

A gasztrointesztinális rendszer nyálkahártyája testünk legnagyobb külvilággal érintkező szemipermeabilis felülete, amelyen keresztül folyamatos anyagátáramlás zajlik. Ennek az érzékeny rendszernek az épsége és megfelelő működése döntő jelentőségű a tápcsatornában lévő és a szervezetünkre káros hatást gyakorló anyagok és kórokozók kizárásában. Ugyanakkor a bélfalban található immunrendszerünk kiemelten fontos része, amely a bélnyálkahártyán át beáramló anyagokkal kölcsönhatásba lépve különféle immunreakciókat eredményezhet. Számos gasztrointesztinális és szisztémás betegség hátterében áll kóroki tényezőként vagy jelentkezik kísérő szövődményként a bélcsonna nyálkahártyájának megváltozott permeabilitása (M. Crohn, cöliákia, emésztőenzim-hiány, ételallergiák, ekcéma). Egyes noxák eredményeként ugyancsak károsodik a bélnyálkahártya integritása, amely következtében áteresztőképessége fokozódhat (citosztatikum kezelés, nem-szteroid gyulladáscsökkentők, sepsis). Mindezek alapján a bélnyálkahártya permeabilitásának vizsgálata nagy jelentőségűnek tűnik a mindennapi klinikai gyakorlatban is. A bélpermeabilitás pontos mérése azonban nehéz feladat. Számos metodika lelhető fel a szakirodalomban, de rutinszerű elterjedésükre, a technikai nehézségek vagy a rossz méréspontosság miatt nem került sor. Rontják a vizsgálatok korrekt értékelhetőségét a bélpermeabilitást egészséges egyéneknél is befolyásoló, szinte kiküszöbölhetetlen tényezők is, mint pl az oro-coecal tranzit idő változása, illetve az egyes mérési technikákban fontos szerepet játszó vesefunkció, hidráltsági állapot. Ennek ellenére a mérési technikák egy része alkalmasnak bizonyult reprodukálható eredményeket adó vizsgálatokra, így meghonosodtak a kutatási célokat szolgáló laboratóriumokban. Példa erre a passzív transzport transzcellularis és paracellularis útjait párhuzamosan vizsgáló laktulóz-mannitol teszt, amely kivitelezése viszonylag egyszerű, de az eredmények nagy szórásúak, sőt egyes közlemények azonos vizsgálati feltételek mellett is ellentmondó következtetésekre jutnak. A bélpermeabilitás mérésének fontossága és nehézsége adta kihívás jelentette a pályázat alapját.

A pályázat kutatási tervében a fő célkitűzés a laktulóz-mannitol teszt metodikájának beállítása és a bélpermeabilitás mérés széleskörű alkalmazhatóságának megteremtése volt a klinikai gyakorlatban. Ennek feltételének tekintettük a mérések megbízható reprodukálhatóságának bizonyítását és a mérés technikát befolyásoló tényezők feltárását, majd lehetőség szerinti kiküszöbölését. A módszer beállítását követően terveztük a közleményekből ismert, legtöbbet vizsgált kórképek esetén a mérések elvégzését és az eredmények összevetését a korábban közölt adatokkal. Tovább lépésként a bélpermeabilitás változásával járó egyéb kórképekben végezzük a vizsgálatokat a betegségek lefolyásával, illetve a noxa erősségével összehasonlítva az eredményeket. A humán bélpermeabilitás vizsgálatok megkezdéséhez szükséges technikai feltételek teljesüléséig a korábban megkezdett állatkísérletes vizsgálatokat folytattuk és a bélpermeabilitás változásával járó kórképek súlyosságát, illetve lefolyását befolyásoló egyéb tényezők kutatását végeztük. Ezen vizsgálatok adatai a későbbi permeabilitás vizsgálatok eredményeivel vethetők össze. A kivitelezett vizsgálatok ennek megfelelően három csoportba sorolhatók: 1. állatkísérletes vizsgálatok, 2. a bélpermeabilitás változásával járó kórképek súlyosságát befolyásoló egyéb tényezők vizsgálata betegeknél, 3. bélpermeabilitás mérés laktulóz-mannitol tesztel.

1. Állatkísérletek során vizsgáltuk a gasztrikus nyálkahártya transzport mechanizmusában szerepet játszó transzmembrán víz-csatorna molekulák, az aquaporinok (AQP) szintjének változását agresszív faktor okozta nyálkahártya károsodás és ödéma esetén. Az eredmények szerint mind az AQP1, mind az AQP4 subtípus mennyisége jelentősen emelkedett az ATP tartalom csökkenésével párhuzamosan a nyálkahártyában, ami szerepet játszhat a nyálkahártya integritásának megőrzését segítő ozmotikus reguláló mechanizmusokban, a lokális ödéma kialakulásában (Acta Physiol.Hung.89:269,2002).

Állatkísérletben vizsgáltuk a n. vagus paraszimpatikus rostjainak szerepét az agresszív faktor okozta gasztrointesztinális nyálkahártya permeabilitás növekedésben. Vizsgálatainkat

CFY törzsű, 190-210 gr tömegű, mindkétnemű patkányokon végeztük, amelