	glikán anti-<i>Saccharomyces cerevisiae</i> antitest
GNB	Gram-negatív baktérium
GPB	Gram-pozitív baktérium
HbSR	haptoglobin-hemoglobin scavenger receptor
HCV	C vírus hepatitis
HCV	high case volume (nagy esetszámú) centrum
Hgb	hemoglobin
HIMEC	human intestinal microvascular endothelial cell
HLA	humán leukocyta antigén
HMG	high mobility group non-histone chromosomal protein
HO-1	hemoxigenáz-1
Hp	haptoglobin
HRGEC	human renal glomerular endothelial cell
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IBD	inflammatory bowel diseases (gyulladásos bélbetegségek)
ICAM-1	intercellular adhesive molecule-1
Ig	immunglobulin
IIF	indirekt immunfluoreszcencia
IL	interleukin
INF	interferon
INF-γ	interferon gamma
IR	immunologically reactive
IQR	interquartile range (interkvartilis tartomány)
LCV	low case volume (alacsony esetszámú) centrum
LDL	low-density lipoprotein

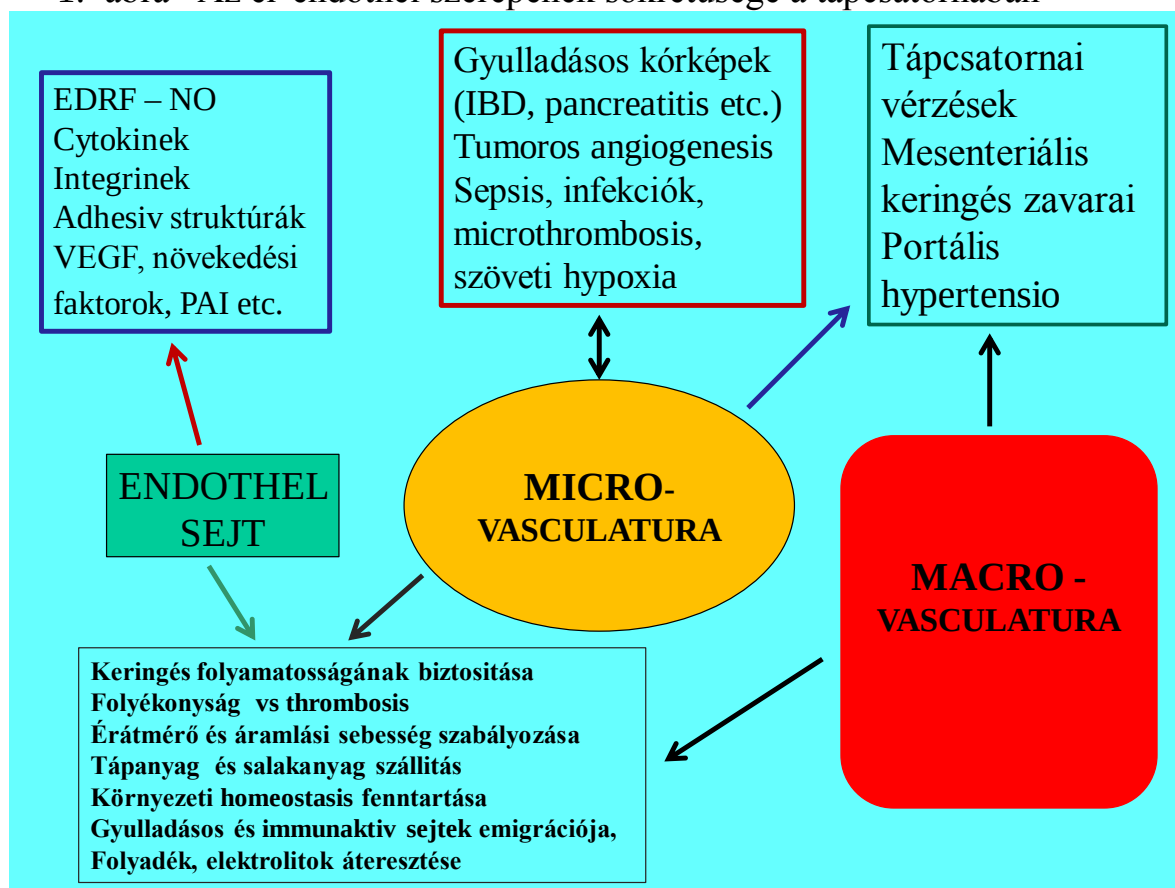
L-NAME	N^G-nitro-L-arginin
L-NMMA	N^G-monomethyl-L-arginin
LPI	labile plasma iron (labilis plazma vas)
LPS	lipopolysaccharid
LRR	leucine-rich repeat (leucingazdag ismétlődés)
MASP-1	MBL-associated serin protease-1
MBL	mannan-binding lectin (mannóz-kötő lektin)
MELD	model for end-stage liver disease
MMP	matrix metalloprotease
MPO	myeloperoxidase
MHC	major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)
MVD	mucosal vascular density
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NBT	nitroblue-tetrazolium klorid
NF-κB	nukleáris faktor kappa B
NK	natural killer cell (természetes ölósejt)
NO	nitrogén monoxid
NOS	nitrogén monoxid szintetáz
iNOS	indukálható nitrogén monoxid szintetáz
eNOS	endotheliális nitrogén monoxid szintetáz
nNOS	neuronális nitrogén monoxid szintetáz
NOD2/CARD15	nucleotid oligomerisatio domain/caspase recruitment domain- gyulladásos bélbetegségekre hajlamosító gén
NPV	negatív prediktív érték
NS	nem szignifikáns
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
OR	odds ratio (esélyhányados)
ODC	ornithin-dekarboxiláz
PAF	platelet activating factor
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
P-ANCA	perinukleáris anti-neutrophil cytoplasmaticus antitest
PAR	protease activated receptor
PBC	primer biliáris cirrhosis
PBS	foszfát puffer
PCR-RFLP	polymerase chain reaction/ restriction fragment length polymorphism

PDGF	platelet-derived growth factor
PECAM-1	platelet-endothelial cell adhaesion molecule-1
PFA	paraformaldehid
PGN	peptidoglikán
PMN	polymorphonucleáris leukocyta
PPV	pozitív prediktív érték
PR3	proteináz-3
PRR	pattern recognition receptor (mintázatfelismerő receptor)
PSC	primer sclerotizáló cholangitis
RES	retikuloendoteliális rendszer
RNS	ribonukleinsav
SBP	spontán bakteriális peritonitis
SD	standard deviáció
SDS-PAGE	sodium-dodecyl-sulphate polyacrylamide gel electroforesis
SIRS	systemic inflammatory respond syndrome
SNP	single nucleotide polymorphism (egyponos nukleotid polimorfizmus)
TGFβ-1	transforming growth factor beta-1
TH/Th	helper T lymphocyta
TLR	toll-like receptor
TNBS	trinitro-benzolszulfonsav
TNF-α	tumor nekrosis faktor- α
TSP-1	thrombospondin-1
VCAM	vasculáris sejtadhéziós molekula
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
vWF	von Willebrand factor

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 betegségcsoportnak óriási klinikai jelentősége van, amire valamivel később térünk ki.

1. ábra Az ér-endothel szerepének sokrétűsége a tápcsatornában



I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

- A. Az ér-endothel működési zavarai
- B. A mikrocirkuláció zavarai a tápcsatornában
- C. A makrocirkuláció eltérései a tápcsatornában

A. Az ér-endothel működési zavarai a tápcsatornában

Ebben a fejezetben a tápcsatornát érintő sejt- és szövetszintű eltérésekből mutatunk be egy szeletet, amelyek az endothelsejtek által expresszált struktúrákkal, növekedési faktorokkal, cytokinokkal kapcsolatosak, ide sorolhatók a sejttenyészetben végzett tanulmányok is. Szó esik továbbá két olyan – máshol termelődő, de a keringésben megjelenő tényezőről is – a haptoglobinról és a mannoz kötő lektinről – amelyeknek az endothelsejtekkel való kölcsönhatásai újabb ismereteink szerint érdemi változásokat eredményezhetnek a gyulladásos folyamatok kialakulásában, illetve az endothel-felszín épségének megőrzésében.

Az EDRF-NO jelentősége a tápcsatornában

Az NO központi szerepet játszik a tápcsatorna élettanában és számos kórformában is. A bél potenciális NO forrásai közé tartoznak a bélfal belső részei, a hízósejtek, epithelium, simaizom, neurális plexus, a bélfalhoz kitapadó, vagy azt infiltráló fehérvérsejtek (neutrophilek, monocyták), míg a lumenális nitrátokat a commensalis anaerob baktériumok bontják el. Az agyban és az endothelsejtekben nyugalmi viszonyok között működő NO szintetáz enzimet konstitutivnak tekintjük, míg az indukálható NO szintetáz gyulladásos viszonyok között aktiválódik. Élettani körülmények között a nyálkahártya vérátáramlását NO szabályozza, ami a mesentérium érhalózatának endothelsejtjeiből származik. Gyulladás esetén az indukálható NO szintetáz által termelt excesszív NO járul hozzá a hyperaemiához. A perisztaltika és a tápcsatornai sphinchterek koordinációját szintén a felszabaduló NO mediálja, amely a non-adrenerg, non-cholinerg enterális idegrendszer elsődleges neurotransmittere. A bél motilitásának lényeges változásai, például paralitikus ileus esetén, excesszív NO koncentráció következményei, amit például endotoxinok generálnak. Az NO szerepet játszik a gyomormucosa sav és bicarbonát szekréciójának a szabályozásában is. A gyomormucosa mikrocirkulációjának fenntartása védő hatású számos károsító tényező – így ischaemia, korai endotoxin shock, önmérsztödés etc.- esetén, például úgy, hogy

akadályozza a neutrophilek kitapadását a mesenteriális endotheliumhoz, gátolja a vérlemezke adhaesiót, megakadályozza a hizósejtek aktivációját. A fiziológiás NO koncentráció védi a nyálkahártya barrier funkcióját, míg az excesszív NO jelenlét közvetlenül károsíthatja a mucosát, károsítja a cytoskeleton actinfilamentjeit, gátolja az ATP képződést, rontja a sejtek közötti szoros kapcsolódási pontok (tight junction) épségét, hyperpermeabilitást idéz elő. Az indukálható NOS izoformák szelektív gátlása, illetve a konstitutív NOS működésének megóvása egyaránt therapiás hatású lehet.

Az endothel barrier károsodása számos kórképben kimutatható, ennek egyik jó példája a súlyos akut pancreatitis. Fontos állatmodell az, ahol intraduktális epeinfúzióval provokálják az akut pancreatitist patkányokban. A kiterjedt, számos szervet érintő oedema kialakulása ilyenkor jól demonstrálja az endothel barrier megnövekedett permeabilitását, amit jelzett albumin kilépéssel is igazolni lehet. Az ismert antioxidáns N-acetyl-L-cysteinnel végzett előkezelés az endothel barrier károsodását és a következményes oedema kialakulást jelentősen mérsékelte, míg calcium csatorna blockolók (verapamil és diltiazem) gyakorlatilag hatástalanok maradtak (1). Egy másik tanulmányában ugyanez a munkacsoport akut pancreatitisben vizsgálta az interleukin-1 (IL-1), IL-6 szintek alakulását, a myeloperoxidase aktivitás változásait, valamint a proinflammatorikus hatású platelet-activating-factor (PAF) antagonistájaként ismert lexipafant előkezelés hatékonyságát az endothel barrier működés károsodásának kivédésében (2). Azt találták, hogy a lexipafant csökkentette a pancreatitissel járó oedemaképződés mértékét és a gyulladásos cytokinek szintjét is. Egy hasonló vizsgálatban ehhez még hozzátették a platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) monoklonális antitestjét is, ami szintén csökkentette az endothelialis működészavart, azt demonstrálva, hogy gyulladásos viszonyok között az aktivált thrombocyták kitapadása rontja a barrier működést, míg ha ennek molekuláris támadáspontját kikapcsoljuk, az javíthat a helyzeten (3). A leukocytá-endothel sejt kapcsolódás különféle formáinak is jelentősége van egyes gyulladásos kórképekben, a két sejtféleség interakciójának három fokozata lehetséges: rolling (gurulás), adherencia és transendotheliális migráció. Ezek jól demonstrálhatók állatkísérletekben, például sugárkezelés okozta enteritis capillárisaiban, gyulladásos bélbetegség aktív fázisaiban, ichaemia/reperfúziós károsodás, bakteriális infekciók esetén is.

A vascularis endothelial growth factor (VEGF) potens mitogén faktor, aminek igen fontos szerepet tulajdonítunk a tumoros angiogenesisben. Több isoforma ismeretes, közülük talán a legjelentősebbek a 18 kDa tömegű VEGF 121, a 23 kDa tömegű VEGF 165 és a 26 kDa tömegű VEGF 189. Egy izgalmas munkában (4) 76 colorectalis tumorban vizsgálták a VEGF isoformák expresszióját, úgy találták, hogy a legkisebb tömegű forma a normál és a tumoros colonszövetben egyaránt kimutatható volt, míg a nagyobb tömegű VEGF formák jelentősebb mennyiségben csak a tumoros szövetben voltak fellelhetők,

a VEGF 189, ami csak sejthez kötött formában detektálható, döntően a legelőrehaladottabb colon tumorban volt a legnagyobb tömegben. A keringő, solubilis VEGF (121 és 165) összemennyisége a tumoros betegekben szignifikánsan magasabbnak mutatkozott, 1081 pg/ml vs 543 pg/ml. Úgy vélik azonban, hogy a keringésben mért mennyiségnél a tumorképzés szempontjából fontosabb a sejthez kötött, legnagyobb tömegű VEGF isoforma.

Az angiogenesisnek, mint fontos pathogenetikai tényezőnek a szerepe az IBD-ben a 2000-es évek első felében merült föl szélesebb körben. Az egyik legaktívabb olasz munkacsoport IBD-s betegek mintáinak vizsgálata mellett human intestinalis microvascularis endothel sejttenyészetben (HIMEC) is tanulmányozta a VEGF, IL-8, bFGF szintek alakulását, a nyálkahártya kapilláris sűrűségét (MVD), és az endothelsejteken az $\alpha\beta 3$ integrin expresszióját. IBD-s nyálkahártya kivonat angiogenetikus potenciálját corneális és chorioallantoikus membrán assay-n tanulmányozták. Állásfoglalásuk szerint számos bizonyíték igazolja az angiogenetikus aktivitást mind a Crohn betegek, mind a colitis ulcerosások nyálkahártyájában, amely egy lokális, gyulladásfüggő angiogenesis (5). Ennek a komplex folyamatnak a tanulmányozása évek óta tart, izgalmas kérdés, hogy miként alakul IBD-ben az angiogén tényezők egyensúlya. Egy új tanulmányban 14 Crohn betegségben, 21 colitis ulcerosában szenvedő betegben, valamint 11 vastagbélrákos betegben vizsgálták immunhistochemiai módszerrel a biopsziás mintákban a VEGF, az indukálható NOS és az antiangiogén hatású thrombospondin-1 (TSP-1) expresszióját (6). Mindhárom vizsgált marker szignifikánsan nagyobb mértékben expresszáldott mindkét IBD-s csoport mintáiban, mint az egészséges kontroll colon mintákban. A vastagbélrákos mintákban csak a VEGF és az iNOS expressziója volt magasabb, míg a TSP-1 nem különbözött az egészséges csoport eredményeitől. Ez arra utal, hogy tumoros milieu-ben az angiogenesis gátló TSP-1 expressziója lényegében elégtelen, míg IBD-ben megemelkedik ugyan, párhuzamosan a VEGF expresszióval, de mértéke nem elégséges a gyulladásos angiogenetikus aktivitás kivédésére. Egy állatkísérletes munkában (7) thrombospondin-1 deficiens egerekben vizsgálták dextran natriumszulfáttal (DSS) indukált colitisben a VEGF, bázikus fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor β -1 (TGF β 1), pro- és antiapoptotikus fehérjék (Fas, és Fas-ligand) szintjének alakulását, a microvascularis érsűrűséget, a endothel apoptosis indexet, valamint a protein 53 és a β -catenin expressziót. A VEGF, bFGF fehérjék szintje, a microvascularis érsűrűség (MVD) egyaránt szignifikánsan nőtt a TSP-1 negatív egerekben, míg az endothel apoptosis index és a Fas-ligand csökkent. Dysplasiát, p53 overexpressziót lényegesen magasabb arányban észleltek a TSP-1 negatív egerekben, mint a normál populációban. Következtetéseik szerint a TSP-1 csökkenteni képes az angiogenesis, a pro-angiogenetikus faktorok szintjének csökkentése révén, ugyanakkor endothel apoptosist tud indukálni Fas és Fas-ligand úton. Ehhez társul még a p53 és β -catenin overexpresszió a TSP-1

negatív eregekben, ami összegezve azt mutatja, hogy a TSP-1 hiányának fontos szerepe lehet a carcinogenesisben!

Az IBD-ben tehát az angiogenesis fontosságának elfogadása egyre világosabb, azonban a folyamat elindításában szerepet játszó sejtek és komponensek nem teljesen világosak. Egy fontos tanulmányban (8) azt vizsgálták, hogy a vérlemezke adhesioja a gyulladt humán bél endotheljéhez milyen hatással van az angiogenesisre. Nem stimulált, ill. thrombinnal aktivált vérlemezkéket rétegeztek nyugalmi állapotban lévő, ill. TNF- α előkezelésben részesített human intestinalis microvascularis endothel (HIMEC) sejt kultúrára. A rendszerhez különböző antitesteket is adagoltak, így vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellularis adhesion molecule-1 (ICAM-1), integrin $\alpha\beta 3$, szöveti faktor és fractalkine (FKN) ellen termelt ellenanyagokat. A thrombocyták kitapadását mikroszkóppal nézték, valamint mérték a VEGF és a solubilis CD40L felszabadulását ELISA-val. Ezt követően Matrigel cső formációs tesztet is végeztek, annak vizsgálatára, hogy a vérlemezkék mennyire indukálnak angiogenesisist a co-kultúrában. A TNF- α előkezelés ICAM-1, FKN, $\alpha\beta 3$ integrin expressziót váltott ki HIMEC-ben. Az aktivált thrombocyták jól tapadtak már a nyugalomban lévő endothelsejtekhez is, de még jobban a TNF- α előkezelést követően. A vérlemezke kitapadás VCAM-1-től és szöveti faktortól nem függött, viszont az ICAM-1-től, FKN-től és az integrin $\alpha\beta 3$ -tól igen. Az endothelsejtek csak akkor termeltek VEGF-t és solubilis CD40L-t, amikor TNF- α előkezelés után vérlemezkékkel találkoztak és ez a hatás még kifejezettebb volt, ha a vérlemezkék IBD-s betegből származtak!! Összegezve: a vérlemezke kitapadást a TNF- α kezelést kapott HIMEC-en az ICAM-1, FKN és $\alpha\beta 3$ integrin mediálja, ez VEGF és solubilis CD40L felszabadulást indukál, ill. aktivált vérlemezkék esetén tubulus formálódást is elindít. További információt szolgáltatott azok a vizsgálatok, amelyek HIMEC-ben a thalidomide hatását tanulmányozták (9). A glutamsav származék thalidomide a TNF- α transkripció inhibitora, de az erekre is hat. Refrakter Crohn betegségben jó hatásfokkal alkalmazták, de a pontos mechanizmus még nem ismert. A HIMEC kultúrában thalidomide előkezelés után végezték a TNF- α aktiválást alacsony áramlási stressz mellett és ezt követően számos tényezőt tanulmányoztak: fvs adherenciát, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1 expressziót, iNOS, COX-2, NF-kappa B aktivációt. A thalidomide kezelés gátolta a fehérvérsejtek kitapadását a HIMEC-hez, blokkolta az adhaesiós molekulák expresszióját és az NF-kappa B aktivációt, ugyanakkor nem befolyásolta az iNOS, ill. a COX-2 expressziót, amelyek fontos molekulák a HIMEC aktiváció lefékezésében. A thalidomide emellett hatékonyan gátolta a VEGF indukálta HIMEC növekedést, csőformálódást és vándorlást. Mindez arra utal, hogy a thalidomide hatásának kulcsa Crohn betegségben az érendothel működésének befolyásolása.

Danese munkacsoportja azt is tanulmányozta, hogy a VEGF az angiogenetikus aktivitáson kívül befolyásolja-e magát a gyulladást is IBD-ben. Egyrészt betegek mintáiban vizsgálták a VEGF-A és receptorai, a VEGFR-1, ill. VEGFR-2

expresszióját, másrészt HIMEC tenyészetben tanulmányozták a VEGF-A hatására a matrigel-cső tesztben a tubulus képződést, a VCAM-1, ICAM-1 expressziót és a neutrophil fehérvérsejtek kitapadását. A VEGF-A és VEGFR-2 szintje magasabb volt az IBD-s betegek mintáiban, a VEGF-A angiogenesist indukált a HIMEC-ben, egyidejűleg azonban fokozta a neutrophilek kitapadását is, úgy tűnik tehát, hogy a VEGF a gyulladásos aktivitás fokozására is képes, tehát a VEGF-A szignál blokkolása akár therapiás lehetőségű is lehet IBD-ben (10).

A proton pumpa gátlók használata igen széleskörű lett az elmúlt 2 évtizedben. Ismeretes, hogy a *Helicobacter pylori* okozta gyomormucosa gyulladás pathomechanismusában az interleukin-8 okozta neutrophil infiltráció szerepet játszik. Egy érdekes tanulmányban japán szerzők azt tanulmányozták humán köldözsínór véna endothel sejt kultúrában (HUVEC), hogy a különféle protonpumpa gátlóknak van-e gyulladáscsökkentő hatása is, a savgátláson túlmenően, vagyis befolyásolják-e a gyomor epithelsejtek (MKN45 sejtvonal) IL-8 termelését, ill. a neutrophil granulocyták transendothelialis migrációját. Mindkét kísérleti sejtenyészetet *H. pylori* vizes kivonatával, ill. IL-1β-tel stimulálták, majd mérték a nuclearis factor kappa B aktivációt és az IL-8 termelést, valamint az IL-8 indukálta transendothelialis fvs migrációt. A vizsgált omeprazol és lansoprazol egyaránt szignifikánsan gátolta az NFκappaB aktivációt és a granulocyták transendothelialis migrációját is (11)!

A mannóz-kötő fehérje (mannose-binding lectin: MBL) az innate immunitás fontos, ún. mintázat-felismerő eleme, amit a máj termel. Kötődni képes a mannose-t, fucose-t vagy N-acetylglucosamint tartalmazó glucoconjugátumokhoz, amelyek számos baktérium, vírus, ill. gombák felszínén megtalálhatók. Ez a kötődés a lectin útvonalon át aktiválhatja a complement rendszert, vagy opsonizálja a microorganismusokat és ezzel elősegíti azok phagocytosisát. A keringő MBL minőségi, vagy mennyiségi eltéréseit újabban számos fertőző betegséggel kapcsolatba hozzák. Az innate immunitás fontos szerepet játszik a nem-alkoholos zsírmáj (NAFLD) kialakulásában, egy holland tanulmányban 43 májbeteg és 10 kontroll májbiopsiás mintáiban vizsgálták a complement faktorok és a mannóz-kötő lectin lerakódását. Aktivált C3-at, C4d-t, neutrophil infiltrációt, pro-inflammatorikus cytokin expressziót találtak a zsírmájú minták 74 %-ában, míg complement aktiváció nem volt kimutatható az egészséges májakban (12). A mannózzal, vagy fukózzal kapcsolt fehérjék viszonyát a májsinusoidok endothelsejteihez és a Kupffer sejtekhez sejtenyészetben is tanulmányozták, úgy találták, hogy a sinusoidális endothelsejteken speciális mannóz receptorok vannak, amelyek kötni tudják a mannozilált és fukozilált bovin szérum albumint (BSA), és ezt a galaktóz jelenléte nem befolyásolta, míg a Kupffer sejtek esetén több receptor is képes a fukózzal kapcsolt BSA megkötésére, tehát a fukozilált proteinek inkább tekinthetők Kupffer sejt szelektívnek (13). Ismeretes, hogy a complement klasszikus aktiválódásának a felismerő molekulája, a C1q kötődik az

endothelsejtekhez és aktivációt vált ki. A mannóz-kötő lectin (MBL), mint a lectin aktiválódási útvonal mintázatfelismerő molekulája szerkezetileg és funkcionálisan is rokonságban van a C1q-val. Magyar munkacsoport tanulmányozta, hogy az MBL milyen módon lép kapcsolatba humán köldökzsínórvéna endothelsejtekkel (HUVEC). Azt találták, hogy a kötődés dózisfüggő és kompetitív a C1q-val, ami arra utal, hogy közös receptoron kötődnek a tenyésztett endothelsejtekkel és ezt a kötődést az endothelsejtek lipopolysachariddal történő előkezelése fokozni képes, mindez gyulladásos folyamatokban fontos szerepet játszhat (14). Egy másik munkacsoport szintén tanulmányozta, hogy az MBL befolyásolja-e a bakteriális LPS endothelsejtekre kifejtett hatását. LPS stimulusra a HUVEC számos cytokint, chemokint képes expresszálni. Ebben a kísérletben human MBL/ MBL-asszociált szerin proteáz komplex, illetve rekombináns humán MBL egyaránt fokozta a HUVEC LPS indukálta cytokin szekrécióját, úgymint az IL-8, IL-6, monocyta-chemoattractant protein-1 elválasztást, mégpedig dózis-függő módon. Ezt a hatást anti-MBL antitest, vagy mannóz gátolni tudta. Valamennyi vizsgált cytokin közül az IL-6 szekréció volt a legnagyobb, függetlenül attól, hogy csak rekombináns MBL-t, vagy a szerin proteázt is tartalmazó komplexet vitték a rendszerbe. Ezek az eredmények azt támogatják, hogy az MBL az ismert lectin-komplement aktivációs út mellett más formában is befolyásolhatja a gyulladásos folyamatokat, mégpedig a mikrocirkuláció területén (15). Fontos klinikai relevanciája is van annak a tanulmánynak, amelyben a carotis endarteriectomiája után kialakuló restenosis mechanizmusát vizsgálták abból a szempontból is, hogy a betegek homozigoták a normál típusú MBL2-re, vagy ennek valamilyen variánsával rendelkeznek. A korai postoperatív időszakban nézték a változásokat a szérum VEGF, EGF (epidermal growth factor) és PDGF (platelet derived growth factor) szintjében, ill. ezek alakulásának és az MBL2 genotípusának hatását a restenosis kialakulására. 82 műtött beteget követtek 14 hónapon át. A normál MBL2 genotípusú betegekben a postoperatív VEGF és PDGF nagymértékű emelkedése jelentősen növelte a restenosis esélyét – OR: 27,73 vs 9,23 a csekély postoperatív emelkedést mutató csoportban. A konklúzió, hogy a restenosis kialakulásában a növekedési faktorok mellett a complement aktiváció is szerepet játszik (16). A complement rendszer képes indukálni és fokozni gyulladásos reakciókat. Az MBL-hez asszociált szerin proteáz (MASP-1) egy döntő eleme a lectin útján történő complement aktivációnak. Egy izgalmas tanulmányban azt vizsgálták, hogy a MASP-1 milyen aktivációt idéz elő a HUVEC sejtenyészetben, és azt találták, hogy stimulálni képes a kalcium függő szignalizációt, az NF-kappaB és a p38MAPK aktivációt is. A másik MBL-hez asszociált szerin proteáz, a MASP-2 nem tudta ezt kiváltani. A MASP-1 hatása a proteolitikus aktivitással függött össze, mégpedig oly módon, hogy az endothelsejteken lévő protease-activated receptor (PAR) régióhoz kapcsolódott, ezen belül is azt találták, hogy a MASP-1 targetje a PAR4. Azt is sikerült demonstrálni, hogy MASP-1 kezelés után a membránhoz

kötött intakt PAR4 mennyisége lecsökken. Ezek az eredmények új adatokat szolgáltatnak az endothel sejtműködés és a complement rendszer aktiválódásának kapcsolatához (17). Egy angol tanulmányban gyermekeken vizsgálták az endothel működés és az MBL genotípus kapcsolatát, exon 1 és promóter polymorphismusok vonatkozásában. 2176 tízéves gyermeket tanulmányoztak, akik közül rövid idővel korábban 544-en estek át fertőző betegségen. Az endothel működést áramlás mediálta dilatáció (flow mediated dilatation: FMD) mérésével nézték. A fertőzés mintegy 10 %-al csökkentette az FMD-t, és ez szignifikánsnak bizonyult azon gyermekeknél, akik homozygóta formában variáns MBL-t hordoztak. Véleményük szerint ez a variáns allel a későbbi atherosclerosisra hajlamosíthatna (18).

Egy kínai munkacsoport két izgalmas vizsgálatban elemezte az MBL hatását human vese glomeruláris endothel sejtenyészeten (HRGEC), különböző cukorkoncentrációjú tápfolyadék alkalmazása esetén. Az MBL okozta aktivációt a TGF- β 1 és az NF-kappaB termelés mérésével ellenőrizték, továbbá áramlási cytometriával nézték az MBL és C3 depozíciókat az endothel felszínén.

A magasabb cukrot + MBL-t is tartalmazó tápoldatban tartott endothelsejtek szignifikánsan több TGF- β 1-et termeltek és az NFkappaB aktivitás is magasabb volt, mind a normális cukorkoncentrációjú közegben, ill. az MBL nélküli magas cukorközegben, mindezt MBL blokkoló antitesttel ki tudták védeni. Összegzésként megállapítják, hogy vese eredetű endothel sejtenyészeten a magasabb cukorszint növeli a TGF- β 1 termelést, amit az MBL tovább képes fokozni, növelve az NFkappaB aktiválódást is (19). A másik tanulmányban IL-6 és TNF- α expressziót mértek a felülúszóban, úgy, hogy a két magas cukorkoncentrációjú tápfolyadékot 24 óra után 30 %-os MBL deficiens human szérummal egészítették ki, további 4 órára, és az egyik tenyészetbe 1 microgramm/ml MBL-t is adtak. A normál cukorkoncentrációjú oldathoz képest a magas cukrot tartalmazó tápfolyadékban az IL-6 és TNF- α termelés szignifikánsan magasabb volt, ami szignifikánsan tovább fokozódott az MBL jelenlétében. Ebben a tenyészetben MBL és C3 depozitumokat is ki tudtak mutatni az endothelsejtek felszínén. Mindez arra utal, hogy a magas cukor és az MBL indukálta complement aktiváció által fokozott gyulladásos faktor képzés a diabeteses nephropathia kialakulásának fontos patogenetikai komponense lehet (20).

Az endothel felszín különböző változásokra eltérő módon reagál, igen érdekes, hogy a nyomásviszonyok változása milyen reakciókat válthat ki, aminek például a klinikumban óriási jelentőséggel bíró portális hypertensio vonatkozásában lehet szerepe. Egy német kísérletes tanulmányban (21) az vizsgálták, hogy a vénás nyomás hirtelen megemelkedése és ezzel kapcsolatban az áramlási stressz változása milyen endotheliális dysfunciót válthat ki, megfigyelésük szerint a vénás hypertensio megemelte a matrix metalloproteinázok (MMP 1,8,9) aktivitását, de egyúttal fokozta a szöveti metalloproteáz inhibitorok (TIMP 1,2) aktivitását is mind a magas, mind pedig az alacsony nyomású területeken. Ehhez

a magas nyomású területeken a vascularis endothelialis növekedési faktor 2 (VEGFR2) receptorának expressziója is megemelkedett! Szintén klinikai relevanciája van a bakteriális transzlokáció vizsgálatának, ami saját megfigyeléseink szerint is, cirrhosisban rontja a betegek életkilátásait. Egy izgalmas állatkísérletben patkányokon vizsgálták a mesenterialis keringés szintjén a bakteriális transzlokáció hatásait és úgy találták, hogy a bél lezárása után az endothelhez kitapadó neutrophil fehérvérsejtek száma 5x-ösére emelkedett, a migráló neutrophilek aránya 11x-esre nőtt és az endothelialis P-szelektin, valamint intercellularis adhesion molecule-1 (ICAM-1) expressziója a capillárisokban megduplázódott. A bakteriális transzlokáció és bélelzáródás természetesen a mortalitást is megemelte (22). Másik igen fontos terület az endothel szerepe a tumoros progresszióban. Dianzani és mtsai (23) emberi köldökzsinór véna endothel sejt kultúrában (HUVEC) tanulmányozták humán colon carcinoma sejt vonal (HT29) tumoros sejtjeinek kitapadását, illetve a cyclooxygenase-2 (COX-2) gátló Celecoxib hatását erre a folyamatra. Azt találták, hogy a Celecoxib mind a nyugvó HUVEC sejtek, mind a TNF- α -val stimulált HUVEC sejtek esetén gátolta a HT29 tumorsejtek kitapadását, a pontosabb analízishez western blot-tal vizsgált ICAM-1 és VCAM-1 adhaesiós molekulák közül azonban csak a stimulált – tehát gyulladásos viszonyokat utánzó - HUVEC sejteken sikerült gátolni az adhaesiós molekulák expresszióját, leghatékonyabban 10 μ M-os celecoxib koncentrációban. Ezek a vizsgálatok újabb bizonyítéka annak, hogy a sejt kultúra megfelelő feltételekkel igen hasznos információkat adhat a humán in vivo vonatkozások irányában is. Az általunk is részletesen tanulmányozott haptoglobinnak az endothel dysfuncióra gyakorolt esetleges hatását tanulmányozták diabeteses gyermekeken. Felnőttekben 2-es típusú diabetesben a haptoglobin 1-1 genotípus meglehetősen protectív hatásúnak tűnik a szövődményekkel szemben. Az aktuális tanulmányban fiatalkori 1-es típusú diabetesben tanulmányozták ezt, de itt az endothel működési zavar csak a HbA1c-vel mutatott egyértelmű korrelációt, a haptoglobin genotípussal nem láttak összefüggést (24). Egy másik, ugyanebben a témakörben megjelent közlemény a cukorbetegségben az endothel működési zavarát a haptoglobin 2-2 genotípusával hozták összefüggésbe (25). Egy rendkívül izgalmas közleményben endothel progenitor sejteket transfectáltak haptoglobin génnel, annak tisztázására, hogy milyen közvetlen hatása mutatkozik a haptoglobinnak az endothel progenitor sejtek érújdonképző faktor expressziójára. Azt találták, hogy a haptoglobinnal módosított endothel progenitor sejtekben számos pro-angiogén faktor expressziója fokozódott, ami in vitro csöképződésben is megnyilvánult. Olyan állatkísérletekben, ahol végtagischaemiát hoztak létre, a módosított endothel progenitor sejtek javították a vérátáramlást és az ischaemiás sérülésekből való felépülést (26). A cikk konklúziója szerint ex vivo endothel progenitorsejtek haptoglobinnal történő modifikációjával az érsérülések okozta ischaemia kezelésében lehetne eredményeket elérni. Egy nagy holland klinikai tanulmányban az ér-endothel

működési zavarának és a gyulladásos markereknek a fontosságát tanulmányozták metabolikus szindrómával társuló coronaria és perifériás érbeteggekben. A CODAM study keretében 539 beteget vizsgáltak, az endothel dysfunctio jellemzésére a solubilis E-selectin, a solubilis VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) és a von Willebrand faktor mérését, míg a gyulladás jellemzésére a C-reaktív protein, IL-6, solubilis ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), serum amyloid A, caeruloplasmin és haptoglobin meghatározását alkalmazták. Eredményeik szerint az endothel dysfunctio egyértelműen nagyobb szerepet játszott metabolikus szindróma mellett a perifériás érbetegség kialakulásában, mint a coronaria betegségben, feltételezhetjük tehát, hogy a perifériás érbetegséghez közelebb álló zsigeri keringési zavarokra is ez az összefüggés lehet a jellemzőbb (27). A tápcsatornai vérzések kezelésének egyik legkevésbé megoldott területe az angiodysplasiából származó vérzés. Közelmúltban jelentek meg olyan megfigyelések, hogy a thalidomide, mint az érújdonképződés inhibitora, hatékony kezelési alternatíva lehetne. Egy érdekes kínai közleményben sebészeti mintákon és humán köldökzsinór véna endothel sejtkultúrában vizsgálták ezt a kérdést. Immunhistochemiai módszerrel vizsgálták a masszív vérzés miatt operált betegek bélrezekátumában a mucosa kapillárisaiban az angiopoetin 2, Notch 1 és delta like ligand 4 expressziót, amit az angiodysplasiás laesiók régiójában fokozottnak találtak, míg ha HUVEC tenyésztetben tanulmányozták különböző dózisú (25 – 200 mg/L) thalidomide-dal történt inkubáció után ezen proteinek mRNA expresszióját, ill. a proteinek megjelenését, azt találták, hogy a thalidomide inkubáció dózisfüggő módon valamennyi vizsgált protein megjelenését gátolta a sejtkultúrában, ami alátámasztja az angiodysplasiák kezelésében az eddigi klinikai hatékonyságra vonatkozó tapasztalatokat (28). Az angiogenesis gátlásának a gyulladásos bélbetegség vonatkozásában feltételezett esetleges előnyös hatását kívánták egy állatkísérletben demonstrálni amerikai kutatók, akik dextran nátriumsultáttal (DSS) provokált egér colitis létrehozása előtt alkalmaztak intraperitoneális bevacizumab injekciót. A kísérlet végén a colon gyulladást és a capillaris sűrűséget elemezték. Megfigyeléseik szerint a VEGF-gátló előkezelés nem csökkentette sem a gyulladást, sem az angiogenesis, inkább hátráltatta a gyulladásból való gyógyulást folyamatát (29)! Az angiodysplasiák kialakulásában egészen újszerű koncepciót fogalmazott meg egy angol munkacsoport (30), abból a klinikai ismeretből indultak ki, hogy von Willebrand betegséghez gyakran társul angiodysplasia is, ezért gátolták tenyésztett endothel sejtekben a vWF expressziót és azt találták, hogy ennek hatására növekedett az in vitro angiogenesis, fokozódott a VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) dependens proliferáció és migrációs aktivitás, nőtt az angiopoetin-2 felszabadulás is, míg az $\alpha\beta 3$ integrin szintek csökkentek. VWF deficiens egerekben végzett vizsgálatokkal is megerősítették azt a hypothesis, miszerint a von Willebrand faktornak az angiogenesisben is fontos szerepe van a haemostasisban betöltött funkció mellett. Szabó Sándor Long Beach-i

munkacsoportja régóta foglalkozik a fekélyképződés kérdésével, az utóbbi időben az endothelialis növekedési faktor szerepét is vizsgálták és azt találták, hogy a megnövekedett VEGF nem segítette elő a gyógyulást, aminek hátterében egy érdekes egyensúlyzavart mutattak ki, nevezetesen VEGF-el egyidejűleg növekszik a gátló hatású endostatin és angiostatin szintje is, amelyek fokozzák a matrix metalloproteinase (MMP) 2 szintjét és ez lehet a magyarázata a gyógyulási folyamat lelassulásának (31). Szintén ez a munkacsoport vetette föl a közelmúltban, hogy a colitis ulcerosa kezelési, gyógyulási folyamatában is hasonló egyensúlyzavar feltételezhető, nevezetesen a microvascularis dysfunctio, endothel barrier defektus hátterében fennállhat a VEGF indukálta pathológiás angiogenesis pathogenetikai szerepe, ugyanakkor egy másik, újabban leírt angiogén faktor, a placentalis növekedési faktor (PIGF) szerepe is felmerült. Ezek alapján a pathológiás angiogenesis gátlása akadályozná a colitis ulcerosa kifejlődését. Másrészt ismeretesek olyan adatok is, hogy már fennálló aktív betegségben az angiogenesis stimulációja PDGF (platelet derived growth factor), vagy bFGF (basic fibroblast growth factor) révén a gyógyulást tudja felgyorsítani. Ezek az új ismeretek új távlatokat nyithatnak a colitis ulcerosa különböző stádiumaiban alkalmazható angiogenikus, vagy éppen anti-angiogenikus terápiák vonatkozásában (32). Az aszimmetrikus arginin (ADMA), amely a konstitutív NO-szintetáz (NOS) enzim endogén inhibitora, fontos szerepet játszik számos kórfolyamatban. 1992-ben írták le először, Vallance és mtsai. Az ADMA főleg a sejtmagban található, metilált arginint tartalmazó proteinek hidrolizisével szintetizálódik és competitiv módon gátolja a vascularis endothelsejtek NO szintetázának működését, ennek megfelelően potenciális rizikófaktor a coronaria betegségek kialakulásának, emelkedett plasma szintje számos olyan folyamatban kimutatható, ahol endothel dysfunctio áll a kórfolyamat hátterében, így hypertensio, hyperglycaemia, veseelégtelenség etc. körülményei között. Állatkísérletekben az ADMA fokozta a gyomormucosa sérülékenységet, amennyiben az NO gátlása révén csökkentette a vérátáramlást és fokozta a TNF- α felszabadulását. Úgy tűnik, hogy szerepe van a H. pylori indukálta gyomormucosa károsodás kifejlődésében is. Hatása ellensúlyozható L-arginine adásával, ami az NOS szubsztrátja és superoxide dismutase-sal (SOD), ami viszont egy jólismert szabadgyök fogó (33).

Igen fontos új felismerés az endothelium működési zavarai és a gyulladásos bélbetegségek kapcsolatrendszerében az NKX2-3 (NK2 transcription factor related locus 3) szabályozó szerepe a microvascularis intestinalis endothelsejtek Endothelin-1 és VEGF szignalizációjában. Az NKX2-3 az NKx család tagja, amely egy homeodomain transcriptiós faktorcsalád, amely fontos szabályozó szerepet játszik szövetspecifikus génexpressziókban a szöveti differenciáció során. Az egyedfejlődés idején az NKX2-3 döntően a közép- és hátsóbél mesodermájában és a lépben expresszálódik, fontos szerepe van egyebek között a normális vékonybélműködés kialakulásában. Az NKX2-3 szintén expresszálódik a bélkapillárisok endothelsejtjeiben is, ahol például egerekben a

lymphocytá adhesios molekulák (MadCAM-1) expressziójához fontos. A microvascularis endothel működése döntő a bél gyulladásos folyamatainak kezelésében, hiszen cytokinek, bakteriális termékek okozta endothel aktiváció nyomán adhaesiós molekulák expresszálódnak, chemokinek termelődnek és megindul a leukocyták transzmigrációja. Miután már kimutatták, hogy az NKX2-3 expressziója fokozódik Crohn betegek bélfalában és B lymphocytáiban (34), ebben a fontos tanulmányban (35) a szerzők human intestinalis microvascularis endothel sejtvonalon (HIMEC) tanulmányozták többek között az endothelin-1 és VEGF expresszióját. Azt találták, hogy az NKX2-3 számos, a gyulladásért felelős gén expressziójáért felelős, így növeli a VEGF, AKT, eNOS expresszióját, míg az Endothelin-1 expresszió fordítottan arányos az NKX2-3 kifejeződéssel.

A haemoglobin kiszabadulása a vörösvértestekből általában gyulladásos folyamatok, infekciók, autoimmun megbetegedések (pl. SLE) kapcsán következik be. Az atheromás plakkból származó lipidek is okozhatnak haemolysist, ilyenkor a kiszabadult haemoglobin oxidálódik, bekövetkezik a haem-oxygenase upregulációja és ez fokozza az endothelsejtek károsodását. A haem kiszabadulását gátló haptoglobin, ill. a haem sequestrációja haemopexin formában csökkenteni képes az érfalkárosodást (36). A csökkent funkcionális haptoglobin aktivitás myocardialis infarktust követően rosszabb életkilátásokkal jár. Ennek okát haptoglobin hiányos egerekben vizsgálva azt találták, hogy ebben a csoportban gyakoribb volt a szivruptúra, illetve, ahol ez nem következett be, ott is súlyosabb intramurális bevérzéseket és leukocytá infiltrációt találtak, ennek okaként fokozott oxidatív stressz, csökkent PAI-1 aktivitás és megnövekedett VEGF α transcriptio és fokozott microvascularis permeabilitás volt kimutatható. A haptoglobin jótékony hatását endothel sejtkultúrában is kimutatták, amennyiben a haemoglobin indukálta oxidatív károsodás kivédése mellett helyreállította az endothelsejtekben a VEGF α /angiopoetin-1 expresszió egyensúlyát is, biztosítva a microvascularis integritás jobb megőrzését (37).

B. A mikrocirkuláció működési zavarai a tápcsatornában

A mikrocirkuláció és a makrocirkuláció működési zavarainak egyik fontos közös példája a thrombosis. Gyulladásos bélbetegségben fokozódik a thromboemboliás események előfordulása. Az alábbi tanulmányban 10 éves periódus során vizsgálták ezt a jelenséget (38). 266 IBD miatt hospitalizált beteg esetében 9 betegben igazolódott valódi thrombosis (3,4%), átlagéletkoruk 31 év volt, 6 férfi és 3 nő, 5 betegnek volt Crohn betegsége és 4-nek colitis ulcerosája, 5 esetben alsóvégtagi mélyvéna thrombosiszt találtak, közülük egynek tüdőemboliája is lett, agyi véna thrombosis 2 esetben igazolódott, porta

thrombosis és jugularis véna thrombosis 1-1 esetben. Hangsúlyozzák, hogy valamennyi esetben az IBD aktív periódusában következett be a thromboemboliás esemény.

A mikrocirkuláció működésének zavarai három fő területen jelennek meg, a krónikus gyulladásos folyamatokban, a tumoros progresszióban, valamint az ischaemia, szöveti hypoxia kialakulásában. A bélfal keringéscsavarának egyik súlyos példája az újszülöttek necrotizáló enterocolitise. Egy kísérletes munkában (39) patkányújszülöttekben idéztek elő nekrotizáló enterocolitist, laser-Doppler vizsgálattal ellenőrizték a terminális ileum régiójában a microvasculatura vérátáramlását, majd peritoneálisan dializáló oldatot juttattak az állatokba. Ennek hatására 48 óra alatt a kontroll csoporthoz képest látványosan alacsonyabb vérátáramlás fokozatosan emelkedni kezdett és elérte a kontrollcsoport kiindulási ilealis vérátáramlási értékét. Egy másik rágcsló modellben trinitrobenzoeszulfonsavval (TNBS) indukált colitisben nézték a diétásan alkalmazott 2% phosphatidylcholine jótékony hatását a gyulladásos folyamat dinamikájára és a mikrocirkulációra (40). Számos markert vizsgáltak, így a colon szövetében a xanthine oxidoreductase-t, myeloperoxidase-t, NO-végtermékeket, a plasmában gyulladásos cytokineket. A TNBS beöntés hyperdinamikus keringést idézett elő, szignifikánsan emelte a gyulladásos markereket, enzimaktivitásokat, a diétás előkezelés hatékonyan csökkentette a gyulladásos reakciókat és megővta a microvasculatura épségét. Az erythropoietin-analóg darbepoietin- α javítja a májfunkciót és segíti a máj regenerációját is parciális hepatectomia után. Egérkísérletben vizsgálták, hogy milyen hatással lehet a májba implantált tumorsejtek proliferációjára és azt találták, hogy a tumoros érújdonképződést és a tumornövekedést egyaránt szignifikánsan fokozta, ami fokozott figyelmet érdemel emberi alkalmazás esetén (41). A klinikumban a közelmúltban vezették be a krónikus májelégtelenség akut fellángolásának fogalmát (acute-on-chronic liver failure ACLF), ami rossz prognózisú, magas mortalitású fordulatot jelent, az ACLF patofiziológiájában az innate immunitás dysfunctioja, megnövekedett bakteriális transzlokáció, a bél keringési zavara és ezekkel összefüggésben az ún. SIRS (systemic inflammatory response syndrome) kialakulása figyelhető meg (42). A portális hypertensio legfőbb oka a megnövekedett intrahepatikus rezisztencia, ennek kialakulásában a májsinusoidok endothelsejtjeinek működészavara döntő jelentőségű, miután ezekben a sejtekben csökken az NO és más vasodilatátorok termelődése, ez a májon belüli megnövekedett vascularis rezisztenciához vezet, a megnövekedő portális nyomás azonban az extrahepatikus területen, a zsigerek, sőt a szisztémás keringés rendszerében ellentétes irányú endothel-dysfunctiot idéz elő, itt a vasodilatáció kerül túlsúlyba, az artériás oldalon értágulat következik meg, másrészt megindul a portosystemás kollaterálisok kifejlődése, ennek minden ismert következményével, a tágult nyelőcsővisszerekkel és az

ascites képződéssel. Az endothel dysfunctio pontos sejt és molekuláris mechanizmusai még nem teljesen ismertek, egy kiváló review tárgyalta az eddigi ismereteket és a jövőendő kutatási útjait (43). Jól ismert, hogy gyulladásos bélbetegségben a COX-gátló gyógyszerek, NSAID készítmények károsodásokat okozhatnak. Éppen ezért egy érdekes tanulmányban experimentális colitis (TNBS indukált) gyógyulási folyamatát vizsgálták a gyomorba juttatott aspirin, szelektív COX-2 gátló celecoxib, valamint NO-donor-ASA mellett. Számos paramétert vizsgáltak, így a myeloperoxidase-t, indukálható NOS-t, TNF- α és IL-1 β expressziót, colon vérátáramlást etc. A TNBS indukálta colitis során a vérátáramlás szignifikánsan csökkent, a colon súlya növekedett, megnövekedett az MPO, plazma IL-1 β és TNF- α aktivitás. Ezeket az aspirin tovább súlyosbította, a celecoxib viszont nem és a szintetikus Prostaglandin E2 adása pedig kivédte. Az NO-ASA kezelés dózis függő formában gyorsította a colon gyógyulási folyamatait, növelte a vérátáramlást, növelte a plasma NO szintet, szupprimálta az MPO képződést és downregulálta a COX-2, iNOS, IL-1 β és TNF- α mRNA-t (44). Egy másik munkában az NO-Aspirin előnyös hatását demonstrálták állatkísérletes reflux oesophagitis modellben is. Itt patkányok aspirint, indomethacint, celecoxibot, NO-donor glyceryl trinitrátot, valamint NO-ASA-t kaptak. A két utóbbi kezelés hasonló módon volt képes a gyulladásos cytokinek emelkedését és a nyálkahártya károsodást kivédeni, miközben a vérátáramlás is jobb volt (45). Egy másik érdekes munkában az indomethacin hatását tanulmányozták a gyomor és vékonybél vasculáris permeabilitására, amit a microvascularis endothel károsodásának jeleként értékeltek. A patkányokban az indomethacin okozta gyomormucosa károsodás és vasculáris permeabilitás fokozódás párhuzamos volt, az atropin mind a kettő vonatkozásában cypoprotective hatású volt, de csak intakt nervus vagus mellett (46). A heparanase enzim összefüggésben áll a cyclooxygenase-2 termeléssel és együttesen befolyásolják a kapilláris sűrűséget (microvessel density: MVD) is, ami a tumor progressziót kísérő angiogenesis egyik mutatója lehet. Egy tanulmányban colon carcinomás szövetekben vizsgálták ezeket a paramétereket (47), immunohistochemiai módszerekkel, Western blot technikával, ill. a kapilláris sűrűséget anti-CD34 antitestekkel. A normális colonszövetben heparanase csak 5 %-ban volt kimutatható, míg a tumoros szövetben 80,7%-ban, ez szorosan korrelált, mind a COX-2 expresszióval, mind a nyirokcsomó metastasis képződéssel, mind a fokozott kapilláris sűrűséggel és a rövidebb túléléssel. Egy kiváló olasz munkacsoport (Silvio Danese és mtsai) több fontos közleményben foglalkozott az IBD és a gyulladásos angiogenesis kapcsolatával, az egyik fontos munkában (48) az új TNF- α gátló infliximab hatását tanulmányozták a colon nyálkahártyában észlelhető angiogenesis folyamatára, 14 Crohn betegség miatt infliximabbal kezelt betegből származó szövetmintát és vérmintát vizsgáltak a kezelés indítása előtt és 1 év kezelést követően. A mucosa angiogenesisét CD31, valamint Ki-67 festéssel értékelték, a vasculáris endothelial növekedési faktor-A (VEGF-A) megjelenését pedig ELISA-val

mérték mucosa szövettényészetben. Párhuzamosan humán intestinális fibroblast sejt kultúrában is vizsgálták a VEGF-A expressziót TNF- α stimulus hatására infliximab jelenlétében ill. anélkül. A humán intestinális microvascularis endothelsejtek migrációját is tanulmányozták in vitro. A Crohn betegek colon nyálkahártyájában a kapilláris sűrűség szignifikánsan nagyobb volt, mint az egészséges nyálkahártyában, ami azokban az esetekben, amelyek az infliximab kezelésre jól reagáltak egyértelműen csökkent! Ezzel összhangban a proliferációs Ki-67 marker expressziója az endothelsejtekben szintén szignifikánsan csökkent, hasonlóképpen mérséklődött a mucosa VEGF-A koncentrációja is a kezelés hatására. Intestinális fibroblast kultúrában a TNF- α indukálta VEGF-A termelést az infliximab felfüggesztette. Ezek alapján tehát megállapítható, hogy az infliximab downregulálja a Crohn betegek nyálkahártyájában az angiogenezist és csökkenti a mucosa fibroblastok VEGF-A produkcióját, ezek szerint a TNF- α blokád therapiás hatása ebben az irányban is érvényesül. Egy másik olasz munkacsoport az endothel dysfunctiót és gyulladásos paraméterek összefüggését vizsgálta Crohn betegekben és colitis ulcerosás betegekben, normál kontroll páciensekkel összevetve. CRP-t és IL-6-t mértek, valamint nézték az endothelium-dependens vasodilatációt acetylcholinra, ill. az endothelium-independens vasodilatációt nitroprussid nátriumra, TNF- α elleni antitest (infliximab) kezelés kapcsán is. Azt találták, az endothel-függő vasodilatáció károsodott volt a Crohn betegekben, de ezt nem észlelték a colitis ulcerosás betegekben, az endotheliumtól független vasodilatáció viszont egyik csoportban sem változott. Az infliximab kezelés javította az acetylcholinra adott reakciót a Crohn betegekben, de nem változtatta meg egyik csoportban sem a nitroprussid nátriumra adott értágulást. Véleményük szerint az endothel dysfunctio a Crohn betegekre specifikus eltérés, amit ugyanakkor az intravasculáris TNF- α neutralizáció jótékonyan befolyásol (49). A kapilláris sűrűség (microvessel density MVD) változását és a VEGF, valamint az endoglin expresszióját gastroenteropancreatikus neuroendocrin tumorokban is tanulmányozták (50), a kapilláris sűrűség meghatározására az endoglin mellett a CD31 antitest meghatározást is alkalmazták, az utóbbi lényegesen magasabbnak adódott a neuroendocrin tumorokban, mint az endoglin expresszió, amely azonban jó párhuzamot mutatott a tumorok méretével, a metastasisok megjelenésével és a tumoros progresszióval, ezekben a vonatkozásokban az egyébként szintén emelkedett VEGF-nél érzékenyebbnek bizonyult, tehát ebben a tumorfajtában az endoglint potenciális markernek ajánlják. Egy érdekes állatkísérletben a keringő, sejttől független oxyhaemoglobin káros hatását demonstrálták az intestinális mikrocirkulációra és következményesen a bélhámra. A vízzel, vagy oxyhaemoglobin infúzióval előidézett haemolysis az intestinális mikrokeringés csökkenését eredményezte, ami hozzájárult a bélfal károsodásához (51). Az endothelsejt specifikus molekula-1 gén (endothelial cell-specific molecule-1: ESM-1) jelentősége több folyamatban felmerül, így a tumorképzésben is. Egy érdekes közleményben (52)

a gyomorrákban tanulmányozták a kapilláris sűrűség (MVD) és az ESM-1 mRNA expresszió alakulását 159 beteg anyagán, összevetve 40 kontrollmintával. Az MVD jellemzésére anti-CD34 antitesteket használtak és elemezték az ESM-1 expresszióját a tumoros érhálózatban is. Ezenkívül GC MKN28 gyomorrákos sejtvonalon, valamint humán microvascularis endothel sejtkultúrában is tanulmányozták az ESM-1 proliferációt kiváltó hatását. Eredményeik szerint az ESM-1 mRNA szignifikánsan emelkedett expressziója volt kimutatható a gyomorrákos szövetekben, az ESM-1 fehérje termelődése pedig szoros korrelációt mutatott a távoli metastasisképződéssel, a vasculáris invázióval és a Borrmann IV-es típusú tumornövekedéssel. Az ESM-1 expressziót mutató betegek ötéves túlélése szignifikánsan rosszabb volt, ez a fehérje tehát független prognosztikai faktornak bizonyult. Az ESM-1 elleni antitest dóziszfüggő módon gátolta mindkét tanulmányozott sejtvonal növekedését, ennek alapján az ESM-1 gátlása potenciális therápiás cél lehet. Hasonló eredményről számolnak be egy másik munkában is (53), ahol a VEGF expresszió és a kapilláris sűrűség összefüggéseit vizsgálták gyomorrákban. 87 beteg anyagát tanulmányozták, immunhistochemiai vizsgálatok során anti-VEGF és anti-CD34 antitesteket alkalmaztak. VEGF-pozitivitás a betegek 71,2%-ában volt bizonyítható, ebben a csoportban az MVD 64-nek bizonyult, szemben a VEGF negatív csoportban mért 48,33 értékkel. Mindkét paraméter szorosan korrelált a nyirokérinvázióval és a tumoros differenciációval.

C. A makrocirkuláció működési zavarai tápcsatornai betegségekben, különös tekintettel a tápcsatornai vérzésekre

A tápcsatornai vérzések klinikai jelentősége vitathatatlan, az ellátás módját, helyét illetően azonban komoly irodalmi viták zajlottak az elmúlt két évtized során. Amíg a 80-90-es évekig inkább sebészeti osztályon kerültek elhelyezésre a vérző betegek, addig a következő években, döntően az endoscopos ellátási lehetőségek és az intenzív monitorozás fejlődése következtében elhelyezésük számos intézményben tényleges intenzív, vagy un. szubintenzív osztályon történt, de döntően belgyógyászati kereteken belül. Indokolta mindezt pedig az a tény, hogy a tápcsatornai vérzések sebészi ellátási szükségessége nem haladta és nem haladja meg a 10 %-ot. Ha a tápcsatornai vérzések mortalitásában és sebészi ellátási indikációiban nem is történtek látványos változások, a vérzések okában, epidemiológiai vonatkozásaiban azonban igen. Nevezetesen látványosan növekedett a kardiológiai, vagy reumatológiai indikációval aspirint, NSAID-ot szedő páciensek száma, ennek következtében folyamatosan emelkedett a jelzett gyógyszerek szedésével összefüggő tápcsatornai vérzések előfordulása is.

Az utóbbi évek egyik nagyszabású tanulmánya, a „Prometeo” study (54), akut, nem varixból eredő, felső tápcsatornai vérzőbetegek adatait gyűjtötte egybe, 13 olasz centrumból, 2006 nyaratól 2007 nyaráig (1. fázis), valamint 2008 decemberétől 2009 decemberéig (2. fázis). 1413 beteg (932 férfi, átlagéletkor 66,5 év, 481 nő, átlagéletkor 74,2) részletes feldolgozásából kiderült, hogy 83 %-ban voltak társbetegségek, 52,4% szedett aspirint, vagy NSAID gyógyszert, de csak 13,9 %-ban alkalmaztak gyomorvédelmet. A betegek 13,3 %-ában fordult elő már korábban is gastrointestinalis vérzés, transfúzióra 43,9 %-ban volt szükség. Az endoscopos vizsgálat eredményesen állapította meg a vérzésforrást 93,2%-ban. A vérzésforrások közül nyombélfekély volt a leggyakoribb (36,2%), gyomorfekélyt 29,6%-ban igazoltak, míg csupán felszínes erosiókat 10,9 %-ban irtak le. Az endoscopos vizsgálat során az esetek egyharmadában végeztek H. pylori infekció irányában vizsgálatot, ami a vizsgált esetek felében lett pozitív. Korai újravérzést 5,4%-ban tapasztaltak, közülük 14,3%-ban került sor sebészeti beavatkozásra, a vérzéssel összefüggő halálozás 4 %-nak adódott, multivariáns analízis során a halálos kimenetel a női nemmel (OR: 2,19), daganat jelenlétével (OR:2,7) többszörös társbetegség fennállásával (OR: 5,04), a felvételtől észlelt shock-állapottal (OR: 4,55), valamint a korai újravérzés előfordulásával (OR:1,47) mutatott összefüggést. Fontos kérdés, hogy mennyire tudjuk megjósolni a vérzés miatt érkező beteg súlyosságát, kimenetelét. Stanley AJ (55) elemzésében a két leggyakrabban emlegetett „risk scoring” rendszert, a Rockall score-t és a Glasgow blatchford score-t veti össze és elemzi további pontrendszerek tükrében, de jól látszik, hogy ez a kérdés még távolról sincs lezárva. Magunk is alkottunk, ill. alkalmaztunk ilyen rendszert (56), amelyben tulajdonképpen a Rockall score tökéletesítésére törekedtünk. Az aspirin kiterjedt használatával kapcsolatos újabb felmérést közöltek óriási beteganyagban a közelmúltban olasz szerzők (57), ebben 186425, kisdózisú aspirint szedő egyént hasonlítottak össze ugyanilyen létszámú kontrollcsoporttal, közel 6 éves követési periódus során. Az aspirint szedő csoportban 5,58 vérzés fordult elő 1000 fő/év vonatkozásában, szemben a kontrollcsoport 3,6/1000fő/év adatával, érdekes módon a cukorbetegség önmagában valamelyest növelte a vérzés esélyét, viszont az aspirin és a cukorbetegség együttesen már nem jelentett további kockázatnövekedést. Az USA-ban is központi kérdés a tápcsatornai vérzések epidemiológiájának alakulása, Laine L és mtsai (58) friss közleményében 2001 és 2009 között vizsgálták a felső és alsó tápcsatornai vérzések előfordulását, kórházi kezelésének és halálozásának változásait. Az életkorral és nemmel összefüggésben vizsgált adatok szerint a tápcsatornai vérzéses komplikációk előfordulása 100000 lakosra számítva 236,1-ről 223,7-re csökkent, ami nem szignifikáns változás, a halálozás 3,78 %-tól 2,7 %-ra csökkent. A vérzéseket három csoportra osztották, a hospitalizációt igénylő, komplikáltabb felső vérzések előfordulása 85/100000-ről 66/100000-re csökkent, míg a tisztázatlan eredetű vérzések 50,8-ról 53,3-ra emelkedtek és minimálisan nőtt a komplikált

alsó vérzések előfordulása is: 100,3-ról 104,4-re. A halálozást minden betegcsoportban növelte a perforáció (10,7% felső tápcsatornai perforáció, 16% alsó tápcsatornai perforáció esetén) és az elzáródás előfordulása. Szintén amerikai elemzés értékelte az akut vérzések mortalitását és ennek összefüggését a 24 órán belül elvégzett endoscopyával (59). Eredményeik szerint akut varixvérzés esetén a férfi nem, 60 év fölötti életkor, afro-amerikai származás, társbetegségek, az egészségügyi biztosítás típusa és a későbbi endoscopyos vizsgálat fokozták a mortalitást, a nem varix eredetű vérzéscsoportban a faji vonatkozás maradt ki az előzőek közül, ebben a csoportban ez nem „számított”. Különbféle korrekciós számítások után úgy találták, hogy akut varixvérzés esetén a 24 órán belüli endoscopyos vizsgálatra több esélye volt a fehér amerikaiaknak, akik 18–40 év közötti korúak voltak, privát biztosítással rendelkeztek és nem volt társbetegségük. Ezzel szemben az afro-amerikaiaknak kisebb eséllyel történt meg a 24 órán belüli endoscopyója és mortalitásuk magasabbnak adódott. Az akut varixvérzés ellátásában az utóbbi években sebészi beavatkozással viszonylag ritkán került sor, hiszen az endoscopyal nem kezelhető esetekben inkább a transjugularis intrahepatikus portosystemás shunt (TIPS) a választandó eljárás. Ezért is volt érdekes az az amerikai közlemény, amely sürgős portocavalis shunt műtétet hasonlított össze hosszabb távon az endoscopyos sürgős sclerotherapiával (60). 211 cirrhosisban szenvedő beteg közül 106-ot randomizáltak endoscopyos ellátásra, míg 105 esetén sürgős portocavalis shuntműtétre került sor, mindössze 8 órás elővizsgálatok után. A betegek 96 %-át 10 éves követés után értékelték. A 10 éves túlélés a sclerotherapiás csoportban mindössze 8 %-volt, szemben a műtött csoportban tapasztalt 51 %-al, szintén jobb volt a műtött csoportban a porto-systemás encephalopathia incidenciája: 179 epizód versus 93 esemény, a kumulatív vérigény: 1005 E versus 320 E, a kórházi újrafelvételek száma: 387 vs 292.

A percutan coronaria intervención átesett betegek kettős „antiplatelet” kezelést igényelnek, amihez általában protonpumpa gátló kezelést is kapnak, tápcsatornai vérzéssel komplikációk megelőzésére. Egy spanyol tanulmányban (61) 1219 konszekutív beteget követtek, közülük elbocsátáskor 96,7% volt kettős thrombocytagátló kezeléssel és 76,6% PPI terápián, ami a követés során 87,9%-ra emelkedett. A betegeket 1,72 +/- 1.07 évig követték, 8 beteg esetében a tápcsatornai vérzés már a kórházi tartózkodás alatt jelentkezett, 27 esetben pedig a követés során. A vérzéssel események 81,4%-a az első év során lépett föl, átlagosan 7 hónap telt el a vérzésig és 84,6%-uk tartós PPI kezeléssel volt a vérzés idején is. Az alsó vérzés közel 3x gyakoribb volt: 74% vs 26%, az előbbi csoportban az anamnesztikus fekélybetegség, az utóbbiban pedig a warfarin kezelés egyidejűsége volt az egyetlen kimutatható rizikófaktor. A konklúzió, hogy a tartós PPI védelem mellett fokozottabban kell gondolnunk alsó tápcsatornai vérzés lehetőségére. Akutan jelentkező felső tápcsatornai vérzés esetén nagy fontossága van a varixvérzés mielőbbi felfedezésének, tehát fontos, hogy milyen szempontok alapján kell erre gondolnunk. Egy 2020 beteget

feldolgozó, 21 kórházat érintő, másfél éves időtartamra vonatkozó retrospektive kanadai tanulmány (62) szerint 215 beteg (10,6%) vérzett varixból, ezt az anamnesisben szereplő májbetegség (OR: 6,36) az excessis alkohol fogyasztás (OR 2,28), a haematemesis (OR 2,65), a haematochesia (OR 3,02) és krónikus májbetegség jelei (OR 2,49) valószínűsítették leginkább. Míg az antithrombotikus gyógyszeres kezelés inkább más vérzésforrást valószínűsített (OR 0,44). A varixvérzés primér profilaxisa fontos terápiás kérdés, egy újabb meta-analysis (63) a beta blokkoló kezelést és az endoscopos varix ligációt vetette össze: 19 tanulmányban összesen 1483 beteget kezeltek, az általános vérzési arány szignifikánsan alacsonyabb volt a ligációs csoportban (OR 2,06), de ha csak a kifogástalan minőségű tanulmányokat vették tekintetbe, akkor az a különbség már nem volt szignifikáns, sem a vérzéssel összefüggő, sem az általános halálozásra, egyetlen vizsgált időpontban sem (6, 12, 18, 24 hónap után). A beta blokkoló kezelés gyakrabban okozott súlyosabb mellékhatásokat (OR 2,61), de a fatális mellékhatások a ligatúrával kapcsolódtak (OR 0,14), az összegzés tehát az, hogy a ligatúra valamivel jobbnak látszik az első varixvérzés kivédésére, de az eddigi eredmények még nem elégségesek a hangsúlyosabb ajánláshoz. Az endoscopos úton nem ellátható tápcsatornai vérzések életveszélyt jelentenek, az ilyen esetek akut sebészi ellátása mindig komoly kihívásnak számít, ezt jelzi az a friss német tanulmány (64), amely 91 beteg (58 férfi és 33 nő) ellátását elemzi 2000 és 2009 között. A betegek átlag életkora 67,4 év volt, a mortalitás pedig 34,1%-nak adódott! A vérzésforrás 57 betegben (62,6%) nyombélfekély volt, 25 esetben pedig gyomorfekély. Átlagosan 21 egység vérkészítmény adására került sor, a sebészi ellátás az esetek felében volt reszektiv, ill. nem reszektiv. A halálozás kockázatát az antikoaguláns gyógyszer használata, a postoperatív lélegeztetés szükségessége, a 7 napnál hosszabb intenzív osztályos elhelyezés növelte szignifikáns módon. A postoperatív komplikációk (pneumonia, sepsis, újravérzés, varratelégeltelenség) kockázatát pedig a 10 E-nél több vérigény, a második műtét szükségessége, az újravérzés fellépése és a hosszabb intenzív osztályos ápolás növelte meg, szintén statisztikailag szignifikáns mértékben. A konklúzió szerint az elmúlt évtizedben sajnos nem csökkent a sebészi ellátást igénylő tápcsatornai vérzőbetegek magas mortalitása, amit a növekvő életkor, a gyakori társbetegségek és az endoscopos ellátás sikertelensége okozta „negatív szelekció” magyaráznak. Ahogy már említettük, az egyik kiemelt betegcsoport, ahol a tápcsatornai vérzések előfordulása komolyabb kihívást jelent, azok a krónikus májbetegségek. Itt számos tényező játszhat szerepet, így például érdekes elemzés jelent meg cirrhosisban a SIRS (systemic inflammatory response syndrome) előfordulásáról és jelentőségéről (65). 203 cirrhosis miatt kórházba utalt betegből 81-ben volt megállapítható SIRS (39,9%), közülük 26 beteg halt meg (12,8%), 30-ban (14,7%) alakult ki hepaticus encephalopathia, 15-ben lépett föl varixvérzés. Szignifikáns összefüggést mutattak ki a SIRS fennállása és a sárgaság, bakteriális infekció, magas kreatinin szint, magas GPT szint, alacsonyabb

albumin szint, magasabb bilirubin szint és a megnyúlt INR érték között. A SIRS fennállása kifejezetten rossz prognózist jelentett, mind a halálozás, mind a varixvérzés vonatkozásában. Mivel a májbetegekben a tápcsatornai vérzések mortalitása magasabb, ezért ebben a betegcsoportban vizsgálták többen az „universalis vérzéscsillapítónak tekintett” humán recombináns aktivált VII-es faktor hatékonyságát, a Cochrane adatbázis felhasználásával (66). 493 randomizált beteget találtak, és a feldolgozás során nem sikerült bizonyítaniuk a rVIIaF előnyös hatását sem 5, sem pedig 42 nap után, igaz a thromboemboliás adverz események számában sem mutatkozott különbség. Nemcsak a varixvérzés, hanem a peptikus fekély is fontos ok lehet a májbetegek tápcsatornai vérzésében, egy érdekes tanulmányban (67) Taiwan-on a májcirrhosis és a visszatérő peptikus fekélyvérzés kapcsolatát tanulmányozták, a nemzeti adatbázis segítségével. 1997 január és 2006 december között 271 ezer beteget kezeltek kórházban peptikus fekélyvérzés miatt, közülük 9711 betegnek volt portális hipertensióval járó cirrhosisa. Az elemzés szerint májcirrhosisban hosszabb távon is gyakoribb a rekuráló fekélyvérzés, mint a kontrollcsoportban, ez csupán idősebb korban nem érvényes, az egyéb okból bekövetkező magasabb halálozás miatt. A nyelőcső varixvérzés a cirrhosisban szenvedő betegek körében az egyik legfontosabb halálok, egy portugál tanulmányban a kórházon belüli mortalitás kockázati tényezőit tanulmányozták (68). 102 beteg esetét dolgozták föl (átlagéletkor 55,4 év volt, a betegek több, mint 2/3-a férfi volt), valamennyi esetben 12 órán belül megtörtént az endoscopia és felvételt követően elindult az octreotide, vagy terlipressin kezelés, ami optimális esetben 5 napig tartott. A MELD score és a Child-Pugh score kiszámolásához szükséges laboratóriumi vizsgálatokat 6 órán belül végezték el. A kórházon belüli halálozás 18,6% (19 fő) volt, ennek kockázatát a 100 G/l alatti vérlemezke szám, a 2E-nél több vértranszfúzió, a >10 Child-Pugh score és a >18 MELD score növelték. A krónikus vesebetegségben szenvedőkben a tápcsatornai vérzések kimenetele több közlemény tárgya, egy amerikai tanulmányban (69) a nemzeti kórházi felvételi adatbázist használva 1000 kórház közel 8 millió felvételi adatát elemezték. 2007-ben 398213 felvétel közül, melyben az elsődleges diagnózis felső tápcsatornai vérzés volt, 35985 esetben volt szó krónikus vesebetegségről és 14983 esetben végstádiumú veseelégtelenségről, az esélyhányados tápcsatornai vérzés miatti hospitalizációra 1,3-nak, ill. 1,84-nek adódott a két vesebeteg csoportban, a összesített halálozás kockázata pedig 1,47-nek, ill. 3,02-nek. Tehát a végstádiumú vesebetegek tápcsatornai vérzéssel összefüggő halálozási esélye mintegy 3x magasabb, ami fokozott figyelmet igényel. Egy másik dolgozatban (70) dializált betegek tápcsatornai vérzését elemezték, különös tekintettel az akut, nem varix eredetű felső vérzések előfordulására és a 30 napos mortalitásra. 948345 beteg alapján 2296323 beteg-évet dolgoztak föl 1997-től 2008-ig terjedő időtartamban. A vérzéseket nem csillapodó, súlyosabb és spontán csillapodó, enyhébb kategóriára bontották, ennek megfelelően 1000 betegévre számítva a

súlyosabb vérzések előfordulása 57 epizódus volt 1997-ben, az enyhébb kategóriában pedig 328 epizódus szerepelt. A következő 10 év során az előfordulás évente 2,7 %-al, illetve 1,5 %-al csökkent. A 30 napos mortalitás ebben a súlyos betegcsoportban 1997-ben 11,8%-nak adódott, ami nyilvánvalóan magasabb az átlagpopulációban tapasztalt nem varix eredetű vérzéses mortalitásnál. A javuló ellátásnak köszönhetően a súlyosabb formában évente 2,3%-os mortalitás csökkenést kalkuláltak, az enyhébb csoportban pedig évi 2,8%-os mérséklődést.

Egy következő tanulmányban (71) hétéves periódus tapasztalatait dolgozták föl, 2004-2011 között felső tápcsatornai vérzés miatt fölvetett 1000 páciens adatai alapján. 54 % volt a férfi, átlagéletkoruk 52 év volt, 88%-ban sürgősségi felvételre került sor és csak 12 %-ban jelentkezett a vérzés kórházi tartózkodás közben. A betegek 68 %-ának volt társbetegsége, 50 %-uk esetében májbetegség is ismert volt. 724 esetben történt endoscopos vizsgálat. Varixvérzést 31 %-ban diagnosztizáltak, peptikus fekélyt 28 %-ban. 232 esetben volt aktív a vérzés, vagy láttak ércsonkot az endoscopia során, ilyenkor endoscopos ellátás történt, ami 207 esetben (89%) volt eredményes priméren. 13 betegnél további vérzés miatti újabb endoscopos ellátásra volt szükség, míg sebészeti beavatkozást csak 9 beteg igényelt (0,9%). A betegek 68 %-a távozott javult állapotban, az általános halálozás 15 %-nak adódott, de a 60 évnél idősebbek között 24 % volt, a májbetegségei között pedig 22%, közvetlenül a varixvérzésben 9% halt meg. Ez az elemzés is hangsúlyozza a májbetegség fontosságát. Szintén jelentősége van a vérzések létrejöttében a betegek által szedett gyógyszereknek, mindenekelőtt a nem-steroid gyulladáscsökkentő gyógyszereknek (NSAID), egy japán tanulmányban 305 fekélyvérző és 76 fekélyperforáció miatt felvett beteg adatai elemezték, 2000 és 2008 között (72). A perforáló fekélyek közül 22 esetben volt NSAID szedés igazolható, míg a 305 fekélyvérző esetében 94 betegben NSAID szedés, valamint további 55 esetben kisdózisú aspirin szedés szerepelt a kórelőzményben. A halálozás az NSAID csoportban 12,8%, az aspirin csoportban 10,9 % volt, szemben az ilyen típusú gyógyszert nem szedő fekélyvérzők szignifikánsan alacsonyabb, 2,6%-os mortalitásával! Egy tajvani tanulmányban (73) cirrhotikus beteganyagban vizsgálták a különböző típusú NSAID készítmények hatását. 4876 beteg anyagát dolgozták föl 2006-ban. Varixvérzést és fekélyvérzést egyaránt beszámítottak, celecoxib mellett a vérzés fellépésének esélye 1,44 volt, míg a nem szelektív orális NSAID csoportban ez 1,87-re nőtt, parenterális NSAID alkalmazása hasonlóképpen, 1,9-re növelte a gastrointestinalis vérzéses komplikációk előfordulásának esélyét. A protonpumpa gátlók és a H₂ receptor antagonisták használata minden csoportban valamelyest csökkentette a gyógyszer toxicitást. Álláspontjuk szerint egyértelmű különbség állapítható meg a celecoxib javára a nem szelektív NSAID-okkal szemben. Az akut varixvérzés endoscopos ellátására a scleroterapia és a ligációs eljárások szolgálnak, azonban az esetek mintegy 10 %-ában ezek nem tudják megállítani a vérzést, ilyenkor ballon-

tamponád lehelyezése válik szükségessé. Egy új tanulmány öntáguló fémstent alkalmazását írta le ebben a helyzetben (74), amivel 8 beteget kezeltek. Az akut vérzés valamennyi esetben megállt és nem is tért vissza, amíg a stent a nyelőcsőben maradt. Egyikükben a stentelést követően röviddel TIPS behelyezésére került sor, egy másik beteg pedig májtranszplantációra került. A többi 6 beteg esetében az öntáguló stentet átlagosan 11 nap után távolították el, közülük 3 esetben 9 napon belül újabb vérzést észleltek. Úgy vélik, hogy az akut siker ellenére ez a technika csak átmeneti lépést jelenthet a tartósabb megoldások felé vezető úton. Fontos tanulmány jelent meg a TIPS hosszútávú hatékonyságával kapcsolatban (75), egy chicagói munkacsoport 128 beteget követett 1998 és 2010 között, akik refraktaer varixvérzés miatt TIPS-et kaptak. 82 férfi és 46 nő, átlagéletkor 52 év, átlagos Child-Pugh score 9, MELD score 18 volt. 2004-ig fedetlen Wallstentet alkalmaztak, ettől kezdve pedig fedett graftot. A behelyezés technikai sikeressége 100 % volt, a portosystemás nyomásgrádiens átlagosan 13 Hgmm-rel csökkent, 30 nap után 14 %-ban fordult elő encephalopathia, a shunt átjárhatósága 30 nap, 1 év és 2 év után 93%, 82% és 60 % volt. TIPS dysfunctio gyakrabban fordult elő a fedetlen stentek esetében (29% vs.11%), de az újrávérzés vonatkozásában nem volt érdemi különbség: 1 év után 22%, 2 év után 29%, illetve ahol a varixok embolizációjára is sor került, ott csak 5% volt az újrávérzés 1 év után. Az átlagos túlélés 30 nap után 80%, 1 év után 69 %, 2 év után pedig 65 % volt, a fedetlen és a fedett stent mortalitási rátája nem különbözött szignifikánsan (35% vs 26% $p=0,31$). Elmondható tehát, hogy a TIPS módszer kiállta az idő próbáját. A klinikai gyakorlatban gyakran jelent komoly kihívást a gastrointestinalis vasculáris malformációkból, angiectasiákból származó, visszatérő, esetenként jelentős anaemiát okozó vérezgetések kezelése. Újabban felmerült az angiogenesis folyamatát gátló thalidomide jótékony hatásának lehetősége ebben a témakörben, egy fontos kínai eredetű tanulmányban, amit azonban a Gastroenterology-ban közöltek, 4 hónapos orális thalidomide (100 mg/die) kezelés hatékonyságát vizsgálták, átlagosan 3 éves utánkövetés során. Egy év elteltével elemezték a vérzéses epizódusok számát, a vérzés megszűnésének arányát, a hospitalizációk alakulását, a transzfúzió igényt. Minden vonatkozásban szignifikánsan jobbnak bizonyult a thalidomide-dal kezelt csoport – 71,4% vs. 3,7 % - és a mért VEGF szint is szignifikánsan csökkent ebben a csoportban, lényeges mellékhatást nem tapasztaltak (76). Hasonló problémát jelent esetenként az Osler kóros betegek (hereditaer haemorrhagiás teleangiectasia) kezelése is. Egy izgalmas esetbeszámolóban 85 éves nőbeteg kezelhetetlen, életet fenyegető vérezgetéseit kísérelték meg befolyásolni Avastin (bevacizumab) infúzióval és beszámolójuk szerint a kezelés látványos eredménnyel járt (77).

II. 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 világreszeken 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 háttér továbbra sem ismert, mégis az elmúlt 10 évben jelentős előrelépések történtek ezen a területen, amelyek alapvetően változtatták meg e kórképekről alkotott elképzeléseinket. Ez a fejlődés szolgált alapul az úgynevezett biológiai kezelés különböző formáinak bevezetéséhez, egyben előrevetíti a további kutatási utakat és előrelépési lehetőségeket. Új felismerések születtek az bélhám működéséről, permeabilitásáról, a bélben élő baktérium mikroflóra 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 egyik meghatározó tényezője az EDRF-NO (endothelial derived relaxing factor-nitrogen oxide) rendszer, mely a szervezet egyik általános és alapvető mediátor és effektor anyagát az NO-t termeli L-argininből. A nitrogén (mon)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 (78,79,80). 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 teljesen tisztázott. Az epithelium, a nyálkahártyát infiltráló gyulladásos sejtek, valamint a bélfal mikrokeringésének 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 mindez valószínűleg eltérő módon érvényesül a Crohn betegségben, illetve a colitis ulcerosa-ban.

Munkánk során a nitrogén oxid szintetáz izoformák expressziójának minőségi és mennyiségi vizsgálatát végeztük Crohn-os és colitis ulcerosás betegek bélnyálkahártyájából vett mintákban, valamint a bélgyulladás különböző fázisaiban lévő betegek szérumával kiegészített tápfolyadékkal kezelt, tenyésztett humán köldökzsínór véna endothelsejtekben (HUVEC). Célunk az NO szerepének megvilágítása, a különbségek regisztrálása volt a gyulladásos bélbetegségek különböző formáiban, és ezeknek a felismeréseknek esetleg gyakorlati, differenciáldiagnosztikai szempontból való értékelése.

A nitrogén oxid és nitrogén oxid szintetáz izoformák

A nitrogén oxid szintetáznak (NOS) három különböző formája ismert. Az I. típusú NOS, vagy neuronális NOS (nNOS), egy citoplazmában lévő szolubilis enzim, mely elsősorban az agyban van jelen, de megtalálható a gerincvelőben, a perifériás idegekben, vázizomzatban, vesében és pancreasban is (81). Konstitutívan expresszálódik az intracelluláris Ca^{++} minimális emelkedésének hatására az idegsejtekben és idegvégződéseken. A hatására keletkező NO többek között a tanulási és memória funkciókban, a fájdalom ingerek kialakulásában és a gasztrointesztinális motilitás befolyásolásában vesz részt.

A II. típusú NOS, vagy indukálható NOS (iNOS), szintén szolubilis enzim és neutrophil granulocytákban, monocytákban, macrophagokban, T-lymphocytákban, endothel, epithelialis valamint egyéb sejt típusokban fordul elő (82). Transzkripciós szinten szabályozható, bakteriális lipopolysaccharidok és gyulladásos citokinek 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^{++} -kaldmodulin függő és a vascularis tónus valamint az endothelium homeostázisának fenntartásában játszik jelentős szerepet. Konstitutívnak tekinthető, kismennyiségben termel NO-t, mely aktiválja a szolubilis guanilát-cikláz enzimet és ezzel a másodlagos hírvívő cGMP szintézisét elősegítve, a fiziológiás simaizom tónus fenntartását biztosítja (83,84,85,86).

A Th1 és a macrophag eredetű citokinek, mint a TNF- α , TNF- β (lymphotoxin- α , INF- γ) vagy IL-1 β , önmagukban, vagy együttesen iNOS expresszót indukálnak, és egyúttal fenntartanak egy általános gyulladásos választ, más citokinek, endothelialis sejtadhéziós molekulák (ECAM) és enzimek indukálásával. A folyamat részletei nem tisztázottak, de *in vitro* vizsgálatok azt mutatják, hogy ezek a mediátorok aktiválják az NF- κ B-t. Az NF- κ B ubiquiter transzkripciós faktor, az immunfolyamatok és a gyulladásos reakciók pleiotrop szabályozó molekulája (87). Aktiválódását követően az NF- κ B a sejtmagba transzlokálódik és különböző gének promoter régióihoz kötődve aktiválja a gyulladásos és immunválaszban fontos gének transzkripcióját, így pl. az IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , ICAM-1 (intercellular cell adhesion

molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), E-selectin, iNOS, COX-2 képződését indukálja. Az NF- κ B a Rel transzkripciós faktorok családjába tartozó, heterodimer molekula, amely egy p50 és egy p65 alegységből áll és a citoplazmában található az I κ B inhibitor molekulával együtt. Aktiválódása különböző bakteriális és vírus eredetű anyagok hatására történik.

Az NF- κ B aktivációs mechanizmusa még nem teljesen tisztázott. A különböző aktiváló tényezők több jelátvivő utat aktiválnak, melyek az intracelluláris reaktív oxigén metabolizmus erősítése irányába konvergálnak (88, 89). Az intracelluláris oxidatív stressz hatására egy vagy több redox érzékeny kináz aktiválódik, amelyek specifikusan az I κ B-t foszforilálják. Ez a foszforiláció teszi lehetővé egy nem-lizozomális ATP-függő 26S proteolitikus komplexnek az I κ B lebontását, ami lehetővé teszi a p50/p65 heterodimer fehérje transzlokációját a sejtmagba. A 26S proteoszoma fontos része az NF- κ B aktivációjának, szelektív gátlása blokkolja az ICAM, E-selectin, és VCAM citokin aktivációját és a következményes sejt-endothel interakciót.

Az NO sejt és szöveti hatásai

Az NO a gastrointestinális hámsejtek funkcióinak fenntartásában is fontos, és fokozza a gyomor és bélhám szekréciót (90). A szolubilis guanilát-cikláz aktiválásán keresztül a gyomorban a mucin termelődését segíti elő a cholinerg receptorok aktiválásának következtében (83). Potens vasodilatátorként a megfelelő vérellátás biztosítása által a nyálkahártya védekező funkcióit támogatja (81). Ugyanez a hatása érvényesül szepszisben is.

A gyulladásos cytokinek befolyásolják és szabályozzák az endotheliális NO szintet, amely az endothel homeosztázisának fontos eleme (91). Az endothelsejt apoptózisát a gyulladásos cytokinek és a reaktív oxigén gyökök fokozzák, míg az eNOS eredetű NO gátolja. Az apoptózis gátlása hozzájárul az endothel eredetű NO gyulladáscsökkentő és angiogenetikus aktivitásához (92).

Az NO csökkenti az adhéziós molekulák expresszióját a neutrophil granulocytákon és az endotheliumon, ezáltal csökkenti a leukocita adhéziót, és valószínűleg gátolja a hízósejtek aktivációját (93,94). Az NO csökkenti a macrophag citokin termelést ugyanakkor az iNOS eredetű NO a macrophagokban meghatározó jelentőségű a baktériumok elleni védekezésben. Oxidatív stressz körülményei között gyökfogóként csökkenti a sejtkárosodást. Az iNOS aktivitás bizonyítottan proliferáció gátlással, fokozott apoptozissal és cytotoxikus aktivitással társul. Az NO sejtkárosító hatásának pontos mechanizmusa nem ismert. Az egyik elképzelés szerint, az iNOS eredetű NO oxigén szabadgyökökkel, pl. szuperoxiddal reagálva peroxinitritet képez, amely elősegíti a tirozin oldalláncok nitrotirozinná történő átalakítását (95). Magas NO szintek esetén fokozódik a DNS károsodás, romlik a vas-kén tartalmú enzimek működése és a mitokondriális légzés (96,97,98,99).

Az NO és a gyulladásos bélbetegségek

a. Az iNOS vizsgálata klinikai tanulmányokban

A NO-nak mint gyulladásos mediátornak a vizsgálata colitis ulcerosában és Crohn betegségben gyakran ellentmondó eredményekhez vezetett. A citrullin szint alkalmas lehet az iNOS aktivitás meghatározására, miután az NO-val equimoláris mennyiségben keletkezik az argininből NOS hatására. A citrullin szintet magasnak találták aktív colitis ulcerosás betegek rectális biopsziás mintájában (100). NOS gátló N^G -monomethyl-L-arginin (L-NMMA) hozzáadása a biopsziás mintákhoz csökkentette a citrullin szintet (100). Más vizsgálatokban az iNOS aktivitás szignifikánsan magasabb volt colitis ulcerosás nyálkahártyában, mint a kontrollban de nem volt magasabb Crohn betegekben a kontrollhoz viszonyítva (101,102).

Az NO meghatározás más módjai a lumenális gáz közvetlen kimutatása, a nyálkahártya NO szintjének elektródokkal való mérése, valamint az NO metabolitok követése. A vastagbél gázok chemiluminescenciás technikával történő vizsgálata jelentősen magasabb NO tartalmat mutatott colitis ulcerosás betegekben a kontrollhoz képest (103). Hasonló technikát alkalmazva az aktív colitis ulcerosás betegekhez hasonlóan magas NO szinteket detektáltak Crohn betegség különböző klinikai formáiban is (104). Ugyanakkor jelentősen nagyobb NO gáz mennyiség volt észlelhető collagen colitisben, mint colitis ulcerosában ami megkérdőjelezhetné az NO jelentőségét mediátorként gyulladásos bélbetegségekben (105).

A nyálkahártya NO, colonoscopon át bevezetett elektródákkal történő közvetlen mérése colitis ulcerosában, a makroszkóposan ép és fekélyes területeken is szignifikánsan magasabb értékeket mutatott, mint a kontroll csoportban (106). A steroid kezelés mintegy felére csökkentette a nyálkahártya NO tartalmát (106). A nitrit, mint az NO stabil metabolitja, a vizeletben - standard körülmények között és fertőzés hiányában - jelezheti az NO aktivitás mértékét. Az aktív colitis ulcerosás betegek 12 órás illetve 24 órás gyűjtött vizeletének nitrit tartalma jelentősen magasabbnak mutatkozott az inaktív colitis és a kontroll csoporthoz képest (107). Saját megfigyeléseink is voltak hasonló irányban (128).

Összességében tehát az iNOS expresszió és aktivitás, illetve a NO termelés általában magasabb IBD-ben. Ez az összefüggés határozottabb colitis ulcerosában és bizonytalan Crohn betegségben. Tisztázatlan tehát, hogy a NO nemspecifikus markere-e a bélgyulladásnak, vagy közvetlen mediátora a gyulladásos válasznak. A magas szöveti iNOS aktivitás és NO szint jól korrelált a colitis ulcerosa klinikai és endoscopos aktivitásával (108). Az NO, illetve a szérum és vizelet nitrit szintje, jó megfelelést mutatott a C-reaktív protein, a vvt süllyedés, a fehérvérsejt és a thrombocyta szám értékével (107, 109). Az iNOS expresszió korrelációja a betegség aktivitásával Crohn betegségben kevésbé egyértelmű (110,111).

b. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az iNOS fehérje expresszió fokozott volt colitis ulcerosás betegek lamina propria-jában, valamint az epitheliális sejtek citoplazmájában a kontroll mintákhoz képest (112). Hasonló eloszlást észleltek Crohn betegségben is (113). Fokozott iNOS expressziót és az iNOS+ keringő monocyták magasabb arányát figyelték meg IBD betegeken (114).

A konstitutív NOS izoformák expressziója is megváltozik colitis ulcerosában. Az nNOS csökkent a muscularis mucosae-ban, míg az eNOS fokozott volt a lamina propria területén (115). A magas iNOS szint nem specifikus IBD-re, mivel fokozott expressziót találtak infektív colitisben is az epithel sejtekben, amely a gyógyulás során csökkent (116). Az intenzív iNOS festődés mellett, nitrotirozin pozitivitás is kimutatható colitis ulcerosás és Crohn betegek nyálkahártya epithel sejtjeiben, jelezve az NO – peroxinitrit - nitrotirozin folyamatsort, amely a celluláris fehérjéket károsítja (117).

c. Az NO colitises állatmodellekben

Trinitro-benzolszulfonsav (TNBS) által indukált tengerimalac ileitisben N^G-nitro-L-arginin (L-NAME), egy nem szelektív NOS inhibitor hatására, a gyulladásos eltérések csökkentek (118). Szelektív iNOS gátló aminoguanidin (AG) szintén csökkentette a gyulladás intenzitását hasonló modellen (119). Peptidoglican/polysaccharid indukálta patkány colitisben az L-NAME és AG egyaránt csökkentette az NO termelődését, a vizeletben és szérumban mért nitrit/nitrát szintek alapján (120). Hasonlóan csökkent a myeloperoxydase aktivitás, a colitisre jellemző bélfal megvastagodás és az intesztinális izom hyperplasia (121,122). Más vizsgálatokban azt találták, hogy a NOS gátlás ideje meghatározó lehet, TNBS előtt adott L-NAME rontja a colitist, míg fordítva a colitis javult. Valószínű, hogy a korai gátlás a konstitutív NOS kiesésével a védő hatás elmaradásához vezet (123).

Az iNOS káros hatását bizonyító vizsgálatok mellett több kísérlet számolt be gyulladáscsökkentő, védő határról is. TNBS indukált patkány colitis modellen az L-NAME-val történő gátlás fokozta a gyulladásos eltéréseket (124). Patkányon DSS indukált colitisben az L-NAME és az AG kezelés is károsnak bizonyult (125).

Az iNOS hiányos genetikai modelleken indukált colitisekben egymásnak ellentmondó elváltozásokat észleltek az iNOS szerepére vonatkozóan (126, 127).

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

A fentiek alapján tehát megállapítható, hogy széleskörű vizsgálatok ellenére sem tekinthető tisztázottnak az NO-nak a krónikus gyulladásos bélbetegségekben játszott szerepe. A legtöbb vizsgálatban magas NO szintet és

fokozott NOS expressziót találtak colitis ulcerosás vastagbél nyálkahártyában, ugyanakkor a Crohn betegségben mért értékek ellentmondásosak (110). Újabban az IBD különböző formáiban mért eltérő szérum és vizelet nitrit szintek (78, 109, 128) alapján felmerült, hogy az NO mennyiségek a gyulladás mértékét illetve különböző formáit jellemzik, és magyarázatot nyújthatnak az észlelt microvasculáris szerkezeti változásokra és bélmotilitásbeli különbségekre (82, 92, 129).

d. Az arginin metabolizmus alternatív útjai

Az arginin metabolizmus kompetitív útja az argináz által történő bontás melynek eredményeként L-ornithin és urea keletkezik, az előbbi az ornithin-dekarboxiláz (ODC) szubsztrátumaként poliaminokká alakulhat. A poliaminok a vastagbél hámsejtek növekedését serkentik és befolyásolják a nyálkahártya apoptózist pro-apoptotikus vagy anti-apoptotikus irányba, egyúttal csökkentik a mononukleáris sejtek veleszületett immunválasz potenciálját (130, 131, 132, 133, 134). Az argináz hatása tehát a bélgyulladásban két módon érvényesül: egyrészt az iNOS kompetitív gátlásával, másrészt a poliaminok termelésével, melyek a bél pathofiziológiáját modulálják. Két argináz forma különíthető el, az I. típus, amely elsősorban a májsejtekben található és a II. típus, mely a legtöbb szövetben előfordul a mitochondriumokhoz társulva (135).

Fokozott argináz aktivitást észleltek colon tumorban és colitisekben (136). Ellentmondó eredmények születtek az ODC decarboxiláz aktivitásáról IBD-s szövetben (137, 138, 139).

Az állatkísérletek során arginin adása egyes esetekben enyhítette a gyulladást, más esetekben fokozta a szöveti károsodást a magas iNOS aktivitás és NO szint révén (140, 141, 142). Más állatmodellekben az argináz-ODC rendszer erősítésével és a NOS gátlásával sikerült védő hatást elérni. Az ellentmondások magyarázatául szolgálhat, hogy a NOS gátlók nem teljesen szelektívek és potenciális argináz gátló hatásuk is lehet. (143, 144).

e. A HUVEC és NO

A humán köldökvér véna endothelsejtek (HUVEC) tenyésztését gyakran használják, mint specifikus modellt az endothelium működésének vizsgálatára. A HUVEC rendkívül érzékeny azokra a gyulladáskeltő ágensekre, melyeket a különböző citokinek önmagukban vagy együttesen különböző összetételben képviselnek. Az NO-t a HUVEC-ben konstitutívan az eNOS termeli, míg bizonyos stimulusok hatására az iNOS. (145-146). A termelt NO hozzájárul az endothelsejtek apoptózisának, proliferációjának, valamint sejt differenciációjának (angiogenezis) szabályozásához (147, 148, 149).

A kísérletes, laboratóriumi vizsgálatok célkitűzései

1. A iNOS és eNOS expressziójának és lokalizációjának vizsgálata colitis ulcerosás és Crohn betegek bélnyálkahártya biopsziás mintáiban.
2. A NOS expressziót mutató sejtek és szövetstruktúrák azonosítása (kettős jelölésű immunhisztokémiai technikákkal) és összehasonlítása a különböző betegségformákban, valamint azon belül a vastagbél makroszkóposan gyulladt vagy gyulladásmentes szakaszai között.
3. A minőségi vizsgálatok mellett (hisztokémia, immunhisztokémia), a különböző betegcsoportokból nyert colonoscopos biopsziás minták NOS proteinjének mennyiségi meghatározása Western blott technikával.
4. A vasculáris státusz összehasonlítása colitis ulcerosás és Crohn-os vastagbél biopsziás mintákban, különös tekintettel a neovascularizációs jelenségekre.
5. A klinikai kép, aktivitási tünetek, és a NOS izomerek expressziója közötti összefüggés vizsgálata.
6. A NADPH-diaforáz expressziójának és lokalizációjának vizsgálata colitis ulcerosás és Crohn-os vastagbél biopsziás mintákon.
7. A NADPH-diaforáz és a NOS izoformák co-lokalizációjának vizsgálata IBD-s vastagbél biopsziákban.
8. Az eNOS és iNOS expressziójának, lokalizációjának és változásainak regisztrálása colitises és Crohn-os szérummal kezelt konfluens és semi-konfluens HUVEC tenyészetekben. A különböző típusú gyulladásos szérumok által kiváltott változások összehasonlítása.
9. A sejtek viabilitási mutatóinak, az apoptotikus és nekrotikus aktivitásnak valamint a sejt proliferáció változásainak a vizsgálata IBD-s szérummal kezelt HUVEC tenyészetben a NOS izoformák expressziójának függvényében.
10. TNF- α és ezt gátló infliximab antitest hatásának vizsgálata HUVEC-tenyészetben.
11. Infliximabbal kezelt betegek szérumából készített tápfolyadékok hatásának vizsgálata a HUVEC eNOS aktivitására és VEGFR expressziójára.

Anyagok és módszerek

Betegek kiválasztása, kezelése

A vizsgálatban résztvevő IBD-s betegek tartósan fennálló colitis ulcerosában (CU) vagy Crohn-betegségben szenvedtek, a colonoscopos 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, de a nem-stenotizáló és nem-penetráló gyulladásos formákat vizsgáltunk, melyet a bécsi Crohn-betegség osztályozás (Vienna classification, 1998) alapján határoztunk meg. A Crohn-betegeknek magasabb 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.

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

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

G₀₋₃: A colitis ulcerosa endoscopos gyulladásos foka (Lennard-Jones, Br Med J, 1964, 1:89)

CDEIS: A Crohn betegség endoscopos súlyossági indexe (Modigliani, Gut, 1989, 30:983-89)

UC-DAI: Colitis ulcerosa aktivitási index (Truelowe-Witts, Br Med J, 1955, 2:1041)

CDAI: Crohn betegség aktivitási index (Best, Gastroenterol, 1979, 77:843)

5-ASA: 5-amino-salicyl sav

Biopszia mintavétel

A vastagbél biopszia mintákat IBD-s betegekből a gyulladt és makroszkóposan a gyulladás által megkímélt sigma és jobb oldali colon területekről vettük. (1. táblázat). A kontroll mintákat colorectalis carcinoma szűrésen résztvevő, egészséges egyének 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 fagyaszttóban (-80°C) tároltuk.

Szövettani 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, továbbá 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 specifitásának 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 specifitását 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 foszfátázzal (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 endoszkóposan gyulladt CU és Crohn-beteg, valamint kontroll vastagbélből vett biopsziákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd dörzscsészében nitrogén alatt porrá őröltük és a mintákat – 70 °C-os fagyasztóban tároltuk felhasználásig. A mintákat RIPA lízis puffer-ben (0.01 M NaH₂PO₄, 1% Nonident P-40, 1% Na-deoxycholate, 0.1% Na-dodecil szulfát (SDS), 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA, 100 U/μl proteáz inhibitor keveréket (Sigma-Aldrich) használva homogenizáltuk. Az összfehérje tartalmat BCA módszerrel határoztuk meg, kontrollként BSA-t használva. ELISA leolvasóban 540 nm-en. A kapott értékeket GraphPad Prism szoftverrel, lineáris regressziós függvény alkalmazásával határoztuk meg mg/ml-ben. A teljes homogenizátum 100 μl-éhez 80 μl mintapuffert (100 mM Tris pH 6.8, 0.2% bromfenol kék, 20% glicerin) és 20 μl β-merkaptotetanolt adtunk és az oldatot 5 percig főztük 100 °C-on. Mindegyik mintából 20 μl fehérje-oldatot (1 mg/ml) vittünk fel 10% SDS-polyacrylamid gélre, és a fehérjéket elektroforetikusan szétválasztottuk 120V feszültség mellett 1 órán keresztül. A fehérjéket a gélről nitrocellulóz membránra (Pharmacia, Bécs, Ausztria) blottoltuk (100 V-on 90 perc) transzfer pufferben (192 mM glycine, 25 mM Tris-base, 20% methanol) folyamatos kevertetés és hűtés 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 torma-peroxidáz (Vector, Bulingam, CA, USA) PBS-Tween-ben. A membrán ismételt 3 x 5 perces PBS-Tween-ben, majd egyszer PBS-ben történő mosása után, a blottokon kifejlődő immunreakciókat kemilumineszcens reagenst tartalmazó kit (Pierce, Rockford, Illinois, USA) segítségével hívtuk elő röntgen filmen. Mennyiségi analízis céljából, azonos betegségből származó, három különböző homogenizátumból készült immunreaktív sáv intenzitásainak átlagát számítottuk, a sávok denzitometriás analízise alapján (Molekuláris Analízis Szoftver térfogató elemzésre, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A denzitometriás analízishez kontrollként BSA-t vagy myosin-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 sejtszuszpenziót 1000 rpm fordulattal 15 percig centrifugáltuk, a felülúszót leszívtuk és a sejteket újra szuszpendáltuk tenyésztő folyadékban.

A sejteket (2×10^6 sejt/ml koncentrációban) oltottuk Greiner műanyag tenyésztőedényekbe. 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 tároltuk. A mintákból immunoblottot a biopsziákhoz hasonlóan készítettünk. 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. Azokat a 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 benőtt 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 biopsziás 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) vizsgáltuk. 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ avidin-fluoreszcein-nel inkubáltuk szintén 15 percig. Mosás után a fedőlemezen lévő sejteket tárgylemezre csöppentett PBS-glicerin 1:1 oldatra fektettük. A sejtosztódás aktivitásának valamint az apoptózis/nekrozis vizsgálatára jelölt sejteket a lefedés előtt 1% toluidin-kékkel festettük, mely a sejtmagok festődésén keresztül a teljes sejtszám meghatározására adott lehetőséget. A sejtváz alakjának és épségének vizsgálatát az aktin rostok 0.2 $\mu\text{g/ml}$ falloidin-FITC-cel (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 fénnnyel 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 μl 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 µl 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 százat.

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 µl 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)

Citokinek 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 citokineket CBA Cytokine Flex bead –ekkel mértük meg a sejtenyészetek felülúszójából, 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.

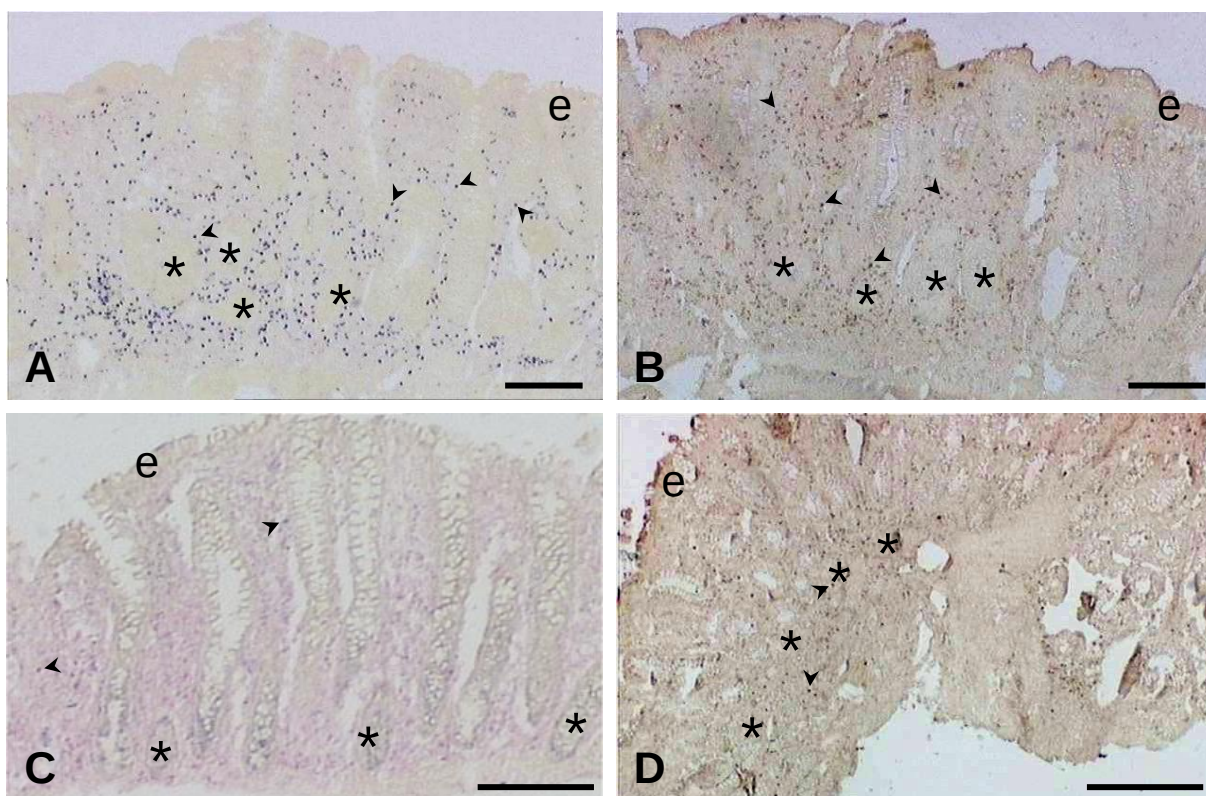
Statisztika

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

Az iNOS+ immunreaktív sejtek megoszlása és jellemzése IBD nyálkahártyában

Aktív colitis ulcerosa gyulladt területein jelentős mennyiségű, hisztokémiaileg NADPH-diaforáz reakciót adó sejtet észleltünk. (2.1A ábra). A NADPH-diaforáz pozitív sejtek főként a Lieberkühn kripták mélyén és falaik mentén helyezkedtek el. Párhuzamos metszeteken iNOS ellenes antitestekkel végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy az iNOS immunreaktív sejtek és a NADPH-diaforáz pozitív sejtek eloszlása és morfológiai jellemzői megegyeztek. (2.1B ábra) A colitis ulcerosás mintákkal ellentétben Crohn betegekből származó mintákban szembetűnően kevesebb volt a NADPH-diaforáz pozitív (2.2A) és az iNOS (2.2B) immunreaktív sejtek előfordulása.



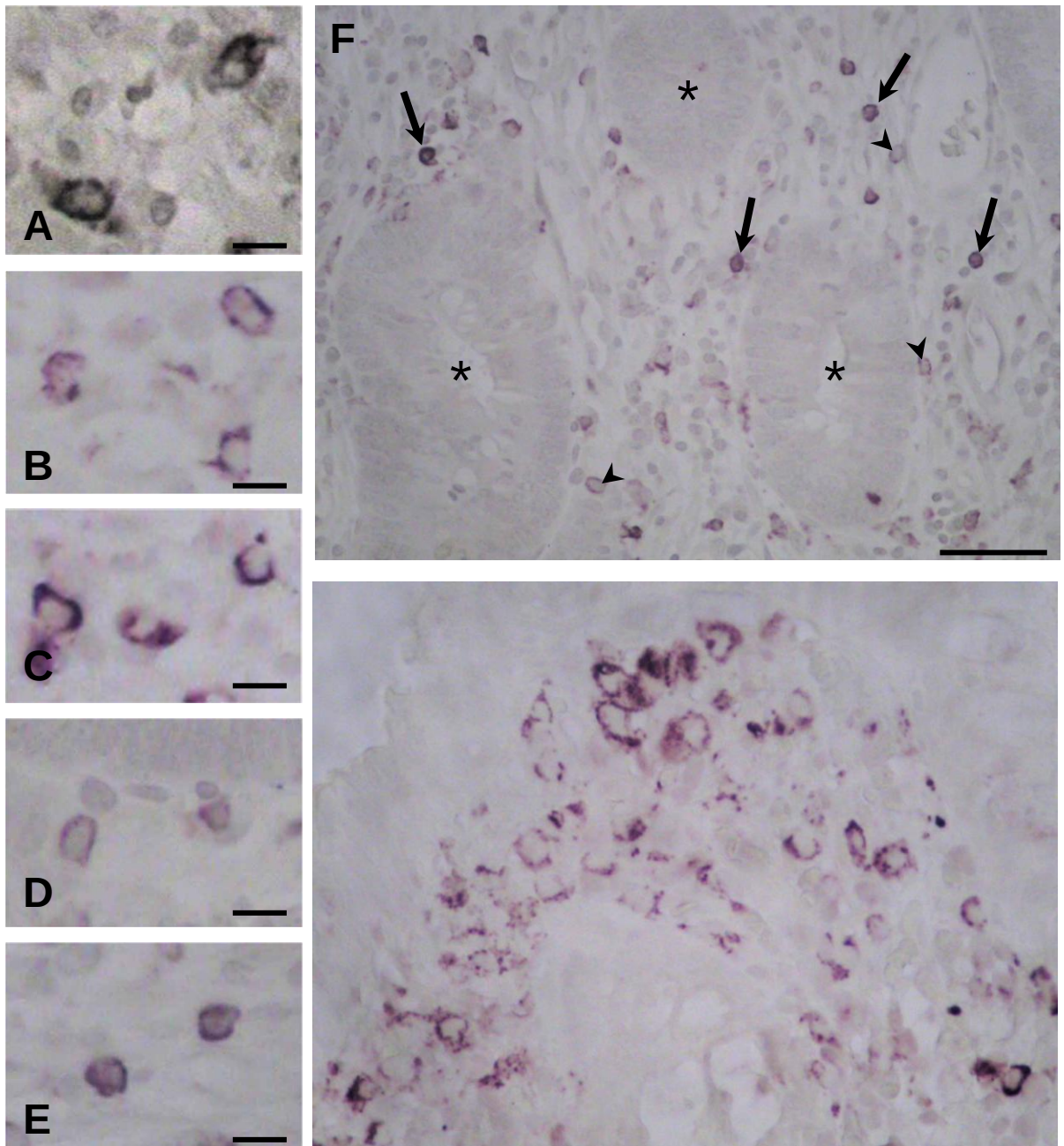
2. Ábra iNOS-t tartalmazó sejtek IBD-s betegek colon biopsziáiból készített horizontális metszetben, teljes nézetben. // **A-B.** Az UC mucosában az immunsejtek NADPH-diaforáz hisztokémiai reakcióval (A) detektálhatók. A NADPH-diaforáz reaktív sejtek (nyílhegyek) főként a Lieberkühn-kripták bazális részén és a fala mentén akumulálódnak. Csillag: a kripták alja; e: a mucosa epitheliális felszíne. A metszeteken iNOS kimutatást (B) is végeztünk immunreakció segítségével, számos iNOS-IR sejt mutatható ki a kripták oszlopa mentén és bazális részén. A. Megjegyzendő, hogy az iNOS-IR sejtek eloszlása és jellemzői hasonlóak az A ábrán látható NADPH-diaforáz reaktív sejtékére. Csillag: a kripták alja; e: a mucosa epitheliális felszíne. **C-D.** CD mucosából készített metszetek. Ezekben a biopsziákban csak kevés NADPH-d reaktív (C) és iNOS-IR sejt (nyíl) található a lamina propriában. Csillag: a kripták alja; e: a mucosa epitheliális felszíne. A 4. ábrán látható az IBD-ben kimutatható iNOS-IR sejtek kvantitatív kiértékelése és statisztikai analízise. // A skála egy beosztása 400 μ m. //

Kettős jelölésű immunhisztokémiai vizsgálatok során gyulladt IBD nyálkahártya iNOS pozitív gyulladásos sejtjeinek CD68 és CD15 felszíni membrán antigén pozitivitása a macrophagokat (CD68-IR sejtek) valamint a neutrophil granulocytaikat azonosította. (3. ábra) Colitis ulcerosás nyálkahártyában a CD15 pozitív sejtek túlnyomó többsége iNOS pozitivitást mutatott. (3F ábra) Ezzel ellentétben Crohn betegségben a domináns gyulladásos sejt típus a macrophag volt, ugyanakkor a CD68 immunreaktív sejtek kisebb hányada mutatott iNOS immunreaktivitást. (3G ábra)

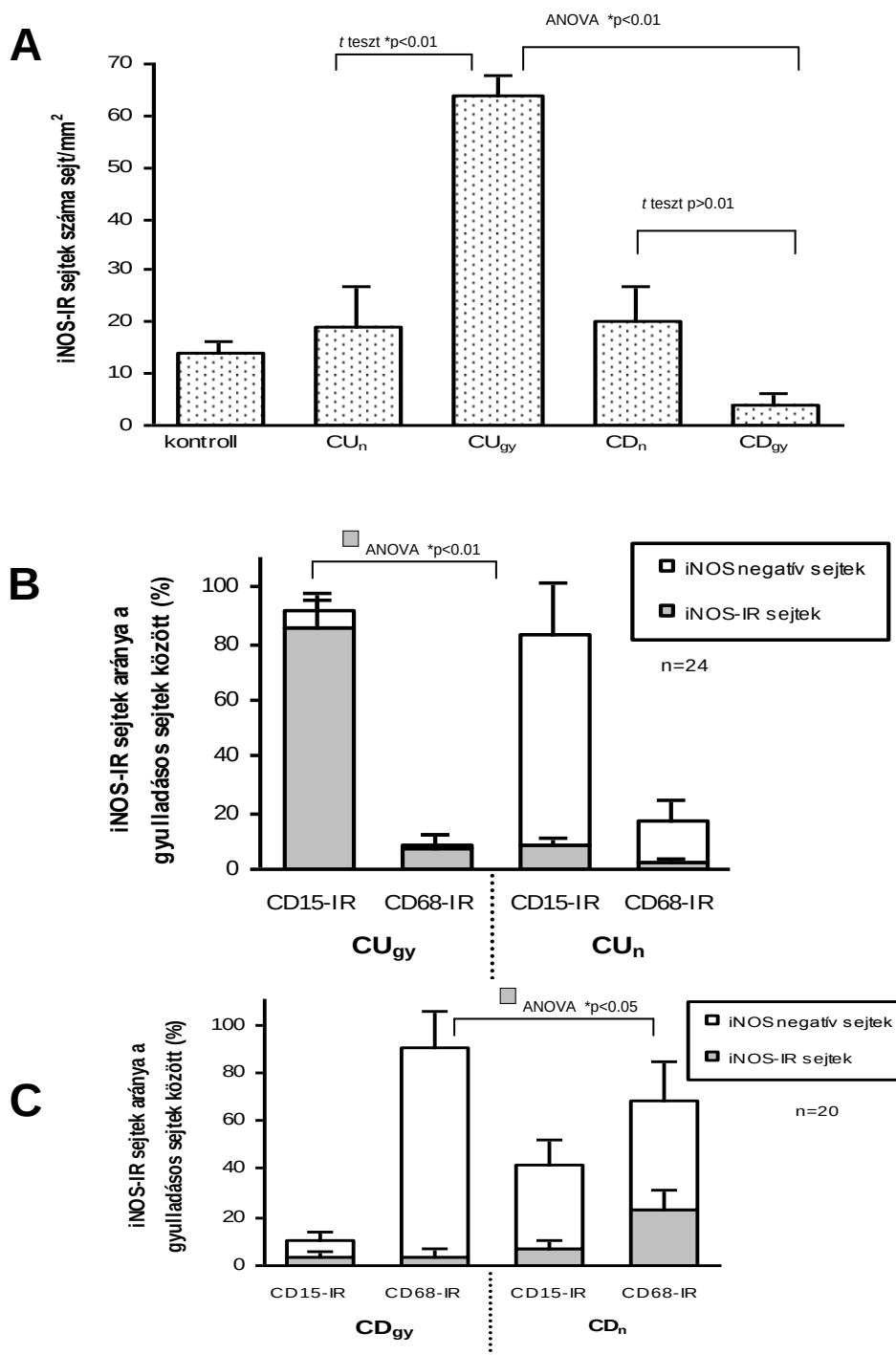
Számítógépes képanalízissel végzett mennyiségi vizsgálat szignifikánsan több iNOS immunreaktív sejtet mutatott colitis ulcerosa gyulladt területeiről származó nyálkahártyában (UC_i 64 ± 4 sejt/ mm^2) mint a Crohn-os gyulladt területeken (CD_i 4 ± 2 sejt/ mm^2). (4.A ábra) Ugyancsak szignifikáns különbség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

A CD15 immunreaktív sejtek száma messze meghaladta a CD68 pozitív sejtek számát aktív colitis ulcerosában, az eloszlási arányt tekintve 92% illetve 8%-t találtunk. (3B ábra) A CD15 immunreaktív sejtek 92,4%-a iNOS pozitív volt ($85 \pm 10\%$ -a a CD15+ és CD68+ sejtek összegének) míg CD68+ sejtek 87,5%-a mutatott iNOS immunreaktivitást is ($7 \pm 5\%$ a teljes festődő sejtszámnak). (4.B ábra) A colitis ulcerosás, de nem gyulladt területeken az iNOS pozitív sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt, 9,6% a CD15+ sejtek között és 11,8% a CD68+ sejtek között. Az összes CD15 és CD68 festődést mutató sejten belül, csak az iNOS pozitív neutrophilek (CD15+ 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+ sejtek jelenléte (90%), szemben CD15+ sejtekkel (10,0%). (4.C ábra) A sejtek alacsony hányada mutatott iNOS pozitivitást, a CD15+ sejtek esetében 14,3%, a CD68+ sejtek között pedig csak 4,4%.



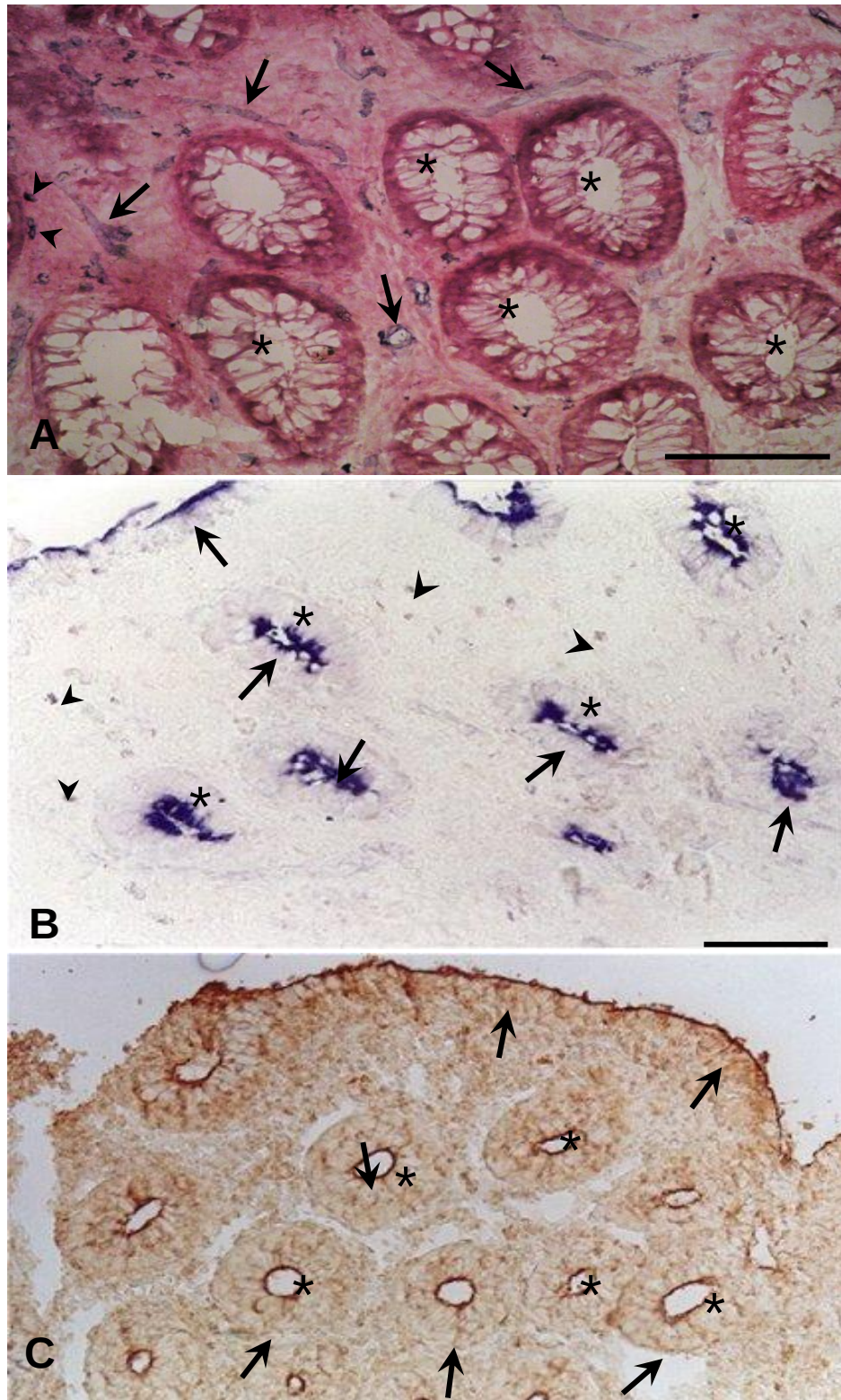
3. Ábra. Az iNOS-IR sejtek sejtípusának meghatározása paraffinba ágyazott IBD-s biopsziákon. // **A.** Az UC kötőszövetében fekete színű iNOS-IR sejtek ABC-Ni/DAB módszerrel detektálhatók. // **B.** Az UC-ben lévő anti-CD68 ellenanyaggal megjelölt macrophágokat chromogénként New Fuchsint (rózsaszín)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



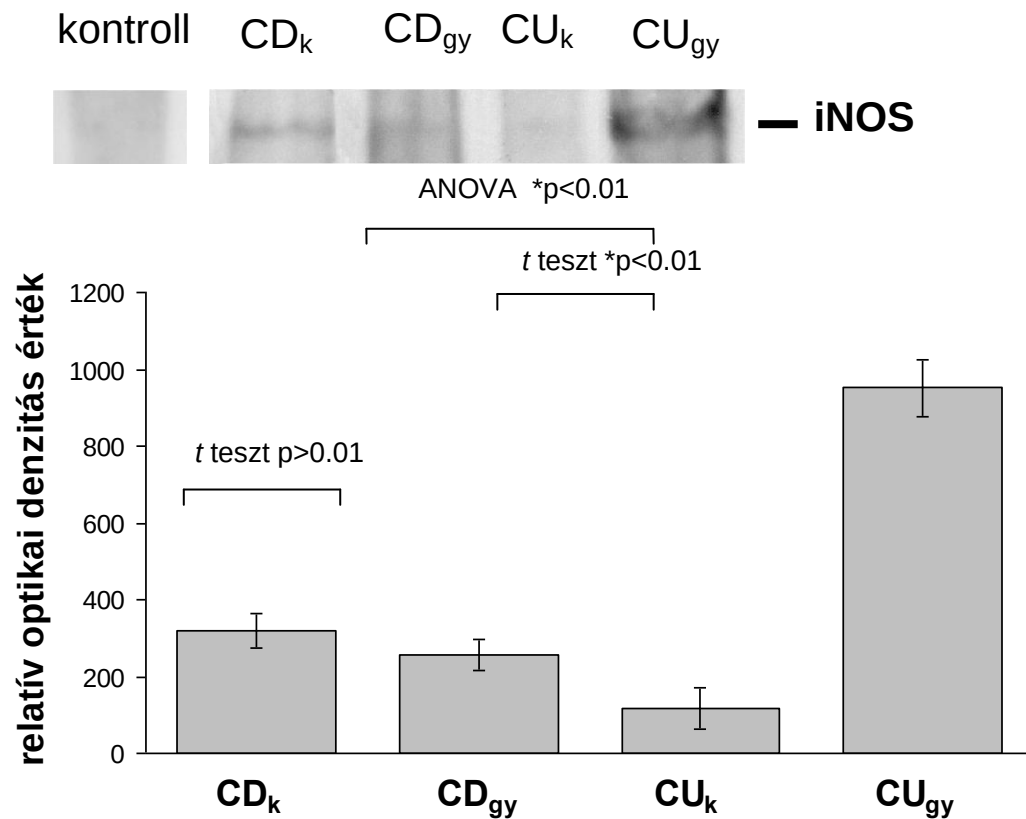
4. Ábra Az iNOS-IR sejtek kvantitatív értékelése (A) és sejttípusának meghatározása UC (B) és CD (C) esetében. // **A.** Az iNOS-IR sejtek száma szignifikánsan magas az UC-ből (UC_i), alacsonyabb a CD-ből származó gyulladt mucosa biopsziákban (CD_i) az IBD colon nem gyulladt részeiből (UC_u, CD_u) valamint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

A makroszkóposan nem érintett területeken (CD_u) az iNOS immunreaktív sejtek aránya a $CD15+$ sejtek között nem változott jelentősen (16,7%), míg a $CD68+$ sejtek között magasabb volt, mint a gyulladt területeken (33,8%). A teljes sejtszámra ($CD15+$ és $CD68+$) vonatkoztatva, az iNOS immunreaktív $CD68+$ sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb volt a gyulladt területeken (CD_i $4\pm3\%$) mint a gyulladásmentes területeken (CD_u $23\pm8\%$). A metszetek jelentős részén, elsősorban azokon, ahol az iNOS immunreaktív sejtek száma alacsonyabb volt, a gyulladt területeken az epithelium apicalis része erős NADPH-diaforáz (5.B ábra) és iNOS (5.C ábra) festődést mutatott mind colitis ulcerosában mind Crohn betegségben. A kontroll vizsgálatokon NADPH-diaforáz reaktív vagy iNOS immunreaktív epithelium nem volt kimutatható. (5.A ábra)

Az IBD-s betegek colonoscopos biopsziás mintáinak homogenizátumából végzett immunblott vizsgálat egy 130 kD molekulatömegű iNOS immunreaktív fehérje sávot mutatott, mely a human iNOS molekulatömegének megfelel. (6. ábra) A sáv intenzitása szignifikánsan nagyobb volt a gyulladt colitises anyagban, mint a nem gyulladt mintákban, ezzel szemben a Crohn betegekből származó anyagban nem jelentkezett szignifikáns intenzitásbeli különbség az érintett és ép területek között, valamint a kontroll csoportokhoz viszonyítva. (6. ábra) Az immunblott denzitometriás szemikvantitatív vizsgálata bizonyította az iNOS szignifikáns mennyiségi különbségeit a colitis ulcerosás és a Crohn-os biopsziák között. (6. ábra)



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



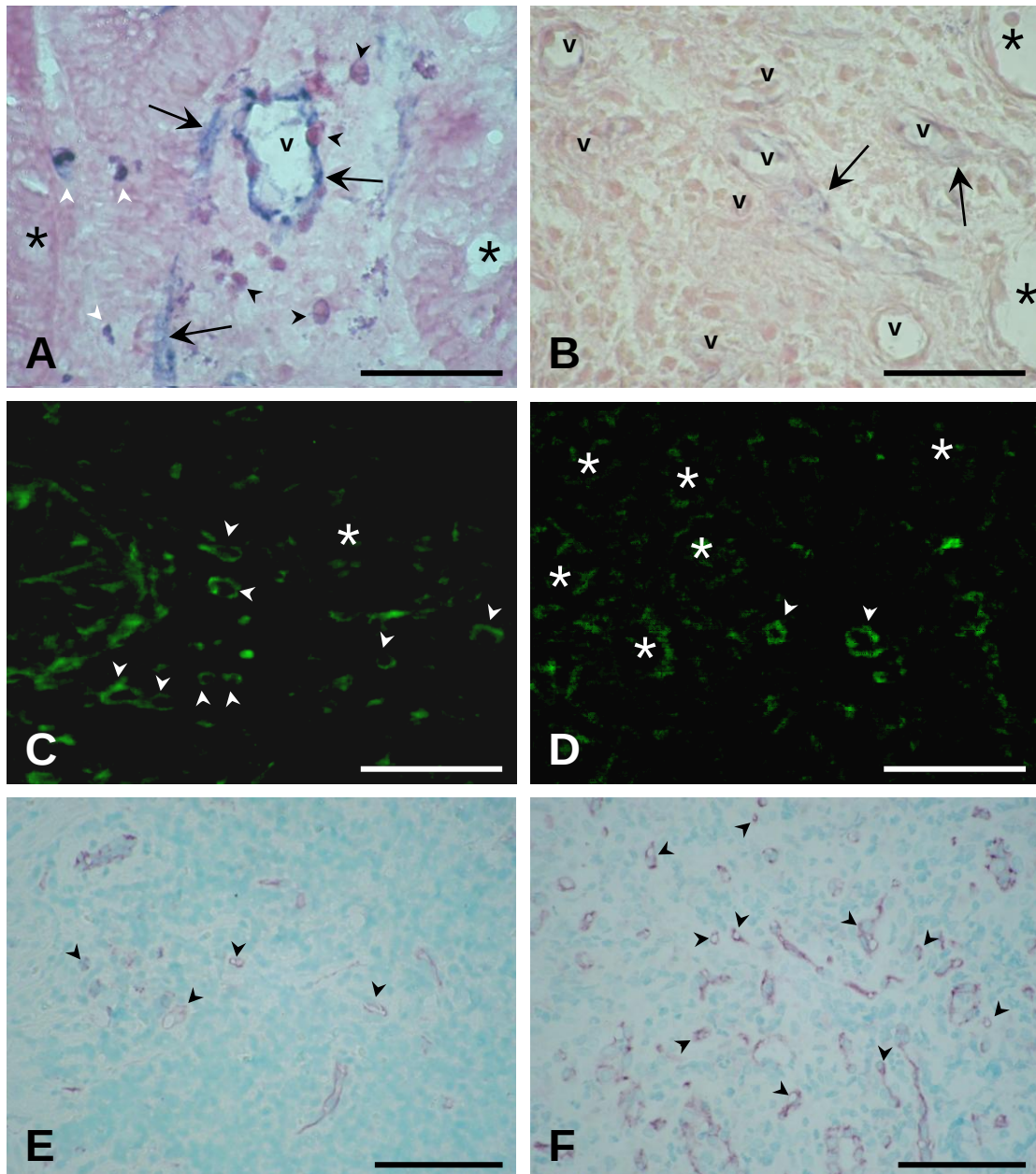
6. Ábra IBD-s colon mucosa biopszia homogenizátum immunoblot anti iNOS-sal. // Az egyes sávok a kontroll, valamint UC-ben és CD-ben szenvedő páciensek intakt (nem gyulladt, u alsó index), és gyulladt (i alsó index) colon szakaszaiból származó 5-6 biopszia mintából nyert fehérjét tartalmaznak azonos mennyiségben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

Az eNOS lokalizációja és a vasculáris status összehasonlítása

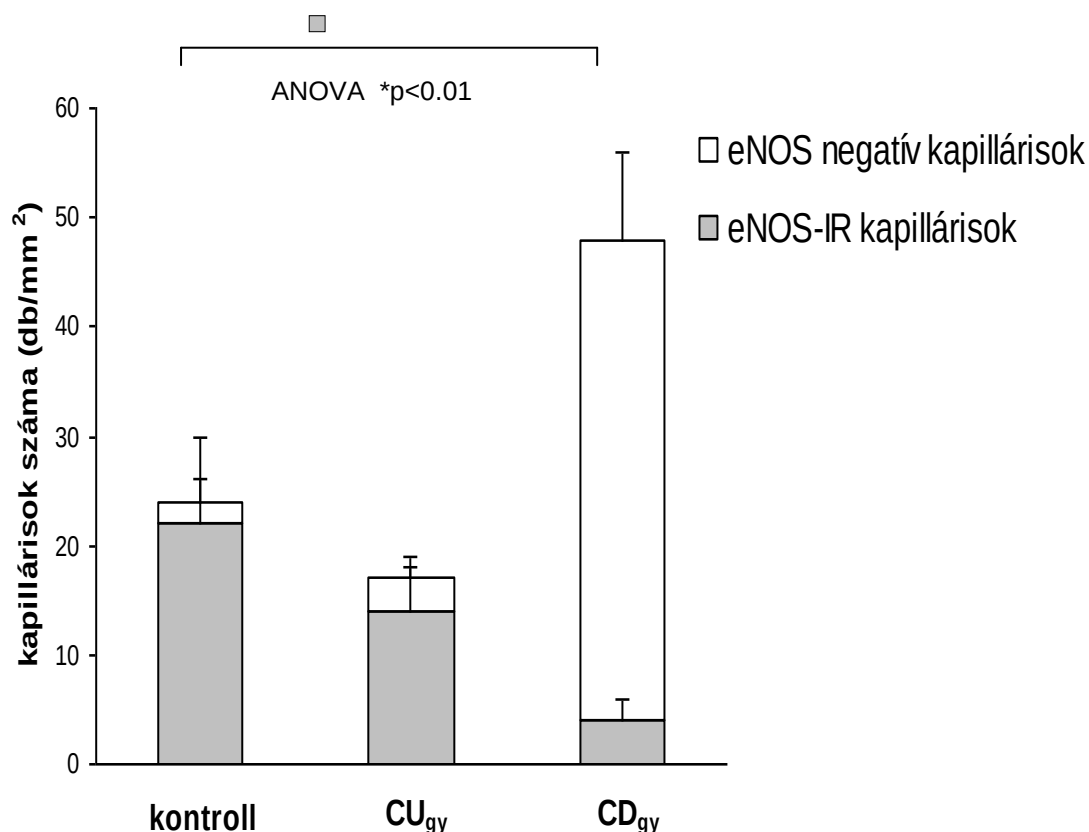
Az érstruktúrák NADPH-diaforáz festődése a colitis ulcerosus és Crohn-os mintákban jelentősen különbözött. Colitis ulcerosában általában tág érképleteket találtunk, melyek endotheliuma intenzív NADPH-diaforáz reaktivitást mutatott. (7.A ábra) Ezzel szemben a Crohn betegekből származó mintákon relatíve sok, kis átmérőjű ér volt kimutatható, melyek endotheliuma gyakorlatilag nem mutatott NADPH-diaforáz pozitivitást. (7.B ábra) Az erek fala a lamina propria területén megvastagodott és lumenük szűkebb volt. (7.B ábra) A kontroll csoportból származó mintákban a kapillárisok NADPH-diaforáz reaktivitása mérsékelt volt. (5.A ábra) Hasonló mintázatot találtunk a nem gyulladt colitises és Crohn-os anyagban is.

A kapillárisok és a kis erek eNOS immunreaktivitása kifejezett volt a colitis ulcerosus metszetek lamina propriájában, ezzel szemben eNOS immunreaktív endothelium alig volt detektálható a Crohn betegek mintáiban. (7.C, 7.D ábra) Ugyanakkor, a kripták körüli myoepithelialis sejtek eNOS immunreaktivitása megfigyelhető volt minden vizsgált csoportban (7.C, 7.D ábra)

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



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



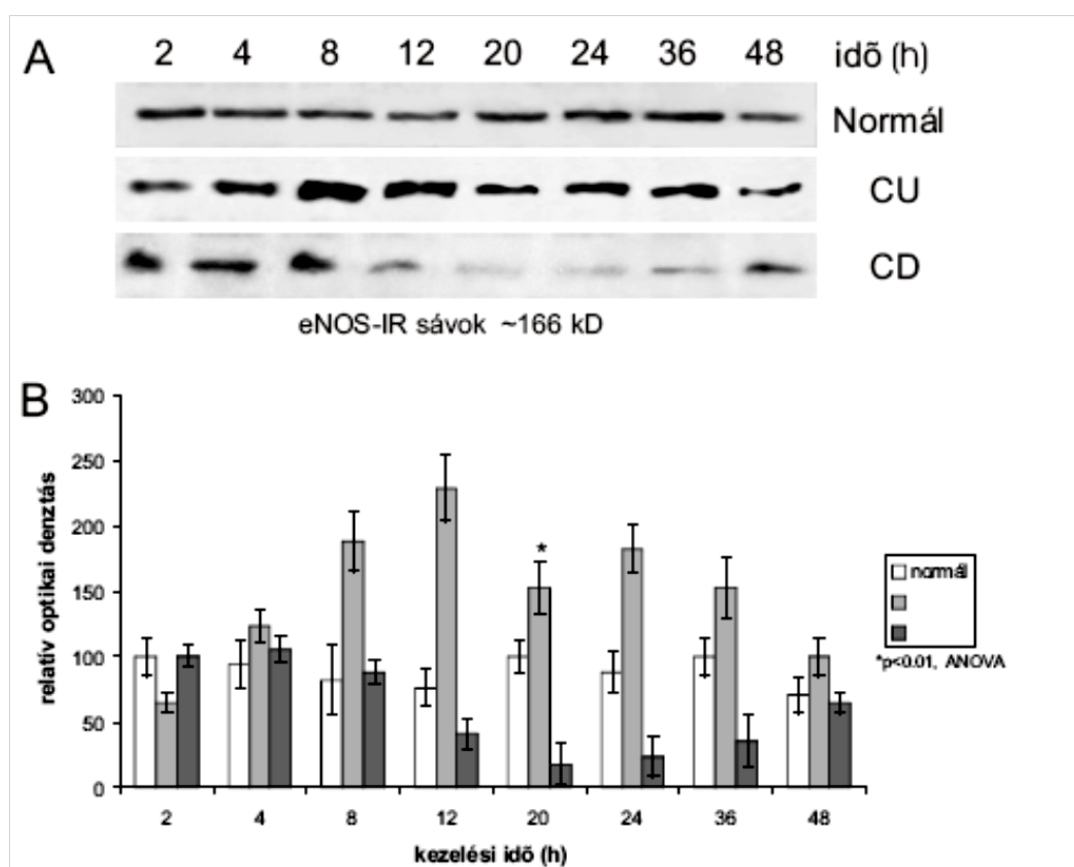
8. Ábra A lamina propriában előforduló eNOS-IR és nem immunreaktív kiserek (kapillárisok) számának becslése gyulladt IBD biopsziák (UC_i, CD_i) esetén. // A kapillárisok számát a CD31-IR mennyiségének számítógépes elemzésével határoztuk meg. // Az adatok azt mutatják, hogy CD esetén sokkal több kapilláris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

Az eNOS kimutatása immunblott és immunfluoreszens vizsgálattal HUVEC-n

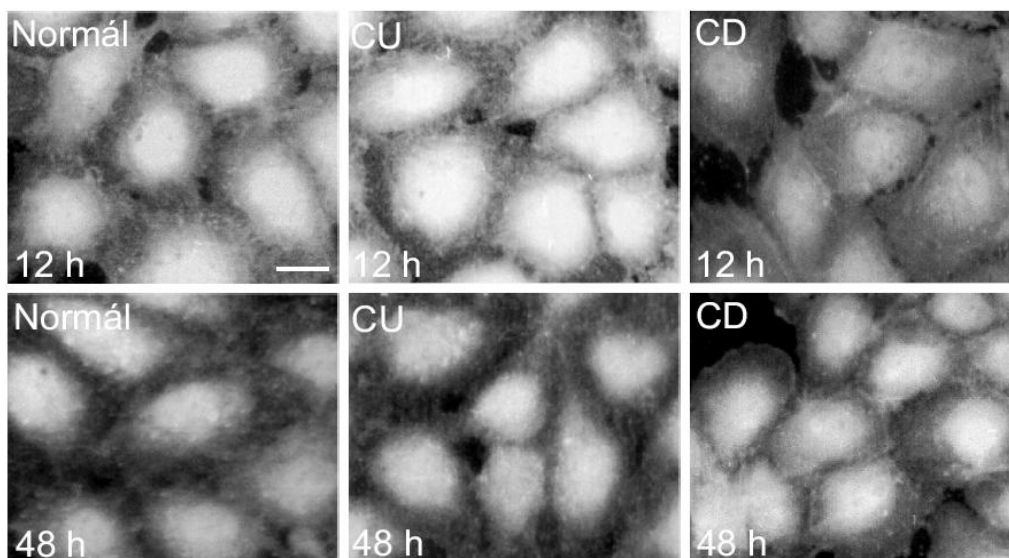
A HUVEC lizátum Western-blott vizsgálata a humán eNOS-nak megfelelő molekulatömegű 160 kDa immunreaktív csíkot mutatott ki. (9.A ábra) 50%-os normal humán szérummal kezelt HUVEC sejtkultúrában az eNOS mennyisége nem változott szignifikánsan a 48 órás vizsgálati idő alatt. Ugyanakkor az 50%-os colitis ulcerosás szérum hatására az eNOS szint 8 óra után kezdett emelkedni és 12 óránál érte el a csúcspontot (a relatív optikai denzitás értéke $188 \pm 23\%$ és $229 \pm 26\%$, $P < 0,01$). A tizenkettedik órában az eNOS szint duplája volt a második órában mért normál szinthez képest ($100 \pm 15\%$). 12 órán túl 50%-os colitis ulcerosás szérummal történt inkubáció során az eNOS szintje csökkent (36 óránál $153 \pm 23\%$, $P < 0,01$), és a kontroll szintjét 48 óránál érte el ($100 \pm 8\%$). 50%-s Crohn-os szérummal történt inkubálás során az eNOS nem változott számottevően 8 óráig, majd csökkenni kezdett 12 óra után ($41 \pm 12\%$, $P < 0,01$) 20-24 óra között érve el a legalacsonyabb szintet ($18 \pm 16\%$ és $23 \pm 15\%$, $P < 0,01$).

Ezt követően lassú fokozatos növekedés volt észlelhető és 48 óránál a kontrollal közel megegyező szintet detektáltunk ($65 \pm 8\%$, 9.A, 9.B).

Az eNOS immunfluoreszcens vizsgálata HUVEC-ben az enzimet főleg a sejt citoplazma nukleáris régiójában azonosította, de kimutatható volt a sejt perifériás területein is. (10. ábra) A normál humán szérum nem befolyásolta az eNOS immunreaktivitás intenzitását és eloszlását HUVEC-ben. Colitis ulcerosás szérummal történt 12 órás kezelést követően az eNOS immunreaktív terület kiszélesedése és az immunfluoreszcens aktivitás enyhe élénkülése volt észlelhető. Ezzel szemben Crohn-os szérummal történt kezelés negyedik órájától kezdve az eNOS immunreaktivitás mindinkább a sejtek központi részére koncentráldott és az immunfluoreszcens aktivitás csökkent. (10 ábra) Nem találtunk egyértelmű különbséget a normál, a colitis ulcerosás és Crohn-os szérum hatása között a HUVEC eNOS immunfluoreszcens aktivitásában a 48 órás periódus végén.



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



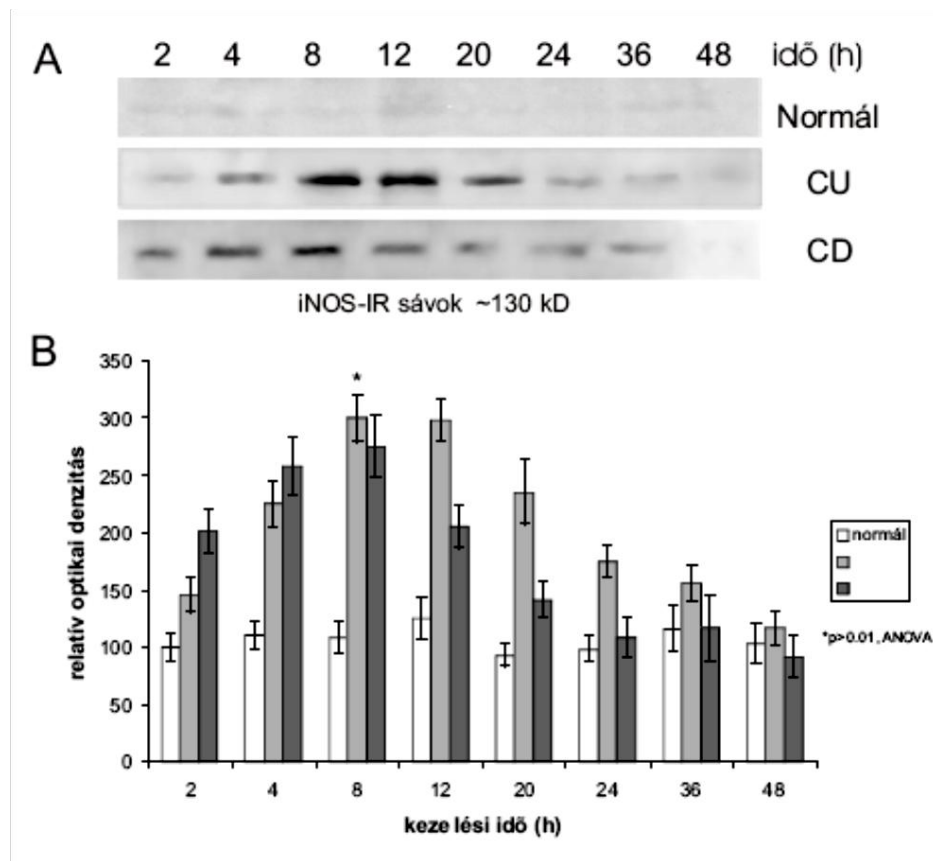
10. Ábra eNOS immunfluoreszcencia HUVEC-ben 50%-os normal, 50%-os UC és 50%-os CD szérummal történt inkubáció mellett. Jelentős különbség észlelhető a fluoreszcens jel intenzitásában a különböző kezelésekben 12 óránál de ez eltűnik 48 órás kezelésnél. Méretarány: 10 μ m

Az iNOS kimutatása immunblott és immunfluoreszcens vizsgálattal HUVEC-n

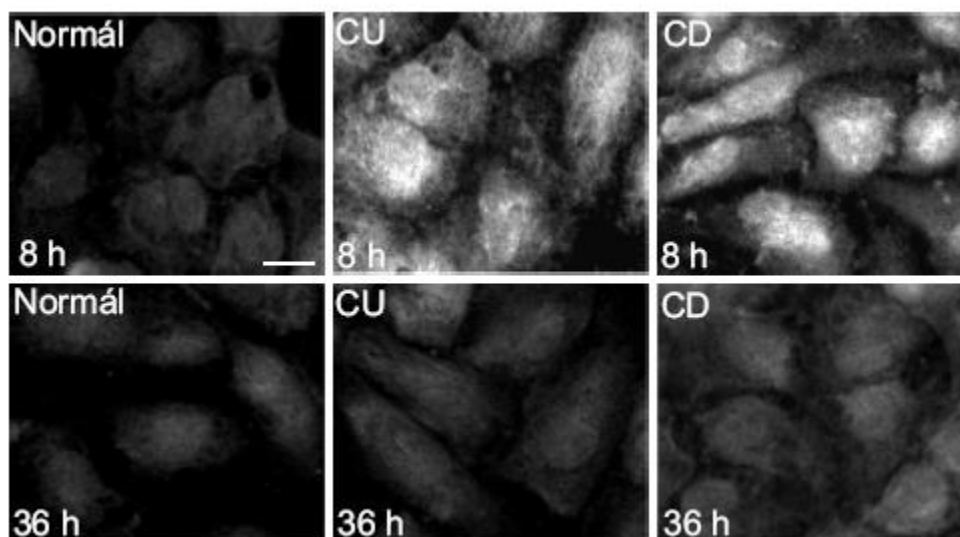
A HUVEC lizátum Western blott vizsgálata enyhe iNOS immunreaktív sávot mutatott 130 kDa-nál, amely megfelel a humán iNOS molekulatömegének. (10.A ábra) Az enyhe iNOS expresszió HUVEC tenyészetben 50%-os normál humán szérummal történt 48 órás inkubáció alatt nem mutatott szignifikáns változást. Ötven százalékos colitis ulcerosás szérummal történt inkubálás során az iNOS négy óra után kezdett emelkedni (a relatív optikai denzitás értéke $225 \pm 20\%$, $P < 0,01$), a legmagasabb értéket 8 óránál érte el ($300 \pm 21\%$, $P < 0,01$), majd ezt követően fokozatosan csökkent és 48 óra után a normál értékhez közelített ($117 \pm 15\%$). A HUVEC 50% Crohn-os szérummal történt inkubációja során az iNOS szintje 2 óra után kezdett nőni ($201 \pm 19\%$, $P < 0,01$) és 8 óránál érte el a maximális értéket. ($275 \pm 27\%$, $P < 0,01$) Fokozatos csökkenés volt észlelhető 12 órától és a 24-48 órás időszakban a kontrollal közel azonos szintet mutatott. (48 óránál $92 \pm 18\%$, 11.A, 11.B ábra)

Ötvenszázalékos normál szérummal történt inkubáció mellett a HUVEC enyhe immunfluoreszcens aktivitást mutatott. (12. ábra) Az iNOS megjelenése HUVEC-n immunfluoreszcens módszerrel IBD-s szérum mellette 4-12 órás periódusban volt a legkifejezettebb. Szétszórtan a citoplazmában, helyenként granuláris elrendeződésben, intenzív fluoreszcens jel volt észlelhető. Mind a colitis ulcerosás, mind a Crohn-os szérum szignifikánsan fokozta az iNOS

immunfluorescenciát a 4-12 órás periódusban. A kezelést követő négy óra alatt valamint 12 óra utáni mintákban az iNOS immunfluoreszcens módszerrel nem volt egyértelműen kimutatható a sejtenyészetben.(12. ábra).



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



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

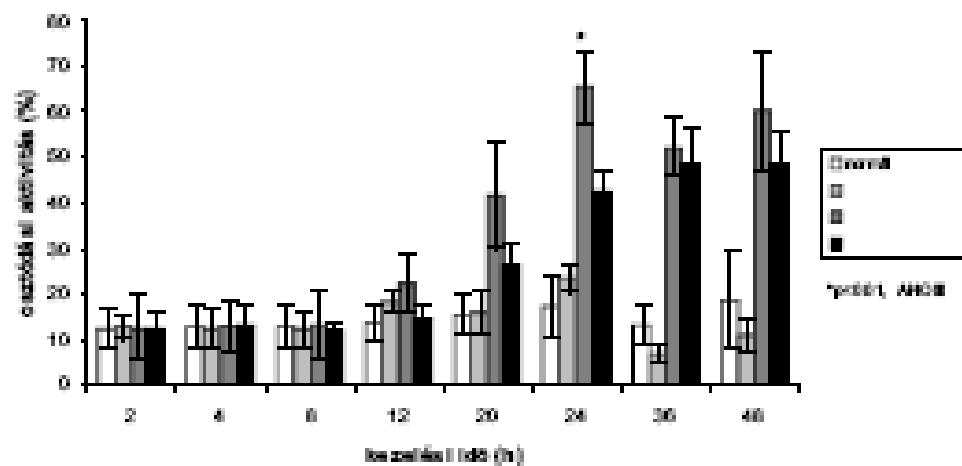
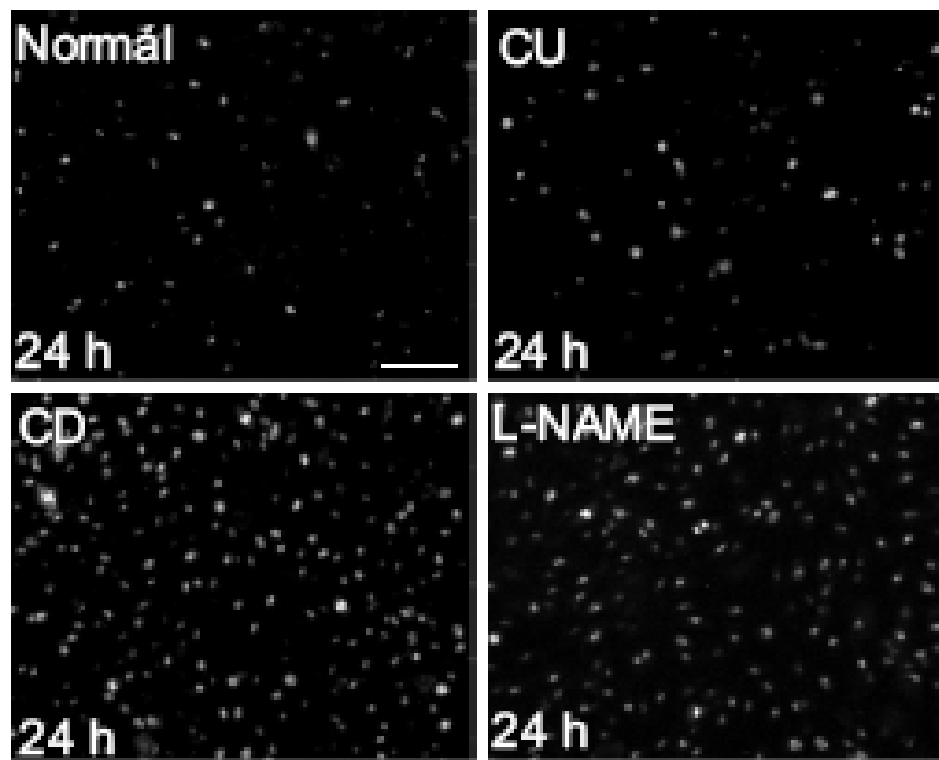
A colitis ulcerosás és Crohn-os szérum hatása a HUVEC proliferációs aktivitására

A vizsgálatok kezdetén a Ki-67 immunfestés szerint a HUVEC 10-50 %-a a sejtosztódás valamelyik állapotában volt, a sejtkultúra 20-30%-os konfluenciája mellett (13. ábra). A 2-48 órás periódusban nem észleltünk különbséget a Ki-67 immunreaktív/toluidin kék festődést mutató sejtmagok arányában 50%-os normál (48 óránál $19 \pm 10\%$) és 50%-os colitis ulcerosás (48 óránál $10 \pm 3\%$) szérummal történt kezelés mellett. Ezzel szemben 50%-os Crohn-os szérum hatására a proliferáló sejtek szignifikáns emelkedését lehetett észlelni 20 óra után ($41 \pm 12\%$, $P < 0,01$). A HUVEC magok 50-65%-a Ki-67 immunfluoreszcenciát mutatott CD szérummal történt 24-48 órás kezelés alatt (13. ábra). Hasonló mértékű változást észleltünk 10^{-4} M L-NAME 50%-os normál szérumot tartalmazó HUVEC tenyészetéhez történő hozzáadásával; a proliferációs aktivitás szignifikánsan emelkedett 24 órától kezdve ($42 \pm 5\%$, $P < 0,01$) 48 óráig ($48 \pm 7\%$, $P < 0,01$).

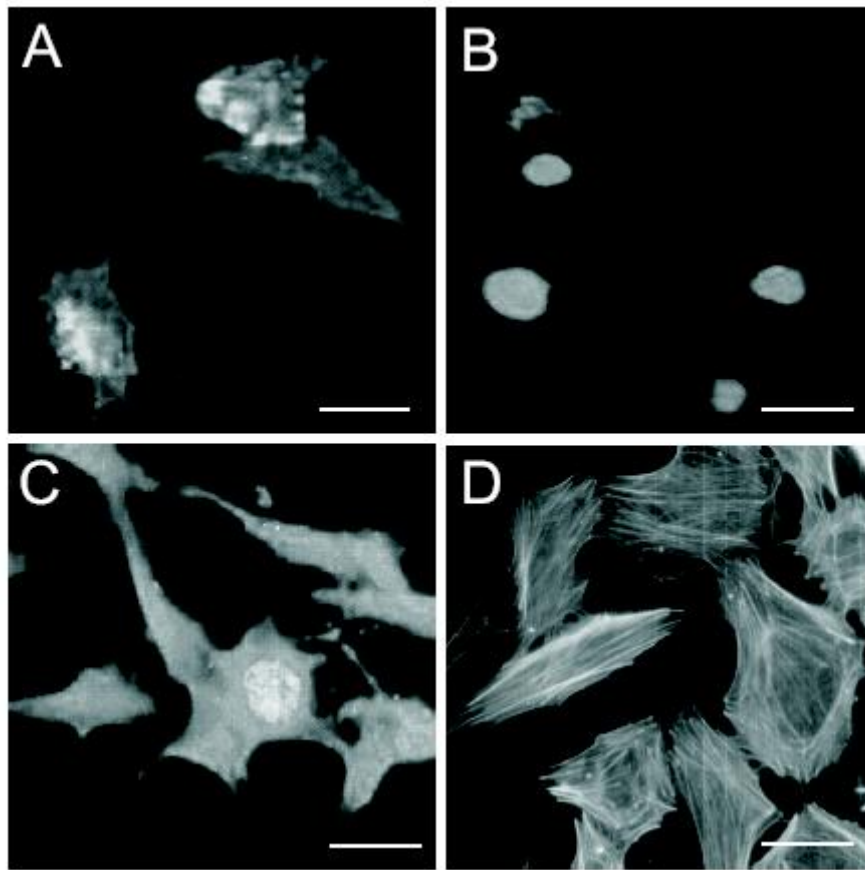
A colitis ulcerosás és Crohn-os szérum hatása a HUVEC viabilitására

Annexin-V-biotin módszer használatával a korai apoptotikus sejteket tudtuk kimutathatni, amelyek membránján azonosítható a fluorescens jel (14.A ábra), míg a propidium-jodid a sejtmag DNS-hez kapcsolódó, úgynevezett nukleáris fluorescens jelet adva a nekrotikus sejteket jelölte (14.B ábra). Mindkét festés

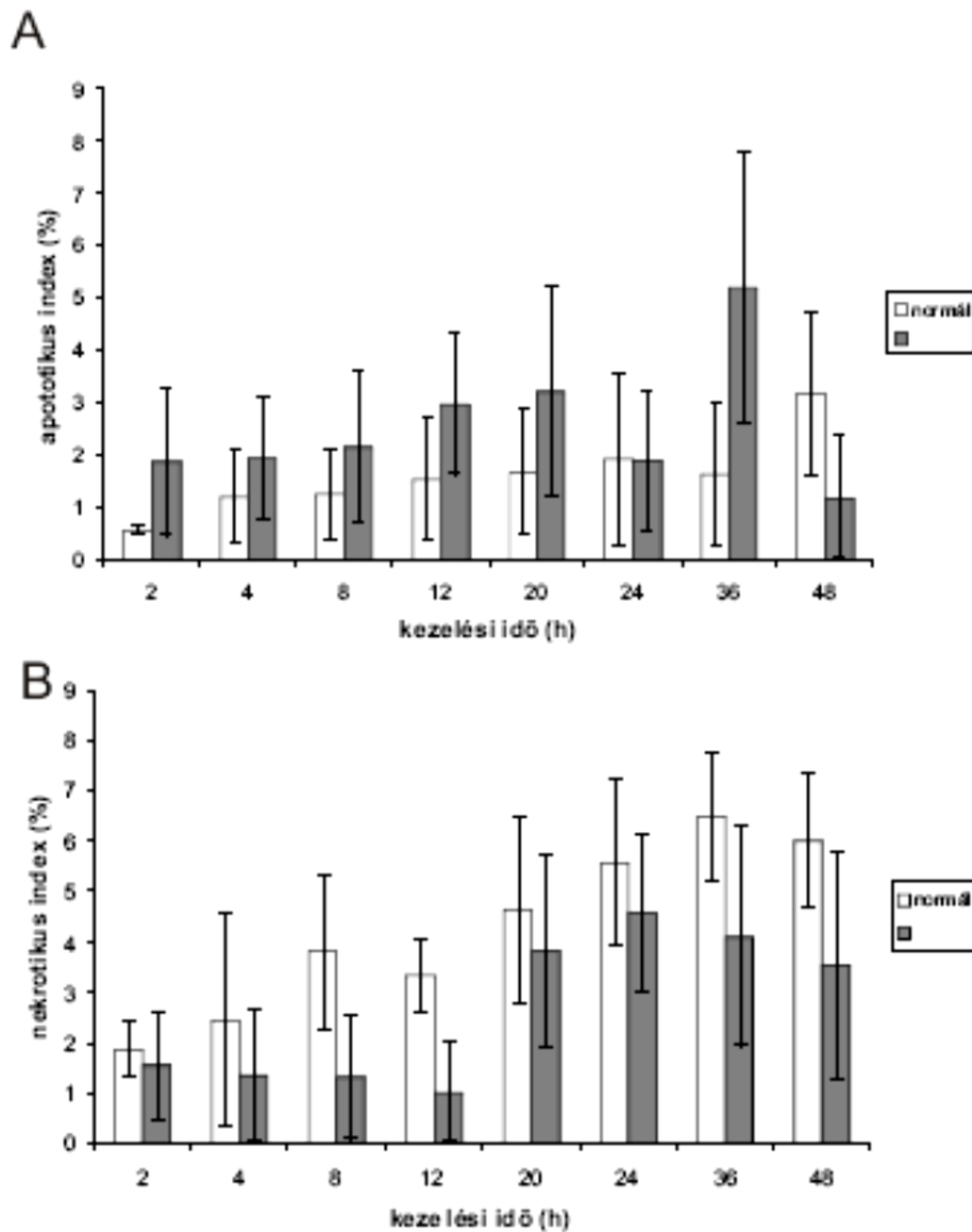
észlelhető a késői apoptotikus sejteken egyaránt jelölve a sejtek membránját és magját (14.C ábra). A 48 órás vizsgálati idő alatt 50% normál szérummal történt inkubáció során az apoptotikus sejtek aránya alacsony maradt (1-3%), ezzel szemben folyamatos, de nem szignifikáns, növekedés volt észlelhető az apoptotikus sejtek számában 50%-s Crohn-os szérummal történt inkubáció során (2-5% maximális szinttel 36 óránál). (15.A ábra). 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 a vizsgálati periódus alatt, de a nekrotikus index nem mutatott szignifikáns változást. (15.B ábra) A falloidin-FITC-el megjelenített actin filamentumok azonos intenzitással festődtek, jelezve a sejtek szerkezeti stabilitását, függetlenül az inkubáló oldattól vagy az inkubáció idejétől. (14.D ábra)



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



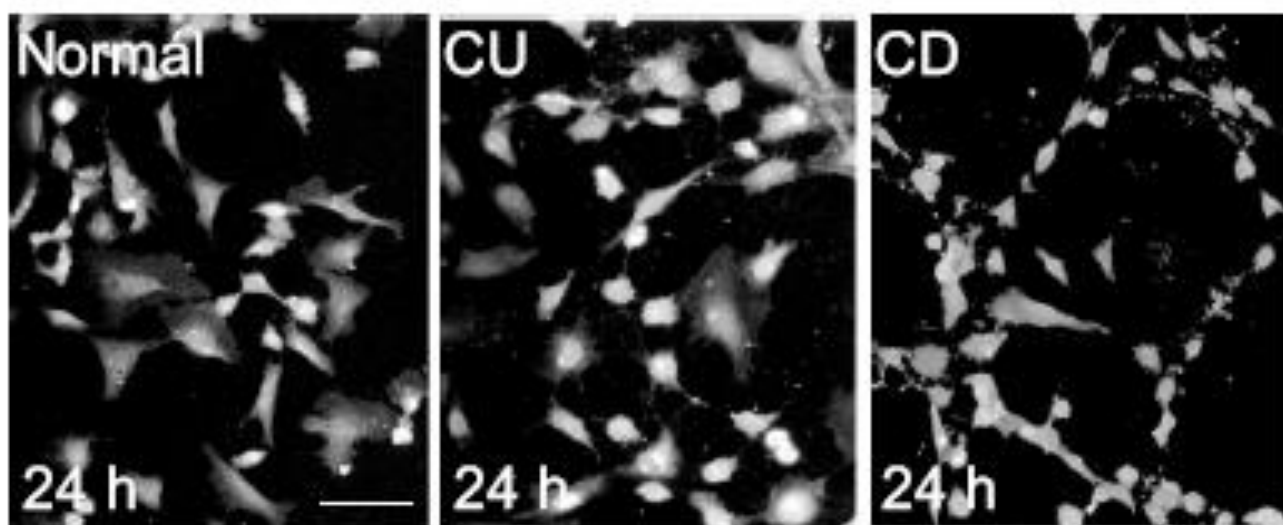
14. Ábra HUVEC életképességének vizsgálata. Minden képet 24 órás CD szérummal való kezelés után készítettük. **A.** Korai apoptotikus sejtek, melyek annexin-V-biotinhoz kötött avidin-FITC-el jelölik a membrán külső falán megjelenő foszfatidil szerint. **B.** A nekrotikus sejtek magja festődik propidium-jodiddal,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



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

A colitis ulcerosás és Crohn-os szérum hatása a HUVEC kultúra alakjára és szerkezetére

A gyulladásos bélbetegségek 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 láthatóak. Ötven százaléknál normál és 50%-nyi colitis ulcerosás szérum jelenlétében a sejtek formája és eloszlása nem változott szembevetően 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 emlékeztetnek (16. ábra).



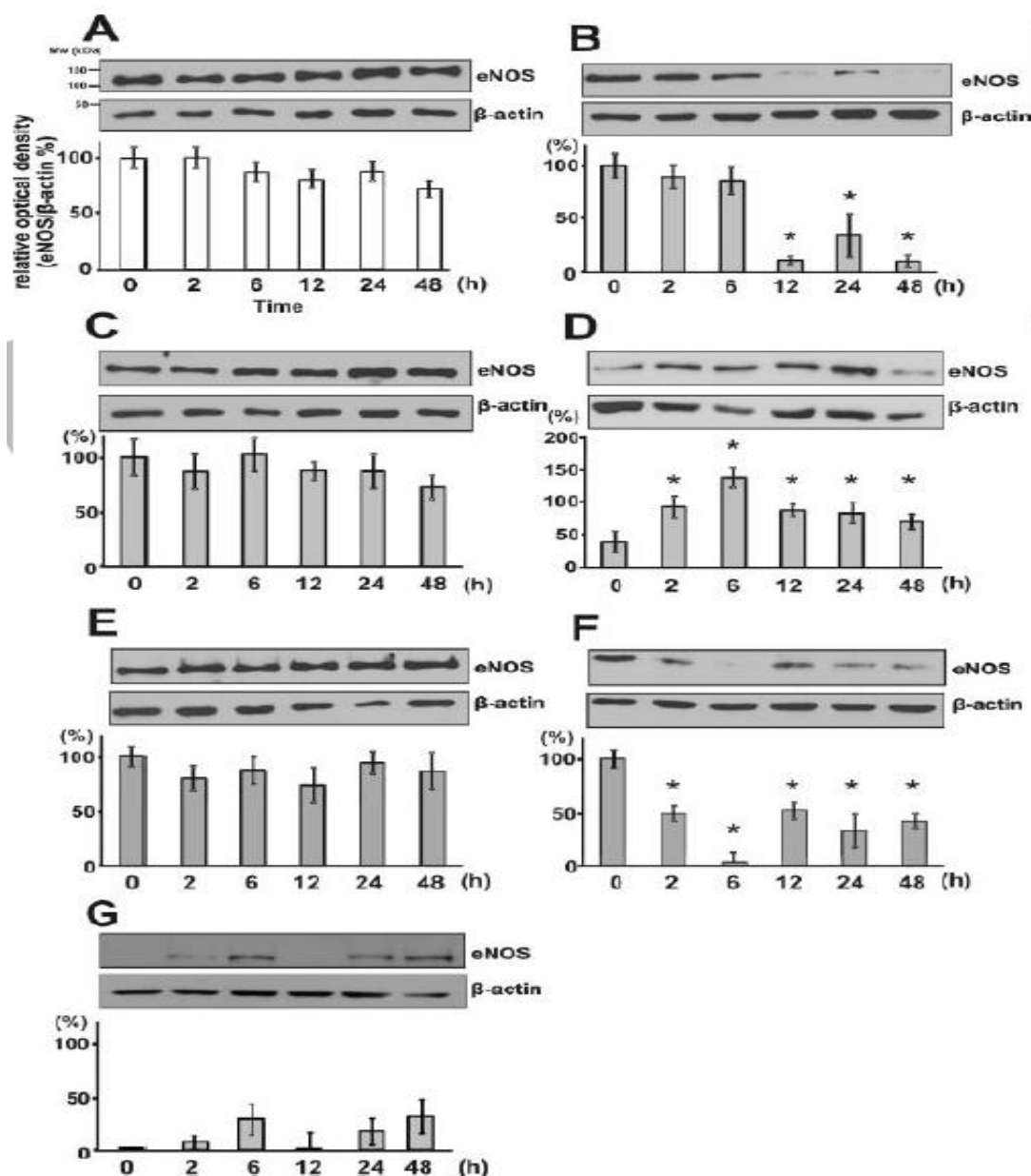
16. Ábra A HUVEC tenyészetek alakváltozása, 50%-os normál, 50%-os CU és 50%-os CD szérummal történő 24 órás inkubáció után. A vizsgálatban 20-30%-s konfluenciát mutató sejtenyészeteket használtunk. A sejteket eNOS immunfluoreszcenciával jelenítettük meg. Méretarány: 50 μ m.

Az infliximab kezelés hatása az eNOS protein expressziójára HUVEC sejtenyészetben

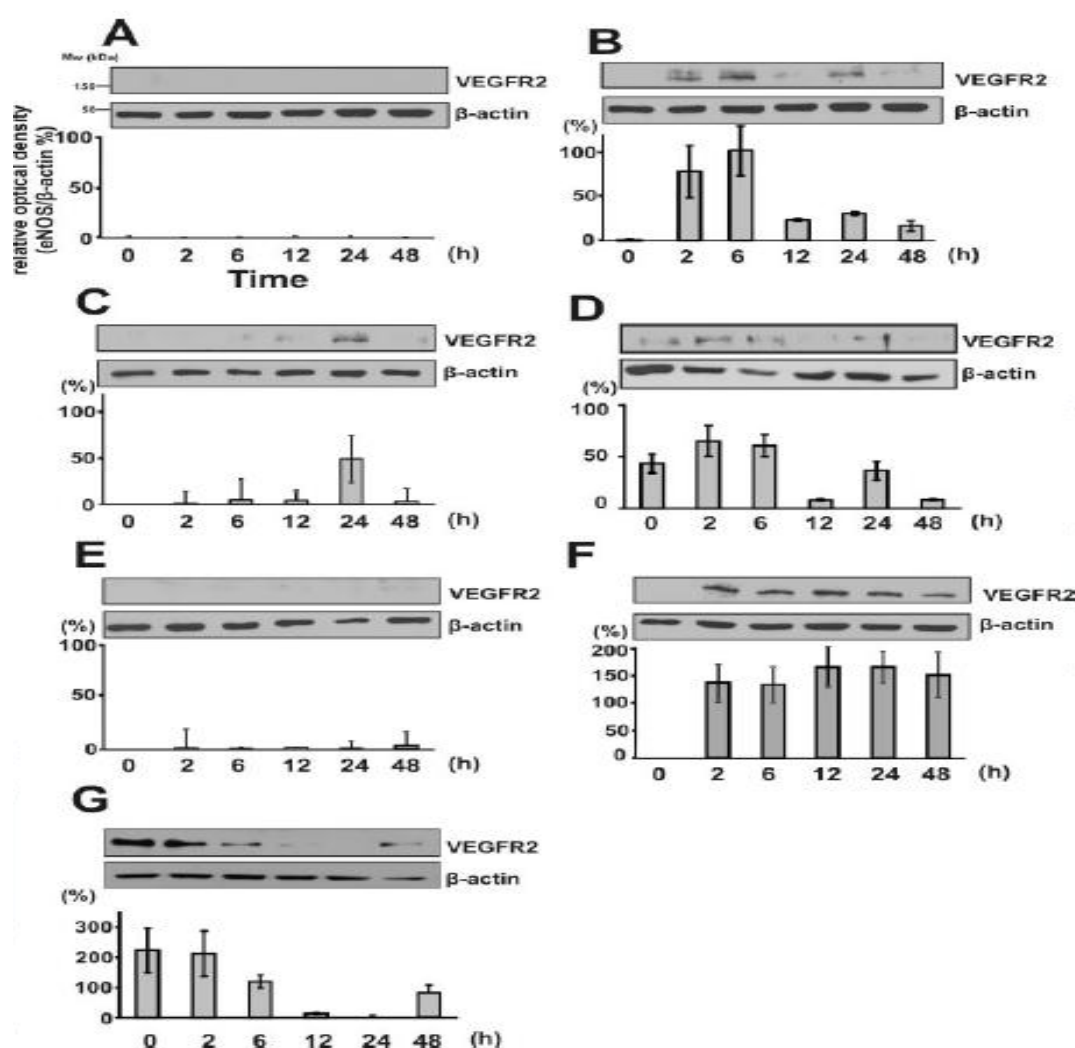
Infliximab-bal kezelt aktív Crohn betegek szérumával inkubált HUVEC tenyészetben az eNOS protein expresszió 100%-ig korrigálható volt a korábbi aktív Crohn szérum okozta 40-70%-os szignifikáns csökkenéshez képest. Az infliximab (15 ng/mL) hozzáadása hasonló eNOS protein expresszió növekedést mutatott 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 alkalmazott infliximab kezelés (15ng/ml) nem okozott szignifikáns eNOS változást.

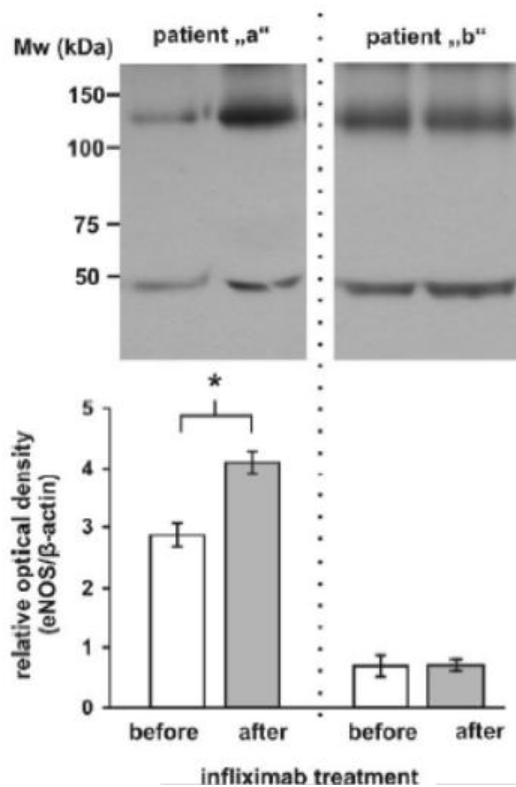
Az infliximab kezelés hatását úgy is vizsgáltuk, hogy a betegből 5 mg/KG infúziós infliximab kezelésre adott jó klinikai válasz esetén 2 hét után vett szérumot használtuk föl a tápfolyadék készítésére. Jó klinikai válasz esetén az egyénileg készített tápfolyadék alkalmazásával HUVEC tenyészetben az eNOS szint normalizálódását tudtuk elérni 24 óra után. Ugyanakkor infliximab-ra refrakter betegből nyert szérum nem módosította az eNOS szintet (19. ábra).



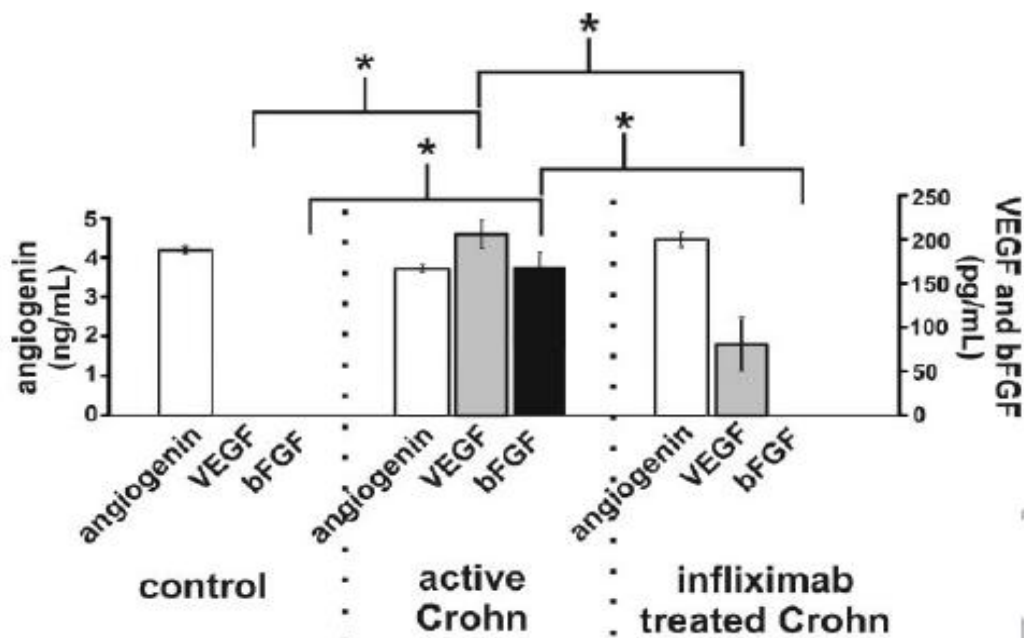
17. ábra Az infliximab (anti-TNF- α antitest) kezelés hatása HUVEC tenyészet eNOS fehérje expressziójára. A sejteket 48 órán át tenyésztettük olyan médiumban, amelyet különböző szérumokkal kondicionáltunk. Az endothel sejteket eltérő időpontokban vettük föl, lizáltuk és Western blot analysis-sel vizsgáltuk. 4 független vizsgálatból származó jellemző immunoblot szerepel az ábrán, az eNOS csíkok optikai denzitását megfelelő β -actin mintákhoz normalizáltuk, és az indulási időpontban mért denzitást tekintettük 100%-nak. $p < 0,05$. **A:** HUVEC egészséges kontroll szérumban **B:** HUVEC Crohn betegek gyűjtött szérumával inkubálva **C:** HUVEC infliximab infúziós kezelésben részesült Crohn betegek szérumával, 24 órával 5 mg/KG dózisú infúziót követően gyűjtve a szérumot **D:** a Crohn betegek gyűjtött szérumával inkubált HUVEC tenyészetéhez 24 óra után 15 ng/ml infliximab-ot adtunk **E:** normal szérummal inkubált HUVEC tenyészetéhez adtunk 15 ng/ml infliximab-ot **F:** HUVEC tenyészetet közvetlenül kezeltünk a standard médiumhoz adott 20 ng/ml human rekombináns TNF- α -val **G:** 15 ng/ml infliximab-ot adtunk olyan HUVEC tenyészetéhez, amit 24 órán át preinkubáltunk 20 ng/ml TNF- α -t tartalmazó standard médiumban.



18. ábra Az infliximab (anti-TNF- α antitest) kezelés hatása a VEGFR2 protein expressziójára HUVEC tenyészetben. Az endothel sejteket 48 órán át inkubáltuk eltérő módon kondicionált standard médiumokban, **A:** HUVEC egészséges kontroll szérumban **B:** HUVEC Crohn betegek gyűjtött szérumával inkubálva **C:** HUVEC infliximab infúziós kezelésben részesült Crohn betegek szérumával, 24 órával 5 mg/KG dózisú infúziót követően gyűjtve a szérumot **D:** a Crohn betegek gyűjtött szérumával inkubált HUVEC tenyészetéhez 24 óra után 15 ng/ml infliximab-ot adtunk **E:** normal szérummal inkubált HUVEC tenyészetéhez adtunk 15 ng/ml infliximab-ot **F:** HUVEC tenyészetet közvetlenül kezeltünk a standard médiumhoz adott 20 ng/ml human rekombináns TNF- α -val **G:** 15 ng/ml infliximab-ot adtunk olyan HUVEC tenyészetéhez, amit 24 órán át preinkubáltunk 20 ng/ml TNF- α -t tartalmazó standard médiumban.



19. ábra. Az eNOS fehérje expressziója HUVEC tenyészetben, amelyet két, infliximabbal kezelt Crohn beteg szérumával kondicionáltunk 24 órán át: “patient a” a szérumot két héttel a kezelést követően gyűjtöttük olyan betegből, aki jól reagált a kezelésre; “patient b” a szérum a kezelésre nem reagáló betegből származott. 4 független vizsgálati mérésből származó blottból választottuk ki az ábrán szereplőt. ($p < 0,05$).



20. ábra Angiogén cytokinek termelődése HUVEC tenyészetben, amelyek a médiumban normál szérumot tartalmaztak (control), Crohn-os beteg szérumát aktiv betegségi fázisban, ill. 24 órával az infliximab kezelést követően. A cytokine koncentrációk mérését a megfelelő fejezetben leírtak szerint végeztük, $N=4$; $p < 0.01$

Az Infliximab kezelés hatása az eNOS mRNA expresszióra HUVEC tenyészetben

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

Az Infliximab kezelés hatása a VEGFR2 expressziójára HUVEC tenyészetekben

A VEGFR2 megjelenése ismert módon függ az eNOS szintézistől. HUVEC tenyészetben történő expresszióját Western-blott technikával vizsgáltuk. Kontroll közegben tartott HUVEC tenyészetben a VEGFR2 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. Infliximabbal kezelt Crohn beteg széruma mellett a VEGFR2 szint szignifikánsan alacsonyabb maradt, mint a nem kezelt esetekben. Crohn-os 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) gyors VEGFR2 emelkedést váltott ki, amely végig megmaradt a 48 órás vizsgálati periodusban. Infliximab hozzáadásával a rendszerhez 12 órás inkubációt követően az alacsony VEGFR2 szint visszaállt (18. ábra).

Angiogén hatású cytokin szint meghatározás HUVEC felülszóban infliximab kezelés után

A vastagbél nyálkahártya microvasculáris rendszerének eNOS deficienciája Crohn betegekben valószínűleg hozzájárul a proliferáció indukálta neovascularizációhoz. Az 50%-os egészséges szérummal inkubált HUVEC felülszó alig tartalmaz angiogén cytokint, 24 órás inkubációt követően csupán az angiogenin volt detektálható 3.56 ± 0.04 ng/ml koncentrációban. Aktív Crohn szérummal történő kezelés után az angiogenin 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 angiogenin és a bFGF koncentráció a kontroll szintjén maradt (angiogenin 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 (20. ábra).

III. KLINIKAI BETEGVIZSGÁLATOK SZERVEZÉSE

A Debreceni Egyetem II. Belklinikáján 2001-ben alakult meg a nem önálló Gasztroenterológiai Tanszék, megelőzően 1996-ban szerveződött a tápcsatornai vérzőbetegek ellátását végző „szubintenzív vérzőbeteg részleg”, de lényegében a tanszék megalakulását követően indult el a jövőbeni klinikai betegvizsgálatok alapjául szolgáló szervező tevékenység.

Májcirrhosis: 2006 májusában elindítottuk egy szerológiai mintabank és egy ahhoz tartozó klinikai adatbázis létrehozását a tanszék által rendszeresen gondozott krónikus májbetegek részére. Az autoimmun májbetegségek ritka előfordulására tekintettel ezen kezdeményezésünkhöz öt magyar és egy német hepatológiai centrum is csatlakozott.

2011 novemberéig klinikánkon 422 különböző etiológiájú májcirrhosisban szenvedő betegről (egy részüktől, $n = 150$, a későbbiek során több alkalommal is) történt mintavétel (férfi/nő: 226/196, életkor: $56,6 \pm 10,9$ év, betegségtartam a diagnózis felállításától: $3,9 \pm 4,2$ év). A májcirrhosis diagnózisának felállítása a klinikai, biokémiai, képalkotó vizsgálatok és amennyiben elérhető volt, szövettani lelet alapján történt. A májcirrhosis 63,0%-ban alkoholos, 29,6%-ban hepatitis C vagy B vírus okozta, 4,7%-ban autoimmun és 2,6%-ban egyéb etiológiájú volt. A szerológiai mintabank mellett egy klinikai adatbázist is létrehoztunk, melyben a mintavételkor rögzítettük a betegség súlyosságát és a betegség specifikus komplikációk jelenlétét tükröző különféle klinikai és laboratóriumi adatokat (Child-Pugh stádium, MELD score, portális hipertensio, hepatocelluláris carcinoma, extrahepatikus társbetegségek kardio- és cerebrovaszkuláris, pulmonológiai, vese- és daganatos betegség, illetőleg diabetes mellitus, valamint a klinikailag szignifikánsan tekinthető infekció (CSI) jelenléte).

IBD: Gasztroenterológiai munkacsoportunk 2005-ben csatlakozott a Semmelweis Egyetem, I. sz. Belgyógyászati Klinika Gasztroenterológiai Munkacsoportja által létrehozott és koordinált magyar IBD Study Group-hoz, mely lehetővé tette a résztvevő centrumok részére, az összegyűjtött szérum- és DNS minták ($n=990$), (CD: 740, férfi/nő: 337/403, életkor: $36,7 \pm 12,7$ év, betegségtartam a diagnózis felállításától: $8,7 \pm 7,6$ év; UC: 250 férfi/nő: 114/136, életkor: $42,9 \pm 14,4$ év, betegségtartam a diagnózis felállításától: $11,2 \pm 9,2$ év), valamint a keresztmetszeti klinikai adatokat tartalmazó adatbázis közös használatát tudományos munkavégzéshez. 2005 októberében a tanszék által

rendszeresen gondozott IBD betegek részére elindítottuk egy saját prospektív szerológiai mintabank és egy ahhoz tartozó klinikai adatbázis létrehozását is, mely lehetővé tette a keresztmetszeti klinikai tanulmányok mellett longitudinális vizsgálatok elvégzését is. 2011 novemberig klinikánkon 472 IBD betegről történt mintavétel (CD: 268, férfi/nő: 111/157, életkor: $33,0 \pm 12,5$ év; UC: 204 férfi/nő: 90/114, életkor: $41,0 \pm 14,6$ év). Az IBD diagnózisának felállítása a Lennard–Jones kritériumrendszer alapján történt (klinikai, endoszkópos, radiológiai és kórszövettani vizsgálat alapján). A klinikai adatbázisba a mintavételkor rögzítettük a betegség klinikai klasszifikációját a montreáli beosztás szerint (életkor a betegség jelentkezésekor, a betegség fennállásának ideje, lokalizáció, viselkedés és perianális érintettség), az extraintesztinális manifesztációk (EIM) jelenlétét, a korábbi relapszusok gyakoriságát (gyakori relapszus: > 1 klinikai relapszus/év), a korábbi sebészeti beavatkozásokat, thromboemboliás eseményeket, a családi IBD előfordulását és a dohányzási szokásokat. A tervezett (3-6 havonta) és soron kívüli ambuláns betegvizitek, valamint a kórházi bennfekvések alkalmával folyamatosan rögzítettük a betegség klinikai és laboratóriumi aktivitására, a gyógyszeres kezelés hatékonyságára és a betegség kimenetelére vonatkozó adatokat (szövődmény kialakulása, thromboemboliás esemény bekövetkezése, sebészeti beavatkozás szükségessége).

A klinikai aktivitást CD esetén a Crohn-betegség Aktivitási Index [CDAI] és a Harvey-Bradshaw Index [HBI] segítségével határoztuk meg. Klinikai relapszusként értékeltük, ha a $CDAI > 150$ és a $HBI \geq 5$ pont voltak vagy a kezdeti vérvétel időpontjában észlelt értékhez képest a $\Delta CDAI > 100$ és a $\Delta HBI \geq 3$ pont volt, mellyel egyidejűleg a gyógyszeres kezelésen is változtatnunk kellett. Egyéb esetben klinikai remissziót véleményeztünk. A klinikai aktivitást UC esetén a Truelove-Witts Index [TWI] segítségével határoztuk meg. Klinikai relapszusként értékeltük, ha $TWI \geq 11$ pont volt. Az adatbázisból a betegség aktivitására és kimenetelére vonatkozó adatok mind folyamatában, mind pedig időszakokra lebontva elérhetőek (3 hónap, 6 hónap, 1 év, 2 év, teljes követési idő).

Tápcsatornai vérzőbetegek:

A vérzőbeteg intenzív osztály beteganyagát 1996 óta szisztematikusan követjük, ennek kapcsán évente történik az ott ellátott betegek adatainak részletes feldolgozása: a rögzített adatok: a betegek neme, életkora, az intézeti felvétele időtartama, időpontja, a vérzésforrások, dohányzási szokások, *Helicobacter pylori* fertőzöttségre vonatkozó adatok, anamnesztikus gyógyszerek: coumarin,

aspirin, NSAID típusú gyógyszerek szedése, alapterbetegségek, társuló betegségek részletes rögzítése, különös tekintettel a májbetegségek alcsoportjaira, vírusfertőzésekre, alkoholizmusra, ismert nyelőcső varicositasra, cukorbetegségre, magas vérnyomásra. Pontosan rögzítjük az intenzív osztályos ellátás sajátosságait, az endoscopos vérzéscsillapítás alkalmazott módszereit (scleroterapia, ligatúra, tonogén infiltráció, Sengstaken szonda alkalmazása, clip, HPU, argon plazma koaguláció etc.), a gyógyszeres kezelést: octreotid, terlipressin, DDAVP, antibiotikumok, a felhasznált vérkészítményeket, az esetleges újravérzés tényét, ellátását, a beteg felvételekor és az elbocsátásakor mért laboratóriumi adatokat – különös tekintettel a hemoglobin szint, hematocrit, fehérvérsejtszám, vérlemezke szám, haemostasis paraméterek, májenzimek, bilirubin, urea, kreatinin, CRP, albumin alakulására. Végül rögzítésre kerül a sebészeti és egyéb osztályos áthelyezés, ill. az elhalálozás is.

Kontroll csoport: A különböző betegcsoportok mintáinak összegyűjtésével párhuzamosan, 400 egészséges egyén (HC) (férfi/nő: 190/ 210) szérummintáit is összegyűjtöttük. A kontroll csoportok összeállítása az egyes tanulmányok esetén úgy történt, hogy az életkorban és nemben illesztett legyen a vizsgált betegcsoportéhoz. A kontroll csoport tagjainak nem volt ismert gasztrointesztinális vagy májbetegsége.

Statisztikai módszerek

A statisztikai elemzéseket Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) és SPSS13.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) programokkal statisztikus ellenőrzése mellett (Dr. Dinya Elek) magunk végeztük. A normalitást Shapiro-Wilk's W teszt segítségével vizsgáltuk. A PRR funkcionális polymorphismus vizsgálatoknál a genotípus megoszlásokat Hardy-Weinberg equilibrium teszt segítségével vizsgáltuk. A különböző alcsoportok adatainak összehasonlítására Fischer egzakt tesztet illetve χ^2 -próbát alkalmaztunk helyenként Yates korrekcióval, esélyhányadost (OR, odds ratio) és 95%-os megbízhatósági intervallumot (95%CI) számoltunk. Amennyiben szükséges volt, meghatároztuk a prevalenciát, és azt használtuk a számításokban. Szenzitivitást, specificitást, pozitív prediktív értéket (PPV) és negatív prediktív értéket (NPV) számoltunk, hogy meghatározzuk az adott szerológiai marker hatékonyságát a különféle betegcsoportok és HC csoport valamint a betegcsoporton belüli alcsoportok elkülönítésében, illetőleg a klinikai relapszus és CSI előrejelzésében. A diagnosztikus hatékonyság vizsgálatára a fentiekén túl valószínűségi hányados (LR) tesztet illetve Receiver Operating Characteristics (ROC) analízist

végeztünk, ennek segítségével határoztuk meg az egyes markerek esetén a küszöbértéket. Kruskal-Wallis teszt segítségével vizsgáltuk a szerológiai markerek időbeli stabilitását a betegség lefolyása során. A különféle tesztek egyezését súlyozott Kappa teszt segítségével határoztuk meg. A bináris tényezők multivariancia analízisét logisztikus regresszió analízissel végeztük el, a különbségeket p értékben és OR-ben fejeztük ki. Az egyes faktorok összefüggését a betegség időbeni lefolyásával a fentiekén túl Kaplan-Meier analízisben, a különböző alcsoportok szignifikanciáját LogRank illetve Breslow tesztek segítségével vizsgáltuk. A multivariancia analízishez Cox regresszió analízist használtunk. Az univariációs analízisben $p < 0,1$ tényezők illetve egyes *a priori* kiválasztott tényezők kerültek bevonásra a multivariancia analízisekbe. Amennyiben nincs külön más kritérium jelezve a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A nyers adatokat „átlag $\pm$ szórás”, „medián (kvartilis)” illetve „esetszám (%)” formában adtuk meg.

Etikai engedélyek

A klinikai tanulmányok protokolljait a Debreceni Egyetem OEC Etikai és Tudományos Bizottsága és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága is elfogadta. Etikai engedélyszámok: DEOEC RKEB/IKEB 81-2003, 2601-2007, 2595-2006, 2735-2008, 2860-2008, 3514-2011, 3515-2011; ETT-TUKEB 321-81/2005-1018-EKU, 80/2007-EKU, 25403/2011-EKU, 26186/2011-EKU. A betegek megfelelő tájékoztatást kaptak az adott tanulmányról és aláírták a betegtájékoztató bejegyzési nyilatkozatot.

Anyagi források

A klinikai és kísérletes tanulmányok a Debreceni Egyetem OEC Mecenatúra (2/2000; 11/2005), OTKA (T43003, K61868) és ETT (296/1997; 41/2000; 370/2003; 347/2006, 041/2006) pályázatok, EU Marie Curie Mobility Grant MRTN-CT-2006-036032 (TRACKS), a Richter Gedeon a Gasztroenterológiai Kutatásért Pályázat (2007), a Debreceni Régió Gasztroenterológusainak Közhasznú Egyesülete, valamint az INOVA Diagnostics támogatásának segítségével történtek.

IV. KLINIKAI VIZSGÁLATOK

A haptoglobin polymorphismus klinikai jelentőségének vizsgálata

A haptoglobin sajátosságai és klinikai jelentősége

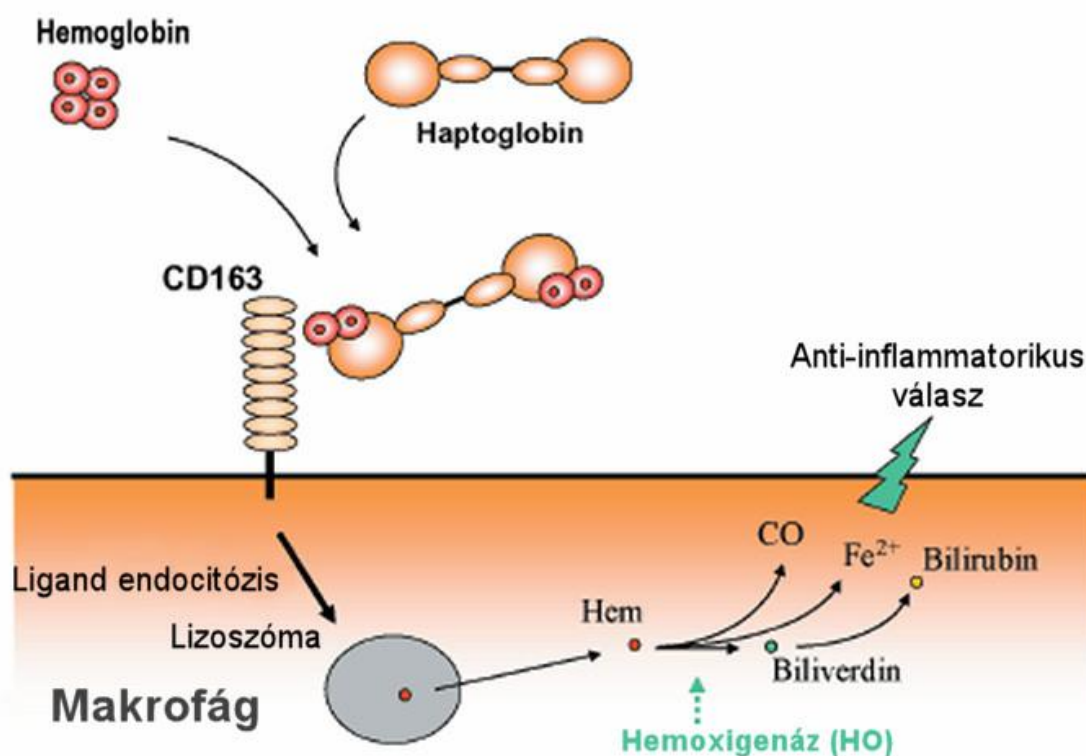
A haptoglobin (Hp) molekula jelentős antioxidáns tulajdonságokkal rendelkező akut fázis fehérje, melynek fő feladata, hogy intravascularisan a vörösvértestekből kikerülő, a sejtek számára toxikus szabad haemoglobint (Hb) megkösse, és azt a keringésből eltávolítsa. A Hp ugyanakkor az extravascularis szövetekben és testfolyadékokban is aktív: direkt angiogenetikus, anti-inflammatorikus és immunmoduláns hatású (150). Átjut az érfalon és bizonyos hatásokra különböző szövetekben is expresszálódik. A Hp a neutrofil granulocytákban is megtalálható, a gyulladás helyén lokálisan felszabadulva képes a szövetkárosodás csökkentésére (151,152). A Hp receptorai a monocytamacrophag rendszer sejtjein expresszálódó CD163 és a CD11b (CR3), mely a granulocytákon, természetes ölüsejteken és a lymphocyták egy kis csoportjának felszínén található (153). A Hp a CD4+ és CD8+ T lymphocyták többségéhez is kötődik, közvetlenül képes gátolni azok proliferációját és módosítja a Th1/ Th2 egyensúlyt (154, 155). 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 (156).

Az intravascularis haemolysis során a vörösvérsejtek destrukciójának következtében szabaddá váló haemoglobin (Hb) és haem érendothel 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 hiány 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, trombocita aktivációhoz, valamint aggregációhoz vezet. A szabaddá váló haem a protoporphyrin gyűrűbe zárt ferro vas(II) miatt is veszélyt jelent: a Fenton-reakció során keletkező hidroxil gyökök direkt módon károsíthatják az érfalat, valamint jelentős szerepet játszanak a low-density

lipoprotein (LDL) oxidációban is (157, 158). Az extravascularisan szabaddá váló Hb, pl. szöveti gyulladás vagy érsérülés során, hasonló módon oxidatív stresszt, NO hiányt eredményez, mely macrophag aktivációhoz és következményes proinflammatorikus cytokin felszabaduláshoz vezet.

A vörösvértestekből kiszabaduló és oxidálódó Hb-nak (methaemoglobin) a vérzés helyén Hp-nal történő stabilizálása és a CD163/haemoxigenáz-1 (HO-1)/biliverdin reduktáz rendszer működése azonban képes ellensúlyozni a methaemoglobin NO scavenger, vasoconstrictiv, proliferatív, inflammatorikus és pro-oxidáns tulajdonságát (159, 160). A Hp-Hb komplex képződése során megjelenő új epitóp a macrophagok és kisebb mértékben a monocyták felszínén is jelenlévő CD163 receptorhoz (haptoglobin-haemoglobin scavenger receptor, HbSR) kötődik. A kötődés Ca^{2+} -dependens és nagy affinitású (153); a komplex endocytosisát követően annak lebomlását eredményezi a lizoszómákban. A HO-1 enzim hatására a haem molekula szénmonoxiddá (CO), biliverdinné és ferro vas(II)sá alakul. A CO vasodilatátor, antiproliferatív, anti-inflammatorikus és antioxidáns tulajdonságú. A biliverdin és az azt bilirubinná alakító biliverdin reduktáz szintén antioxidáns hatású. A felszabaduló ferritin pedig azonnal megköti a ferro vas(II)-t (161) (21. ábra)

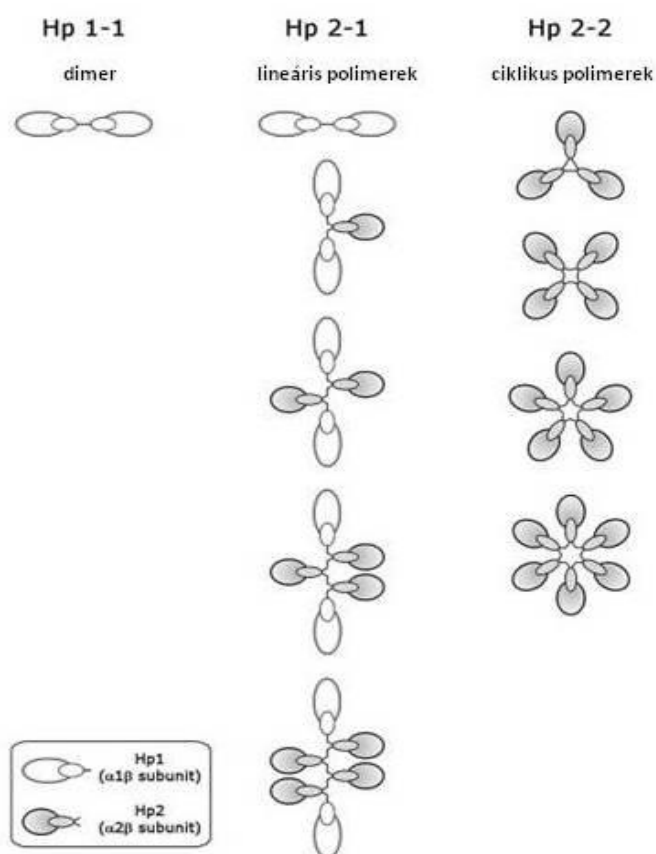
21. ábra A haemoglobin haptoglobinhoz való kötődése és a komplexnek a macrophagok CD163 scavenger receptorán keresztül történő metabolizmusa (Moestrup SK, Moller HJ. Ann Med 2004,36,347-354 nyomán).



A Hp-Hb komplex elsősorban a májban (90%), kisebb részt a keringésben lévő monocytákban (10%) metabolizálódik, extravascularisan azonban az egyetlen lehetőség a macrophagokon keresztül történő clearance (162). A Hp-Hb komplexnek a CD163 receptorához való kötődése és metabolizmusa egyben a veleszületett („innate”) immunrendszerrel való fontos, szorosan szabályozott kapcsolódási pontot is jelenti, ugyanis a monocyta/macrophag sejtek aktivációját eredményezi: fokozódik az anti-inflammatorikus tulajdonságú IL-10 termelése (163). A gyulladás során az IL-6, IL-10 és a glükokortikoidok hatására nemcsak a keringésben lévő monocytákon, hanem az érintett szövetek macrophagjain is fokozódik a CD163 receptor expressziója. Ugyanakkor a klasszikus macrophag-aktivációban szerepet játszó cytokinek (INF- γ , TNF- α) illetőleg a LPS csökkentik a CD163 receptor expresszióját. Az alternatív úton aktivált, CD163+ macrophagok egy rendkívül heterogén csoportot jelentenek, melyek a különböző stimulusokra sokrétű, ugyanakkor testreszabott módon képesek válaszolni. Kulcsszerepük van mind az akut, mind pedig a krónikus gyulladásos folyamatok mérséklésében, a tolerancia indukcióban és a szöveti regenerációban (154).

A Hp molekula egy $\alpha 2\beta 2$ sialoglycoprotein, szintézise elsősorban a hepatocytákban zajlik, melyet az akut fázis reakció során felszabaduló proinflammatorikus cytokinek indukálnak, elsősorban az IL-6 és glükokortikoidok (együtt szabályozódás a CD163-val és HO-1-vel) (164). A molekula ugyanakkor nemcsak a keringésben, hanem az extravascularis szövetekben és a testfolyadékokban is jelen van. Egyrészt átjut az érfalon, másrészt LPS hatására adipocytákban, alveoláris sejtekben és epidermális sejtekben is megjelenik. Beszámoltak továbbá a Hp jelentős fokú ektópiás megjelenéséről adenomatosus vastagbélpolypokban és daganatszövetben (165), valamint tartósan fennálló áramlásváltozások következtében a nyírófeszültség és NO hatására az artériák falában is (166)! A Hp a neutrophil granulocytákban is megtalálható. Nagyonbbrészt a myeloid érés során a myelocyta/metamyelocyta fázisban *de novo* szintetizálódik és a specifikus granulumokban tárolódik ill. kis mértékben a plazmából az exogén Hp endocytosisa is lehetséges. A Hp így a gyulladás helyén lokálisan is felszabadul, és képes csökkenteni a szövetkárosodást (151, 152). A Hp a szövetekben valódi chaperone aktivitást fejt ki azáltal, hogy megakadályozza a különféle fehérjék hősokk és az oxidatív stressz indukálta misfoldingját - fehérjék nem megfelelő feltekeredése, gombolyodása, hibás fehérje térszerkezetek kialakulása – és precipitációját, melyek toxikus hatásai jól ismertek (167).

A Hp molekula polymorphismusát az α -láncot kódoló gén két kodomináns allélja – Hp1 és Hp2 – határozza meg, mely a 16q22 kromoszómán helyezkedik el. Így a molekula genetikai polymorphismusa három fő fenotípusban nyilvánul meg (Hp1-1, Hp2-1 and Hp2-2). A Hp gén locus a Hp1 allél által kódolt 5 vagy a Hp2 allél által kódolt 7 exonból áll. A Hp2 a Hp1 allélből keletkezett az exon 3 és az exon 4 intragénikus duplikációja révén, feltehetőleg egy nem-homológ DNS crossing-over folyamat során. A Hp monomerek összekapcsolódásához szükséges kritikus diszulfid kötőhelyek az exon 3-ban és az exon 4-ben találhatóak. A Hp1 monomerek monovalensek és dimerek keletkeznek belőlük. A Hp2 monomerek viszont bivalensek, tekintve, hogy az exon 3-t és az exon 4-et duplikátumban tartalmazzák és így két másik Hp monomer megkötésére képesek. Ennek következtében a Hp1 génre homozigóta egyének esetén létrejövő Hp1-1 molekula, két $\alpha_1\beta$ alegységből álló dimer (86kDa). A Hp2 génre homozigóta egyénekben nagy molsúlyú ciklikus polimerek alakulnak ki. Az így képződő Hp2-2 molekula valójában ezen változó számú $\alpha_2\beta$ alegységből álló ciklikus polimerek keveréke (170-900kDa). A Hp génre heterozigóta egyénekben szintetizálódó Hp2-1 molekula szerkezete teljesen eltér a homozigótákban képződő molekulákétól. Szintén egy polimer keverék, azonban ezt a molekulát két $\alpha_1\beta$ alegysége között különböző számú $\alpha_2\beta$ alegységből kialakuló lineáris polimerek alkotják, mintegy 86-300 kDa tömegben. (22. ábra)



22. 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 (168).

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 (150). A Hp1-1 és 2-2 molekula a különféle funkcionális vizsgálatokban általában ellentétesen viselkedett. A Hp2-1 működését ugyanakkor gyakran intermedierek tartják, noha a molekula aktivitását csak ritkán vizsgálták és csak nagyon kevéssé ismert annak valódi viselkedése, esetleges különbözősége a másik két fenotípushoz képest. A Hp2-1 molekula szerkezetét figyelembe véve sem tekinthető a másik két fenotípus intermediérének, mely szintén arra enged következtetni, hogy ugyanez érvényes a molekula működésére is.

A Hp egyik legtöbbet vizsgált tulajdonsága az antioxidáns kapacitása. A Hp Hb-kötő képessége és kapacitása (169, 170) az egyes fenotípusok esetén különböző, az antioxidáns aktivitásban észlelhető eltéréseket mégis elsősorban a Hp-Hb komplexben lévő vasnak a környezete számára való eltérő hozzáférhetőségével magyarázzák. A Hp molekulák közül Hp2-2 rendelkezik a legkisebb antioxidáns kapacitással, mind a keringésben, mind az extravascularis szövetekben. Egyrészt a Hp2-2-Hb komplexben lévő vas a leginkább elérhető a környezet számára, melynek következtében fokozott kelátképződési hajlam és kifejezettebb redoxaktivitás jellemezi a Hp1-1-Hb komplexben lévő vashoz képest. Ez az ún. labilis plazma vas (LPI) felelős a Hp2-2-Hb komplex esetén kimutatható fokozott szabadgyök képződésért. A Hb oxidálódása vagy glikozilálódása esetén azt is megfigyelték, hogy az LPI mennyisége nő, illetőleg az antioxidáns kapacitásban észlelhető fenotípus-függő különbség is jelentősen fokozódik (171,172). Továbbá a Hp-Hb komplex kiürülése a Hp2-2 fenotípus esetén jóval lassúbb és kevésbé hatékony a Hp1-1-hez képest (173). Az extravascularis szövetekben és a különféle testfolyadékokban is a Hp2-2 antioxidáns kapacitását a nagy molekulatömege még tovább csökkenti azáltal, hogy korlátozza az érfalon való átjutásban (174).

Számos klinikai tanulmány igazolta a Hp polymorphismus független prognosztikai szerepét a diabéteszes érszövődmények kialakulásában. A Hp2-2 fenotípusú diabéteszes betegekben gyakrabban alakul ki nephropathia, retinopathia és különféle cardiovascularis szövődmények, mint Hp2-1 és Hp1-1 fenotípusú egyéneknél (175, 176), melyet a molekula csökkent antioxidáns kapacitása mellett egyre inkább annak fokozott immunreaktivitásával is összefüggésbe hoznak (177).

Célkitűzések

A haptoglobin (Hp) polymorphismus következtében létrejövő három különböző fenotípusú haptoglobin molekula térszerkezete eltérő és különböző mértékű antioxidáns, scavenger és immunmoduláns tulajdonságokkal rendelkeznek, melynek révén kapcsolatot mutatnak egyes gyulladásos betegségek prevalenciájával és lefolyásával. Célunk volt, hogy a haptoglobin polymorphismusát 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 polymorphismusok kapcsolatba hozhatók-e a Crohn-betegség kialakulásával, annak extraintestinalis manifesztációival, a betegség klinikai megjelenési formájával és a kezelésre adott válasszal. Vizsgáltuk továbbá a Hp kapcsolatát más genetikai tényezőkkel is, mint a NOD2/CARD15 mutációk illetve a TLR4 D299G polymorphismussal.

Májbetegek esetén nagyszámú cirrhotikus betegen tanulmányoztuk a Hp fenotípusok megoszlását és ennek összefüggéseit a betegség lefolyását súlyosbító infekciók előfordulásával.

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 szérumból – 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.

A Hp polimer-expresszió stabilitásának, valamint a fenotipizálási módszer reprodukálhatóságának ellenőrzésére 27 coeliakiás beteg esetén két vagy több különböző időpontban levett szérummintákból nyert eredményeket hasonlítottuk össze. A mintavételek között eltelt medián időintervallum 12,8 év [tartomány 0,2-14,8 év] volt.

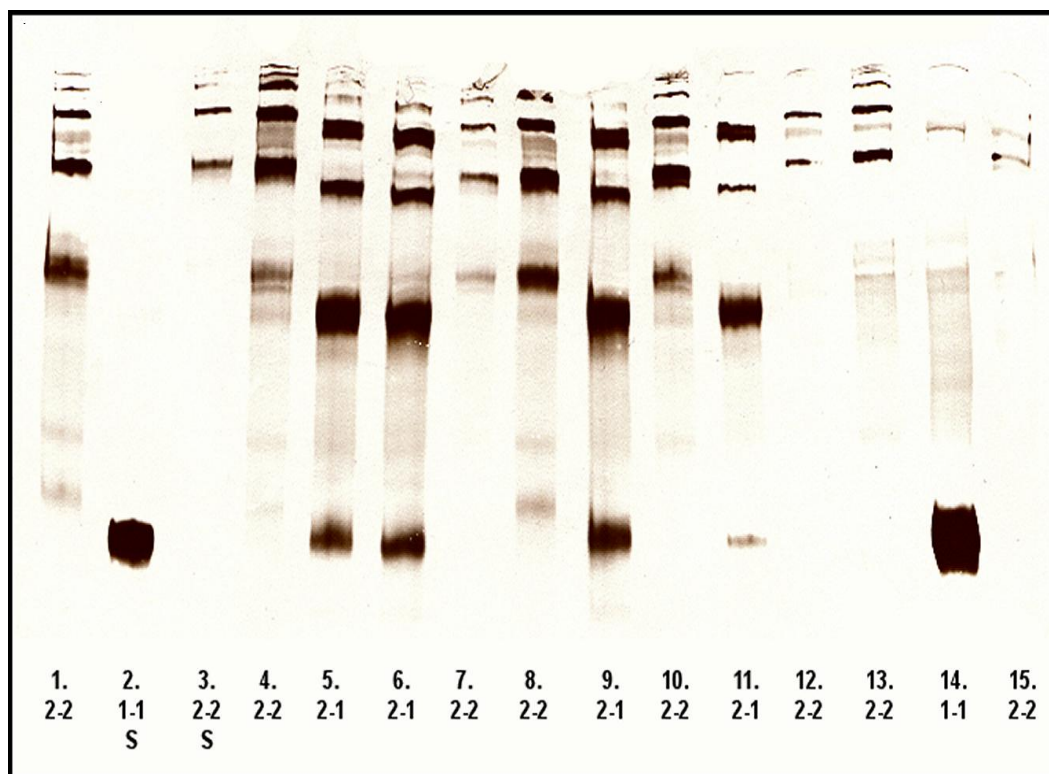
A különböző Hp fenotípusok elektroforetikus mobilitásuk és sávmintázatuk alapján könnyen elkülöníthetőek (23. ábra).

Haptoglobin polymorphismus vizsgálata

Az egészséges kontroll populáció Hp fenotípus megoszlása megegyezett a korábbi, mintegy 2609 magyar egyént magába foglaló populációs szintű felmérés adataival (180) és a nem, valamint az életkor nem befolyásolta. A Hp1 és Hp2 allélek a kontroll csoportban megfeleltek a Hardy-Weinberg egyensúlynak (2. táblázat).

23. ábra Különböző haptoglobin (Hp) fenotípusok elektroforetikus képe.

A Hp1-1 fenotípus esetén egyetlen, kis molekulatömegű, gyorsan vándorló sáv látható. A Hp 2-2-t számos, nagy molekulatömegű, lassan vándorló sáv jellemzi. A Hp 2-1 fenotípusban pedig mind a Hp 1-1-nek megfelelő sáv, mind pedig számos lassabban vándorló sáv is megfigyelhető. S=gyári standard.



2. táblázat Haptoglobin (Hp) fenotípusok és a Hp allélok gyakorisága Crohn-betegekben, colitis ulcerosa-sokban és egészséges egyéneknél.

	Esetek	Hp(1-1)	Hp(2-1)	Hp(2-2)	Hp1 allél
Crohn-betegség, n (%)	468 (100,0%)	71 (15,2%)	227 (48,5%)	169 (36,1%)	0,3951*
Colitis ulcerosa n (%)	43 (100,0%)	4 (9,4%)	23 (53,5%)	16 (37,2%)	0,3140
Kontrollok, n (%)	384 (100,0%)	44 (11,5%)	177 (46,1%)	163 (42,4%)	0.3451*

* OR:1,24, 95%CI: 1,02-1,51, p=0,03 a kontrollhoz képest

Haptoglobin polymorphismus vizsgálata Crohn-betegségben

A Crohn-betegség pathofiziológiájában egyre inkább előtérbe kerül az az újszerű szemlélet, miszerint a döntő fontosságú első lépés az innate immunitásban észlelhető defektust lenne, és ennek következményeként alakulna ki az adaptív immunitás zavara. A Hp-nak mind az innate mind pedig az adaptív immunrendszer szabályozásában betöltött komplex, esetenként fenotípusfüggő szerepe, valamint a granulomatosis fertőzések lefolyására kifejtett hatása alapján felmerülhet az IBD pathogenezisével vagy annak kórlefolásával való kapcsolata is. Ugyanakkor a Hp polymorphismus megoszlásról IBD-s betegek vonatkozásában csak kevés adat ismert. Mindössze egy, a Th1/Th2 orientáció genetikai hátterét vizsgáló tanulmány részeként került sor 28 Crohn-betegben a Hp fenotípus-megoszlás meghatározására (181).

Multicentrikus tanulmányunkban magyar IBD betegekben, elsősorban Crohn-betegekben vizsgáltuk a Hp polymorphismus megoszlást és annak esetleges kapcsolatát a betegség klinikai megjelenésével, a kezelésre adott válasszal és az extraintesztinális manifesztációkkal. Vizsgáltuk továbbá a Hp kapcsolatát más genetikai tényezőkkel (NOD2/CARD15 mutációkkal illetőleg a TLR4 D299G polymorphismussal) is.

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. A Crohn-betegek klinikai adatait a **3. táblázat** tartalmazza.

Az IBD diagnózisának felállítása a Lennard-Jones által leírt (klinikai, endoszkópos, radiológiai és kórszövettani) kritériumok alapján történt (182). A betegek adatainak rögzítését a gondozó gastroenterologus szakorvos végezte előre elkészített kérdőív kitöltésével, mely tartalmazta a beteg nemét, az aktuális és a betegség felismeréskori életkort, az extraintestinalis tünetek jelentkezését (arthriti: perifériás, axiális; szemészeti szövödmények: conjunctivitis, uveitis, iridocylitis; bőrelváltozások: erythema nodosum, pyoderma gangrenosum; májszövödmények: PSC; a relapszusok gyakoriságát (gyakori relapszus: $>1/\text{év}$), a gyógyszeres kezelés hatékonyságát (steroid és/vagy immunszuppresszív szerek alkalmazásának szükségessége, steroid-rezisztencia az ECCO [European

Crohn's and Colitis Organisation] Konszenzus Report alapján (183), vagy az infliximab kezelésre adott rövid-távú válasz), a sebészeti beavatkozás szükségességét (reszekciós műtétek), a családi IBD előfordulást, a dohányzási szokásokat. Továbbá a perianalis szövődmény jelentkezését is rögzítettük. A betegség klinikai osztályozását (betegség felismeréskori életkor, a betegség lokalizációja, viselkedése) a bécsi klasszifikáció szerint végeztük (184) (nem-gyulladásos betegségforma, strikturáló vagy penetráló betegség).

A tanulmányba történő bevonás feltétele volt, hogy a végleges diagnózis felállításától legalább egy év elteljen, a beteg folyamatos ellenőrzés alatt álljon és két évnél, ne legyen régebbi a tápcsatorna endoszkópos és szövettani vizsgálata.

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, $p=0,03$) (**2. táblázat**), a Hp fenotípus megoszlás azonban nem különbözött a vizsgált IBD csoportokban a kontroll populációtól (**3. táblázat**). A Crohn-beteg csoportban egyetlen ahaptoglobinaemias (Hp 0-0) esetet észleltünk.

A Hp polymorphismus nem mutatott összefüggést Crohn-betegségben sem azzal az életkorral, amelyben a betegség kezdődött, 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.

Kapcsolatot találtunk viszont a betegség viselkedése és a Hp polymorphismus között: 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.

3. táblázat Crohn-betegek klinikai adatai a haptoglobín (Hp) fenotípusok szerint.

	Hp(1-1) (n=71)	Hp(2-1) (n=227)	Hp(2-2) (n=169)	Összes (n=468)
Nem (férfi/nő)	37/34	110/117	86/83	233/235
Életkor (évek)	36,2±12,7	36,0±12,7	37,4±12,6	36,5±12,7
Életkor a CD kezdetekor (évek)	28,3±11,8	27,7±12,1	29,2±11,2	28,2±11,7
Betegségstartam (évek)	8,6±6,1	8,3±7,1	8,1±6,5	8,3±6,7
Családi IBD előfordulás ¹	12 (16,9%)	23 (10,1%)	23 (13,6%)	58 (12,4%)
Lokalizáció ¹ L1	16 (22,5%)	55 (24,2%)	42 (24,9%)	113 (24,1%)
L2	18 (25,4%)	53 (23,3%)	44 (26,0%)	116 (24,8%)
L3	35 (49,3%)	115 (50,7%)	80 (47,3%)	230 (49,1%)
L4	2 (2,8%)	4 (1,8%)	2 (1,2%)	8 (1,7%)
Viselkedés ¹ B1	26 (36,6%)	102 (44,9%)	58 (34,3%)	186 (40,4%)*
B2	23 (32,4%)	46 (20,3%)	55 (32,5%)	125 (26,7%)**
B3	21 (29,6%)	79 (34,8%)	55 (32,5%)	155 (33,1%)
Perianális lézió ¹	21 (29,6%)	64 (28,2%)	46 (27,2%)	131 (28,0%)
Gyakori relapszus ¹	25 (35,2%)	96 (42,3%)	73 (52,5%)	194 (41,6%)
Extraintesztinális tünetek Arthritis ¹	21 (29,6%)	73 (32,1%)	56 (33,1%)	150 (32,1%)
Szem ¹	6 (8,5%)	22 (9,7%)	10 (5,9%)	38 (8,1%)
Erythema nodosum, pyoderma ¹	5 (7,0%)	19 (8,4%)	13 (7,7%)	37 (7,9%)
PSC ¹	0 (0,0%)	7 (3,1%)	11 (6,5%)	18 (3,8%)*
Szteroid kezelés/ refrakter ¹	60 (84,5%) 10 (14,1%)	187 (82,4%) 18 (7,9%)	145 (85,8%) 14 (8,3%)	393 (84,0%) 42 (9,0%)
Azathioprin kezelés	47 (66,2%)	146 (64,3%)	111 (65,7%)	305 (65,2%)
Reszekciós műtétek ¹	25 (35,2%)	89 (39,2%)	72 (42,6%)	186 (39,7%)
Többcsörös reszekció ¹	8 (11,3%)	21 (9,2%)	22 (13,0%)	51 (10,9%)
Dohányzás (n)				
nem	46	135	88	270
igen	20	75	61	156
korábban	5	17	19	41
NOD2 (n=404)				
carrier	21 (33,3%)	58 (30,1%)	44 (29,9%)	123 (30,4%)
non-carrier ¹	42 (66,7%)	135 (69,9%)	103 (70,1%)	281 (69,6%)
TLR4 D299(n=404)				
carrier	7 (12,5%)	22 (11,4%)	11 (7,5%)	41 (10,1%)
non-carrier ¹	56 (87,5%)	171 (88,6%)	136 (92,5%)	363 (89,9%)

¹n (%); * OR_{B1Hp2-1} vs egyéb: 2,06, 95%CI: 1,29-3,28; ** p_{B2Hp-2-1} vs egyéb: 0,04; *** p= 0,039 a kontrollhoz képest

Nem volt összefüggés a Hp fenotípusok és a TLR4 D299G polymorphismus között sem. A NOD2/CARD15 gén LRR régiójában lévő három fő mutáció közül az SNP 12 (= single nucleotid polymorphism) az 1-1 fenotípus esetén szignifikánsabban gyakrabban fordult elő (14,3% [9/63]), mint a másik két fenotípus esetén (2-1: 3,6% [7/186], 2-2: 6,1% [9/138]) (p=0,025),

az SNP 8 és 13-val nem találtunk kapcsolatot. Colitis ulcerosában fenotípus-genotípus kapcsolatot nem találtunk, igaz az esetszám kicsi volt (adatokat nem mutatjuk).

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a Hp1 allél szignifikánsan gyakrabban fordult elő magyar Crohn-betegekben, a Hp fenotípusok pedig a betegség viselkedésével és a PSC gyakoriságával mutattak összefüggést, melyek a Hp polymorphismus vagy egyéb társult polymorphismusok betegségmódosító szerepére utalhatnak Crohn-betegségben.

Haptoglobin polymorphismus vizsgálata májbetegekben

A bakteriális infekciók a mortalitás és a morbiditás jelentős tényezői májcirrhosisos betegekben, köszönhetően az immunkomprimált állapotnak. 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 májcirrhosisos betegről (férfi/nő: 188/148, a májzsugor fennállásának ideje $3,9 \pm 4,2$, kor: 56.5 ± 10.8 év) történt mintavétel. A klinikai adatokat az **4. táblázatban** összegeztük. 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. Pozitív klinikai jelnek tekintettük a sárgaságot, erythema palmare-t, a Dupuytren szindrómát, a szörzetvesztést, férfiaknál a nőies szörzet, a gynecomastia kialakulását, a csillag-naevus-ok jelenlétét, az ascitest, az izom-atrophia-t, az encephalopathia-t. Biokémiai pozitivitást jelentett a csökkent vérlemezke-szám, fvs-szám, anaemia, megnyúlt protrombin idő, emelkedett bilirubin szintek, és májenzimek, csökkent koleszterin, albumin és kolinészteráz értékek. Ultrahang vizsgálat során a fokozott echogenitás, a noduláris felszín, a nagyobb lép, atrophizált jobb és hypertrophizált bal lebeny

(185), valamint a duplex technika során látott portális kollaterálisok szóltak májcirrhosis mellett. Felső panendoscopia során ellenőriztük a nyelőcső varixok jelenlétét, állapotát, az esetleges portális gastropathia-t (186). Azokban az esetekben, ahol ezek alapján nem volt egyértelmű a diagnózis, májbiopszia történt (összesen 104 betegben igazoltuk szövettanilag a májcirrhosist). Alkoholos májzsugorban szenvedő betegeink alkohol fogyasztása meghaladta a napi 60g-ot. 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. Rögzítettük a betegek adatait: életkor, életkor a betegség felismerése idején, etiológia, a cirrhosis súlyossága, ascites megléte, foka, nyelőcső varicositas és annak mértéke, megelőző varixvérzés(ek), társbetegségek.

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 májcirrhosis súlyosságát a Child-Pugh klasszifikáció (187), és a model for end-stage liver disease (MELD) score (188) 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 is.

4.táblázat A Hp polymorphismus vizsgálatába bevont májbetegeink adatai

Májcirrhosisban szenvedő betegek, n	336
Nemek (ffi/nő), n	188/144
Kor ($\pm$SD)	56,5$\pm$ 10,8 év
Etiológia, n (%)	
Alkoholos	219 (65,2%)
HCV	97 (28,9%)
Egyéb	20 (5,9%)
Child A/B/C, n	110/128/98

Társbetegségek, n (%)	149 (44,3%)
Egy	99
Kettő	31
Három, vagy több	9
Hepatocellularis carcinoma, n (%)	36 (10,7%)
Betegek, akiknek fertőzése volt, n (%)	113 (33,6%)
Egy	51
Kettő	31
Három	31
Egészséges kontrollok, n	384
Nemek (ffi/nő), n	192/192
Kor ($\pm$ SD)	52,5 $\pm$ 10,2 év

Klinikailag szignifikánsnak akkor tekintettük a fertőzést, ha a beteg általános állapota, a májfunkció romlása, vagy szövődmények (encephalopathia, varixvérzés, hepatorenális szindróma) kialakulása miatt kórházi felvételt igényelt. A követési időszak alatt betegeink profilaktikus antibiotikum kezelést nem kaptak.

Az infekciós epizódok értékelése során figyelembe vettük a klinikai tüneteket, lázat, laboratóriumi eredményeket, tenyésztési eredményeket (ha rendelkezésre álltak), képalkotó vizsgálatok eredményeit. A betegek halála (n=108) esetén a boncjegyzőkönyvek is áttekintésre kerültek. A bőr- és lágyrész, a szájüregi, a felső és alsó légúti (akut bronchitis, pneumonia), az epeúti (cholangitis, cholecystitis, májtályog), a bél- (gastroenteritis), a húgyúti (cystitis, pyelonephritis) infekciók, az osteomyelitis és az endocarditis diagnózisának felállítása a konvencionális kritériumok alapján történt. Spontán bakteriális peritonitis-t akkor vélelmeztünk, ha a hasüregben infekcióforrás nem volt észlelhető, de az ascites folyadékban a PMN leukocytaszám nagyobb volt, mint 250 mm³, függetlenül attól, hogy volt-e pozitív ascites-tenyésztési eredmény.

A kontrollcsoport 384 korban és nemi megoszlásban a betegektől nem különböző (ffi/nő: 192/192, kor: 52.5 $\pm$ 10.2 év) egészséges emberből állt, akiknek sem gasztroenterológiai, sem májbetegségük nem volt.

EREDMÉNYEK

Haptoglobin polymorphismus megoszlása májbetegekben

A cirrhotikus betegek Hp fenotípus megoszlása megegyezett az egészségesben talált arányokkal (**5.táblázat**), az értékek a Hardy-Weinberg szerint számított egyensúlynak megfeleltek, nem különböztek kor és nem szerinti megoszlásban sem.

5. táblázat Haptoglobin fenotípus és Hp1 allél frekvenciák cirrhotikus betegekben és egészséges kontrollokban

	Esetek	Hp(1-1)	Hp(2-1)	Hp(2-2)	Hp1 allél
Gyakoriság cirrhotikus betegekben, n	336	36	161	139	0,3467
(%)	(100,0%)	(10,7%)	(47,9%)	(41,4%)	
Gyakoriság egészséges kontrollokban, n	384	44	177	163	0,3451
(%)	(100,0%)	(11,5%)	(46,1%)	(42,4%)	

Nincs statisztikai különbség

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 (**6.Táblázat**), 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 bacteriaemia, 2,4%-ban epeúti fertőzés, 0,5%-ban osteomyelitis volt igazolható. A fertőzés lokalizációját 16,5%-ban nem tudtuk meghatározni.

6. táblázat A Hp fenotípusok megoszlása cirrhotikus betegeinkben

	Összes N = 336	Hp1-1 n = 36	Hp2-1 n = 161	Hp2-2 n = 139
Nem (ffi/nő), n	188/148	15/21	85/76	88/51
Kor (Átlag ± SD, év)	56,5±10,8	57,5±13,1	56,7±10,2	55,9±10,9
Child-Pugh stage, n				
A				
B	110	12	48	50
C	128	12	63	53
Meld score (pontok)	98	12	50	36
Szérum bilirubin (μmol/L)	14,7±6,3	14,4±5,1	15,0±7,0	14,3±5,7
Szérum albumin (g/L)	65,5±94,1	67,1±95,8	64,5±85,5	64,3±100,3
Trombocita (G/L)	33,1±8,0	34,2±7,5	32,1±8,0	34,0±8,1
Immunoglobulinok (g/L)	123,1±72,4	136,3±84,2	122,8±84,2	119,9±63,1
IgG				
IgA	18,3±7,2	18,4±6,0	18,9±7,8	17,6±7,0
IgM	6,9±4,9	6,1±5,5	6,8±4,3	7,4±5,2
	2,8±3,7	2,3±1,8	2,7±3,0	3,0±4,9
Társbetegségek, n (%)	149 (44,3%)	19 (52,7%)	70 (43,5%)	60 (43,2%)
Egy	109	14	50	45
Kettő	31	4	17	10
Három v. több	9	1	3	5
HCC, n (%)	36 (10,7%)	5 (13,9%)	18 (11,2%)	13 (9,4%)
Követési idő ± SD (nap)	443±363	428±374	476±369	410±353
Medián követés, IQR (days)	420 [88-742]	325 [67-761]	472 [120-767]	371 [63-711]
Betegek, akiknek infekciója volt a követés alatt, n (%)	113 (33,6%)	18 (50,0%)*	58 (36,0%)	37 (26,6%)*
Egy	51	10	27	14
Kettő	31	3	15	13
Három vagy több	31	5	16	10
Betegek, súlyos infekcióval, n (%)	95 (28,3%)	16 (44,4%)	47 (29,2%)	32 (23,0%) [#]

SD: standard deviáció, IQR: inter-quartilis tartomány, HCC: hepatocellularis carcinoma

* $p=0,039$, [#] $p=0,03$, χ^2 -test Yates korrekcióval

Pozitív tenyésztési eredmény 138 esetben állt rendelkezésre, ami a fertőzéses epizódok 55,6%-t jelentette. A kórokozók 57,2%-ban Gam-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%).

Összefüggés a Hp fenotípusok, a klinikai jellemzők és a klinikailag szignifikáns bakteriális infekciók megjelenése között

Nem találtunk különbséget a kórokozókat és az infekciók lokalizációit tekintve az egyes Hp fenotípusok között. (nem mutatott adatok) 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. **(6. Táblázat)**

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. **(6.táblázat)** 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 vs. egyéb}: 2,16, 95% CI: 1,07-4,33). Ráadásul Hp1-1-s fenotípus esetén az infekciók egyértelműen súlyosabb formában zajlottak ($p=0,03$). Nem találtunk összefüggést a Hp koncentráció kvartilisek és az infekciók kialakulása között. **(7.táblázat)**

7.táblázat Klinikailag szignifikáns bakteriális infekciók előfordulása haptogloblin koncentráció kvartilisek szerint

Hp koncentráció (g/L)	Q1 (0-0,14)	Q2 (0,15-0,51)	Q3 (0,52-1,06)	Q4 (1,07-3,52)
Betegek, akiknek infekciója volt	32,9%	31,3%	36,9%	33,3%

Logisztikus regressziós analízissel a betegség Child-Pugh stádium szerinti súlyossága, a társbetegségek és a Hp1-1 fenotípus az infekciók kialakulása független rizikótényezőinek bizonyultak. (8.Táblázat)

Kaplan-Meier túlélési görbén ábrázolva Breslow és LogRank tesztet alkalmazva a Child-Pugh stádium (24.ábra), az ascites jelenléte (25.ábra) és a társbetegségek (26.ábra) mutattak összefüggést az első szisztémás infekció megjelenéséig eltelt idővel. Hp1-1-s fenotípusú betegek esetén az első fertőzés kialakulásáig eltelt idő rövidebb volt, mint Hp2-2-s fenotípus esetén (27.ábra). (medián, 492 vs. 965 nap; HR: 2,31 95% CI: 1,86-4,51, pBreslow=0,014 és pLogRank=0,017).

8.táblázat. Logisztikus regresszió: A bakteriális infekciók prediktív tényezői májcirrhotikus betegekben

Faktor	Koefficiens	P érték	OR	95%KI
Női nem	0,316	0,21	-	-
Child-Pugh stádium	0,334	0,038	1,40	1,02-1,91
Társbetegségek	0,969	<0,001	2,64	1,63-4,27
Haptoglobin fenotípusok	-	0,039	-	-
Hp2-2	<i>Referencia</i>			
Hp2-1	0,427	0,11	-	-
Hp1-1	1,006	0,015	2,74	1,22-6,14

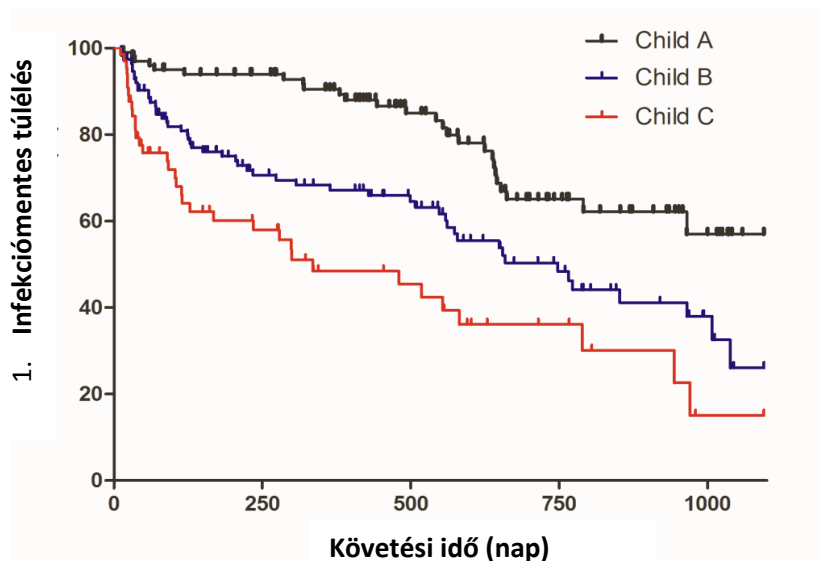
A koefficiens az OR természetes logaritmus; *p* érték: szignifikancia szint; OR: odds ratio; 95%CI: 95% konfidencia intervallum

9.táblázat A Cox modell összegzése: Az első bakteriális infekcióig eltelt idő hosszát befolyásoló tényezők

	<i>P</i>	Esélyhányados	95%CI
Női nem	0,16	-	-
Child-Pugh stádium	<0,001		
Child A	<i>Referencia</i>		
Child B	0,02	2,16	1,33-3,51
Child C	<0,001	4,43	2,60-7,56
Társbetegségek	0,004	1,79	1,21-2,65
Haptoglobin fenotípusok (Hp)	0,05		
Hp2-2	<i>Referencia</i>		
Hp2-1	0,412	-	-
Hp1-1	0,014	2,03	1,15-3,61

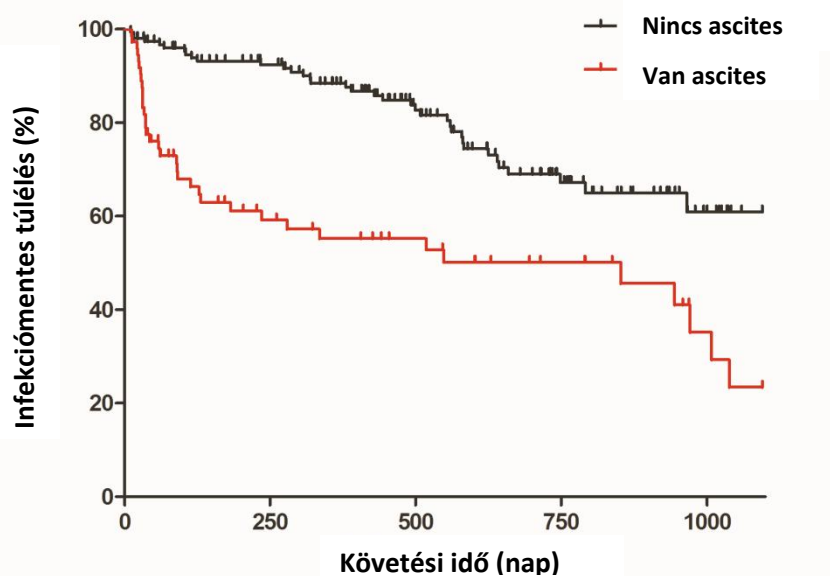
p érték: szignifikancia szint; 95%CI: 95% Konfidencia intervallum

24. ábra Az első infekcióig eltelt idő alakulása a cirrhosis súlyossága szerint



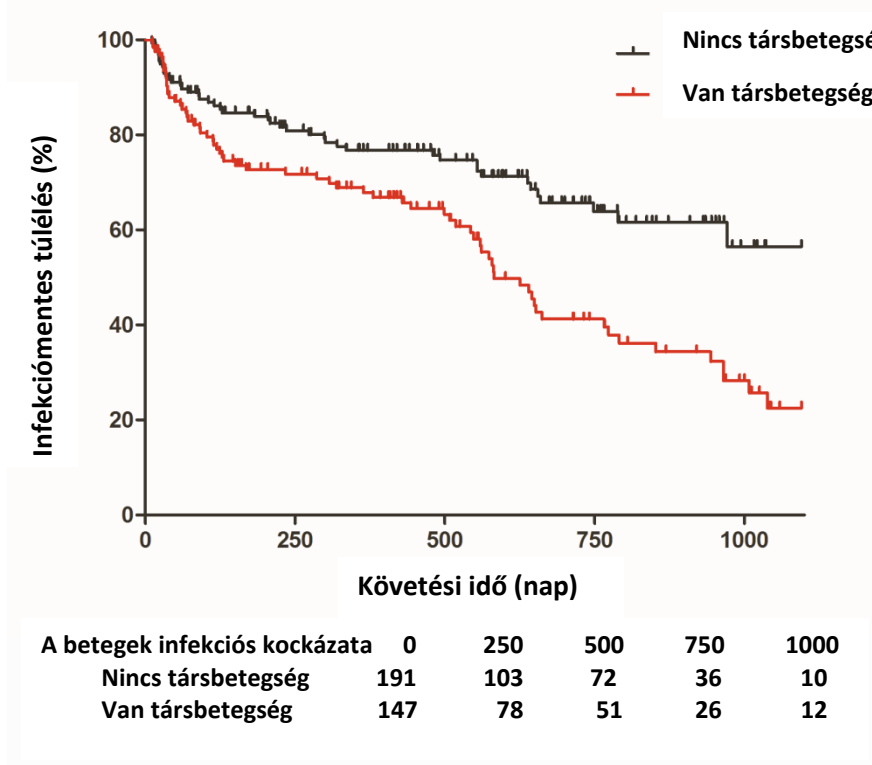
A betegek infekciós kockázata	0	250	500	750	1000 nap
ChildA	110	85	54	28	11
ChildB	126	64	48	25	9
Child C	102	28	16	8	2

25. ábra. Az első infekcióig eltelt idő alakulása ascites jelenléte és hiánya esetén

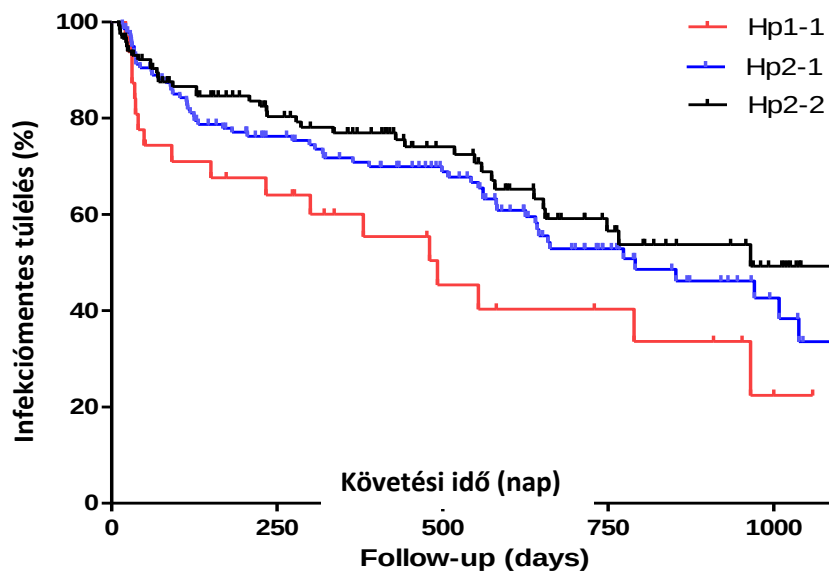


A betegek infekciós kockázata	0	250	500	750	1000
Nincs ascites	169	92	83	67	61
Van ascites	169	59	55	50	29

26. ábra Az első infekcióig eltelt idő alakulása társbetegségek jelenléte és hiánya esetén



27. ábra A fertőzések kialakulásának rizikója különböző haptoglobin fenotípusok esetén



Cox-regresszióval a Child-Pugh C ($p < 0,001$) stádium, a társbetegségek jelenléte ($p = 0,004$) és a Hp1-1-s fenotípus ($p = 0,014$) bizonyultak az első infekció kialakulásáig eltelt rövidebb időt meghatározó független tényezőknek. (lásd még 9.Táblázat)

A mannóz-kötő lektin klinikai jelentőségének vizsgálata

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 (189). **(28. ábra)** A multimer formának az MBL funkciójában van jelentősége. 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 (190).

Az MBL szerepe az innate immunitásban

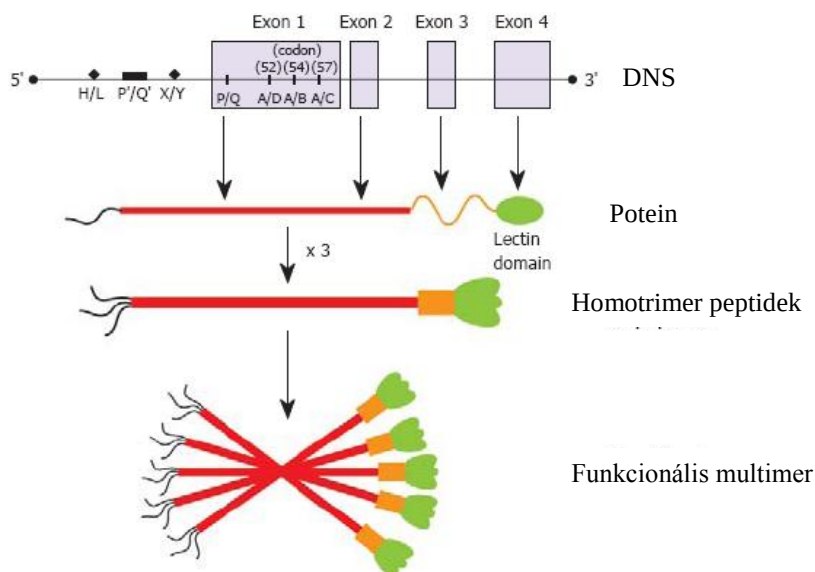
Az innate, vagy veleszületett immunitás jelenti az elsődleges védelmi vonalat a behatoló kórokozókkal szemben. Ennek az elsődleges védelmi rendszernek a résztvevői az ép epitél mellett szolúbilis molekulák (antimikrobiális peptidek, komplement, citokinek, természetes antitestek), a phagocyták és a mintázat 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 (191).

Az MBL a mikroorganizmusok széles skáláját képes felismerni (Gram-pozitív és negatív baktériumok, vírusok, gombák, protozoonok), vizsgálatok szerint a CRD-vel történő kapcsolódás alapján (191). 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-glükózamin, mannóz, N-acetil-mannózamin, fukóz, glükóz (192), 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. A kötődést követően az MBL konformáció változáson megy át, melynek jelentősége van az ezt kövező

lépések beindításában (komplement-aktiváció, a phagocytosis, a gyulladásos válasz és az adaptív immunválasz). A károsodott saját sejtek felismerése a megváltozott felszíni struktúrák alapján történik. Az MBL a keringésben az MBL asszociált szerinproteázzal (MASP) komplexet alkotva kering. Kapcsolódásuk a kollagén doménen keresztül történik. Az MBL kötődése a mikrobiális felszínhez módosítja a kollagén konformációját és a MASP autoaktivációját váltja ki, mely hasítani képes a C2 és C4-t, létrehozva a C4bC2a (klasszikus C3 konvertáz) molekulát, beindítva a komplement aktiváció lektin útját. A phagocytosis inicializálása azonban nem csak a komplement rendszer aktiválásán keresztül történik. Állatkísérletes modellekben az MBL-null egerek *Staphylococcus aureus* infekcióra való fogékonysága megegyezett az MBL-null+C3-null egerekével, de lényegesen nagyobb volt, mint a C3-null egereké, mely alapján feltételezhető, hogy a phagocytosis beindításának a komplement rendszertől független útja is létezik (193). Shiratsuchi és mtsai bizonyították, hogy az MBL MASP-tól függetlenül (tehát komplement aktiváció nélkül) is, direkt úton fokozza a phagocytosist, hidat képezve a falósejt és a kórokozó között. A célsejthez történt kapcsolódással egyidőben az MBL- valószínűleg a kollagén doménen keresztül - kapcsolódni képes a phagocyta sejtek felszínén található komplement receptor CR1-hez, valamint a kollektin receptor C1qR-hez (192). Ez azt jelenti, hogy az MBL nem csak fokozza az opsonophagocytosist, de maga is opsoninként funkcionál (191). Az MBL saját károsodott sejtek eliminálásában betöltött funkcióját komplement-függőnek találták. A phagocytosis ugyan bekövetkezik a sejt felszíni receptoroknak a patogénekhez, vagy sérült sejtekhez való közvetlen kapcsolódása révén is, mégis a komplement és az MBL hiányában az eltakarítás késik.

Az MBL szerepet játszik a citokin szabályozásban is. Alacsony szintje fokozta a TNF- α , az IL-1 β és az IL-6 felszabadulást, magasabb koncentrációk csökkentették (194). TLR-2/6 co-receptorként működve az intracelluláris jelátvitelben is közreműködik, szerepe van a phagocytáknak a bekebelezett organizmusra adott válaszában (195).

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



Az MBL főleg a májban szintetizálódik, mint szérumban fehérje a keringésbe jut. Kimutatták jelenlétét középfülben lévő folyadékban, gyulladt ízületi folyadékban, 26. terhességi hét után a magzatvízben, torokváladékban (191). Ráadásul intracellulárisan a phagocyták granulumaiban, valamint az endoplazmás retikulumban is jelen van, ahol feltételezések szerint a phagocytált részecskéknek az endoplazmás retikulumból a Golgi apparátusig történő transzportját szabályozza (196).

A proteint kódoló MBL2 génnek több allélja van. A promotor régió mutációi a fehérje expresszióját befolyásolják. Az exon „missense” mutációi a multimer forma kialakulását teszik lehetetlenné, vagy a molekula stabilitását rontják. Az MBL polymorphismus a szérumkoncentrációnak és az aktivitás széles variációjában nyilvánul meg (197). Akik az exon régió missense mutációira nézve homozigoták, igen alacsony MBL szinttel rendelkeznek (MBL deficiensek). Az adott egyénben a szérumkoncentráció és az MBL aktivitás genetikailag meghatározott, az élet folyamán, gyulladások kapcsán nem változik, de az individuális különbségek nagyok.

Az MBL deficiencia 10-15%-ban fordul elő a normál populációban. Viszonylagos gyakoriságát az magyarázhatja, hogy bár számos baktériummal szemben a védelem némileg csökkent lesz, intracelluláris kórokozók

(*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, gyakorinak találták az infekciók, elsősorban a légúti fertőzések előfordulását (198). Gyakrabban fordultak elő súlyos infekciók hematológiai tumorok kemoterápiáját követően MBL deficiensekben (199), valamint nagyobb valószínűséggel alakult ki fertőzések kapcsán septicus shock (200). 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 (201). Kisebb tanulmányban azt találták, hogy B hepatitis talaján kialakult cirrhotikus betegekben gyakoribb volt a spontán bakteriális peritonitis MBL hiányosokban, mint az MBL kompetens csoportban (202). 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 (203).

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

MBL-szint meghatározáshoz

591 különböző etiológiájú krónikus májbetegségben szenvedő, nem májcirrhotikus beteg vizsgálatát végeztük el. Hat magyar hepatológiai centrum (Debreceni Egyetem, Semmelweis Egyetem, Pécsi Egyetem, BAZ Megyei Kórház, Miskolc Szent Ferenc Kórház) és egy német központ Otto-von-Guericke Egyetem (Magdeburg) betegek kerültek beválasztásra: 406 autoimmun májbeteg (ff/ nő : 122/184, kor: 50.5 ± 17.0 év): primer biliáris cirrhosis (PBC, n=182), primer szklerotizáló cholangitis (PSC, n=76), és autoimmun hepatitis (n=148), valamint 185 krónikus C hepatitises beteg (krónikus HCV, ff/ nő: 90/95, kor: 54.3 ± 12.5 év). **(10. táblázat)**

A PBC diagnózist cholestatikus enzimemelkedés, anti-mitochondriális antitest (AMA) és/vagy PBC specifikus AMA-pozitivitás, hisztológiai lelet, valamint az extrahepatikus cholestasis kizárása alapján állítottuk fel (204). A PSC-t a cholestatikus enzimemelkedés mellett, meglévő jellegzetes epeúti sztenózisok, dilatációk igazolták. Legtöbb esetben hisztológiai megerősítés is történt (205). Az AIH diagnózisa során az ismert májkárosodáshoz vezető faktorok (alkohol,

vírus, gyógyszer és toxin indukálta és hereditár májbetegség) kizárását követően a Nemzetközi AIH Csoport (International AIH Group) score rendszerét használtuk (206). Krónikus HCV infekciót a HCV RNS pozitivitása, emelkedett transzaminázok ($> 2 \times U$ legalább 6 hónapon át), valamint amennyiben elérhető volt, hisztológiai lelet alapján mondtuk ki.

A kontroll csoport 296 korban és nemi megoszlásban a betegcsoportnak megfelelő egészséges emberekből állt (ffi/nő: 140/156, kor: 49.5 ± 16.5 év), akiknek sem gasztrointesztinális, sem májbetegségük nem volt.

Mintavétel történt 338, a DEOEC II. Belklinika által gondozott, különböző etiológiájú májcirrhotikus betegtől is (nő/ffi: 189/149, kor: 56.4 ± 10.8 év) 2006. májusa és 2008. áprilisa között. A klinikai adatokat a **10. táblázatban** foglaltuk össze. 220 esetben (65,1%) alkoholos eredetű volt, 98 (29,0%) betegben C vírus fertőzés talaján alakult ki, 20 (5,9%) betegben

10. táblázat Az MBL szint vizsgálatába bevont betegek

Diagnózis	Szám
Krónikus HCV infekció cirrhosis nélkül, n	185
Nemek (Ffi/nő), n	90/50
Kor ($\pm$ SD)	54,3 $\pm$ 12,5 év
Autoimmun májbetegség cirrhosis nélkül, n	406
Nemek (Ffi/nő), n	122/184
Kor ($\pm$ SD)	50,5 $\pm$ 17,0 év
PBC	182
PSC	76
AIH	148
Különböző etiológiájú májcirrhotosis, n	338
Nemek (Ffi/nő), n	189/149
Kor ($\pm$ SD)	56,4 $\pm$ 10,8
Alkoholos, n (%)	220 (65,1%)
HCV-vel összefüggő, n (%)	98 (29,0%)
Egyéb, n (%)	20 (5,9%)
Egészséges kontroll, n	296
Nemek (Ffi/nő), n	189/149
Kor ($\pm$ SD)	56,4 $\pm$ 10,8 év

egyéb etiológiájú volt a májzsugor. A beválasztási kritériumok és a klinikai adatok értékelése a haptoglobin vizsgálatba bevont betegekével azonos módon történt.

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 perig 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, Schnellendorf, 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.

Statisztikai analízis

A különböző beteg és kontroll csoportok, valamint az adott betegség esetén az alcsoportok adatainak összehasonlítására T-próbát, különböző

variációjú 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

MBL szintek és deficiencia májbetegségekben

A különböző krónikus májbetegségben szenvedő betegek és a kontroll csoport MBL szintjeit a **11.Táblázat** mutatja. Sem az MBL szintek, sem az MBL deficiencia gyakorisága nem különbözött ALD, krónikus HCV infekció és májzsugor esetén a kontrol csoportban talált értékektől. Az abszolút MBL hiány (MBL<100ng/ml) 10,7-15,6%-ban fordult elő az egyes csoportokban, az alacsony MBL (MBL<500ng/ml) előfordulása 31,1%-41,3% volt. Előrehaladott májcirrhosis esetén alacsonyabb MBL szintek voltak mérhetők /Child-Pugh stádium (**29./A Ábra**) vagy MELD score (**29./B Ábra**), 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 (nem mutatott adat).

11. táblázat MBL szintek különböző etiológiájú májbetegekben és a kontrolcsoportban

	Szám	Átlagos MBL szint ng/ml (IQR)	Abszolút MBL hiány (<100 ng/ml)	Alacsony MBL szint (<500 ng/ml)
Krónikus HCV infekció Cirrhosis nélkül	185	1139 (320-2352)	11,9 %	37,8 %
Autoimmun májbetegség cirrhosis nélkül	406	959 (276-2204)	14,5 %	36,2 %
PBC				
PSC	182		14,3 %	37,9 %
AIH	76		13,2 %	38,2 %
	148		15,5 %	33,1 %
Különböző etiológiájú májcirrhosis	338	1118 (337-2454)	10,7 %	31,1 %
Alkoholos				
HCV-vel összefüggő	220	1026 (309-2259)	11,8%	31,8%
Egyéb	98	1120 (335-2621)	10,2%	31,6%
	20	1208 (428-2739)	10,1%	29,9%
Egészséges kontroll	296	1027 (253-2120)	15,6 %	41,3 %

AIH= autoimmun hepatitis, HCV= vírus hepatitis C, PBC= primer biliáris cirrhosis, PSC= primer szklerotizáló cholangitis, IQR: inter-kvartilis tartomány

Nincs statisztikai különbség

A bakteriális infekció kialakulásának klinikai és laboratóriumi előrejelzői

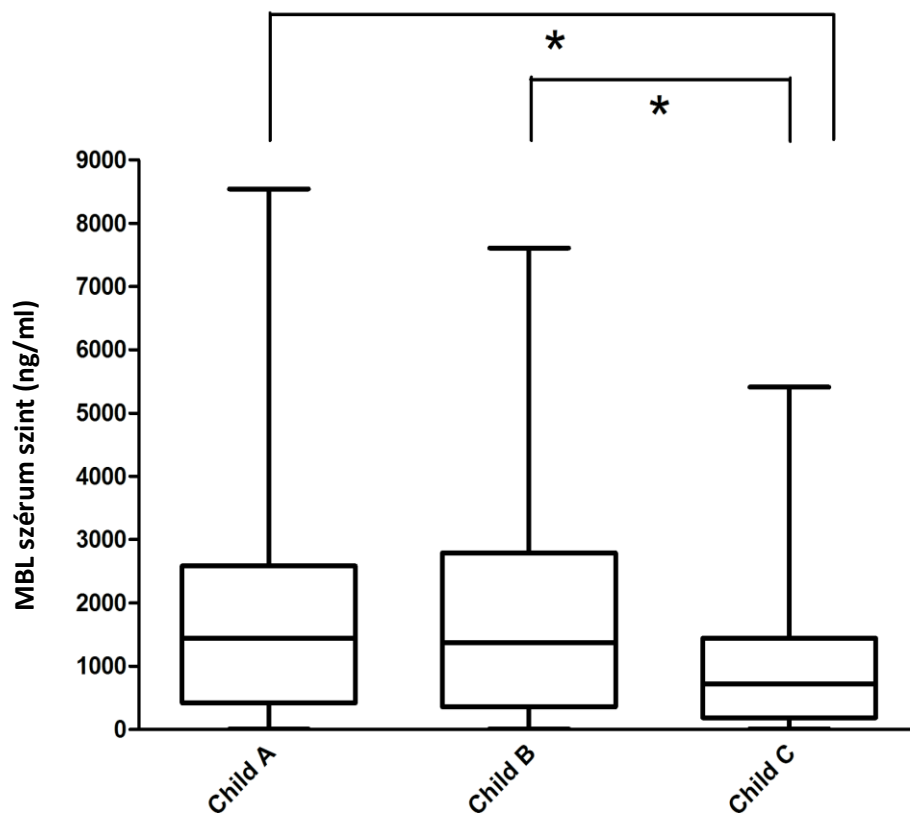
338 cirrhotikus betegben 251 infekciós epizódot észleltünk, a betegek 33,7%-ában a követési idő alatt. (12. Táblázat). Azon betegekben, akiknek volt infekciója, 56,1 %-ban több fertőzőes epizód zajlott. 32,5%-ban húgyúti infekciót, 20,4%-ban SBP-t, 15,5%-ban pneumóniát, 8,7%-ban bőr, vagy lágyrészinfekciót, 3,4%-ban bakterémiát, 2,4%-ban epeúti gyulladást, 0,5%-ban osteomyelitist igazoltunk. 16,5%-ban az infekció lokalizációja nem volt ismert.

(A Hp fenotípus vizsgálatba bevont betegpopuláció, és az MBL vizsgálat során követett májcirrhosisos csoport nagy átfedése miatt ez utóbbi eredmények a két tanulmányban hasonlóan alakultak)

29. ábra. Összefüggés az MBL szintek és a májcirrhosis súlyossága között (n=338)

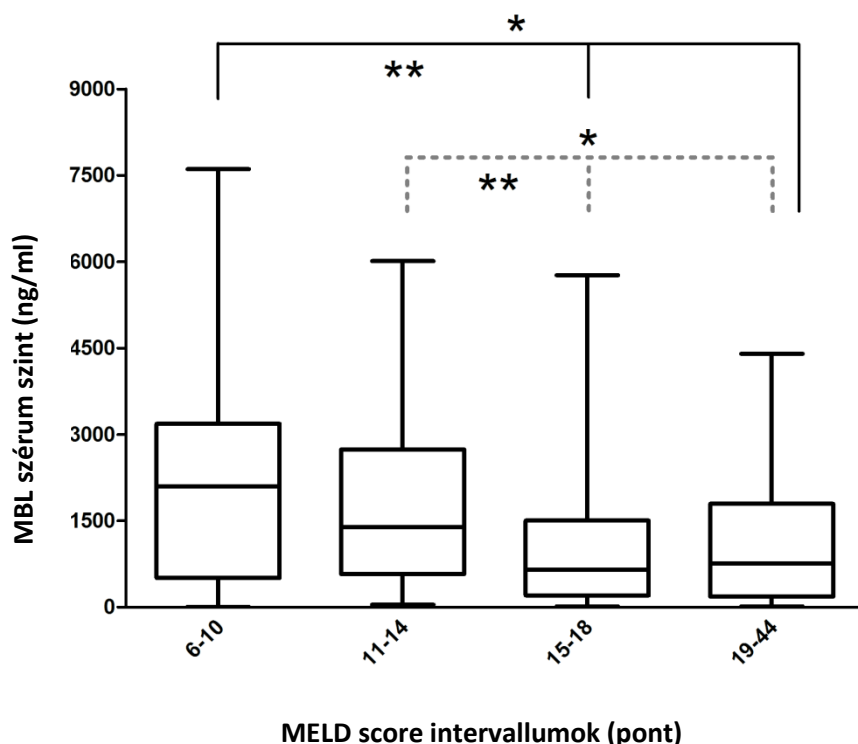
(A dobozdiagram a 25-75 percentilnek felel meg. A dobozon belüli vízszintes vonalak a medián értékeket mutatják.)

A. Az átlagos MBL szintek szignifikánsan alacsonyabbak Child C stádiumú májcirrhosisos betegekben, mint akár a Child A vagy Child B stádiumúakban



* $p < 0,001$ U test Mann-Whitney szerint

B. Az átlagos MBL szintek szignifikánsan alacsonyabbak magasabb MELD score esetén



* $p < 0,001$ and ** $p < 0,01$ U teszt Mann-Whitney szerint

Az abszolút MBL deficiencia ($<100\text{ng/ml}$) szoros összefüggést mutatott az infekciók kialakulásának valószínűségével (OR: 2,15; 95%CI: 1,07-4,31, $p=0,039$) cirrhotikus betegekben. **(12.Táblázat)**. Nem találtunk összefüggést, ha az MBL szint cut-off-ját 500ng/ml -nél adtuk meg, vagy ha az MBL szint kvartilisek szerint értékeltük az adatokat. (Q1: <337 , Q2: 338-1118, Q3:1119-2454, Q4: >2455 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. **(13.Táblázat)**

A követési idő alatt bekövetkezett összesített kórházi halálozás 15% volt, 51 esetben olyan betegben következett be, akinek fertőzése volt, 57 esetben 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, $p=0.013$).

12. táblázat . Cirrhotikus betegeink epidemiológiai, klinikai és laboratóriumi jellemzői és a mannóz-kötő lektin (MBL) szintek

	Totál	Abszolút MBL hiány (<100 ng/ml) n = 36	MBL kompetens (>100 ng/ml) n = 302
	N = 338		
Nem (ffi/nő), n	189/149	17/19	172/130
Kor (átlag ± SD, év)	56,4±10,8	58,1±9,6	56,2±10,9
Child-Pugh stádium, n			
A			
B	110	13	97
C	126	11	115
	102	12	90
Meld score (pontok)			
Szérum bilirubin (μmol/L)	14,8±6,3	15,3±6,9	14,7±6,3
Szérum albumin (g/L)	66,5±94,6	66,2±75,8	66,6±96,7
Trombocita (G/L)	33,2±7,9	35,1±8,0	32,9±7,9
	121,3±70,6	119,6±57,1	121,5±72,2
Társbetegségek, n (%)	147 (43,5%)	16 (43,2%)	131 (43,4%)
Egy	109	10	99
Kettő	30	6	24
Három v. több	8	0	8
HCC, n (%)	36 (10,7%)	5 (13,9%)	31 (10,3%)
Átlagos követés ± SD (nap)	443±364	435±344	444±366
Átlagos követés, IQR (nap)	420 (87-745)	474 (100-713)	413 (85-761)
A követési idő alatt bekövetkezett infekciók, n (%)	114 (33,7%)	18 (50,0%)*	96 (31,8%)*
Egy	50	6	44
Kettő	33	5	28
Három v. több	31	7	24
Infekciós epizódok	251	47	204
A bakteriális infekciók típusa			
Húgyúti	82 (32,7%)	15 (31,9%)	
Spontán bakteriális peritonitis			67 (32,8%)
Pneumonia	51 (20,3%)	8 (17,0%)	43 (21,1%)
Bőr és lágyrész	39 (15,5%)	7 (14,9%)	32 (15,7%)
Egyéb	22 (8,7%)	5 (10,6%)	17 (8,3%)
	57 (22,8%)	12 (25,5%)	45 (22,1%)

SD: standard deviáció, IQR: inter-kvartilis tartomány HCC: hepatocellularis carcinoma

p= 0,039

13. táblázat. Logisztikus regresszió: A bakteriális infekció prediktorai májcirrhosisos betegekben

Faktor	koefficiens	<i>P</i> érték	OR	95%CI
Női nem	0,43	0,135	1,54	0,87-2,70
Child-Pugh stádium	0,38	0,02	1,45	1,06-1,99
Társbetegségek	1,02	< 0,001	2,78	1,71-4,50
Abszolút MBL hiány	0,76	0,04	2,14	1,03-4,45

A koefficiens az OR természetes logaritmus; *p* érték: szignifikancia szint; OR: odds ratio; 95%CI: 95% konfidencia intervallum

Az első bakteriális infekció bekövetkeztéig eltelt időt befolyásoló klinikai és laboratóriumi paraméterek

Kaplan-Meier túlélési görbén ábrázolva Breslow és LogRank tesztet alkalmazva a korábbiaknak megfelelően a Child-Pugh stádium, az ascites jelenléte és a társbetegségek mutattak összefüggést az első szisztémás infekció megjelenéséig eltelt idővel.

Rövidebb időn belül jelentkezett az első fertőzés az MBL deficiensekben, mint az MBL kompetens betegekben. (medián 579 vs. 944 nap; HR: 2,05 95%CI: 1,10-3,83, $p_{\text{Breslow}}=0,016$ és $p_{\text{LogRank}}=0,027$) (30. ábra).

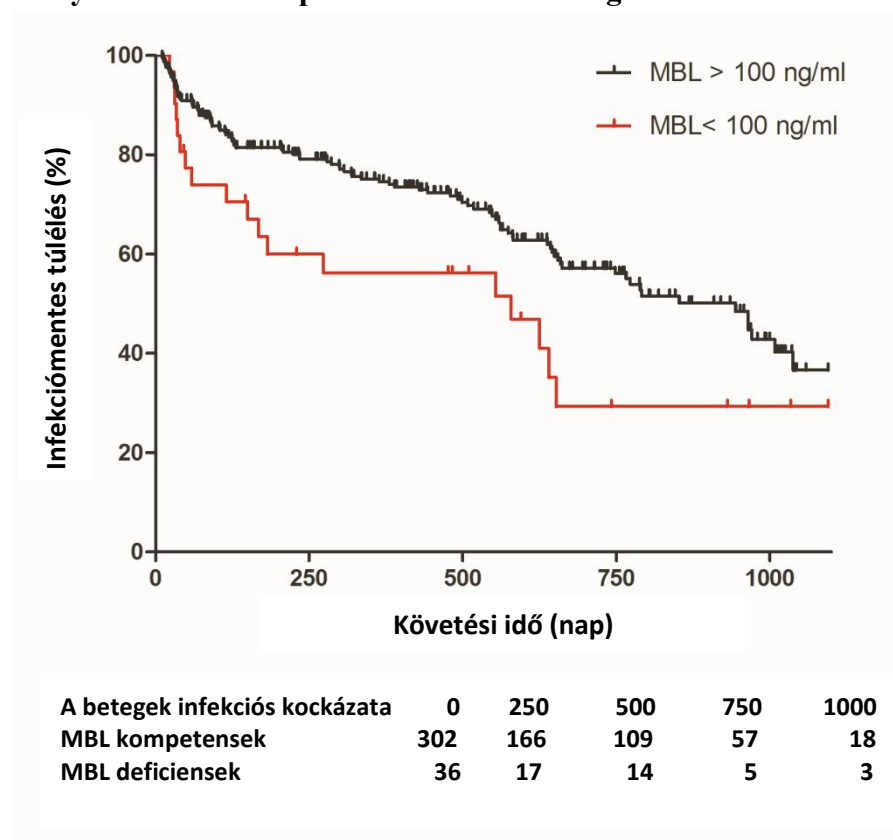
Cox-regressziós analízis szerint a Child-Pugh stádium ($p<0,001$), a társbetegségek ($p=0,003$), és az abszolút MBL hiány($p=0,03$) voltak az első infekció kialakulásáig eltelt rövidebb időt meghatározó független tényezők. (14. Táblázat)

14. táblázat A Cox modell összegzése: Az első bakteriális infekcióig eltelt időt befolyásoló tényezők

	<i>P</i>	Esélyhányados	95%CI
Child-Pugh stádium	< 0,001		
Child A	Referencia		
Child B	0,018	1,87	1,12-3,14
Child C	< 0,001	4,00	2,29-7,01
Társbetegségek	0,003	1,89	1,23-2,90
MBL deficiencia	0,003	2,33	1,34-4,03

p érték: szignifikancia szint; 95%CI: 95% konfidencia intervallum

30. ábra Az infekció kialakulásának valószínűsége az eltelt idő függvényében MBL hiányos és MBL kompetens cirrhotikus betegeknél



Megtörtént az MBL szintek meghatározása IBD-s betegeken is, bár viszonylag nagy szórást észleltünk, de az átlagértékek, ill. az MBL deficit szempontjából nem volt szignifikáns különbség az egészséges kontroll csoporthoz képest. Az eredmények a 15-17. táblázatokban olvashatók. Az MBL deficiencia nem mutatott összefüggést a gyulladásos bélbetegségek klinikai lefolyásával és a párhuzamosan vizsgált számos szerológiai markerrel sem (207).

15. táblázat MBL szintek gyulladásos bélbetegekben

	Átlagos MBL szint ng/ml (IQR)	Abszolút MBL hiány (<100ng/ml)	MBL deficiencia (<500ng/ml)
Crohn's disease (n = 740)	929 (278-1968)	15.0 %	36.9%
Ulcerative colitis (n = 250)	810 (171-1616)	18.4 %	41.6%
Nem IBD kontrol (n = 99)	999 (269-1778)	12.1 %	40.4%
Egészségesek (n = 296)	1027 (253-2120)	15.6 %	41.3%

IQR: inter-quartile range

Statisztikailag szignifikáns eltérést nem találtunk.

16. táblázat. A Crohn betegségben szenvedő páciensek (n=740) klinikai paraméterei az eltérő mannóz-kötő fehérje (MBL) szintek szerint

	MBL deficiencia (<500ng/ml)	MBL szint normális (>500ng/ml)	Total
	n=273	n=467	n=740
Ffi/nő	124/149	213/254	337/403
Kor (évek)*	37.8 ± 12.8	36.1 ± 12.6	36.7 ± 12.7
életkor a dg felállításakor (év)*	29.1 ± 11.5	27.4 ± 10.8	28.1 ± 11.1
Időtartam (év)*	8.6 ± 7.6	8.7 ± 7.5	8.7 ± 7.6
Családi halmozódású IBD¹	36 (13.5%)	48 (10.3%)	84 (11.3%)
Lokalizáció (n)			
L1	65	100	165
L2	70	116	186
L3	137	244	381
L4 csak	1	7	8
L4	4	11	15
Viselkedés (n)			
B1	91	196	287
B2	83	116	199
B3	99	155	254
Perianalis betegség¹	93 (34.1%)	152 (32.5%)	245 (33.1%)
Gyakori relapszus¹	94 (34.4%)	177 (37.9%)	271 (36.6%)
Arthritis¹	81 (29.7%)	151 (32.3%)	231 (31.2%)
Szemészeti manifesztáció¹	10 (3.7%)	34 (7.3%)	44 (5.9%)
Bőr manifesztáció¹	16 (5.9%)	46 (9.8%)	62 (8.4%)
PSC¹	3 (1.1%)	18 (3.8%)	21 (2.8%)
Steroid használat/refrakteritás¹	218 (79.8%) / 29 (13.3%)	375 (80.3%) / 41 (10.9%)	593(80.1%) / 70 (11.8%)
Azathioprin (Imuran) használat¹	132 (48.4%)	247(52.9%)	379 (51.2%)
Sebészeti beavatkozás/ többbszöri¹	111 (40.7%) / 30 (10.9%)	184 (39.4%) / 65 (13.9%)	295(39.9%) / 95 (12.8%)
Válaszkészség infliximab-ra:			
-remisszió	8	9	17
-részleges	8	18	26
-hatástalan	9	25	34
Dohányzás¹			
soha	172	293	465
igen	81	148	228
korábban	20	26	47

¹n (%), *átlag ± standard deviáció (SD)

Lokalizáció: L1: terminalis ileum, L2: colon, L3: ileocolon, L4: felső tápcsatornai manifesztáció

Viselkedés (Behavior): B1: nem stricturáló, nem penetráló, B2: stricturáló, B3: penetráló

PSC: primér sclerotizáló cholangitis,

p=0.07 a szemészeti manifesztációra

p=0.08 a PSC előfordulására

Nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést.

17. táblázat. Colitis ulcerosa miatt kezelt betegek (n=250) klinikai paramétereit a különböző mannóz kötő fehérje (MBL) szintek szerint

	MBL deficiencia (<500ng/ml) n=105	MBL normál szint (>500ng/ml) n=145	Total n = 250
Ffi/nő	48/57	66/79	114/136
Életkor (év)*	42.9 ± 14.3	42.8 ± 14.5	42.9 ± 14.4
Életkor a dg felállításakor (év)*	31.6 ± 12.9	32.1 ± 13.2	31.9 ± 13.1
Időtartam (év)*	11.1 ± 8.5	11.2 ± 9.8	11.2 ± 9.2
Családi IBD¹	7 (6.6%)	7 (4.8%)	14 (5.6%)
Lokalizáció (n)			
Proctitis	11	16	27
Baloldali	65	84	149
Extenzív	29	45	74
Gyakori relapszus¹	27 (25.7%)	41 (28.3%)	68 (27.2%)
Arthritis¹	25 (23.8%)	43 (29.6%)	68 (27.2%)
Szemészeti manifestációk¹	5 (4.8%)	4 (2.8%)	9 (3.6%)
Bőr manifestációk¹	10 (9.5%)	8 (5.5%)	18 (7.2%)
PSC¹	3 (2.9%)	4 (2.8%)	7 (2.8%)
Steroid használat/ refrakteritás¹	59 (56.2%) / 11 (18.6%)	87 (60.0%) / 14 (16.1%)	146(58.4%) / 25 (17.1%)
Azathioprin használat¹	29 (27.6%)	42 (28.9%)	71 (30.0%)
Colectomia¹	7 (6.6%)	13 (8.9%)	20 (8.0%)
Dohányzás¹			
soha	89	117	206
igen	11	19	30
korábban	5	9	14

¹n (%), * átlag ± standard deviáció (SD)

PSC: primér sclerotizáló cholangitis

Nem találtunk statisztikailag szignifikáns eltérést

Tápcsatornai vérzések korszerű ellátása

A tápcsatornai vérzés a gasztroenterológia egyik legfontosabb tünetcsoportja, amit mindig rendkívül komolyan kell venni. Észlelése során haladéktalanul törekedni kell a vérzés okának, helyének, mértékének megállapítására, ezt követi a vérzés megszüntetése, majd pedig az újravérzés megelőzése, lehetőleg a háttérben álló kórkép egyidejű kezelésével (208). A tápcsatornában fellépő vérzés az alig észrevehető, krónikus vérezgetéstől az életet közvetlenül veszélyeztető, hemodinamikai megingást okozó súlyos vérzésig terjedhet, és annak ellenére, hogy az elmúlt évtizedek mind a diagnosztikában, mind pedig az ellátás területén jelentős fejlődést, előrelépést hoztak, még mindig viszonylag magas halálozással jár. Attól függően, hogy honnan származik és időben milyen lefolyású, a vérzéseket az alábbi módon csoportosíthatjuk (31. ábra): akut felső, akut alsó, krónikus felső és krónikus alsó vérzések. Természetesen az akut és krónikus formák közötti határok nem mindig élesek, egyes vérzésformák egymásba átmehetnek. A vérzés háttérben álló legfontosabb patomechanizmusok a következők (32. ábra): érfalsérülés, a keringés megváltozása, az alvadási viszonyok megváltozása. Ezek a komponensek gyakran kombinálódnak, hiszen például a nyelőcsővi vérzés háttérben portalis hypertensio, megnyúlt alvadási idő és érfalsérülés egyidejűleg állhat. A tápcsatornai vérzések okának tisztázása során két alapvető feladatunk van: minél részletesebb anamnéziszfelvétel és alapos fizikális vizsgálat; ehhez társulnak a sürgősséggel megszerezhető laboratóriumi adatok. Ezek az információk segítenek az ellátási feladatok meghatározásában. A kórjóslat felállítására több score-rendszert dolgoztak ki annak eldöntése érdekében, hogy a beteg ellátása hol történjen, illetve várható-e olyan súlyosabb kórlefolyás, amely szövődményekhez vezethet, sebészi beavatkozást indokol, esetleg fatális kimenettel fenyeget. Az akut tápcsatornai vérzések előfordulása évente 100 000 lakosra vonatkoztatva világszerte 100 és 250 eset között változik (209), hazánkban az elmúlt két évtizedben végzett klinikai feldolgozások során ez a szám nagyjából 150-nek adódott (56). Akut vérzésről akkor beszélünk, ha a vérzés három napon belül jelentkezett, klinikailag nyilvánvaló a vérzés ténye és tápcsatornai eredete, a vérvesztés esetenként a beteg hemodinamikai egyensúlyát is megingathatja. Krónikus a vérzés, ha feltehetően régebb óta fennáll, rendszerint inkább okkult formában, és a beteg mérsékelt vagy súlyosabb, de krónikusnak tekinthető vérszegénységét okozta. Az akut vérzés

három fő formája: haematemesis (vérhányás), ami lehet friss vért tartalmazó vagy pedig emésztett vért, tehát savhematint tartalmazó hányadék; melaena az emésztett vér megjelenése a székletben, ehhez legalább 1-2 dl vérnek kell a duodenumba, jejunumba kerülnie; haematochesia (vérszékelés) friss vér megjelenése a székeléskor, ami logikusan általában – de nem kizárólag – a bal colonfélből származik. A beteg anamnézisének felvétele során az alábbi szempontok tisztázása a legfontosabb:

1. Történt-e korábban valamilyen hasi műtét? Volt-e már korábban tápcsatornai vérzése? Volt-e korábban fekélybetegsége? Ismert-e krónikus májbetegség, vesebetegség, krónikus súlyosabb szívbetegség, hematológiai kórkép, vérékenység? Van-e beültetett műbillentyű vagy coronaria stent?
2. Milyen gyógyszereket szed rendszeresen? Szed-e valamilyen véralvadást befolyásoló készítményt, ízületi bántalmak kezelésére szolgáló gyógyszert?
3. Fogyaszt-e rendszeresen alkoholt?
4. Mióta állnak fent az aktuális panaszok (ezek jellege, kezdete, a széklet milyensége stb.)?

A tápcsatornai vérzések tünettanához tartoznak az akut és krónikus vérvesztéssel összefüggő panaszok, így gyengeség, sápadtság, légszomj, a testhelyzet orthostaticus változtatásakor fokozódó tachycardia, tachypnoe, alacsonyabb vérnyomás, hűvösebb végtagok, szájszáradás, súlyosabb esetekben a szervátáramlási zavarokból következően csökkenő vizeletmennyiség, anginás panaszok fellépése, szédülés, látászavar, acidosis, zavartság, encephalopathiás tünetek, továbbá icterus, ascites, hasi rezisztencia, foetor stb.



32, ábra
A vérzések
hátterében álló
főbb
pathogenetikai
mechanizmusok

31. ábra A gyakoribb tápcsatornai vérzésforrások didaktikus felosztása



A legsúlyosabb klinikai képpel járó felső tápcsatornai vérzések két legfontosabb csoportosítási formája a nyelőcsővi vérzés, valamint a nem varixeredetű – zömében peptikus eredetű - felső tápcsatornai vérzések kategóriája. Az elmúlt évek során több olyan konszenzus találkozóra került sor, amely ezzel a két kórformával foglalkozott. A leghíresebb közülük az olaszországi Bavenóban ötévente megtartott, portalis hypertensióval foglalkozó tanácskozás, amelyből az ötödikre 2010 májusában került sor. A továbbiakban a másik fő, az úgynevezett nem varixeredetű felső tápcsatornai vérzésekkel kapcsolatos aktuális irányelveket ismertetjük. 2002-ben a brit gasztroenterológiai társaság adott ki irányelveket (210), egy évvel később pedig *Barkun*, *Bardou* és *Hunt* vezetésével az International Consensus Upper GI Bleeding Conference Group ismertette

a „kanadai konszenzus” elnevezéssel összeállított irányelveket a nem varixeredetű felső tápcsatornai vérzések korszerű ellátásával kapcsolatban az Annals of Internal Medicine-ben (211). Az azóta eltelt évek eredményeinek összegzésére 15 ország 34 tudósának részvételével 2008 októberében Bécsben került sor, ami „International Consensus Recommendations on the Management of Patients with Nonvariceal Upper Gastrointestinal Bleeding” címmel 2010 elején látott napvilágot szintén az Annals of Internal Medicine-ben (212). Az ajánlások öt csoportban kerültek megfogalmazásra:

A. Stabilizáció, kockázatkiértékelés és endoszkópia előtti teendők:

itt a leglényegesebb megállapítások az alábbiak voltak

- döntő az állapot korrekt felmérése (lásd Rockall score, Blatchford score etc. alkalmazása), azonnal meg kell kezdeni a resuscitációt
- nasogastrikus szonda óvatosan alkalmazható, amennyiben nem varixvérzést valószínűsítünk
- transzfúzió adása 70 g/l alatt mindenképpen kötelező, célszerű a koagulációs eltérések korrigálása is, lehetőség szerint $INR < 2,5$, azonban ez lehetőség szerint ne késleltesse az endoscopiát
- az endoscopia előtt alkalmazott PPI valószínűleg csökkenti a laesio mértékét, ezért hasznos, de a mortalitást nem csökkentette
- a korai elbocsátás feltétele a haemodinamikai stabilitás, a fehér fekélyalap, a társbetegségek hiánya és a kórház gyors elérhetősége

B. Endoszkópos ellátással kapcsolatos ajánlások:

- biztosítani kell a multidiscplináris ellátást, a tapasztalt endoscopos szakembert és az asszisztenciát, lehetőség szerint 24 órán belül minden vérzőt meg kell nézni
- 12 órán belül kell elvégezni a tükrözést, ha haemodinamikailag instabil, friss vért hány, $Hb < 80$ g/L és $fvs > 12$ G/l
- tapadó alvadéknál célzott lemosás ajánlott, de nem agresszív mechanikus eltávolítás
- intenzív PPI kezelés célszerű a fekélyvérzéseknél, ami infúziós pumpát jelent, aktiv vérzés esetén endoscopos vérzéscsillapítás történjen, lehetőség szerint kombinált formában (injekciós infiltráció + clip etc.)
- a korábbi ajánlásoktól eltérően az ún. „second look endoscopia” csak aktiv újrávérzés esetén indokolt

C. Gyógyszeres ellátással kapcsolatos fontosabb megállapítások:

- H2 receptor antagonisták alkalmazása fekélyvérzésben nem ajánlott
- a PPI kezelés, ahogy már jeleztük infúziós pumpában történjen
- pozitív esetén a H. pylori eradikáció mindenképpen ajánlott
- somatostatin kezelés fekélyvérzésben nem ajánlott
- tartós PPI kezelés tervezésekor mérlegelni kell a Clostridium difficile fertőzés, az időskori osteoporosis és a nosocomialis pneumonia veszélyét, bár egyelőre erős bizonyítékok még nincsenek

D. Egyéb – nem endoszkópos és nem gyógyszeres – kórházi teendők:

- endoszkopos vérzéscsillapítás esetén legalább 72 órás kórházi megfigyelés indokolt
- az újrávérzés kivédésére a H. pylori eradikáció hatékonyabb, mint az elhúzó PPI kezelés, viszont az eradikáció eredményességét ellenőrizni kell
- amennyiben az endoszkopos vérzéscsillapítás nem eredményes, sebészeti konzílium szükséges, ill. alternatív megoldásként percután szelektív embolizáció is megkísérelhető

E. Elbocsátás után, acetilszalícilsav (ASA) és nem szteroid gyulladásgátlók alkalmazásával kapcsolatos ajánlások:

- korábbi fekélyvérzés után a szelektív COX2 gátló + PPI kombináció alkalmazása ajánlott a cardiovasculáris rizikó mérlegelésével
- kisdózisú ASA visszaadása mielőbb indokolt, mert az abbahagyás után 7-30 nappal a cardiovasculáris történés kockázata háromszorosára nő
- az ASA és PPI együtt kisebb kockázatot jelent, mint a clopidogrel egyedül, amellyel kapcsolatban a CYP2C19 interakció kockázata mérlegelendő

A tápcsatornai vérzőbetegek urgens endoszkopos ellátásának irányelvei a hazai gyakorlatban a fentiektől kissé eltérőek, hiszen országsszerte vannak hosszú évek óta jól működő endoszkopos készenléti szolgálatok, számos helyen endoszkopos asszisztens behívására is van mód, ennek megfelelően a saját gyakorlatunkban az endoscopia 12 órán belül gyakorlatilag mindig megvalósul:

18. táblázat Az urgens endoscopia indikációi

I. a keringés megingását okozó folyamatos vérzés

- látványos haematemesis, vagy ismétlődő melaena
- 24 óra alatt >20 g/l Hb csökkenés
- haemodinamikai instabilitás: tachycardia, tensióesés

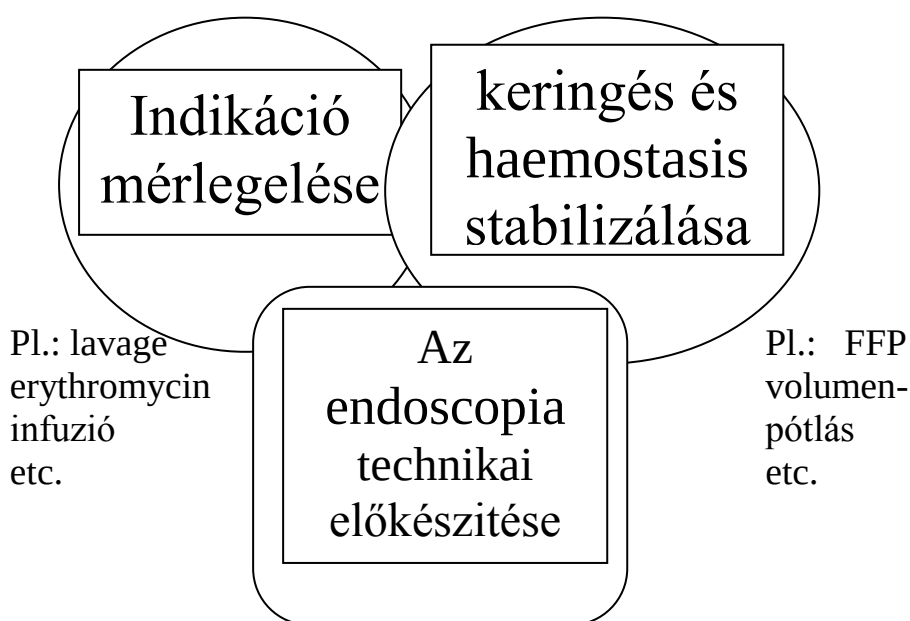
II. ismert, komolyabb kockázatot jelentős társbetegségek

- májcirrhosis
- vérzékenységet okozó gyógyszeres anamnesis (ASA, kumarin, NSAID)

III. megelőző endoscopos beavatkozás

- endoscopos polypectomia
- endoscopos papillotomia
- endoscopos ligatúra

19. táblázat Ügyeleti teendők urgens endoscopia előtt



20. táblázat Az endoscopos vérzéscsillapítás mai lehetőségei

Injekciós infiltrálás (1:10000 higitású tonogén)

injekciós sclerotherapia (polydocanol fél-1 %)

elektrokoaguláció (termikus vérzéscsillapítás)

HPU (heat probe unit) teflon végű szonda

koagulációs biopsiás csipő

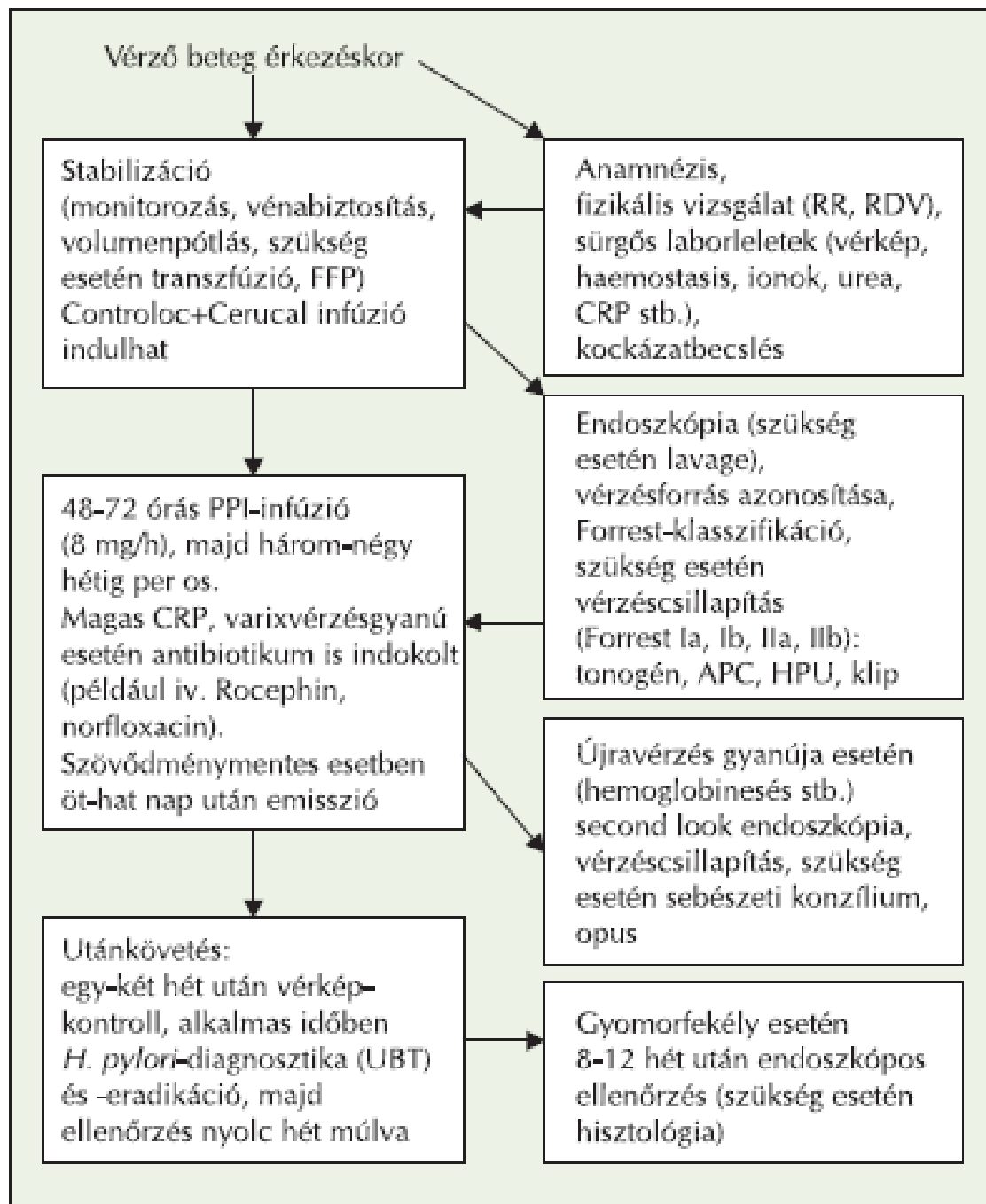
tűpapillotom kogulációs árammal

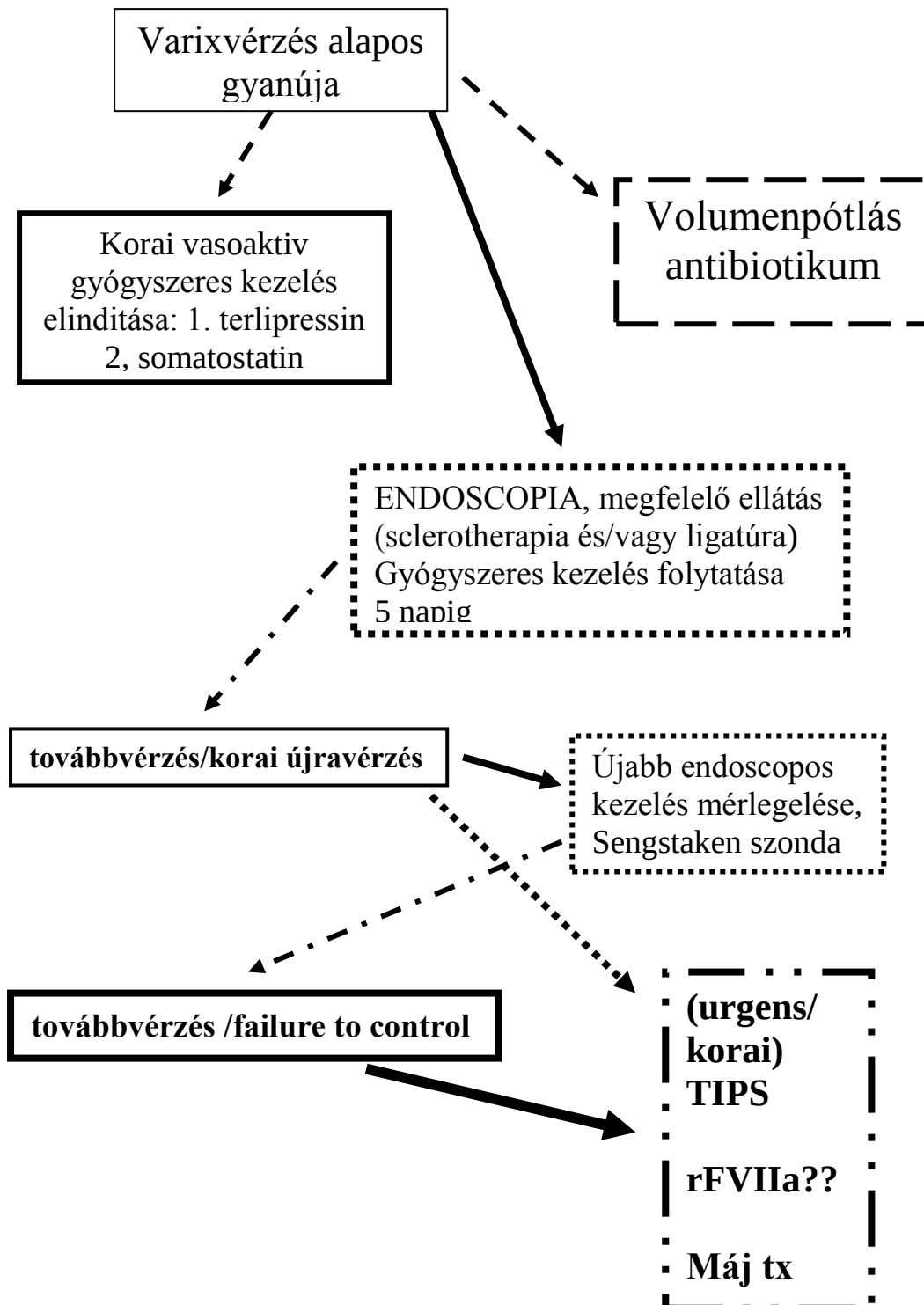
argon plazma koaguláció (non-kontakt)

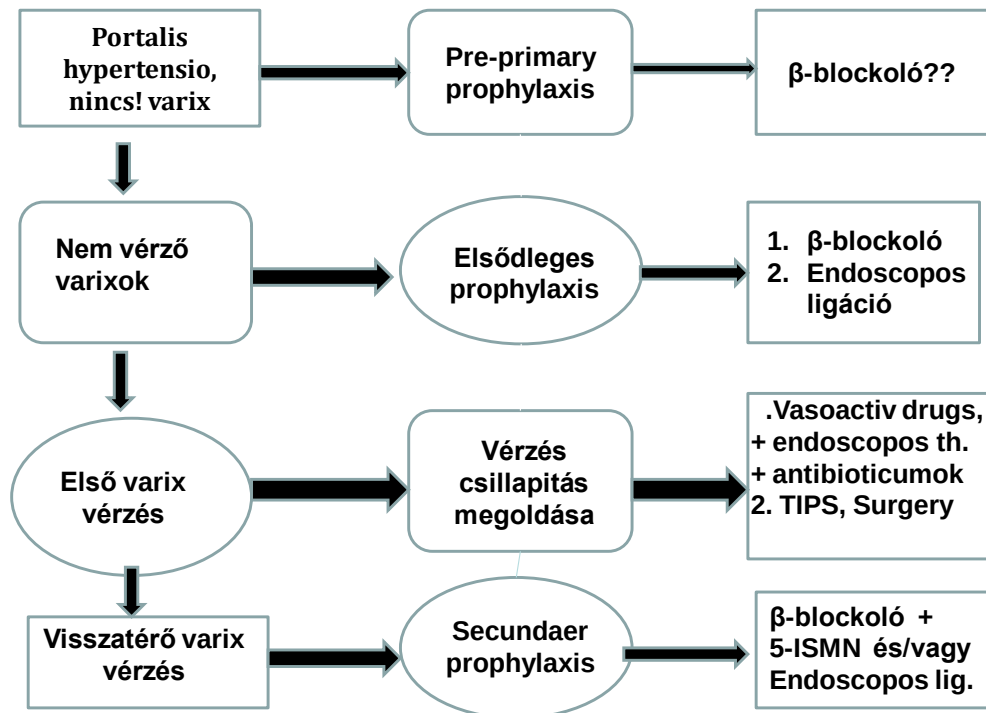
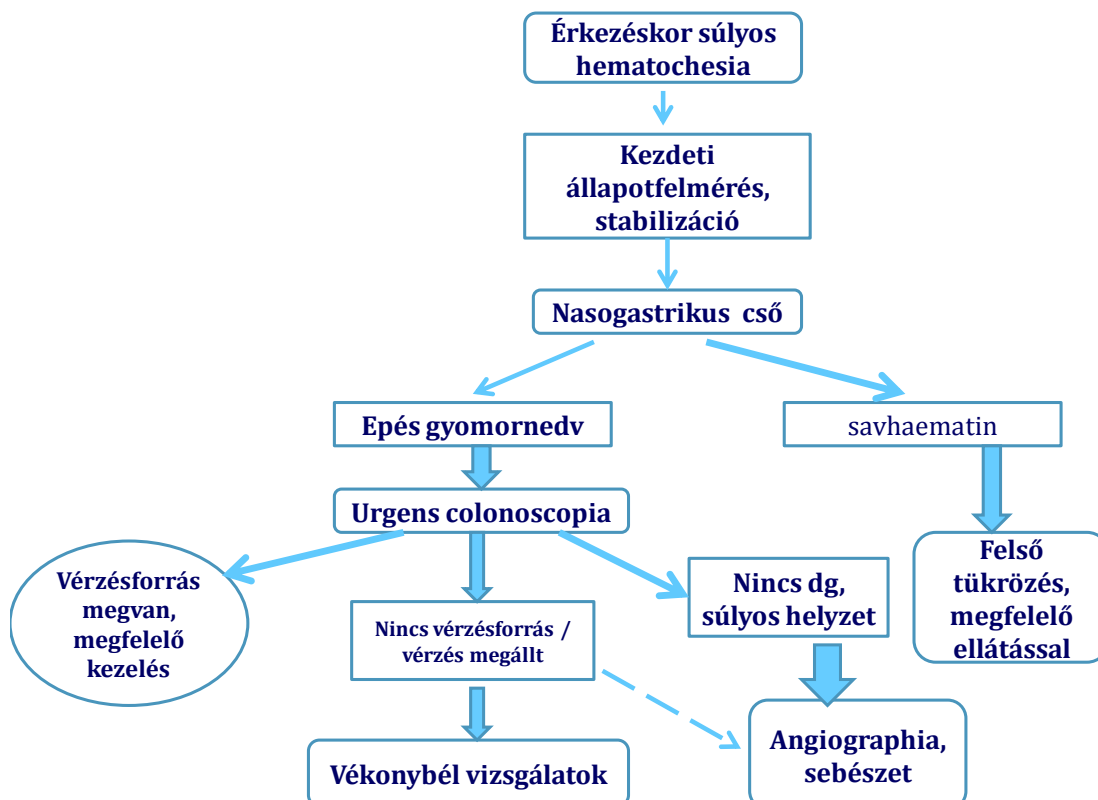
mechanikus vérzéscsillapítás: clip, OVESCO etc.

endoscopos ligatúra (gumigyűrű, mini-loop)

33. ábra A fekélyvérzések ellátásának korszerű menetrendje



34. ábra A nyelőcs varixvérzés korszerű ellátási algoritmus

35. ábra A nyelőcső varixok és a varixvérzés kezelési elvei**36. ábra Az alsó tápcsatornai vérzések ellátási algoritmus**

Beteganyag és módszer

A Debreceni Egyetem II. Belklinikáján 1996 szeptemberében kezdte meg működését a tápcsatornai vérzőbeteg részleg (56), 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.

21. 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	80 alatt 10 sec-nél hosszabb APTI megnyúlás, és/vagy cumarin túladagolás varixból
anamnesisben GI vérzés:	nem volt	ulcus/erosioból	
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

Az általunk kidolgozott és alkalmazott score rendszer hatékonyabbnak bizonyult, mint az alapul szolgáló Rockall score (213), mert több tényezőt vettünk figyelembe – haemostasis paraméterek, endoscopos kép - és árnyaltabban végeztük a besorolást. A 22. 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.

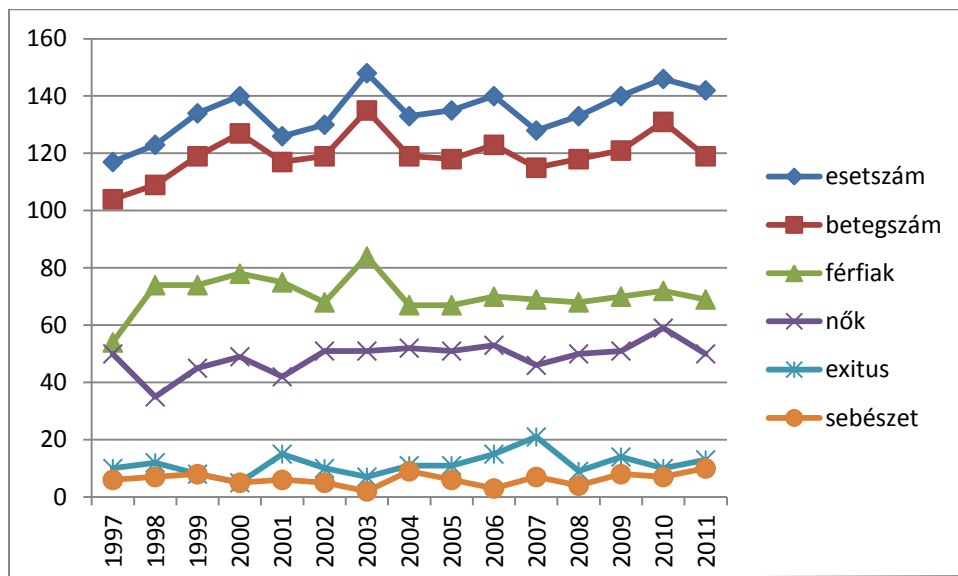
22. táblázat A kockázati score alkalmazása beteganyagunkban

Score érték	Esetszám	Exitus/sebészet
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 / -

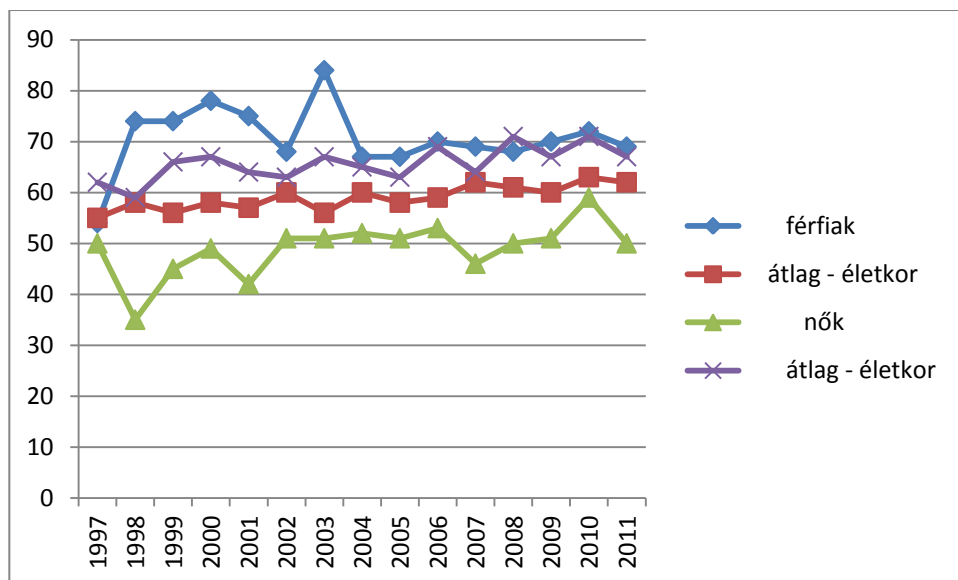
23. táblázat A beteganyag fő számai 1997 – 2011.

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

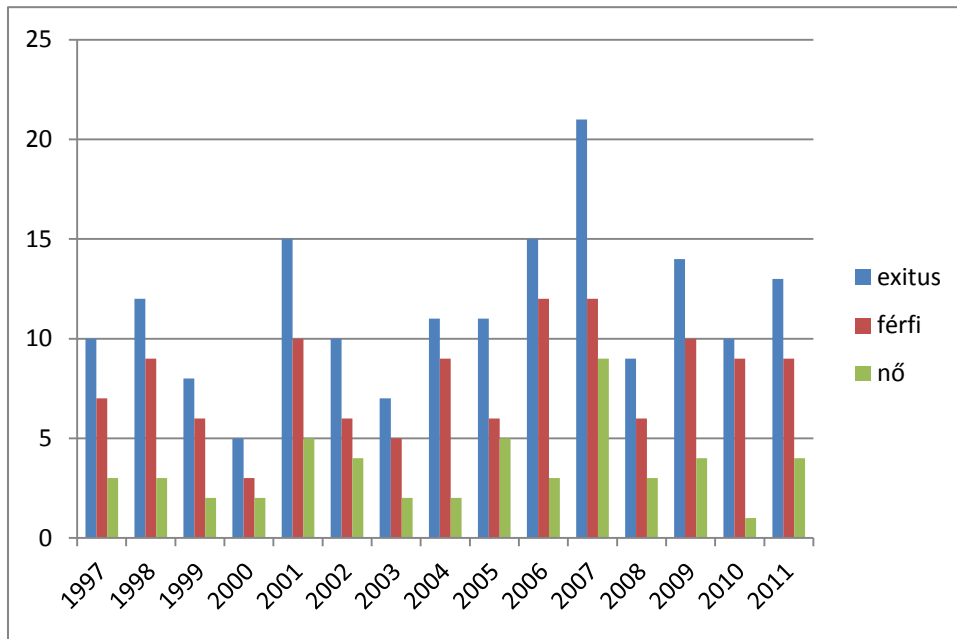
EREDMÉNYEK



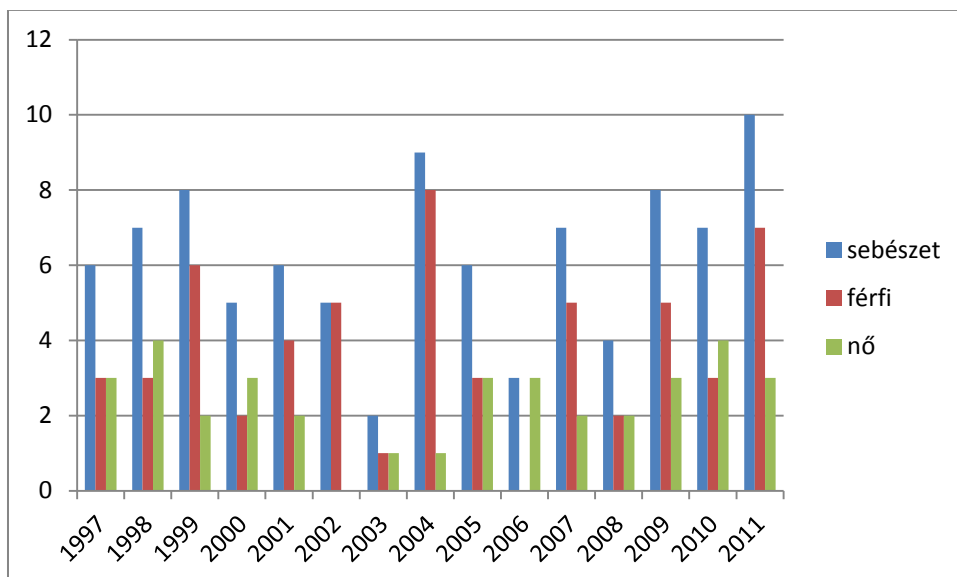
37. ábra A beteganyag és a mortalitás alakulása az idő függvényében



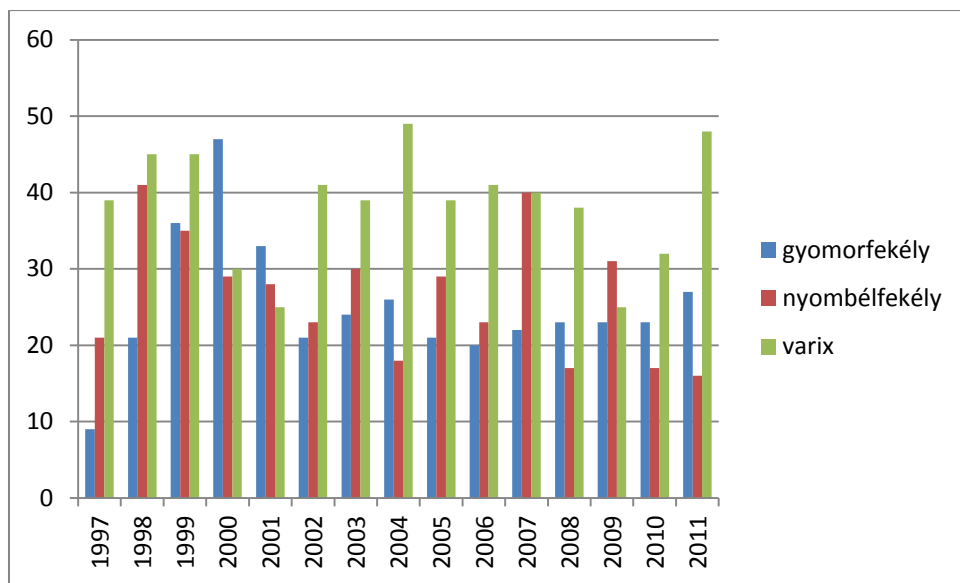
38. ábra A férfi és nőbetegségek száma és átlagéletkora



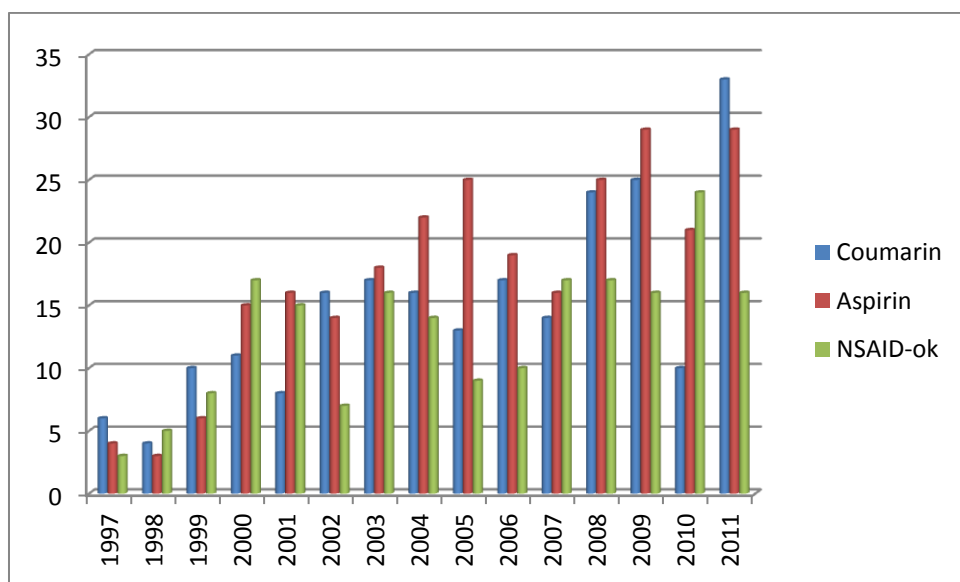
39. ábra Az elhunyt betegek nemek szerinti megoszlása



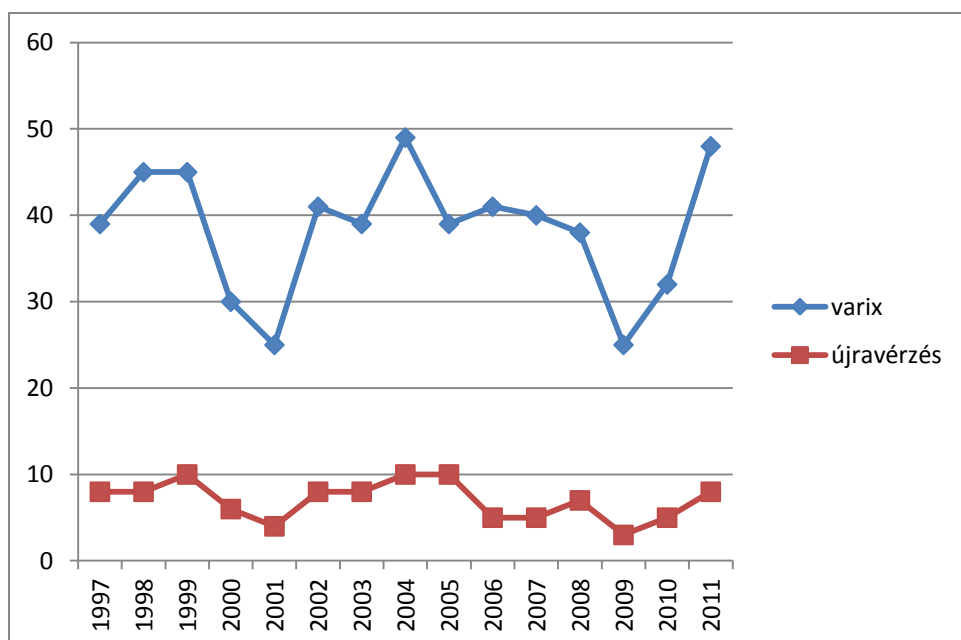
40. ábra A sebészetre került betegek nemek szerinti megoszlása



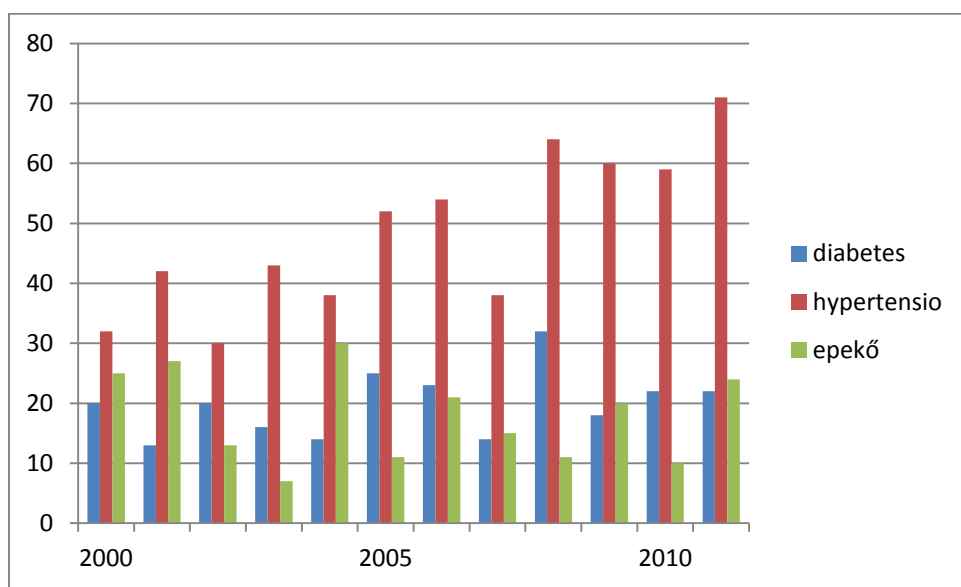
41. ábra A legfontosabb vérzésforrások előfordulása



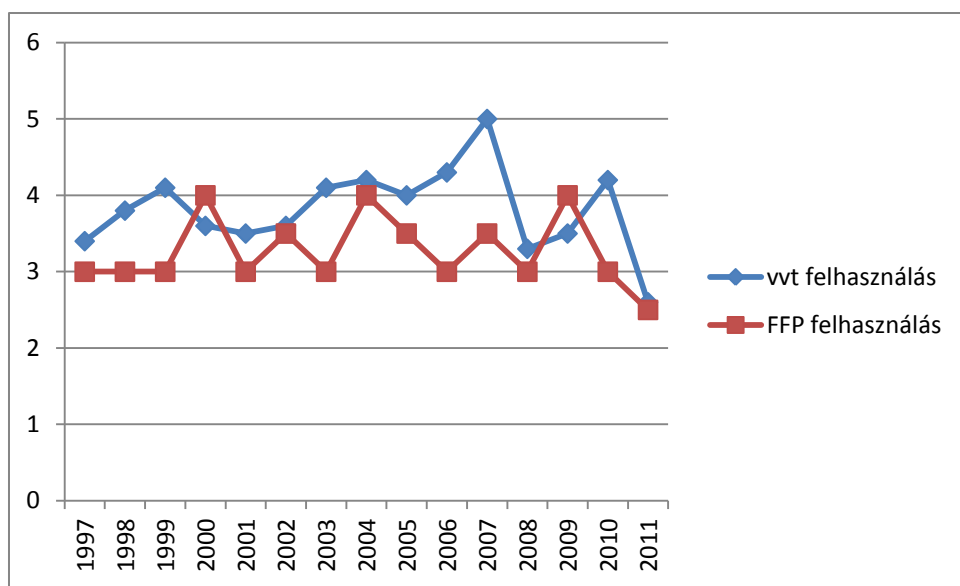
42. ábra Az antikoagulánsok, antithrombotikumok használatának alakulása



43. ábra Varixvérzést követő újravérzések alakulása



44. ábra Az általunk tapasztalt leggyakoribb társbetegségek, az alkoholos májbetegséget nem számítva



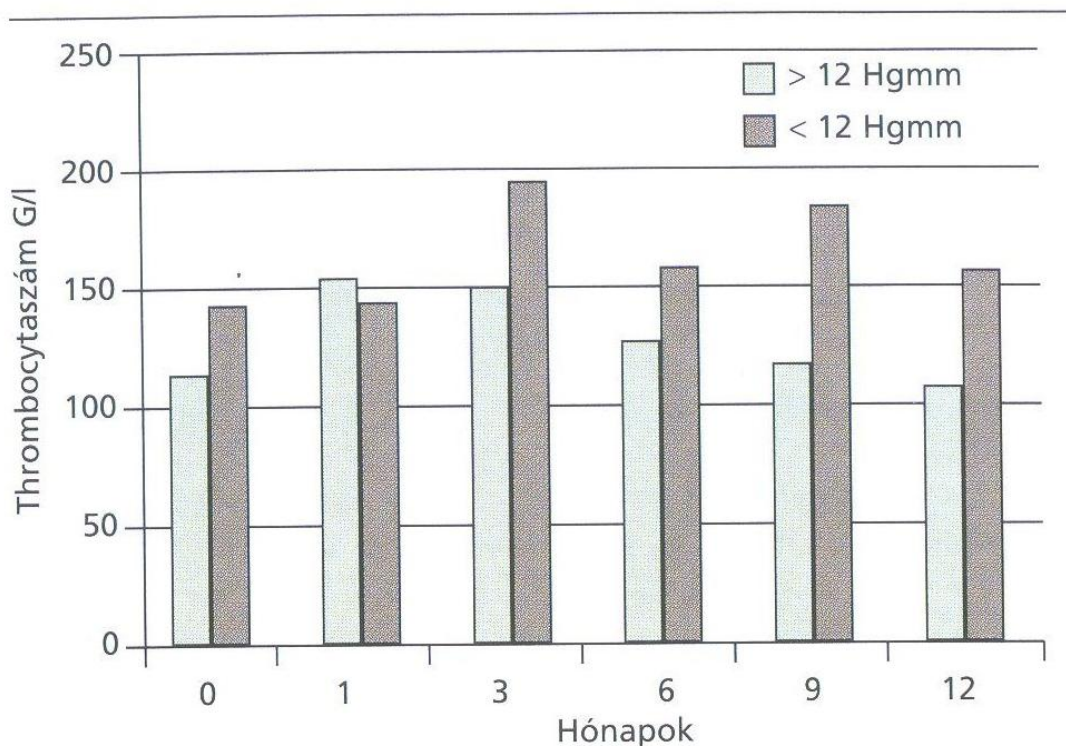
45. ábra Az esetekre vonatkoztatott vérkészítmény felhasználás alakulása

Érdekes esetek és megfigyelések a tápcsatornai vérzések témakörében

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 (215). Természetesen a hazai gyakorlatban nem kerülhet minden előrehaladott májcirrhosisban szenvedő beteg transzplantációs listára, így az esetek többségében a TIPS tartósan szolgálja a beteg életben maradását. A TIPS ismert szövődményei közé tartozik a hepatikus encephalopathia (216), illetve a shunt elzáródása és ezzel párhuzamosan az újrávérzés esélyének megnövekedése (217). Hazánkban elsőként 1995 tavaszán került sor TIPS behelyezésére, Debrecenben, Péter Mózes professzor által. A beavatkozásokhoz a klinikai háttér túlnyomórészt a II. Belklinika gasztro-osztálya biztosította és biztosítja ma is. 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 (218), 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, az adott tanulmányban a betegeket 18 hónapig követtük (219). Elsőként az adott betegnél a TIPS előtti portális nyomásgrádiens és a vérlemezkeszám közötti kapcsolatot vizsgáltuk, de itt egyértelmű összefüggést nem találtunk, tehát a portális nyomásgrádiens mértékéből nem lehetett a thrombocytopenia súlyosságára következtetni. A továbbiakban viszont a vérlemezke szám alakulását a TIPS behelyezés után az eltelt idő függvényében ellenőriztük. 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 nyomásgrádiens a kritikus 12 Hgmm alá csökkent-e, vagy sem, akkor már szignifikáns különbségek jelentek meg, nevezetesen azon betegeken, ahol a portoszisztémás nyomásgrádiens 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 nyomásgrádiens 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 fehérvérsejt szám nem mutatott érdemi változást, a leukopenia sem szűnt meg. A követési idő alatt a betegek 58 %-ában észleltünk egy év után shuntműködési zavart, kétharmaduknál újabb varixvérzés is jelentkezett. Ezeket a betegeket külön értékelve azt láttuk, hogy náluk 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. Egyéb paraméterekkel – pl. haemostasis – ilyen összefüggést nem találtunk. Megfigyelésünk szerint tehát a TIPS beültetés után a thrombocytaszám gondos követése prognosztikus jelentőségűnek bizonyult a későbbi shunt működési zavar, color-Doppler vizsgálattal kimutatható áramláscsökkenés, ill. elzáródás, valamint a varix újravérzés előrejelzésében.



46. ábra A thrombocytaszám alakulása az idő múlásával TIPS beültetés után, 12 Hgmm alatti (n=14) és 12 Hgmm feletti (n=8) portális nyomásgrádienssel rendelkező betegcsoportban (p=0,0226)

24. táblázat: Shuntműködés a thrombocytaszám függvényében

	Az átlagos thrombocytaszám (G/l $\pm$ SD)		P (kétmintás t-próba)
	TIPS előtt (4-6 hét)	TIPS után (3 hónap)	
Jó shuntműködés (n = 14)	109 $\pm$ 30	137 $\pm$ 42	0,011
Shuntműködési zavar varix-vérzéssel (n = 6)	137 $\pm$ 63	103 $\pm$ 34	0,024

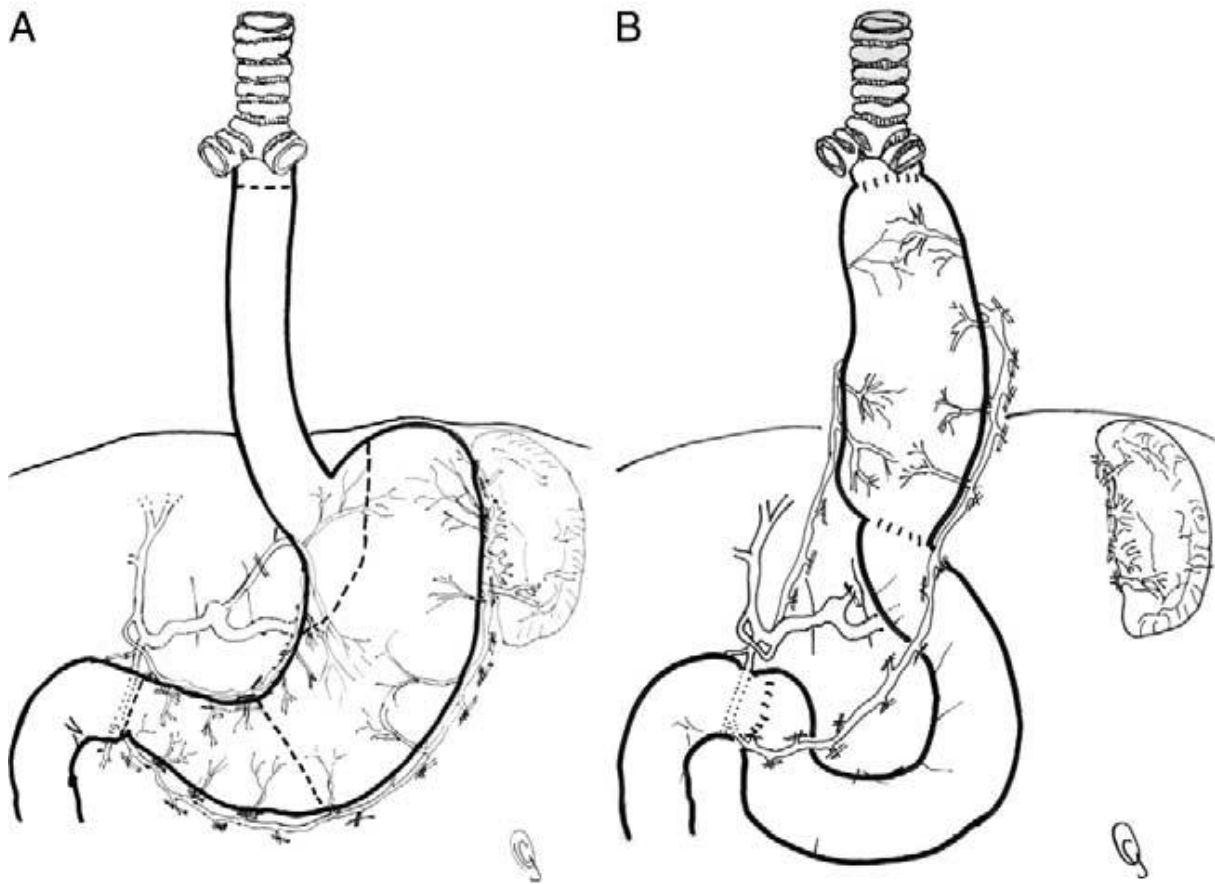
Masszív, életet veszélyeztető felső tápcsatornai vérzés sikeres kezelése recombináns aktiv FVII alkalmazásával aorta-műbillentyűs betegben.

A világirodalomban esetünk volt az első, akinél műbillentyű mellett recombináns FVIIa alkalmazására került sor. Egy 66 éves férfibetegről volt szó, akinél 1979-ben, 42 éves korában került sor először aorta pozícióba műbillentyű beültetésére, infektív endocarditis talaján kialakult súlyos billentyűkárosodás miatt. Thrombotikus történések, illetve súlyos mechanikus haemolysis miatt 3-szor cserélték ki a billentyűt a következő 15 év alatt. 1996-ban krónikus leukaemiát (B-CLL) diagnosztizáltak nála, 2001 decemberében pedig egy második malignomát, tüdőrákot is találtak nála. Erre carboplatin-etoposid kemotherapiát kapott, de a folyamat lassú progressziót mutatott és megjelent a másik tüdőben is. A beteg természetesen hosszú évek óta coumarin kezelést is kapott. 2002 februárjában masszív haematemesis miatt került klinikánk vérzőbeteg osztályára, ahol felvételi hemoglobin értéke 30 g/l, a hematokrit 0,09 volt, ami nagyjából 2,5 liternyi vér elvesztésének felelhetett meg, INR értéke 8,0 fölött volt. Azonnal elkezdődött a transzfúziók adása, de a betegnél hamarosan akut balkamra elégtelenség tünetei léptek föl, így friss fagyasztott plasma adására nem kerülhetett sor. Ezért 50 µg/KG rFVIIa (NovoSeven) adására szántuk el magunkat bólus injekció formájában. A prothrombin idő gyorsan csökkenni kezdett, 30 perc után az INR már csak 1,95 volt, ami biztonságosnak tekinthető, mind a műbillentyű védelme, mind pedig a tápcsatornai vérzés vonatkozásában. Ettől kezdve a beteg állapota gyorsan javult, így 2 óra után a felső panendoscopiára is sort kerítettünk, ennek során a gyomorban diffúzan számtalan erosiót találtunk, de aktiv vérzés már nem volt. A következő napon a beteg 2x50 U/KG LMWH-t (nadroparine) kapott és újból indult a standard antikoaguláns kezelés. Nem voltak DIC-re, vagy műbillentyű eltérésre, ill. endocarditisre utaló jelek. Esetünk felhívta a figyelmet arra, hogy a rFVIIa alkalmazásának lehetnek olyan potenciális „off-label” indikációi, amelyek életmentőek lehetnek. A prothrombin aktivitás elvesztése miatti súlyos vérzés például ilyen lehet. Voltak esetek, amikor cirrhosisban, illetve coumarol túladagolásban került sor a NovoSeven alkalmazására, a hivatalos indikáció, a szerzett faktorhiányos haemophilia mellett. A rFVIIa kevésbé thrombogén, mint például a régebbi prothrombin komplex koncentrátumok voltak, mert csak egyetlen aktivált alvadási faktort tartalmaz és döntően az érsérülés helyén felszabaduló szöveti faktorról lép kapcsolatba, illetve itt képes aktiválni a vérlemezkéket is. Miután a műbillentyűn nincs szöveti faktor, ill. phospholipid, így itt a NovoSeven nem tud IX-es, vagy X-es faktort aktiválni. Előnyei közé

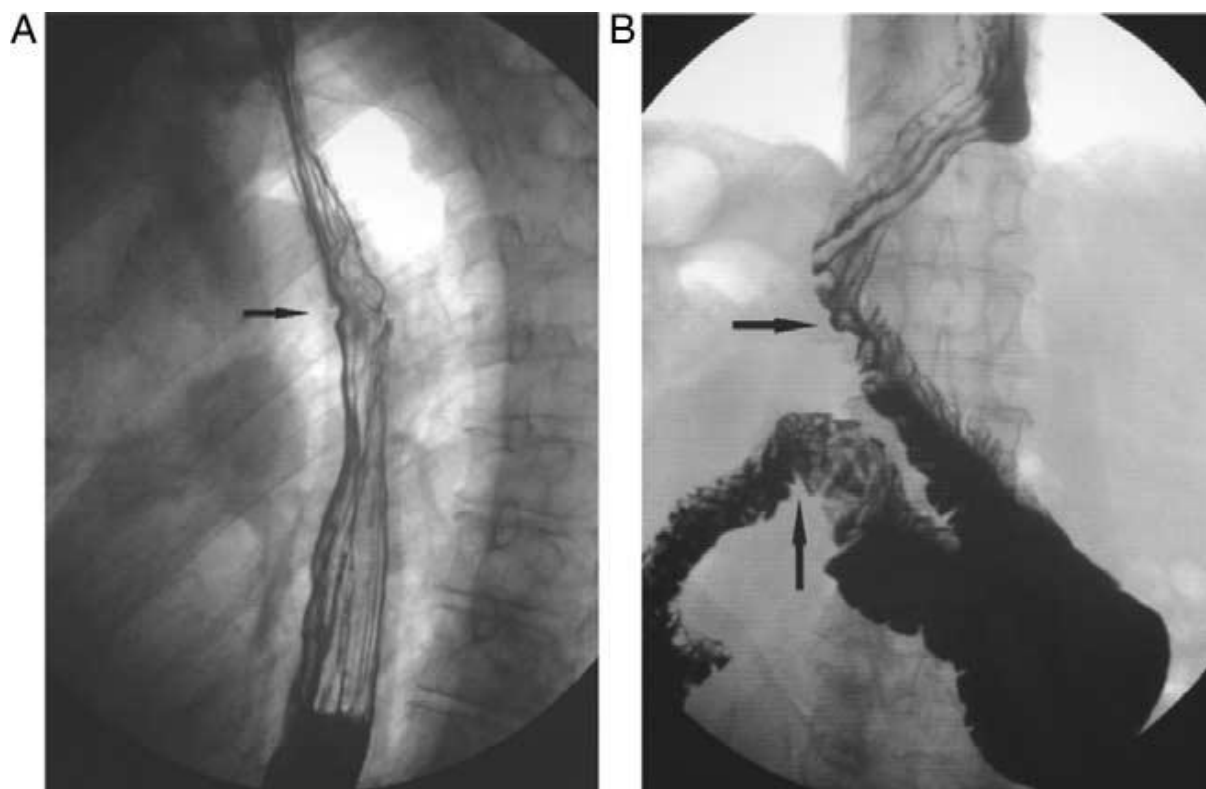
tartozik még a kis volumen, a gyors hatás és a relatív biztonság thrombotikus események kiváltása tekintetében, ami a saját, kétféle malignomával rendelkező betegünkben különösen is fontos volt (220).

Recidiváló hiatus hernia okozta krónikus tápcsatornai vérzés megoldása speciális oesophago-gastro-jejuno-duodenalis anastomosis képzéssel.

Idős nőbetegünk esetében hiatus hernia mellett súlyosbodó reflux oesophagitis talaján kialakult, anaemiát okozó, krónikus tápcsatornai vérzés miatt Nissen-funduplicatio történt a debreceni Kenézy Kórház sebészeti osztályán. A beteg mindössze 2 hónapig volt aránylag panaszmentes, majd refluxos panaszai kiújultak és 3 héttel később haematemesis miatt került föl vételre tápcsatornai vérzőbeteg intenzív osztályunkra. Az elvégzett panendoscopia során masszív, a nyelőcső közepéig felhúzóódó erosiókat találtunk és a funduplicatio szokatlanul magas elhelyezkedésére figyeltünk föl. Nyeletéses vizsgálat és mellkas rtg igazolta, hogy a funduplicatióval képzett mandzsetta gyakorlatilag a rekesz fölé csúszott föl, aminek háttérében nyilvánvalóan egy brachyoesophagus állt. Tekintettel arra, hogy az eredeti műtétet végző intézmény elzárkózott egy újabb műtétől, ill. nem látott erre lehetőséget, egy országos – a nyelőcsősebészetben kimagasló jártasságú – intézettel vettük föl a kapcsolatot, ahol vállalkoztak a probléma megoldására. A műtét során a megrövidült oesophagus distális részét reszekálták, a felhúzott, szintén reszekált gyomorból csövet képeztek, majd ennek distális végéhez egy isoperisztaltikus jejunum-interpozitumot illesztettek, majd ennek distális végét csatlakoztatták a duodenumhoz (47. ábra). A rendkívüli megoldás – amely az un. Merendino műtét (221) továbbfejlesztésének tekinthető – teljes sikerrel járt, a beteg vérzése nem ismétlődött, epés reflux nem jelentkezett és a többéves követés során végzett ismételt biopsziák Barrett metaplasia kialakulását sem mutatták. Ilyen típusú, újszerű műtétből az említett intézményben 1999 és 2002 között 11-et végeztek, részben korai Barrett carcinoma, részben hegesedő peptikus nyelőcsőfekélyek miatt, olyan esetekben, ahol egyéb módon a nyelőcső pótlása nem volt megoldható. Az utóvizsgálatok során – átlagosan 68 hónapos követéssel – 9 betegben történt endoscopia, szövettani ellenőrzés, rtg vizsgálat (46. ábra), 24 órás pH monitorozás, amit közös közleményben jelentettünk meg (222). Az ellenőrzött 9 betegből – a saját speciális esetünket is beleértve 8 betegben a klinikai eredmény kiváló volt.



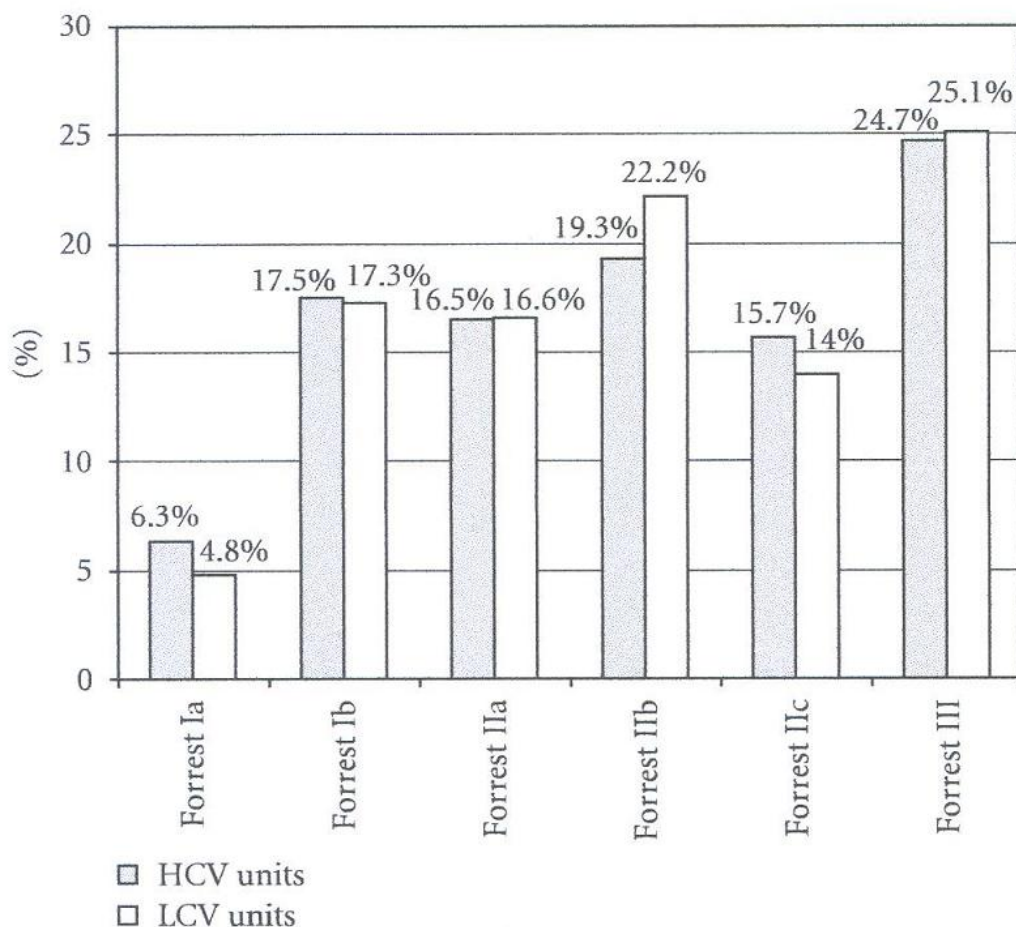
47. ábra A gastro-jejuno-duodenális interpozitum kialakításának sematikus rajza, a szaggatott vonal az A ábrán a nyelőcső, cardia és antrum reszekció helyét jelzi. A felvitt gyomorcorpushoz haladó vérrellátás (B rajz) a jejunális interpozitum szintje előtt halad.



46. ábra Nyeletéses vizsgálat, a nyíl az A ábrán az oesophago-gastrikus anastomosist jelzi, a B ábrán pedig a gastro-jejunális és a jejuno-duodenikus anastomosis helyét.

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 hazai szakmai javaslatok tökéletes összhangban vannak a nemzetközi ajánlásokkal, ezek ismételten publikálásra is kerültek (223, 208). A gyakorlati tapasztalatok minél teljesebb megismerése érdekében országos kérdőíves felmérést szerveztünk, 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 (224). A feltett kérdések 5 csoportot képeztek, egyrészt voltak szervezeti és strukturális kérdések, tehát, hogy az ellátás gasztroenterológián, vagy sebészeti intézményben történt, hány endoscopos szakember végez urgens endoscopiát az adott munkahelyen, hány felső tápcsatornai vérzést és ezen belül is különösen fekélyvérzést látnak el havonta. Az előző hónap leleteinek akkurátus áttekintése után adatokat gyűjtöttünk a vérzésforrásról, a fekélyek Forrest szerinti klasszifikációjáról, az endoscopos kezelés mikéntjéről – tonogénes infiltráció, thermokoaguláció, clip, szoló, vagy kombinált eljárás -, az alkalmazott savgátló kezelés formájáról – protonpumpa gátló, vagy H2 receptor antagonist, bólus, vagy infúziós pumpa – és végül a betegek sorsáról, úgymint újravérzés, sebészi beavatkozás szükségessége, vérzéssel összefüggő mortalitás. Összesen 3033 vérző fekély ellátási adatait dolgoztuk föl, a munkahelyeket az ellátott esetek száma alapján két csoportra osztottuk, a 39 alacsonyabb esetszámú munkahelyen átlagosan 5,3 vérző fekély ellátására került sor havonta, míg a 23 nagyobb esetszámú munkahelyen 12,9 fekélyvérzés történt átlagosan. A 24 órás sürgősségi endoscopos készenlét 54 munkahelyen volt biztosítva, ami 90 %-ot jelentett. Az összes felső akut tápcsatornai vérző esetszám az adott időszakban 6473 eset volt, ezek 46,9%-át tették ki a fekélyvérzők, a már jelzett 3033 eset. A Forrest klasszifikáció szerint nem volt lényeges különbség az alacsony és magas esetszámú központok között (49. ábra), mint ahogy az újravérzés szempontjából nagyobb rizikójúnak tekintett (Forrest Ia-Ib-IIa) csoport arányában sem.



49. ábra A Forrest klasszifikáció százalékos előfordulása az alacsony (LCV) és magas (HCV) esetszámú centrum között nem különbözött lényegesen

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. bólust 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 újrávérzési adatok összevethetőek voltak (10,1% vs 9,5%).

25. táblázat A fontosabb adatok összehasonlítása az alacsony (LCV) és magas (HCV) esetszámu központokban

	HCV units (n = 23)	LCV units (n = 39)	P value
Number of PUB cases	1789	1244	not applicable
Mean number of PUB cases/endoscopists/month	3.2 ± 1.1	2.4 ± 0.9	ns
Item	% (n)	% (n)	
Endoscopic haemostatic treatment			
In Forrest Ia, Ib, and IIa	86 (613)	68 (327)	0.001
In Forrest IIb	45 (154)	39 (97)	0.015
Endoscopic treatment modality in Forrest Ia, Ib, and IIa			
Injection monotherapy	46 (285)	65 (311)	0.001
Haemoclip or thermocoagulation monotherapy	20 (121)	16 (51)	0.002
Combination	34 (207)	19 (61)	0.001
Acid-suppressant therapy after endoscopy with i.v. PPI			
Overall	79 (1413)	81 (1002)	0.490
In patients with Forrest I-II			
With standard dosages	28 (494)	48 (601)	0.001
With bolus + continuous PPI	50 (888)	33 (415)	0.001
Rebleeding rate	10.1 (179)	9.5 (118)	0.680
Need for surgery	5.1 (92)	6.4 (79)	0.181
Mortality			
Overall	2.7 (48)	4.3 (53)	0.023
In Forrest Ia, Ib	6.8 (29)	7.6 (21)	0.791

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% $p=0,023$). A Forrest I súlyosságú fekélyvérzők esetén is valamivel magasabb volt a mortalitás az LCV centrumokban (7,6% vs 6,8%), azonban ez már nem érte el a szignifikancia határát. A fontosabb adatok a 25. táblázatban olvashatók.

V. DISZKUSSZIÓ

A gyulladásos bélbetegségek pathogenetikájának újabb szemléletében egyre fontosabb szerepet kapnak azok a felismerések, amelyek a mikrocirkuláció kóros eltéréseivel, esetenként thrombotikus történésekkel kapcsolatosak. Az endothelium expansiója a gyulladásos bélben egy aktív angiogenesis következménye, amit gyulladásos növekedési faktorok, cytokinek, chemokinek befolyásolnak, és ami az aktív gyulladás fontos ismérve, illetve szoros összefüggést mutat a folyamat súlyosságával is. Az újonnan képződő, gyulladt ereket endothelioma a különböző gyulladásos cytokinekre, növekedési faktorokra adott reakcióiban, adhaesiós molekulák expressziójában, megváltozott antikoaguláns sajátságaiban, barrier működésében eltér a normális capillárisok endothel-jétől (225). A bél microvasculaturájának egyedi élettani és molekuláris jellemzői segíthetnek az IBD számos specifikus vonatkozásának magyarázatában. A bél metabolismusának, a szöveti perfúziónak és az immunsejtek infiltrációjának a változásai az IBD-ben észlelhető microvasculáris adaptációs zavarhoz társulnak.

Haraldsen és mtsai írták le először, hogy a humán intestinális endothel sejtek (HIMEC) jellemzői sejtenyészetben eltérnek az egyéb eredetű endothel sejtektől (226). Például a lipopolysaccharidok csak átmenetileg váltanak ki adhaesiós molekula expressziót, szemben a köldökzsínór véna endothel sejtekkel, ahol ez a hatás sokkal elhúzódóbb, másrészt TNF- α stimulációra is eltérő módon reagálnak, IL-1 β , IL-3 és IL-6 termelés figyelhető meg. Binion és mtsai vizsgálatai utaltak először arra, hogy a HIMEC konstitutív és indukálható NOS aktivitásának megváltozása figyelhető meg gyulladásos bélbetegségekből és ennek az endothelialis dysfunctionnak pathogenetikai szerepe lehet (227).

Az endothel eredetű NO csökkenti a fehérvérsejtek, trombocyták adhaesivitását, elősegíti a vasodilatációt, összekapcsolja a VEGF szignalizációt és az NO-dependens permeabilitást, döntően a ciklikus GMP és a phospholipase C aktivitás fokozása révén. Ugyanakkor az eNOS eredetű NO gyökfogóként is működik, amennyiben O₂-t fog be, miközben azonban toxikus ONOO is képződhet. IBD-ben a csökkent eNOS aktivitás redukálja az EDRF dependens vasodilatációt, egyidejűleg fokozódhat a káros szabadgyök képződés is (228). Az eNOS deléciója azzal fokozza a kísérletes IBD súlyosságát, hogy nem érvényesül az NO szupresszor hatása a cytokin indukált ECAM expresszióra és matrix metalloproteináz aktivációra (229). Egy friss összefoglaló (224) is idézte

azt a megállapításunkat (230), miszerint Crohn betegek széruma redukálta, viszont a colitis ulcerosás betegek széruma fokozta a HUVEC eNOS aktivitását, miközben mindkét fajta szérum növelte az iNOS aktivitást. Egy másik érdekesítő gondolkör a haemostasis és az IBD kapcsolata, hiszen ez is szorosan összefügg az endothel funkcióval, a keringéssel (231). A thromboemboliás szövődmények gyakoriságát IBD-ben 1-8% közé teszik (232), ami 3x-os rizikó növekedést jelent, főleg a fiatalabb korosztályban (233).

Magunk is közöltünk a közelmúltban egy izgalmas esettanulmányt, amelyben egy 46 éves, 10 éve gondozott férfi Crohn betegünkben jobb felsővégtagi akut artériás elzáródás sikeres, katéterrel elvégzett thrombolysiséről számoltunk be (234). Ugyanakkor vannak olyan adatok, amelyek nagy betegkohorton igazolták, hogy haemophilia, vagy Willebrand betegség mellett az IBD előfordulása lényegesen ritkább (235), mintha az öröklött vérzékenység védőhatású lenne. Mindennek egyébként akár újabb therapiás következményei is lehetnek a közeli jövőben, aktuálisan induló klinikai vizsgálatok nyomán.

Az EDRF-NO rendszer szerepe a krónikus gyulladásos bélbetegségekben tehát a nagyszámú humán szöveten végzett vizsgálat, valamint állatmodellen és sejtvonalakon végzett kísérletek ellenére sem tekinthető még teljesen tisztázottnak. Egymásnak ellentmondó eredmények születtek a NO és a NOS izoformák megjelenéséről és aktivitásáról colitis ulcerosában és Crohn betegségben. Nem vitatható azonban, hogy az NO fontos mediátora a szöveti gyulladásnak és szerepe a termelés helyétől, a NO-t termelő sejtek típusától, az oxigén szabadgyökök koncentrációjától függően változik, valamint a gyulladás fennállási idejének és súlyosságának függvényében is eltérő lehet. Colitis ulcerosában inkább a rendszer fokozott aktivitását észlelték, míg Crohn betegségben magas és alacsony NO szinteket egyaránt mértek. Crohn betegségben ismert a nyálkahártya microvasculáris rendszerének strukturális megváltozása és valószínűleg ezzel kapcsolatos a vasodilatator kapacitás működési zavara is. Az NO szintje valamint a NOS expressziója jelezhetik a gyulladásos aktivitást és logikus annak feltételezése, hogy összefüggés van a NOS aktivitás megváltozása, valamint az észlelt morfológiai eltérések között. Vizsgálataink során az iNOS és eNOS expresszióját és lokalizációját vizsgáltuk colitis ulcerosás és Crohn betegek vastagbél nyálkahártya endoszkópos biopsziáiban. A gyulladás által érintett és megkímélt területekből aktív és inaktív klinikai állapotban nyert biopsziás anyagok szisztémás hisztológiai és immunhisztológiai vizsgálatát végeztük (236). Az első, közvetlenül klinikai

jellegű vizsgálatokat követően, a munka második részében laboratóriumi kiegészítő vizsgálatokra került sor. Aktív colitis ulcerosás és Crohn betegek szérumának hatását vizsgáltuk HUVEC tenyészetekben. Az eNOS és iNOS expressziójának és lokalizációjának kimutatására konfluens és semi-konfluens HUVEC tenyészetekben került sor. Szintén követtük a sejtek viabilitási mutatóinak, az apoptotikus és nekrotikus aktivitásnak valamint a proliferációnak a változásait a NOS izoformák expressziójának függvényében gyulladásos és kontroll szérumokkal történt kezelés során. A NO szerepének tisztázása segítheti a gyulladásos bélbetegségek pathogenezisének részletes feltárását, és ezáltal a jövőben diagnosztikus és akár terápiás haszna is lehet.

Aktív colitis ulcerosa gyulladt területein jelentős mennyiségű, hisztokémiailag 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 Crohn-os mintákban szembetűnően kevesebb volt a NADPH-diaforáz pozitív és az iNOS immunreaktív sejtek előfordulása. Kettős jelölésű immunhisztokémiai vizsgálatok során gyulladt IBD-s nyálkahártya iNOS-IR gyulladásos sejtjeinek CD68 és CD15 felszíni membrán antigén pozitivitása a macrophagokat (CD68-IR sejtek) valamint a neutrophil granulocytákat azonosította. Colitis ulcerosás nyálkahártyában a CD15-IR sejtek túlnyomó többsége iNOS-IR volt. Crohn betegségben a domináns gyulladásos sejtípus 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, de 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 részeken (CD_u $23\pm 8\%$).

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

Az IBD-s 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 Crohn-os 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 sejttenyésztő 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 élénkülése volt észlelhető. Crohn-os szérummal történt kezelés negyedik órájától az eNOS immunreaktivitás a sejtek központi részére koncentrálódott 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 sejtenyészetben.

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%-os 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%-os 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%-nyi 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 immunfluoreszens sejtek részben szigetekben helyezkedtek el, poligonális alakzatot véve fel egymáshoz kapcsolódva. A sejtek többségén megnyúlt, állászerű nyúlványok láthatók. Ötven százalékos normál és 50%-os colitis ulcerosás szérum jelenlétében a sejtek formája és eloszlása nem változott szembevetően 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 szérum okozta 40-70%-os szignifikáns csökkenéshez képest. Az infliximab (15 ng/mL) hozzáadása hasonló eNOS protein expresszió növekedést váltott ki 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 sejttenyésztő 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 követő 15 ng/ml infliximab hozzáadás 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-os 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 betegekben 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 angiogenin volt detektálható 3.56 ± 0.04 ng/ml koncentrációban. Aktív Crohn beteg szérumával történő kezelés után az angiogenin 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 angiogenin és a bFGF koncentráció a kontroll szintjén maradt (angiogenin 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.

Eredményeink egyrészt újabb adalékokat adnak az IBD két klinikai formája közötti különbségek pontosabb értelmezéséhez a microvasculatura szintjén, másrészt az infliximabbal végzett vizsgálatok jól demonstrálták ennek a hatékony, új, anti-TNF- α kezelésnek az endothelium működését is befolyásoló, adott esetben korrigáló hatását. Ugyanakkor az egyedi kezelés HUVEC

tenyészetben kimutatott hatásai érzékeny prognosztikai jelzői lehetnek hosszabb távon is a kezelés hatékonyságának az adott beteg esetében (237).

A gyulladásos bélbetegségek (IBD) változatos klinikai megjelenését befolyásoló faktorok jelentős része ismeretlen. A haptoglobin (Hp) molekula fontos antioxidáns anyag, amelynek megfelelő működése, aktivitása fontos befolyást gyakorol egyrészt a gyulladásos folyamatok lefolyására, másrészt a mikrocirkuláció épségére is. Három fő fenotípusát különböztetjük meg, melyek azonban különböző mértékű antioxidáns, scavenger és immunmoduláns tulajdonsággal rendelkeznek, és ezek kapcsolatot mutatnak egyes gyulladásos betegségek kórlefordulásával. A Hp α -lánc 1-1 genotípusa kis molekulású dimerek, a 2-1 genotípus különböző hosszúságú lineáris polimerek, a 2-2 genotípus ciklikus polimerek képződését eredményezi. Munkánk során vizsgáltuk a Hp polymorphismus megoszlását, valamint annak lehetséges kapcsolatát a betegség klinikai megjelenésével nagyszámú IBD betegben. A Hp fenotípusokat nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) és immunblottal határoztuk meg, mely egyértelműen azonosítja a betegek genotípusát is. Az eredményeket a normál magyar népességet reprezentáló egészséges kontrollokhoz viszonyítottuk. A Hp fenotípusok megoszlása IBD-ben nem különbözött az egészséges populációban észlelttől. Ugyanakkor Crohn-betegekben a Hp2-1 fenotípus esetén a gyulladásos forma előfordulása szignifikánsan gyakoribb volt a másik két Hp fenotípushoz viszonyítva, míg a strikturáló forma előfordulása ritkább. Továbbá az extraintestinalis manifesztációk közül primer sclerotizáló cholangitisben a Hp1-1 fenotípus egyáltalán nem fordult elő. A Hp szerepét a molekula immunreakciókban betöltött moduláló hatásai és eltérő térszerkezete magyarázhatják.

A PSC és a Hp polymorphismus kapcsolatát eddig nem vizsgálták, illetőleg az irodalomban nem ismert olyan betegcsoport, ahol a Hp1-1 fenotípus teljes hiányáról számoltak volna be. A PSC kialakulása során immungenetikailag fogékony egyénben a béltraktus krónikus gyulladása során transzlokálódó baktériumok az epeútrendszerben antigénként jelenhetnek meg, a memória T-sejtek pedig nemcsak a colon, hanem az epeutak endothel sejteihez is kötődnek. A memória T-sejtek biliáris traktusba történő homingja vezethet a PSC kialakulásához. Újabb adatok az epeútrendszer oxidatív károsodásában felvetik a mononucleáris sejtek jelentőségét is (238). Primer sclerotizáló cholangitisben a sinusoidális és a perisinusoidális térben macrophagok szaporodnak fel. Az aktivált macrophagoknak és az általuk termelt cytokineknek

szerepük lehet a gyulladás fenntartásában, a fibrosis, majd a cirrhosis kialakulásában (239). A Hp fenotípusok és a PSC kapcsolatának egyik lehetséges magyarázata a CD163+ macrophagok eltérő viselkedése a különböző Hp molekulákkal való kölcsönhatás során. Másrészt a PSC immunogenetikai modelljéhez illeszkedhet az a megfigyelés, hogy a szervezetnek a különféle bakteriális fertőzésekre adott válasza, annak hatékonysága az egyes Hp fenotípusok esetén jelentősen eltér (240).

A kapott eredményeink megerősítésére azonban további, földrajzilag eltérő régióban végzett populációs vizsgálatok szükségesek. További vizsgálatok szükségesek annak tisztázására is, hogy a különböző Hp molekulák milyen szerepet játszanak a különféle gyulladásos folyamatokban, és mi lehet azok pontos patogenetikai kapcsolata az általunk vizsgált betegcsoportokban.

Májcirrhosisos betegekben a bakteriális infekciók kialakulásának lehetséges további rizikófaktorait kerestük a korábbi ismert előrehaladott májbetegség és gastrointestinális vérzések provokáló szerepe mellett. Ennek jelentősége nem egyszerűen abban áll, hogy a legveszélyeztetettebb csoport kiválasztása, szorosabb követése, profilaktikus antibiotikum terápiája révén javíthatjuk a mortalitási mutatókat, de további betekintést enged a bakteriális infekciókkal szembeni védekező folyamatok részleteibe, lehetővé teszi az egyes részfolyamatok klinikai jelentőségének felmérését is. Vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy egészségeseknél minimális jelentőséggel bíró molekuláris variációk, immundeficiens állapotokban komoly rizikótényezőkké válhatnak. Az általunk vizsgált két molekula olyan tényezőnek számít az alap kutatások alapján, amelyeknek a mikrocirkuláció épségének megőrzésében, illetve a bakteriális infekciók kialakulásában fontos szerepe lehet.

Vizsgálati csoportok: krónikus májbeteg: 929 (autoimmun és vírushepatitises májbeteg májcirrhosis nélkül: 591, májcirrhosisos betegek: 338), IBD: 990 (CD: 740 és UC: 250) és egészséges kontroll (HC): 225.

Májcirrhosisos betegekben az MBL hiány előfordulási gyakorisága (10,7% vs. 15,6%) és a különböző Hp fenotípusok megoszlás (Hp1-1: 10,7% vs. 11,5% , Hp2-1: 47,9% vs. 46,1%, Hp2-2: 41,4% vs. 42,4%) megegyezett az egészséges kontroll populációban talált arányokkal és nem mutatott összefüggést a májcirrhosis súlyosságával, vagy a betegség specifikus szövődmények jelenlétével. Vizsgálataink alapján az MBL deficiencia előfordulása és Hp fenotípusok megoszlása nem játszanak lényeges szerepet a májcirrhosis etiopathogenezésében és a betegség specifikus szövődmények kialakulásában.

Követéses vizsgálat során felmértük májzsugorban szenvedő betegeink bakteriális infekcióra való hajlamát (az első infekcióig eltelt idő, az infekciók gyakorisága), és összefüggést kerestünk különböző klinikai jellemzőkkel, valamint vizsgáltuk a Hp polymorphismus és az MBL deficiencia jelentőségét. A májcirrhosisos betegek 33,7%-ban fordult elő valamilyen klinikailag jelentős infekció (CSI) a teljes követési idő alatt és 56,1%-ukban pedig több mint egy fertőzőes epizód zajlott. Az infekciók 32,5%-a húgyúti fertőzés, 20,4%-a spontán bakteriális peritonitis (SBP), 15,5%-a pneumonia, 8,7%-a bőr vagy lágyrész infekció, 3,4%-a bakterémia, 2,4%-a epeúti fertőzés, 0,5%-a osteomyelitis volt. Pozitív tenyésztési eredmény a fertőzőes epizódok 55,6%-ában állt rendelkezésre. A kórokozók 57,2%-ban Gram negatív baktériumok, 42,8%-ban Gram pozitív baktériumok voltak.

Az előforduló bakteriális infekciók típusa és gyakorisága megegyezett más korábbi prospektív klinikai tanulmányokban észleltekkkel. és azokkal egybecsengően a mi vizsgálatunkban is megerősíthető volt, hogy az előrehaladott májbetegség (Child-Pugh C stádium) a kialakuló bakteriális fertőzések fontos prediktora.

Multvariációs analízis során súlyos betegség társulása is az infekciós epizódok független rizikó faktorának bizonyult, amiről, mint új kockázati tényezőről elsőként számoltunk be az irodalomban. A társuló betegségek előfordulási gyakorisága megfelelt *Jepsen és mtsai.* (44% vs. 38%) által közölt dániai országos felmérés értékeinek (241). Adataink alapján az ascites jelenléte esetén is nagyobb valószínűséggel fordult elő fertőzés. Ennek egyik oka, hogy a hasúri folyadék súlyosabb májbetegséget jelent. Ismert azonban, hogy az intestinális bakteriális transzlokáció az infekciók kialakulásának fontos mechanizmusa májzsugorban. Állatkísérletes modellekben és humán vizsgálatokban is igazolták, hogy ascites esetén a BT jelentősebb mértékű (242). Saját tanulmányunkban asciteses betegeinkben a BT markerének tartott lipopolisacharid kötő proteinszint emelkedés (243) és az anti-mikrobális antitest jelenléte gyakrabban fordult elő, mint azokban, akiknek szabad hasúri folyadékuk nem volt. Tanulmányainkban azt találtuk, hogy az infekciók kialakulásának gyakorisága és az első fertőzőes epizód megjelenéséig eltelt idő szignifikáns összefüggést mutatott mind az MBL, mind pedig a Hp fenotípussal. Az abszolút MBL hiányos betegeknél szignifikánsan gyakoribb volt a CSI kialakulásának aránya az MBL kompetens egyénekével összehasonlítva (50,0% vs. 31,8%, $p=0,039$), továbbá az első fertőzőes epizód megjelenéséig eltelt idő is rövidebb volt (medián 579 nap vs. 944 nap, $p\text{LogRank}=0,027$). A Hp1-1

fenotípusú betegekben szignifikánsan gyakoribb volt a CSI előfordulási gyakorisága, mint a másik két fenotípussal rendelkezőkben (Hp1-1: 50,0%, Hp2-1: 36,0% Hp2-2: 26,6%, $p=0,039$). Hasonlóképpen, az első fertőzéses epizód kialakulásáig eltelt idő a Hp1-1 fenotípusú betegek esetén volt a legrövidebb (medián, Hp1-1: 492 nap, Hp2-1: 765 nap és Hp2-2: 965 nap; $pLogRank=0,017$). A kórokozók Gram szerinti típusa és az infekciók lokalizációja azonban nem különbözött az eltérő MBL és Hp fenotípusú egyénekben. Az univariációs és a Kaplan-Meier analízisben a CSI kialakulásában kockázati tényezőnek talált klinikai és szerológiai tényezők független kockázati tényezőnek bizonyultak mind a keresztmetszeti (logisztikus regressziós analízis), mind az időfüggő (Cox analízis) multivariációs modellekben is. A Cox-modellt összegezve a különböző klinikai és szerológiai tényezők esetén a CSI kialakulására vonatkozó esélyhányadosok az alábbiak voltak: Child C stádium (HR: 4,0, 95%CI: 2,29-7,01, $p<0,001$), társbetegség jelenléte (HR: 1,89, 95%CI: 1,23-2,90, $p=0,003$), abszolút MBL hiány (HR: 2,33, 95%CI: 1,34-4,03, $p=0,0034$) és Hp1-1 fenotípus (HR: 2,03 95%CI: 1,15-3,61, $p=0,014$). Az abszolút MBL hiányos és a Hp1-1 fenotípusú betegekben a CSI egyértelműen súlyosabb formában zajlottak ($p=0,03$). Továbbá az abszolút MBL hiány esetén az infekcióval összefüggő halálozás kockázata is magasabb volt (OR: 3,84, 95%CI: 1,29-11,37, $p=0,013$).

Munkánk ide vonatkozó részének tehát legfontosabb új eredménye annak megállapítása volt, hogy az Hp1-1-es típus a bakteriális infekciók független rizikótényezője májzsugor esetén. Ismereteink szerint ez az első olyan klinikai vizsgálat, mely a Hp polimorfizmus szerepét igazolja ebben a vonatkozásban (244). Mindössze egy olyan kisebb esetszámú tanulmány jelent meg, ahol az életet veszélyeztető *Staphylococcus* infekció előfordulását Hp1-1-es fenotípus esetén gyakoribbnak találták (239), de nem cirrhosisos populációban. Valószínű, hogy a mutációt követően kialakult Hp2-es allél gyors elterjedését az magyarázza, hogy szelektív rezisztenciát biztosít a behatoló kórokozókkal szemben (245). Sok kórokozónak vasra van szüksége alapvető anyagcsere folyamataihoz, melyet a Hgb-Hp komplex bekebelezése útján vesz fel. A kis dimer szerkezetű Hp1-1-vel szemben a polimer szerkezetű Hp2-2-s fenotípus ezt lehetetlenné teszi, így akadályozza a baktériumok szaporodását. Ráadásul a multimer szerkezetű Hp2-2 több baktériumkötő hellyel rendelkezve agglutinálja azokat, tovább gátolva szaporodásukat. Ezáltal a polimer formák egy hatékonyabb természetes védelmet jelentenek számos kórokozóval szemben. A Hp1-1 kevésbé serkenti a B és CD4-T lymphocytákat a keringésben (154) és

erősebben gátolja a prosztaglandin szintézist (246). A Th1 válasz szükséges a patogének megfelelő eliminálásához (247), a Th2 válasz a gyulladásos folyamat lecsengéséhez, a szöveti gyógyuláshoz nélkülözhetetlen. A mutációt követően kialakult Hp2-2 a Th2 válasz gyengébb induktoraként az immunválaszt Th1 irányba tolja, ami a bakteriális infekciókkal szembeni védekezést kedvezően befolyásolja, de pl. a diabeteses érszövődmények kialakulásának szempontjából hátrányos következményekkel jár. A fenotípusok között lévő funkcionális különbségek magyarázzák az infekcióra való fokozott fogékonyságot Hp1-1 fenotípusú cirrhotikus betegeinkben.

A T sejt válasz egyensúlyának különös jelentősége lehet lokálisan az extravaszkuláris térben. A Hp szignifikáns lokális szerepére utal, hogy a legkülönbözőbb testfolyadékokban megtalálták, pl. az ascitesben is (248). Felszabadul a granulocytyákból a gyulladás helyén, meghatározott stimulusokra különböző szövetekben expresszálódik (249). Magunk azt is találtuk, hogy a haptoglobin mRNS fokozott mennyiségben van jelen különböző vékony- és vastagbélgyulladásban szenvedő betegek bélbiopsziás mintáiban (még nem közölt adat). Cirrhotisban ismert a vékonybél gyulladásos állapota (250), mely hozzájárul a bakteriális transzlokáció fokozódásához. Feltételezhető, hogy a Hp2-2 fenotípus lokálisan egy erőteljesebb védelmi vonalat hozva létre akadályozza a fertőzés szisztémássá válását.

Az első vérvételkor vett mintákban a Hp koncentrációja széles határok között változott. Mivel egy akut fázis fehérjéről van szó, melynek legfontosabb induktora az infekciók és a szöveti sérülés, csak azokat a betegeket választottuk be, akiknek a CRP-je normális volt, infekcióra utaló jelük nem volt, közelmúltban varixvérzés nem zajlott. A koncentrációk között észlelt nagy különbségeket az magyarázhatja, hogy a fehérje vérszintjét számos tényező befolyásolja. Kissé változik fenotípustól függően, legalacsonyabb a Hp2-1 esetén (251). Valamint befolyásolja a haemolysis szintje is. Tekintettel arra, hogy nagyrészt a májban termelődik, az lenne várható, hogy a májbetegség súlyosságával párhuzamosan csökken a nyugalmi szérumszint és romlik az akut fázis válasz. Ezzel szemben vannak adatok arra, hogy a cirrhosis maga bizonyos fokig indukálhatja a Hp szintézist, indukciót követően pedig jó Hp válasz észlelhető, mivel a cirrhotikus máj a többi metabolikus folyamat kárára is biztosítja a Hp szint emelkedését (252). Ráadásul vannak társbetegségek, melyek során infekció nélkül is magasabb Hp koncentráció mérhető (pl. HCC) (253).

Nem találtunk összefüggést az infekciómentes időszakban mért koncentrációk és a későbbiekben kialakuló infekciók valószínűsége között. Ennek magyarázata az lehet, hogy a vérben keringő Hp-t nagyobbára a máj szintetizálja. Az innate és az adaptive immunválasz szabályozásában pedig a monocyták, granulocyták által termelt, az extravasculárisan autokrin és parakrin módon ható Hp-nak lehet jelentősebb szerepe. Ennek termelése, felszabadulása valószínűleg független a máj funkcionális kapacitásától. Lokálisan a Hp strukturális, ebből következően funkcionális különbségeinek nagyobb jelentősége lehet a vérben mért nyugalmi koncentrációknál. A Hp és annak fenotípusainak pontos szerepe, még felderítésre vár.

A mannóz kötő lektin szintek, deficit részletes elemző vizsgálatára olyan nagy, különböző etiológiájú és súlyosságú májbeteg populációban, mint a saját közleményünkben (254), korábban még került sor. Kettős monoklonális antitest assay-t használtunk, mely elfogadottan egy szenzitív, reprodukálható vizsgálat az MBL szérum szint mérésére, s amely pontosan jelzi a működő molekulákat. Szoros összefüggést találtak a mannóz kötő assay, vagy a komplement aktivációs C4b assay során meghatározott MBL funkció, és az előbb említett módon mért koncentrációk között (255). A vérben keringő MBL mennyiségét elsősorban genetikai tényezők határozzák meg, a promoter génben bekövetkező mutációk, azok homo-, vagy heterozygota formái szabják meg. Valószínűleg ezeken kívül is léteznek nem pontosan ismert befolyásoló tényezők, melyek miatt a mérhető MBL szintek egyénenként jelentős változatosságot mutatnak, a magastól, közepesen át a rendkívül alacsony (MBL deficiens) értékekig. Tanulmányunkban 929 krónikus májbetegben vizsgáltuk az MBL szinteket, melyek a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően széles egyéni variációt mutattak, nem csak a betegek között, de a kontroll csoportban is. Az egészségesek és a betegek között nem találtunk különbséget az átlagos MBL szinteket tekintve, és nem tért el az alacsony MBL szint (<500 ng/ml) és MBL deficiencia (<100 ng/ml) előfordulási gyakorisága sem.

Korábban Matsushita és mtsai. (256) úgy találták, hogy a nagyon magas MBL szint a PSC kialakulásának fokozott rizikó tényezője. Jelen tanulmányban egy kb. háromszor akkora PSC-s populációban nem tudtuk megerősíteni az összefüggést az MBL koncentrációja és a PSC megjelenése között. Nem találtunk eltérést az MBL kompetens és deficiens csoportban a PBC, a PSC vagy az AIH klinikai lefolyását vagy biokémiai eltéréseit tekintve sem. Adataink alapján nem volt kapcsolat az MBL szintek és a krónikus C vírus hepatitis között sem. Ebben a betegcsoportban az eddig közölt adatok ellenmondásosak.

Kilpatrick és mtsai (257) kétszer magasabb MBL koncentrációkat mértek C vírus okozta krónikus hepatitisben szenvedőkben, mint egészségesekben. Egy másik study-ban nem találtak különbséget (258). Szintén eltérőek az adatok a HCV-ben kialakuló fibrózis tekintetében is (259). Krónikus májbetegségben az MBL szinteket befolyásoló tényezőket alig vizsgálták, de az egyes tanulmányokban észlelt kifejezett különbségek miatt ezeknek jelentősége lehet.

Vizsgálatunkban a különböző etiológiájú májcirrhotikus betegek MBL szintjei nem tértek el a nem cirrhotikus populációban észleltektől. Részletesebb vizsgálatok kapcsán azonban előrehaladott cirrhotisban szignifikánsan alacsonyabb értékeket mértünk. (medián, Child C: 716 ng/ml vs. Child A vagy B: 1444 vagy 1375 ng/ml, $p < 0,001$ minden esetben). Ez valószínűleg nem meglepő, hiszen a májsugor előrehaladtával romlik a szintetikus funkció. Az abszolút MBL hiány azonban nem volt alacsonyabb Child C stádiumú betegekben, így ez egy kizárólag genetikailag meghatározott variációnak tartható. Az ascites illetve megelőző varixvérzés jelenléte vagy hiánya nem befolyásolta az MBL szinteket. Ez azt jelenti, hogy a portális hypertensionak nincs szerepe az MBL koncentráció meghatározásában.

Az MBL egy C-típusú lektin, ami központi szerepet játszik az innate immunválaszban. Az utóbbi évek kutatásai derítették fényt arra, hogy TLR co-receptorként működve koordinálja, szinkronizálja erősíti az innate védekező rendszert. Amikor az immunrendszer éretlen, vagy bármilyen okból komprimált, különös jelentőségűvé válik az innate védekezés a bakteriális infekciók kialakulása szempontjából. A májsugor egy szerzett immundeficiens állapot. Így joggal feltételezhető, hogy az MBL deficienciának jelentősége van a cirrhotisban megjelenő bakteriális infekciók kialakulásában. Követésező vizsgálat során kerestük az összefüggést a klinikailag jelentős bakteriális fertőzések kialakulásának rizikója és az MBL hiány között. Az átlagosan 420 napos (IQR: 87-745) követési idő alatt az MBL deficiencia a bakteriális infekciók független előrejelző faktorának bizonyult, mely nemcsak a fertőzés kialakulását, de az első fertőzés megjelenéséig eltelt időt is befolyásolta.

Tanulmányunkban mi is meg tudtuk erősíteni a bakteriális infekciók negatív prognosztikai szerepét májsugorban szenvedők esetén. A kórházi halálozás a Borzio és mtsai által közölt adatoknak (260) megfelelt. Infekció esetén magasabb volt a mortalitás, és az MBL deficiencia tovább rontotta a túlélést. Ez azt bizonyítja, hogy nem csak gyakoribb a fertőzések bekövetkezése, de azok súlyosabb formában is zajlanak MBL hiányos cirrhotikus betegekben. Sajnos az alacsony esetszám miatt csak univariációs analízisre volt

lehetőségünk. Az MBL szintek és a cirrhotikus betegek infekciója közötti kapcsolatot tudomásunk szerint csak egy kisebb tanulmányban vizsgálták korábban, ahol azt találták, hogy krónikus B vírus hepatitis talaján kialakult májcirrhotikus betegekben gyakrabban alakult ki spontán bakteriális peritonitis alacsony MBL szérumszint esetén (261).

Korábban felmerült, hogy az MBL is akut fázis fehérje lenne (262), de a jelenlegi kutatások szerint a szintje nem változik gyulladások kapcsán (263, 264). Méréseink eredményét nem befolyásolta, mivel infekciómentes időszakban, normális CRP mellett történt a vérvétel.

Feltételezhetően az MBL-nek is különösen fontos szerepe lehet lokálisan a bél falon át történő transzlokáció megakadályozásában. Egyes vizsgálatok arra utalnak, hogy az MBL sem kizárólag a májban szintetizálódik. MBL2 gén transzkripció a vékonybélben is bizonyítható. Bár ez a hepatikus értéknek csak kb. 1%-a, mégis azt jelzi, hogy lokális MBL szintézis is létezik, mely intestinális gyulladás kapcsán fokozódhat, a lokális MBL mRNS up-regulációja bizonyítható volt (265). Az MBL gén expresszióját kimutatták a belet infiltráló immunsejtekben (266). Szignifikáns intracelluláris és kis mennyiségű felszíni expressziót találtak humán monocytákban és dendritikus sejtekben (267). A molekula a vékonybél tartalmába is belekerül (268). Feltételezhető, hogy az MBL deficiens betegek, MBL kompetens társaikhoz viszonyítva, (hasonlóan a Hp1-1-es fenotípusú betegekhez) kevésbé képesek védekezni a bél falon át bejutó baktériumokkal szemben.

Az Hp polymorphismus 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 vérzésekkel kapcsolatos 15 éves felmérés számos érdekes megfigyelésre adott módot, hatánkban gyakorlatilag 2 évtizeddel ezelőtt indultak el azok a kezdeményezések, hogy a tápcsatornai vérzőbetegek ellátása szervezetiileg is az endoscopos gasztroenterológusok kezébe kerüljön, a korábbi – történelmi hagyományú – sebészeti osztályos felvétel helyett. Mindez egybe esett az endoscopia eszköztárának látványos fejlődésével, az endoscopos ligatúra, majd pedig az endoscoposan alkalmazható haemostatikus clippek

megjelenésével. És ez a folyamat nem állt meg, hiszen amíg a sebészet a „minimal invasivity” irányába fejlődik, egyre radikálisabb műtétek válnak megoldhatóvá laparoscopos úton, addig a korábban „konzervatív” belgyógyászati szakmák, lásd kardiológia, gasztroenterológia egyre merészebbé váltak, elég utalnunk a coronaria stentelés vívmányaira, vagy a NOTES látványos előretörésére. Ma tehát már nem vitás, hogy a fejlettebb világban mindenütt gasztroenterológiai (szub)intenzív részlegeken történik a vérző betegek ellátása, hiszen általánosságban elmondható, hogy a betegek kevesebb, mint 10 %-a igényel sebészi beavatkozást. Sajnálatos azonban, hogy éppen hazánkban ennek a formának a korrekt finanszírozása mai napig nem megoldott, hiszen ha nincs lehetőség valódi intenzív ágyakat/osztályt biztosítani erre a célra a gasztroenterológusoknak, akkor az ellátás eszköz, felszerelés és vérigénye gazdaságosan nem oldható meg. Természetesen ez az oka annak, hogy számos – nem is a legkisebbek közé tartozó – kórház vezetése nem támogatja a tápcsatornai vérzések magasabb színvonalú, centralizált ellátását. Ma ez Magyarországon elhivatott, elkötelezett endoscopos szakemberek önfeláldozásán múlik, akik vállalják a készenléti szolgálat terheit, a betegek megmentése érdekében. Pedig a legújabb, országos felméréssel készült tanulmányunk (224) látványosan bizonyította, hogy a nagyobb létszámú beteget ellátó, tapasztaltabb centrumok eredményei szignifikánsan jobbak. Ugyanakkor pedig megállják a helyüket a nemzetközi adatokkal történő összevetésben is. Az egyik legújabb – a miénkhez hasonló, sokcentrumú, fekélyvérzőkre vonatkozó – tanulmány, a „Prometeo” Olaszországban (54) tizenhárom centrumból begyűjtött adatok alapján 932 férfi (átlag életkor 66,5) és 481 nőbeteg (átlag életkor 74,2) adatait dolgozta föl. A betegek 83 %-ában voltak társbetegségek, 52,4%-uk használt aspirint, vagy NSAID típusú gyógyszert, miközben hatékonynak tartható gyomorvédelemről csak 13,9%-ban számoltak be. A betegek 13,3 %-ában volt már korábbi felső tápcsatornai vérzés a kórelőzményben, transzfúzióra 43,9 %-ban volt szükség, felvételkor a betegek 9,3%-a volt shockos állapotban. Endoscopos vizsgálatra 93,2%-ban került sor, és vérzésforrásként 36%-ban irtak le nyombélfekélyt, 29,6%-ban gyomorfekélyt, erósiókat 11 %-ban. *Helicobacter pylori* fertőzést mindössze a betegek 37 %-ában vizsgáltak, ha viszont tették, akkor 51,3%-ban pozitívnak bizonyult. Korai újravérzés 5,4%-ban fordult elő, viszont ezek közül minden hatodikat műteni kellett. A vérzéssel összefüggő mortalitás 4 % volt, ami a női nemmel (OR: 2,19), daganat jelenlétével (OR:2,7), többszörös társbetegségekkel (OR: 5,04), felvételkor észlelt shockos állapottal (OR:4,55) mutatott statisztikai

összefüggést. Ha a saját adatokkal vetjük össze, 1059 férfi, (átlagéletkor 59,2) 735 nő (átlagéletkor 65,6), akkor megállapíthatjuk, hogy nálunk a nők valamivel magasabb számban kerültek fölvételekre, mint az olasz populációban, viszont az átlagéletkor mindkét csoportban, több, mint 7 évvel volt alacsonyabb.

Vérzésforrások tekintetében nálunk is közel azonos arányban fordult elő a gyomor- és a nyombélfekély (21% vs. 22,2%). Ami rendkívül látványos, hogy az aspirin, ill. NSAID fogyasztók aránya milyen magasra szökött az utóbbi években, az olasz anyagban 52,4%, de ez egy közelmúltbeli évet reprezentál, míg nálunk 1997-ben minössze 11,5 % volt az alvadást, ill. vérzékenységet befolyásoló gyógyszeres kezelésben részesültek száma, viszont ez a szám 2011-re már 40%-ra nőtt. A tápcsatornai vérzések ellátása során ennek a problémának a részletes elemzésével érdekes közleményben foglalkoztunk korábban (269), ahol az első 100 ilyen beteg tapasztalatait dolgoztuk föl, külön behatóan foglalkozva azokkal a műbillentyűs betegeinkkel, akik coumarin túladagolást követő tápcsatornai vérzéssel kerültek osztályunkra. Ilyenkor az INR értéket óvatosan, friss fagyasztott plazma adásával korrigáltuk 1,5-ös értékhatárig, ebben a stádiumban gyakorlatilag vérzéses tünetek meg nem voltak, korrekt endoscopos ellátás mellett, majd ekkor indítottuk el az óvatos LMWH kezelést, a billentyű épségének megóvása érdekében és valamennyi betegünk esetében sikerült a billentyű épségét megóvnunk, miközben a tápcsatornai vérzést is sikerült uralnunk.

Ahogy a fejlettebb országokból származó adatokból látszik, az egyre idősebb korosztályban jelentkező tápcsatornai vérzések kimenetelét befolyásoló tényezők közül növekvő jelentőséggel bírnak a társbetegségek. Már 1996-ban a Rockall score, illetve az általunk kidolgozott, 1998-ban közölt kockázati pontrendszer elemei között is szerepelt a társbetegségek kockázatot fokozó hatásának pontokban kifejezett megjelenítése, de a 15 éves klinikai anyagunk feldolgozása során ezt megpróbáltuk tovább finomítani: amint az a 44. ábrán látható, a három legnagyobb számban megfigyelt társbetegség – az alkoholos májbetegséget, mint abszolút győztest nem számítva – a hypertensio, ill. a társuló cardiovasculáris elégtelenség, a diabetes mellitus és az epekövesség volt. Érdekes módon, míg a cukorbetegség és az epekövesség előfordulási gyakorisága inkább stagnált, addig a magas vérnyomás előfordulása konzekvensen és határozott mértékben mutatott emelkedő tendenciát. Ehhez nyílván hozzájárul a thrombocyta aggregáció gátló és az ízületi fájdalmakra szedett gyógyszerek alkalmazásának látványos fokozódása is, azonban nyilvánvaló, hogy a kérdés összetettebb. A magasabb vérnyomás kedvez az

idős, sclerotikus erek sérüléseinek, fokozza az ér-endothel károsodását, elősegíti a szöveti szintű keringési zavar, esetenként enyhe ischaemia előfordulását is. Ennek a kérdésnek a további vizsgálata mindenképpen perspektivikus lehet.

A vérző betegek gyógyszeres ellátásában a nemzetközi irányelveket kezdettől igyekeztünk követni, így a vérző fekélybetegek 8 éve már az endoscopos ellátást megelőzően infúziós Controloc kezelésben részesülnek, míg a varixvérzés megalapozott gyanúja esetén az ellátás első lépése az octreotid (Sandostatin) infúziós pumpa elindítása, 25 mg bólust követően 25 mg/h dózisban, minimálisan 2, de inkább általában 3 napon át. A gyógyszeres kezelést – szintén az irodalmi ajánlások alapján - 5 éve antibiotikus kezeléssel (norfloxacin vagy ceftriaxon) egészítjük ki és természetesen ezek a betegek is kapnak az akut időszakban protonpumpa gátló kezelést. Az átlagos vérkészítmény felhasználást a 45. ábrán tüntettük föl, ebből kitűnik, hogy ahol szükség volt rá, ott átlagosan 3-5 E vvt suspensio és 3 E FFP adására került sor. Ebben az elmúlt 15 év során érdemi változást nem tudtunk eléni.

15 év alatt összesen 171 beteget veszítettünk el, 121 férfit és 50 nőt, ami 9,5%-os általános mortalitást jelent, és ha tekintetbe vesszük, hogy a mi anyagunkban a 32%-nyit kitevő, varixból vérző betegek is benne vannak, akkor ez a szám mindenképpen jóval az európai átlag alatt marad. Kétségtelen, hogy a férfiak mortalitása lényegesen nagyobb volt a nőkénel (11,4% vs. 6,8%), ami nyilvánvalóan adódik abból, hogy a krónikus alkoholos májbetegek túlnyomó többsége a férfiak közül került ki. Sebészetre 93 beteget kellett csak átadnunk, ami ha a betegszámot nézzük, 5,2%, ha viszont – és ebben az esetben ez a megfelelőbb -, a felvételi esetszámot, akkor csupán 4,6%. Az átadott betegek közül csupán 51 került műtőasztalra, ami esetekre számolva a vérzés miatt felvett betegeknek mindössze 2,53%-a volt. Ez rendkívül kedvező szám, főleg ha tekintetbe vesszük, hogy ebbe beletartoztak azok is, akiknél megelőző endoscopos beavatkozás (polypectomia, papillotomia etc.) utáni vérzés miatt került sor sebészi vérzéscsillapításra!

Ha a fekélyvérzésekre vonatkozó országos felmérés adatait elemezzük, akkor az általános újravérzési arány 9,8% volt, sebészeti ellátást pedig a betegek 5,6%-a igényelt, ezek az adatok hasonlóak közelmúltban napvilágot látott „real-life” nyugati adatbázisokban közöltekhez (270). A kórházi mortalitás 3,3%-os eredménye pedig jobb, mint a nagy kanadai RUGBE tanulmányban közölt 5,4%, ebben azonban valószínűleg szerepet játszik az is, hogy a kanadai beteganyagban csak a fekélyvérzők egy harmadában került sor endoscopos vérzéscsillapításra (271), míg a mi felmérésünkben a betegek több, mint 40 %-

ában megtörtént aktiv endoscopos vérzéscsillapítás. Kétségtelen, hogy az elmúlt években a vérző fekélyek endoscopos ellátásának a szemlélete valamelyest változott, az egyik legújabb meta-analysis szerint (272), a Forrest II.b. fekélyek esetén, ahol alvadék tapad a fekélyfészekben, csak akkor indokolt az aktiv endoscopos vérzéscsillapítás, ha az alvadék erős vizsugárral lemosható, ha azonban nem, nem indokolt az alvadék erőszakos eltávolítása. Másrészt az aktiv endoscopos ellátás akkor fontosabb, ha a betegnek súlyos társbetegségei vannak, ennek hiányában az aktiv vérzéseket leszámítva, elegendő lehet a protonpumpa inhibitor gyógyszer infúziós alkalmazása. A mi felmérésünkben egyébként az alacsonyabb esetszámú centrumokban a Forrest Ia, Ib, IIa típusú fekélyeknek csupán 68 %-ában történt meg a kívánatos endoscopos vérzéscsillapítás, ami szignifikánsan alacsonyabb volt a magas esetszámú centrumokban tapasztalt 86%-nál ($p=0,001$). Fontos megállapítás volt az is, hogy a nemzetközi ajánlásoktól eltérően még a magas esetszámú centrumokban is csak 34 %-ban alkalmazták kombináltan az endoscopos vérzéscsillapító eljárásokat (injekciós + termikus, vagy injekciós + clip, vagy termikus + clip.), holott a nemzetközi ajánlások ezt már évek óta előnyösebbnek tartják a monoterápiánál (273). Ennek azonban hazai viszonyok között az is oka lehet, hogy a finanszírozás hiánya miatt nem vállalkoznak a kisebb kórházak a költségesebb endoscopos vérzéscsillapítási eljárások (argon plazma koaguláció, haemoclip) beállítására és alkalmazására. Ennek is szerepe lehet azonban abban, hogy az általános mortalitás a magas esetszámú centrumokban elért 2,7%-al szemben az alacsony esetszámú centrumokban 4,3% volt ($p=0,023$), ez a szignifikáns különbség ismételten felhívja a figyelmet arra, hogy megfelelő méretű, aktivitású, esetszámú és természetesen felszereltségű, mindehhez elengedhetetlenül szükséges finanszírozású központok oldhatják meg hazánkban is a tápcsatornai vérzőbetegek nemzetközi standardoknak megfelelő ellátását.

VI. 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 pathogenesisében 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 endoscopos 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 az 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 cytoskeleton megőrzi strukturális integritását.

9. Az IBD-s szérumok olyan cytokin és gyulladásos adhézis 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 adhézis 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 egybevágóak 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, stenotizáló 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 polymorphismus és az MBL szint meghatározásával a májcirrhosisos 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.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

1. Wang XD, Deng XM, Haraldsen P et al. Antioxidant and calcium channel blockers counteract endothelial barrier injury induced by acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 30,1129-36,1995
2. Wang X, Sun Z, Borjesson A et al. Treatment with lexipafant ameliorates the severity of pancreatic microvascular endothelial barrier dysfunction in rats with acute hemorrhagic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 25,45-52,1999
3. Wang X, Sun Z, Börjesson A et al. Inhibition of platelet-activating factor, intercellular adhesion molecule 1 and platelet endothelial cell adhesion molecule 1 reduces experimental pancreatitis-associated gut endothelial barrier dysfunction. *Br J Surg* 86,411-16,1999
4. Cressey R, Wattananupong O, Lertprasestsuke N et al. Alteration of protein expression pattern of vascular endothelial growth factor (VEGF) from soluble to cell-associated isoform during tumorigenesis. *BMC Cancer* 5,128,2005
5. Danese S, Sans M, de la Motte C et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 130,2060-73,2006
6. Alkim C, Sakiz D, Alkim H et al. Thrombospondin-1 and VEGF in inflammatory bowel disease. *Lybian J Med* 7,2012 (epub)
7. Zak S, Treven J, Nash N et al. Lack of thrombospondin-1 increases angiogenesis in a model of chronic inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 23,297-304,2008
8. Rutella S, Vetrano S, Correale C et al. Enhanced platelet adhesion induces angiogenesis in intestinal inflammation and inflammatory bowel disease microvasculature. *J Cell Mol Med* 15,625-34,2011
9. Rafiee P, Stein DJ, Nelson VM et al. Thalidomide inhibits inflammatory and angiogenic activation of human intestinal microvascular endothelial cells (HIMEC). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298,G167-76,2010
10. Scaldaferri F, Vetrano S, Sans M et al. VEGF-A links angiogenesis and inflammation in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 136,585-95,2009
11. Handa O, Yoshida N, Fujita N et al. Molecular mechanisms involved in anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors. *Inflamm Res* 55,476-80,2006.

12. Rensen SS, Staats Y, Driessen A et al. Activation of the complement system in human nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 50,1809-17,2009
13. Higuchi Y, Nishikawa M, Kawakami S et al. Uptake characteristics of mannosylated and fucosylated bovine serum albumin in primary cultured rat sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *In J Pharm* 287,147-54,2004
14. Oroszlán M, Daha MR, Cervenak L et al. MBL and C1q compete for interaction with human endothelial cells. *Mol Immunol* 44,1150-58,2007
15. Kang HJ, Lee SM, Lee HH et al. Mannose-binding lectin without the aid of its associated serine proteases alters lipopolysaccharide-mediated cytokine/chemokine secretion from human endothelial cells. *Immunology*,122,335-42,2007
16. Szabó A, Laki J, Madsen HO et al. Early rise in serum VEGF and PDGF levels predisposes patients with a normal MBL2 genotype to restenosis after eversion endarterectomy. *Stroke*,38,2247-53,2007
17. Megyeri M, Makó V, Beinrohr L et al. Complement protease MASP-1 activates human endothelial cells: PAR4 activation is a link between complement and endothelial function. *J Immunol* 183,3409-16,2009
18. Charakida M, Donald AE, Leary S et al. Endothelial response to childhood infection: the role of mannose-binding lectin (MBL). *Atherosclerosis* 208,217-221,2010
19. Qiu Hy, Fan WX, Zuo C et al. Influence of mannose binding lectin to expression of TGF-beta1 and NF-kappaB in high concentration of glucose cultured human renal glomerular endothelial cells. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi, Xue Ban* 42,604-9,2011
20. Wu XH, Huang SM, Fan WX et al. Influence of high glucose and mannose binding lectin complement pathway activation to IL-6 and TNF-alpha's expression in human renal glomerular endothelial cells. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 42,90-94,2011
21. Alsaigh T, Pocock ES, Bergan JJ et al. Acute venous occlusion enhances matrix metalloprotease activity: implications on endothelial dysfunction. *Microvasc Res* 81,108-16,2011
22. Zanoni FL, Benabou S, Greco KV et al. Mesenteric microcirculatory dysfunctions and translocation of indigenous bacteria in a rat model of strangulated small bowel obstruction. *Clinics (Sao Paulo)* 64,911-919,2009

23. Dianzani C, Brucato L, Gallicchio M et al. Celecoxib modulates adhesion of HT29 colon cancer cells to vascular endothelial cells by inhibiting ICAM-1 and VCAM-1 expression. *Br J Pharmacol* 153,1153-61,2008
24. Shachor-Meyouhas Y, Pillar G, Shehadeh N. Incontrolled type 1 diabetes and endothelial dysfunction in adolescents. *Isr Med Assoc J* 9,637-40,2007
25. Dayan L, Levy AP, Blum S et al. Haptoglobin genotype and endothelial function in diabetes mellitus: a pilot study. *Eur J Appl Physiol* 106,639-44,2009
26. Park SJ, Baek SH, Oh MK et al. Enhancement of angiogenic and vasculogenic potential of endothelial progenitor cells by haptoglobin. *FEBS Lett* 583,3235-40,2009
27. Jacobs M, van Greevenbroek MM, van der Kallen CJ et al. The association between the metabolic syndrome and peripheral but not coronary artery disease is partly mediated by endothelial dysfunction: the CODAM study. *Eur J Clin Invest*, 41,167-175,2011
28. Feng Q, Tan HH, Ge ZZ et al. The potential pathogenesis of gastrointestinal vascular malformation and the potential mechanism of thalidomide in the treatment of gastrointestinal vascular malformation. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 51,385-9,2012
29. Chernoguz A, Crawford K, Vandersall A et al. Pretreatment with anti-VEGF therapy may exacerbate inflammation in experimental acute colitis. *J Pediatr Surg* 47,347-54,2012
30. Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood* 117,1071-80,2011
31. Deng X, Xiong X, Khomenko T et al. Inappropriate angiogenic response as a novel mechanism of duodenal ulceration and impaired healing. *Dig Dis Sci* 56,2792-801,2011
32. Deng X, Szabó S, Khomenko T et al. Novel pharmacologic approaches to the prevention and treatment of ulcerative colitis. *Curr Pharm Des* Aug 23,2012 (epub)
33. Szlachcic A, Krzysiek-Maczka G, Pajdo R et al. The Impact of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA), the Endogenous Nitric Oxide (NO) Synthase Inhibitor, to the Pathogenesis of Gastric Mucosal Damage. *Curr Pharm Des* Aug 23,2012 (epub)

34. Yu W, Lin Z, Kelly AA et al. Association of Nkx2-3 polymorphism with Crohn's disease and expression of Nkx2-3 is up-regulated in B cell lines and intestinal tissues with Crohn's disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 3,189-195,2009
35. Yu W, Hegarty JP, Berg A et al. NKX2-3 Transcriptional Regulation of Endothelin-10 and VEGF Signaling in Human Intestinal Microvascular Endothelial Cells. *PloS ONE* 6,e20454,2011
36. Nagy E, Eaton JW, Jeney V et al. Red cells, hemoglobin, heme, iron and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30,1347-53,2010
37. Arsian F, SAmets MB, Buttari B et al. Lack of haptoglobin results in unbalanced VEGF α /Angiopoietin-1 expression, intramural hemorrhage and impaired wound healing after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* Dec 26.2012 (epub)
38. Said Y, Hamzaoui L, El Jen K et al. Prevalence and risk factors of thromboembolic complications in inflammatory bowel disease. *Tunis Med* 89,924-8,2011
39. Maki AC, Matheson PJ, Shepherd JA et al. Intestinal microcirculatory flow alterations in necrotizing enterocolitis are improved by direct peritoneal resuscitation. *Am Surg* 78,803-807,2012
40. Kovacs T, Varga G, Erces D, et al. Dietary phosphatidylcholine supplementation attenuates inflammatory mucosal damage in a rat model of experimental colitis. *Shock*, 38,177-85,2012
41. Rupertus K, Senger S, Menger MD et al. Darbepoetin-alfa promotes neovascularization and cell proliferation in established colorectal liver metastases. *J Surg Res* 176,517-523,2012
42. Verbeke L, Nevens F, Laleman W. Bench-to-bedside review: acute-on-chronic liver failure – linking the gut, liver and systemic circulation. *Crit Care* 15,233,2011
43. Iwakiri Y. Endothelial dysfunction in the regulation of cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int* 32,199-213,2012
44. Zwolinska-Wcislo M, Brzozowski T, Ptak-Belowska A et al. Nitric oxide-releasing aspirin but not conventional aspirin improves healing of experimental colitis. *World J Gastroenterol* 17,4076-89,2011
45. Pawlik M, Pajdo R, Kwiecien S et al. Nitric oxide (NO)-releasing aspirin exhibits a potent esophagoprotection in experimental model of acute reflux oesophagitis. Role of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *J Physiol Pharmacol* 62,75-86,2011

46. Karádi O, Nagy Z, Bódis B, Mózsik G. Atropin-induced gastrointestinal cytoprotection dependences to the intact of vagal nerve against indomethacin-induced gastrointestinal mucosal and microvascular damage in rats. *J Physiol Paris* 95,29-33,2001
47. Wu BW, Li DF, Ke ZF et al. Expression characteristics of heparanase in colon carcinoma and its close relationship with cyclooxygenase-2 and angiogenesis. *Hepatogastroenterology*, 57,1510-14,2010
48. Rutella S, Fiorina G, Vetrano S et al. Infliximab therapy inhibits inflammation-induced angiogenesis in the mucosa of patients with Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 106,762-770,2011
49. Schinzari F, Armuzzi A, De Pascalis B et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonism improves endothelial dysfunction in patients with Crohn's disease. *Clin Pharmacol Ther* 83,70-76,2008
50. Kuiper P, Hawinkels LJ, de Jonge-Muller ES et al. Angiogenic markers endoglin and vascular endothelial growth factor in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World J Gastroenterol* 17,219-225,2011
51. Hanssen SJ, Lubbers T, Hodin CM et al. Hemolysis results in impaired intestinal microcirculation and intestinal epithelial cell injury. *World J Gastroenterol*, 17,213-18,2011
52. Liu N, Zhang LH, Du H et al. Overexpression of endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1) in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 17,2628-39,2010
53. Kösem M, Tuncer I, Kotan C et al. Significance of VEGF and microvascular density in gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 56,1236-40,2009
54. Del Piano M, Antonia Bianco M, Cipolletta L et al: The „Prometeo” Study: Online collection of clinical data and outcome of Italian patients with acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *J Clin Gastroenterol* 2012 Aug 23 epub
55. Stanley AJ: Update on risk scoring systems for patients with upper gastrointestinal haemorrhage. *World JU Gastroenterol* 18,2739-44,2012
56. Altorjay István, Palatka Károly, Vitális Zsuzsanna, Rejtő László, Györffy Árpád, Udvardy Miklós: Felső tápcsatornai vérzések korszerű ellátása erre specializált gastrointestinális részlegen. *Orv Hetil*, 139,2121-2126,1998
57. De Berardis G, Lucisano G, D'Ettorre A et al: Association of aspirin use with major bleeding in patients with and without diabetes. *JAMA*, 307,2286-94,2012

58. Laine L, Yang H, Chang SC, Datto C: Trends for incidence of hospitalization and death due to GI complications in the United States from 2001 to 2009. *Am J Gastroenterol* 107,1190-95, 2012
59. Wysocki JD, Srivastav S, Winstead NS. A nationwide analysis of risk factors for mortality and time to endoscopy in upper gastrointestinal haemorrhage. *Aliment Pharmacol Ther* 36, 30-36, 2012
60. Orloff MJ, Isenberg JI, Wheeler ET AL: Disability index in a randomized controlled trial of emergency sclerotherapy versus portocaval shunt for bleeding varices in cirrhosis. *Am J Surg* 204, 157-66, 2012
61. Casado Arroyo R, Polo-Tomas M, Roncales MP et al: Lower GI bleeding is more common than upper among patients on dual antiplatelet therapy: long-term follow-up of a cohort of patients commonly using PPI co-therapy. *Heart*, 98, 718-23, 2012
62. Alharbi A, Almadi M, Barkun A et al: Predictors of a variceal source among patients presenting with upper gastrointestinal bleeding. *Can J Gastroenterol*, 26, 187-92, 2012
63. Funakoshi N, Duny Y, Valats JC et al. Meta-analysis: beta-blockers versus banding ligation for primary prophylaxis of esophageal variceal bleeding. *Ann Hepatol* 11,369-83, 2012
64. Czymek R, Grossmann A, Roblick U et al. Surgical management of acute upper gastrointestinal bleeding: still a major challenge. *Hepatogastroenterology*, 59,768-773, 2012
65. Abdel-Khalek EE, El-Fakhry A, Helaly M et al. Systemic inflammatory response syndrome in patients with liver cirrhosis. *Arab J Gastroenterol* 12,173-177, 2011
66. Marti-Carvajal AJ, Karakitsiou DE, Salanti G. Human recombinant activated factor VII for upper gastrointestinal bleeding in patients with liver diseases. *Cochrane Database Syst Rev*, Mar 14; 3:CD004887, 2012
67. Hsu YC, Lin JT, Chen TT et al. Long-term risk of recurrent peptic ulcer bleeding in patients with liver cirrhosis: a 10-year nationwide cohort study. *Hepatology*, 56,698-705, 2012
68. Cerqueira RM, Andrade L, Correia MR et al. Risk factors for in-hospital mortality in cirrhotic patients with oesophageal variceal bleeding. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 24,551-557, 2012
69. Sood P, Kumar G, Nanchal R et al. Chronic kidney disease and end-stage renal disease predict higher risk of mortality in patients with primary upper gastrointestinal bleeding. *Am J Nephrol* 35,216-224, 2012

70. Yang JY, Lee TC, Montez-Rath ME et al. Trends in acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 23, 495-506, 2012
71. Gado AS, Ebeid BA, Abdeimohsen AM et al. Clinical outcome of acute upper gastrointestinal hemorrhage among patients admitted to a government hospital in Egypt. *Saudi J Gastroenterol* 18, 34-39, 2012
72. Ishikawa S, Inaba T, Muzuno M et al. Characteristics of serious complicated gastroduodenal ulcers in Japan. *Hepatogastroenterology*, 59, 147-154, 2012
73. Lee YC, Chang CH, Lin JW et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs use and risk of upper gastrointestinal adverse event in cirrhotic patients. *Liver Int* 32, 859-866, 2012
74. Dechene A, El Fouly AH, Bechmann LP et al. Acute management of refractory variceal bleeding in liver cirrhosis by self-expanding metal stents. *Digestion* 85, 185-191, 2012
75. Gaba RC, Omene BO, Podczerwinski ES et al. TIPS for treatment of variceal hemorrhage: clinical outcomes in 128 patients at a single institution over a 12 year period. *J Vasc Interv Radiol* 23, 227-235, 2012
76. Ge ZZ, Chen HM, Gao YJ et al. Efficacy of thalidomide for refractory gastrointestinal bleeding from vascular malformation. *Gastroenterology*, 141, 1629-37, 2011
77. Lupu A, Stefanescu C, Treton X et al. Bevacizumab as Rescue Treatment for Severe Recurrent Gastrointestinal Bleeding in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *J Clin Gastroenterol* Nov 15. 2012 (epub)
78. Grisham MB, Pavlick KP, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Wolf RE. Nitric oxide and chronic gut inflammation: controversies in inflammatory bowel disease. *J Invest Med* 2002;50:272-83.
79. Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflam bowel dis* 2003;9:179-89.
80. Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, et al. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Rad Biol Med* 2002;33:311-2.
81. Perner A, Rask-Madsen J. Review article: the potential role of nitric oxide in chronic inflammatory bowel disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;14:135-44.

82. Beck PL, Xavier R, Wong J, Ezedi I, Mashimo H, Mizoguchi A, et al. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:G137-47.
83. Brown JF, Kentes AC, Hanson PJ és mtsi. Nitric oxide generation and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Am J Physiol* 1993, 265:G418-22
84. Lippe IT, Holzer P. Participation of endothelium-derived nitric oxide but not prostacyclin in the gastric mucosal hyperaemia due to acid back-diffusion. *Br J Pharmacol* 1992, 708:708-14
85. Banick PD, Chen Q, Xia YA és mtsai: Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *J Cell Physiol* 1997, 172:12-24
86. Duvenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology* 1994, 107:1050-8
87. Baeuerle PA, Baltimore D, NF- κ B: Ten years after. *Cell* 1996;87:13-20
88. Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L Redox regulation of NF- κ B activation. *Free Radic Biol Med* 1997;22:1115-1126
89. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-2258
90. Vallance BA, Dijkstra G, Qiu B, van der Waaij LA, van Goor H, Jansen PL, et al. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial derived NOS maintains mucosal integrity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G867-74.
91. Cook JP. NO and angiogenesis. *Atherosclerosis* 2003; (Suppl. 4):53-60
92. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des* 2003; 9:521-530
93. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leucocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Rad Biol Med* 1998;25:404-33.
94. Kanwar S, Wallace JL, Befus D et al. Nitric oxide synthesis inhibition increases epithelial permeability via mast cells. *Am J Physiol* . 1994. 266:G222-9

95. Dijkstra G, Moshage H, van Dullemen HM, de Jager-Krikken A, Tiebosch AT, Kleibeuker JH, et al. Expression of nitric oxide synthase and formation of nitrotyrosine and reactive oxygen species in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 1998;186:461-71.
96. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM et al. DA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991;254:1001-3
97. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL at al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3030-4
98. Liu RH, Hotchkiss JH Potencial genotoxicity of chronically elevated nitric oxide : a review. *Mutat Res* 1995;339:73-89
99. Kurose I, Ebinuma H, Higuchi H at al. Nitric oxide mediates mitochondrial dysfunction in hepatoma cells induced by nonactivated Kupffer cells: evidence implicating ICAM-1-dependent process. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:S68-71
100. Middleton SJ, Shortouse M, Hunter JO Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993;341:465-6
101. Boughton-Smith NK, Evans SM, Hawkey CJ, Cole AT, Balsitis M, Whittle BJR, et al. Nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Lancet* 1993;342:338-40.
102. Rachmilewitz D, Stamler JS, Bachwich D, Karmeli F, Ackerman Z, Podolsky DK. Enhanced colonic nitric oxide generation and nitric oxide synthase activity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1995;36:718-23.
103. Lundberg JON, Hellström PM, Lundberg JM, Alving K. Greatly increased luminal nitric oxide in ulcerative colitis. *Lancet* 1994;344:1673-1674.
104. Ljung T, Herulf M, Beijer E et al. Rectal nitric oxide assessment in children with Crohn disease and ulcerative colitis; indicator of ileocaecal and colorectal affection. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:1073-1076
105. Perner A, Nordgaard I, Matzen P et al. Colonic production of nitric oxide gas in ulcerative colitis, collagenous colitis and uninflamed bowel. *Scan J Gastroenterol* 2002;37:183-188
106. Iwashita E, Greatly increased mucosal nitric oxide in ulcerative colitis determined in situ by a novel nitric oxide-selective microelectrode. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:391-95

107. Goggins MG, Shah SA, Goh J et al. Increased urinary nitrite, a marker of nitric oxide, in active inflammatory bowel disease. *Mediators Inflamm* 2001;10:69-73
108. Rachmilewitz D, Eliakim R, Ackerman Z, Karmeli F. Direct determination of colonic nitric oxide level: a sensitive marker of disease activity in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1998;93:409-12.
109. Rees DC, Satsangi J, Corenlissen PL et al. Are serum concentrations of nitric oxide metabolites useful for predicting the clinical outcome of severe ulcerative colitis? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:227-30
110. Guihot G, Guimbaud R, Bertrand V, Narcy-Lambare B, Couturier D, Duee P, Chaussade S, Blachier F. Inducible nitric oxide activity in colon biopsies from inflammatory areas: correlation with inflammation intensity in patients with ulcerative colitis but not with Crohn's disease. *Amino Acids* 2000; 18:229-237
111. Kimura H, Miura S, Shigematsu T, et al. Increased nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase activity in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1997;42:1047-54
112. Godkin AJ, De Balder AJ, Villa L, et al. Expression of nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1996;26:867-72
113. Leonard N, Bishop AE, Polak JM, et al. Expression of nitric oxide synthase in inflammatory bowel disease is not affected by corticosteroid treatment. *J Clin Pathol* 1998;51:750-3
114. Dijkstra G, Zandvoort AJ, Kobold AC, et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase in circulating monocytes from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:546-54
115. Vento P, Kiviluoto T, Jarvinen HJ, Soinila S. Changes in distribution of three isoforms of nitric oxide synthase in ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:180-189
116. Kolios G, Rooney N, Murphy CT et al. Expression of inducible nitric oxide synthase activity in human colon epithelial cells: modulation by T lymphocyte derived cytokines. *Gut* 1998;43:56-63
117. Kimura H, Hokari R, Miura S, et al. Increased expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Gut* 1998;42:180-7

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

129. Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, Gutterman DD. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: loss of nitric oxide-mediated vasodilatation. *Gastroenterol* 2003;125:58-69.
130. Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:244-58
131. Ray RM, McCormack SA, Johnson LR. Polyamine depletion arrests growth of IEC-6 and Caco-2 cells by different mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G37-43
132. Li L, Rao JN, Bass BL, et al. NF- κ B activation and susceptibility to apoptosis after polyamines depletion in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G992-1004
133. Zhang M, Caragine T, Wang H, et al. Spermine inhibits proinflammatory cytokine synthesis in human mononuclear cells: a counterregulatory mechanism that restrains the immune response. *J Exp Med* 1997;185:1759-68
134. Hasko G, Kuhel DG, Marton A, et al. Spermine differentially regulates the production of interleukin-12 p40 and interleukin-10 and suppresses the release of the T helper 1 cytokine interferon gamma. *Shock* 2000;14:144-9
135. Morris SM Jr, Bhamidipati D, Kepka-Lenhart D, Human type II. Arginase: sequence analysis and tissue-specific expression. *Gene* 1997;193:157-61
136. Kocna P, Fric P, Zavoral M, et al. Arginase activity determination: a marker of large bowel mucosa proliferation. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:619-23
137. Ricci G, Stabellini G, Bersani G, et al. Ornithine decarboxylase in colonic mucosa from patients with moderate or severe Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:903-4
138. Obayashi M, Matsui-Yuasa I, Matsumoto T, et al. Polyamine metabolism in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1992;87:736-40
139. Pillai RB, Tolia V, Rabah R, et al. Increased ornithine decarboxylase activity in inflammatory bowel disease in children. *Dig Dis Sci* 1999;44:1565-70
140. Raul F, Galluser M, Schleiffer R, et al. Beneficial effects of L-arginine on intestinal epithelial restitution after ischemic damage in rats. *Digestion* 1995;56:400-405

141. Akisu M, Ozmen D, Baka M, et al. Protective effect of dietary supplementation with L-arginin and L-carnitine on hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *Biol Neonate* 2002;81:260-265
142. Seven A, Seymen O, Inci F, et al. Evaluation of oxidative stress in experimental colitis: effects of L-arginine-nitric oxide pathway manipulation. *J Toxicol Environ Health* 2000;61:167-76
143. Boucher JL, Moali C, Tenu JP, et al. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginin utilization . *Cell Mol Life Sci* 1999;55:1015-28
144. Moali C, Boucher JL, Sari MA, et al. Substrate specificity of NO synthases: detailed comparison of L-arginin, homo-L-arginine, their N omega-hydroxy derivatives, and N omega-hydroxynor-L-arginine. *Biochemistry* 1998;37:10453-60
145. Sasaki M, Gharwani S, Jordan P, Elrod JW, Grisham MB, Jackson TH, Lefer DJ, Alexander JS. Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis. *Free Radical Biol Med* 2003; 35:1679-1687
146. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers CL, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S, Michel T. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Letters* 1992; 307:287-293
147. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufmann S, Watson CA, Pober JS. Regulation of nitric-oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical endothelial vein cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *J Clin Invest* 1994; 93:2236-2243
148. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE)-like and cystein protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 1997; 185:601-607
149. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997; 100:3131-3139 [PMID: 9399960]
150. Langlois MR, Delanghe JR: Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem.* 1996; 42:1589-600.

151. Wagner L, Gessl A, Parzer SB, Base W, Waldhausl W, Pasternack MS. Haptoglobin phenotyping by newly developed monoclonal antibodies. Demonstration of haptoglobin uptake into peripheral blood neutrophils and monocytes. *J Immunol.* 1996;156: 1989-96.
152. Theilgaard-Monch K, Jacobsen LC, Nielsen MJ, Rasmussen T, Udby L, Gharib M, Arkwright PD, Gombart AF, Calafat J, Moestrup SK, Porse BT, Borregaard N. Haptoglobin is synthesized during granulocyte differentiation, stored in specific granules, and released by neutrophils in response to activation. *Blood* 2006;108: 353-61.
153. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, Moestrup SK. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001;409: 198-201.
154. Langlois M, Delanghe J, Philippe J, Ouyang J, Bernard D, De Buyzere M, Van Nooten G, Leroux-Roels G. Distribution of lymphocyte subsets in bone marrow and peripheral blood is associated with haptoglobin type. Binding of haptoglobin to the B-cell lectin CD22. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1997;35: 199-205.
155. Arredouani M, Matthijs P, Van Hoeyveld E, Kasran A, Baumann H, Ceuppens JL, Stevens E. Haptoglobin directly affects T cells and suppresses T helper cell type 2 cytokine release. *Immunology* 2003;108: 144-51.
156. Carter K, Worwood M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol.* 2007;29: 92-110.
157. Russell PR, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. A novel mechanism of human disease. *JAMA* 2005; 293: 1653-1662.
158. Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Eaton JW, Balla G. Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res.* 2005;49: 1030-43.
159. Moestrup SK, Moller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med.* 2004;36: 347-54.
160. Zuwala-Jagiello J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease. *Acta Biochim Pol.* 2006;53: 257-68.

161. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem.* 2002;234-235: 249-63.
162. Zvi B, Levy AP. Haptoglobin phenotypes, which one is better and when? *Clin Lab.* 2006;52: 29-35.
163. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res.* 2004;94: 119-26.
164. Wassell J. Haptoglobin: function and polymorphism. *Clin Lab.* 2000;46: 547-52.
165. Bresalier RS, Byrd JC, Tessler D, Lebel J, Koomen J, Hawke D, Half E, Liu KF, Mazurek N; Great Lakes-New England Clinical and Epidemiology Center of the Early Detection Research Network. A circulating ligand for galectin-3 is a haptoglobin-related glycoprotein elevated in individuals with colon cancer. *Gastroenterology* 2004;127: 741-8.
166. Smeets MB, Pasterkamp G, Lim SK, Velema E, van Middelaar B, de Kleijn DP. Nitric oxide synthesis is involved in arterial haptoglobin expression after sustained flow changes. *FEBS Lett.* 2002;529: 221-4.
167. Yerbury JJ, Rybchyn MS, Easterbrook-Smith SB, Henriques C, Wilson MR. The acute phase protein haptoglobin is a mammalian extracellular chaperone with an action similar to clusterin. *Biochemistry* 2005;44: 10914-25.
168. Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schomig A, Kastrati A. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem.* 2002;48: 1377-82.
169. Okazaki T, Nagai T. Difference in hemoglobin-binding ability of polymers among haptoglobin phenotypes. *Clin Chem.* 1997;43: 2012-3.
170. Javid J. The effect of haptoglobin polymer size on hemoglobin binding capacity. *Vox Sang.* 1965; 10: 320-5.
171. Bamm VV, Tsemakhovich VA, Shaklai M, Shaklai N. Haptoglobin phenotypes differ in their ability to inhibit heme transfer from hemoglobin to LDL. *Biochemistry* 2004;43: 3899-906.
172. Asleh R, Guetta J, Kalet-Litman S, Miller-Lotan R, Levy AP. Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2005;96: 435-41.

173. Asleh R, Marsh S, Shilkrut M, Binah O, Guetta J, Lejbkowitz F, Enav B, Shehadeh N, Kanter Y, Lache O, Cohen O, Levy NS, Levy P. Genetically determined heterogeneity in haemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Cir Res.* 2003;92: 1193-1200.
174. Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy NS, Ricklis RM, Levy AP. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood* 2001;98: 3693-8.
175. Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick HE, Lee ET, Best L, Howard BV; Strong Heart Study. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The Strong Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40: 1984-90.
176. Asleh R, Levy AP. In vivo and in vitro studies establishing haptoglobin as a major susceptibility gene for diabetic vascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1: 19-28.
177. Levy AP, Moreno PR. Intraplaque hemorrhage. *Curr Mol Med.* 2006;6: 479-88.
178. Yang SE, Min WK, Park H, Chun S, Nah J, Kim JQ. Distribution of haptoglobin phenotypes in a Korean population, using the semi-automated PhastSystem. *Ann Clin Biochem.* 2000;37: 205-9.
179. Papp M, Lakatos PL; Hungarian IBD Study Group, Palatka K, Foldi I, Udvardy M, Harsfalvi J, Tornai I, Vitalis Z, Dinya T, Kovacs A, Molnar T, Demeter P, Papp J, Lakatos L, Altorjay I. Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease, disease behavior, and extraintestinal manifestations in Hungarian patients. *Dig Dis Sci.* 2007;52: 1279-84.
180. Tauszik T, Szabo L. Haptoglobin polymorphism in Hungary. *Gene Geogr.* 1992;6: 153-7.
181. Bottini N, Gloria-Bottini F, Amante A, Saccucci P, Bottini E. Genetic polymorphism and TH1/TH2 orientation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;138: 328-33.
182. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1989;170: 2-6.
183. Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, Von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Scholmerich J, Reinisch W; European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 2006;55: i1-15.

184. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis.* 2000;6: 8-15.
185. Carey E, Carey WD. Noninvasive tests for liver disease, fibrosis, and cirrhosis: Is liver biopsy obsolete? *Cleve Clin J Med.* 2010;77:519-27.
186. Escorsell A, Garcia-Pagán JC, Bosch J. Assessment of portal hypertension in humans. *Clin Liver Dis.* 2001;5:575-89.
187. Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: Child-Pugh versus MELD. *J Hepatol.* 2005;42:S100-7.
188. Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology* 2007;45:797–805.
189. Sheriff S, Chang CY, Ezekowitz RA. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple alpha-helical coiled-coil. *Nat Struct Biol.* 1994;1:789-794.
190. Weis WI, Drickamer K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure.* 1994;2:1227-1240.
191. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev.* 2009;230:9-21.
192. Shiratsuchi A, Watanabe I, Ju JS, Lee BL, Nakanishi Y. Bridging effect of recombinant human mannose-binding lectin in macrophage phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunology.* 2008;12:575-583.
193. Neth O, Jack DL, Johnson M, Klein NJ, Turner MW. Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol.* 2002;169:4430-4436.
194. Jack DL, Read RC, Tenner AJ, Frosch M, Turner MW, Klein NJ. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dis.* 2001;184:1152-1162.
195. Ip WK, Takahashi K, Moore KJ, Stuart LM, Ezekowitz RA. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *J Exp Med.* 2008;205:169-181.

196. Nonaka M, Ma BY, Ohtani M, Yamamoto A, Murata M, Totani K, Ito Y, Miwa K, Nogami W, Kawasaki N, Kawasaki T. Subcellular localization and physiological significance of intracellular mannan-binding protein. *J Biol Chem.* 2007;282:17908-20.
197. Larsen F, Madsen HO, Sim RB, Koch C, Garred P. Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. *J Biol Chem.* 2004;279:21302-11.
198. Thórarinsdóttir HK, Lúdvíksson BR, Víkingssdóttir T, Leópoldsdóttir MO, Ardal B, Jónsson T, Valdimarsson H, Arason GJ. Childhood levels of immunoglobulins and mannan-binding lectin in relation to infections and allergy. *Scand J Immunol.* 2005;61:466-474.
199. Vekemans M, Robinson J, Georgala A, Heymans C, Muanza F, Paesmans M, Klastersky J, Barette M, Meuleman N, Huet F, Calandra T, Costantini S, Ferrant A, Mathissen F, Axelsen M, Marchetti O, Aoun M. Low mannose-binding lectin concentration is associated with severe infection in patients with hematological cancer who are undergoing chemotherapy. *Clin Infect Dis.* 2007;44:1593-601.
200. Eisen DP, Dean MM, Thomas P, Marshall P, Gerns N, Heatley S, Quinn J, Minchinton RM, Lipman J. Low mannose-binding lectin function is associated with sepsis in adult patients. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;48:274-82.
201. Worthley DL, Johnson DF, Eisen DP, Dean MM, Heatley SL, Tung JP, Scott J, Padbury RT, Harley HA, Bardy PG, Angus PW, Mullighan CG. Donor mannose-binding lectin deficiency increases the likelihood of clinically significant infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis.* 2009;48:410-7.
202. Yuen MF, Lau CS, Lau YL, Wong WM, Cheng CC, Lai CL. Mannose binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic hepatitis B infection. *Hepatology.* 1999;29:1248-51.
203. Boniotto M, Braida L, Baldas V, Not T, Ventura A, Vatta S, Radillo O, Tedesco F, Percopo S, Montico M, Amoroso A, Crovella S. Evidence of a correlation between mannose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. *J Mol Med.* 2005;83:308-315.
204. Kaplan MM, Gershwin ME. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005;353:1261-1273.

205. Weismüller TJ, Wedemeyer J, Kubicka S, Strassburg CP, Manns MP. The challenges in primary sclerosing cholangitis--aetiopathogenesis, autoimmunity, management and malignancy. *J Hepatol* 2008;48 Suppl 1:S38-57.
206. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-938.
207. Papp M, Lakatos PL, Harsfalvi J, Farkas Gy, Palatka K, Udvardy M, Molnar T, Farkas K, Nagy F, Veres G, Lakatos I, Kovacs A, Dinya T, Kocsis KA, Papp J, the Hungarian IBD Study Group, Altorjay I. 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. *Human Immunology* 2010; 71: 407–413
208. Altorjay I. A nem varixeredetű felső tápcsatornai vérzések korszerű ellátásának irányelvei. *LAM* 2010;20:375–381.
209. Van Leerdam ME, Vreeburg EM, Rauws EA, et al. Acute upper GI bleeding: did anything change? *Am J Gastroenterol* 2003;98: 1494-9.
210. British Society of Gastroenterology Endoscopy Committee. Nonvariceal upper gastrointestinal haemorrhage: guidelines. *Gut* 2002;51(Suppl4):1-6.
211. Barkun AN, Bardou M, Marshall JK. Nonvariceal Upper GI Bleeding Consensus Conference Group. Consensus recommendations for managing patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Ann Intern Med* 2003;139:843-57.
212. Barkun AN, Bardou M, Kuipers EJ, et al. International consensus recommendations on the management of patients with nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Ann Intern Med* 2010;152:101-13.
213. Rockall TA, Logan RFA, Devlin HB: Selection of patients for early discharge or outpatient care after acute upper gastrointestinal haemorrhage. *Lancet*, 1996;347:1138-1140.
214. Green PH. The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology* 2005;128(4 Suppl 1): S74-8.

215. Banares R, Casado M, Rodriguez-Laiz JM et al. Urgent transjugular intrahepatic portosystemic shunt for control of acute variceal bleeding. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 75-79.
216. Pomier-Layrargues G. TIPS and hepatic encephalopathy. *Semin Liver Dis* 1996;16:315-320.
217. Rössle M, Siegerstettler V, Huber M et al. The first decade of the transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS): state of the art. *Liver* 1998;18:73-89.
218. Alvarez OA, Lopera GA, Patel V et al. Improvement of thrombocytopenia due to hypersplenism after transjugular intrahepatic portosystemic shunt placement in cirrhotic patients. *Am J Gastroenterol* 1996;91:134-137.
219. Papp M, Mezei G, Udvardy M, Altorjay I. Hematológiai és haemostasis paraméterek változása transjugularis intrahepatikus portosystemás shunt hatására. *Orv Hetil* 2003;144:1341-1345.
220. Udvardy M, Telek B, Mezey G, Batar P, Altorjay 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 prothetic aortic valve and two malignancies (chronic lymphoid leukemia and lung cancer). *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2004;15:265-267.
221. Merendino KA, Dillard DH. The concept of sphincter substitution by an interposed jejunal segment for anatomic and physiological abnormalities at the esophagogastric junction. *Ann Surg* 1955;142:486-506.
222. Altorjay Á, Kiss J, Paál B et al. The place of gastro-jejuno-duodenal interposition following limited esophageal resection. *Eur J Cardio-thoracic Surg* 2005;28:296-300.
223. Rácz I. Az akut gasztroduodenális vérző fekélyek diagnosztikája és ellátása. A stressz ulcus megelőzése. *LAM* 2004;14:19-25.
224. Rácz I, Kárász T, Lukács K et al. Management of Peptic Ulcer Bleeding in Different Case Volume Workplaces: Result of a Nationwide Inquiry in Hungary. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012; Article ID:956434
225. Cromer WE, Mathis JM, Granger DN et al. Role of the endothelium in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2011;17:578-593.
226. Haraldsen G, Rugtveit J, Kvale D et al. Isolation and longterm culture of human intestinal microvascular endothelial cells. *Gut* 1995; 37: 225-234

227. Binion DG, Rafiee P, Ramanujam KS et al. Deficient iNOS in inflammatory bowel disease intestinal microvascular endothelial cells results in increased leukocyte adhesion. *Free Radic Biol Med* 2000; **29**: 881-888
228. Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, Gutterman DD. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: Loss of nitric oxide-mediated vasodilation. *Gastroenterology* 2003; **125**: 58-69
229. Sasaki M, Bharwani S, Jordan P et al. Increased disease activity in eNOS-deficient mice in experimental colitis. *Free Radic Biol Med* 2003; **35**: 1679-1687.
230. Palatka K, Serfozo Z, Veréb Z et al. Effect of IBD sera on expression of inducible and endothelial nitric oxide synthase in human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 1730-1738.
231. Scaldaferri F, Lancellotti S, Pizzoferrato M, De Cristofaro R. Haemostatic system in inflammatory bowel diseases: New players in gut inflammation. *World J Gastroenterol* 2011; **17**: 594-608.
232. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, Wajda A. The incidence of deep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Thromb Haemost* 2001; **85**: 430-434
233. Spina L, Saibeni S, Battaglioli T, Peyvandi F, de Franchis R, Vecchi M. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: role of inherited thrombophilia. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 2036-2041
234. Ilonczai P, Tóth J, Tóth L et al. Catheter-directed thrombolysis in inflammatory bowel diseases: Report of a case. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 4791-4793
235. Thompson NP, Wakefield AJ, Pounder RE. Inherited disorders of coagulation appear to protect against inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; **108**: 1011-1015
236. Palatka K, Serfőző Z, Veréb Z, Hargitay Z, Lontay B et al. 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
237. Altorjay I, Veréb Z, Serfőző Z et al. Anti-TNF- α antibody (infliximab) therapy supports the recovery of eNOS and VEGFR2 protein expression in endothelial cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011; **24**: 323-335.

238. Aoki CA, Bowlus CL, Gershwin ME. The immunobiology of primary sclerosing cholangitis. *Autoimmun Rev.* 2005;4: 137-43.
239. Cameron RG, Blendis LM, Neuman MG. Accumulation of macrophages in primary sclerosing cholangitis. *Clin Biochem.* 2001;34: 195-201.
240. Wasserzug O, Blum S, Klement E, Lejbkowitz F, Miller-Lotan R, Levy AP. Haptoglobin 1-1 genotype and the risk of life-threatening *Streptococcus* infection: evolutionary implications. *J Infect.* 2007;54: 410.
241. Jepsen P, Vilstrup H, Andersen PK, Lash TL, Sørensen HT. Comorbidity and survival of Danish cirrhosis patients: a nationwide population-based cohort study. *Hepatology* 2008;48: 214-220.
242. Garcia-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835-1841.
243. Albillos A, de la Hera A, González M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, Alvarez-Mon M. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208-217.
244. Vitalis Zs, Altorjay I, Tornai I, Palatka K, Kacska S et al. Phenotypic polymorphism of haptoglobin: A novel risk factor for the development of infection in liver cirrhosis. *Human Immunology* 2011;72:348-354.
245. Bowman BH, Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and point mutation. *Adv Hum Genet* 1982;12:189-261.
246. Saeed SA, Ahmad N, Ahmed S. Dual inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase by human haptoglobin: its polymorphism and relation to hemoglobin binding. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 353:915-20.
247. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008;180:5771-5777.
248. Elg SA, Carson LF, Fowler JM, Twiggs LB, Moradi MM, Ramakrishnan S. Ascites levels of haptoglobin in patients with ovarian cancer. *Cancer* 1993;71: 3938-41.
249. Yang F, Friedrichs WE, Navarajo-Ashbaugh AL, deGraffenried LA, Bowman BH, Coalson JJ. Cell type-specific and inflammatory-induced expression of haptoglobin gene in lung. *Lab Invest* 1995;73:433-40.
250. Norman K, Pirlich M. Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:613-619.

251. van Rijn HJ, van der Wilt W, Stroes JW, Schrijver J. Is the turbidimetric immunoassay of haptoglobin phenotype-dependent? Clin Biochem. 1987;20:245-8.
252. Nielsen SS, Grøfte T, Tygstrup N, Vilstrup H. Synthesis of acute phase proteins in rats with cirrhosis exposed to lipopolysaccharide. Comp Hepatol. 2006;5:3.
253. Ang IL, Poon TC, Lai PB, Chan AT, Ngai SM, Hui AY, Johnson PJ, Sung JJ. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. J Proteome Res. 2006;5:2691-700.
254. Altorjay I, Vitalis Zs, Tornai I, Palatka K, Kacska S et al. 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.
255. Thiel S, Møller-Kristensen M, Jensen L, Jensenius JC. Assays for the functional activity of the mannan-binding lectin pathway of complement activation. Immunobiology 2002;205:446-454.
256. Matsushita M, Miyakawa H, Tanaka A, Hijikata M, Kikuchi K, Fujikawa H, et al. Single nucleotide polymorphisms of the mannose-binding lectin are associated with susceptibility to primary biliary cirrhosis. J Autoimmun 2001;17:251-257.
257. Kilpatrick DC, Delahooke TE, Koch C, Turner ML, Hayes PC. Mannan-binding lectin and hepatitis C infection. Clin Exp Immunol 2003;132:92-95.
258. Alves Pedroso ML, Boldt AB, Pereira-Ferrari L, Steffensen R, Strauss E, Jensenius JC, et al. Mannan-binding lectin MBL2 gene polymorphism in chronic hepatitis C: association with the severity of liver fibrosis and response to interferon therapy. Clin Exp Immunol 2008;152:58-264.
259. Brown KS, Keogh MJ, Tagiuri N, Grainge MJ, Presanis JS, Ryder SD, et al. Severe fibrosis in hepatitis C virus-infected patients is associated with increased activity of the mannan-binding lectin (MBL)/MBL-associated serine protease 1 (MASP-1) complex. Clin Exp Immunol 2007;147:90-98.

260. Borzio M, Salerno F, Piantoni L, Cazzaniga M, Angeli P, Bissoli F, Boccia S, Colloredo-Mels G, Corigliano P, Fornaciari G, Marengo G, Pistarà R, Salvagnini M, Sangiovanni A. Bacterial infection in patients with advanced cirrhosis: a multicentre prospective study. *Dig Liver Dis* 2001;33:41-8.
261. Chong WP, To YF, Ip WK, Yuen MF, Poon TP et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005;42:1037-1045.
262. Frakking FN, van de Wetering MD, Brouwer N, Dolman KM, Geissler J, Lemkes B, et al. The role of mannose-binding lectin (MBL) in paediatric oncology patients with febrile neutropenia. *Eur J Cancer* 2006;42:909-916
263. Perez-Castellano M, Peñaranda M, Payeras A, Milà J, Riera M, Vidal J, et al. Mannosebinding lectin does not act as an acute-phase reactant in adults with community-acquired pneumococcal pneumonia. *Clin Exp Immunol* 2006;145:228-234.
264. Dean M, Minchinton RM, Heatley S, Eisen DP. Mannose binding lectin acute phase activity in patients with severe infection. *J Clin Immunol* 2005;25:346-352.
265. Seyfarth J, Garred P, Madsen HO. Extra-hepatic transcription of the human mannosebinding lectin gene (mbl2) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. *Mol Immunol* 2006;43:962-971
266. Milanese M, Segat L, Marziliano, Crovella S. The expression of innate immunity genes in Italian Crohn disease patients. *Eur J Histochem* 2007;51:199-202.
267. Downing I, Koch C, Kilpatrick DC. Immature dendritic cells possess a sugar-sensitive receptor for human mannan-binding lectin. *Immunology* 2003;109:360-364.
268. Kelly P, Jack DL, Naeem A, Mandanda B, Pollok RC, Klein NJ, et al. Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. *Gastroenterology* 2000;119:1236-1242.
269. Udvardy M, Palatka K, Tornai I, Altorjay I: Antitrombotikus kezelés heveny felső gastrointestinalis vérzés esetén. *Orv Hetil* 2002;143:183-187
270. Vreeburg E, Snel P, de Bruijne J et al. Acute upper gastrointestinal bleeding in the Amsterdam area: Incidence, diagnosis, and clinical outcome. *Am J Gastroenterol* 1997; 92:236-243

271. Barkun A, Sabbah S, Enns R et al. The Canadian Registry on Nonvariceal Upper Gastrointestinal Bleeding and Endoscopy (RUGBE): endoscopic hemostasis and proton pump inhibition are associated with improved outcomes in a real-life setting. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1238-1246
272. Laine L, McQuaid KR: Endoscopic therapy for bleeding ulcers: an evidence-based approach based on meta-analyses of randomized controlled trials. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:33-47
273. Marmo R, Rotondano G, Piscopo R et al. Dual therapy versus monotherapy in the endoscopic treatment of high-risk bleeding ulcers: a meta-analysis of controlled trials. *Am J Gastroenterol* 2007;102:279-289

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 hipertensio 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 nyelőcsővarix-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., Osztoivits, 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.**Altörjay 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. Rácz, István., Lukács, Krisztina., Rácz, Ferenc., Kersák, János., Wacha, Judit., Szalóki, Tibor., Szász, Magdolna., Gyenes, István., Kárász, Tibor., **Altörjay, 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, **Altörjay 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

A értekezéshez kapcsolódó, nemzetközi folyóiratokban megjelent idézhető absztraktok:

Altörjay I, Palatka K, Huszka M, Györffy Á., Udvardy M: Urine nitrate level as marker of activity in inflammatory diseases. Gut, 1997, 41: A118

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

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

Altörjay I, Palatka K, Vitalis Zs., Györffy Á., Udvardy M: Predictive value of a risk-score system for the outcome of patients with upper gastrointestinal bleeding. Z Gastroenterology, 1998, 36, 415-156

Palatka K. Szerző Z., **Altörjay I.**, Varga V., Udvardy M: Altered nitric-oxide synthase activities in intestinal inflammatory disease. Immunology letters, 1999, 69:166

Palatka K, Szerző Z, Veréb Z, **Altörjay I.**, Hargita Z, Nemes Z, Udvardy M: Immunohistochemical studies on endothelial nitric oxide synthase activity in IBD colonic mucosa: Gut, 2001, 49: A1632

Palatka K, Szerző Z, Veréb Z, Hargitay Z, Nemes Z. **Altörjay I**: Crohn's serum changes the 2NOS/iNOS level in cultured human endothelial cells. Z Gastroenterology, 2002. 40:350.

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

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

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

Palatka K., Veréb Z, Serfőző Z, Erdődi F, Lontay B, **Altörjay I**: Crohn's serum decrease the eNOS protein level in endothelial cell culture. Gut, 2003, S2. A156

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

Palatka K., Papp. M, Udvardy M, **Altörjay I**: Assessment of routine laboratory and clinical data for activity of Crohn's disease in correlation with myeloperoxidase and matrix metalloproteinase activity. Gut, 2004, 53, S 4

Papp M, Udvardy M, Palatka K, **Altörjay I.**: Inflammation and aggressive proteolytic enzymes: myeloperoxidase and matrix metalloproteinase-9 - do they play a role in acute variceal bleeding? GUT, 2004 53:(Suppl I) p. A259.

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

Papp M, Palatka K, Foldi I, Udvardy M, Harsfalvi J, Tornai I, Vitalis Z, Dinya T, Kovacs A, Molnar T, Demeter P, Papp J, Lakatos L, Lakatos PL, **Altörjay I**. Haptoglobin polymorphisms are associated with Crohn's disease; disease behaviour and extraintestinal manifestations in Hungarian patients. GUT 55:(SUPPL IV) p. A113. (2006)

Papp M, Lakatos PL, Udvardy M, Foldi I, Harsfalvi J, Balogh I, **Altörjay I**, Dinya T, Habior A, Szalay F, Tornai I: Haptoglobin and myeloperoxidase promoter polymorphism in primary biliary cirrhosis. Falk Symposia 155 – 157, 2006 október (378).

Z Vitalis, I Tornai, **I Altörjay**, K Palatka, S Kacska, E Palyu, M Udvardy, J Harsfalvi, T Dinya, PL Lakatos, M Papp. Haptoglobin polymorphism: a novel genetic risk factor for the development of infection in liver cirrhosis. GUT 58:(SUPPL III) p. A357. (2009)

M Papp, PL Lakatos, K Palatka, J Harsfalvi, T Szamosi, L Lakatos, A Kovacs, T Molnar, K Farkas, J Papp, G Veres, Hungarian IBD Study Group, **I Altörjay**. MBL level and deficiency is not associated with either Crohn`s disease or ulcerative colitis; disease phenotype; CRP; serology profile and NOD2/CARD15 genotype in a large Hungarian IBD cohort; but was associated to the lack of TLR4 variants in CD. GASTROENTEROLOGY 136:(SUPPL I) p. T1722. (2009)

M Papp, Z Vitalis, I Tornai, K Palatka, S Kacska, M Udvardy, J Harsfalvi, T Dinya, P Orosz, B Lombay Jr, G Par, A Par, F Szalay, A Csepregi, PL Lakatos, **I Altörjay**. Mannan-binding lectin deficiency confers risk for infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis. GUT 58:(SUPPL III) p. A357. (2009)

Papp M, Vitalis Zs, Tornai I, Palatka K, Udvardy M, Harsfalvi J, Dinya T, Orosz P, Lombay B, Par G, Par A, Osztovits J, Szalay F, Csepregi A, Lakatos PL, **Altörjay I**. Mannose-binding lectin deficiency confers risk for bacterial infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis. GASTROENTEROLOGY 138:(5) p. S794. (2010)

I Foldi, G Farkas, **I Altörjay**, M Udvardy, E Nemes, J Harsfalvi, T Dinya, G Veres, PL Lakatos, IR Korponay-Szabo, M Papp. Mannose-binding lectin deficiency is a protective factors in the development of celiac disease and associated with its clinical manifestations. GUT 59:(suppl III) p. A395. (2010)

VIII. ÖSSZESÍTETT SCIENTOMETRIAI ADATOK:

Összes:

Kandidatúra után:

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 rigolyait 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.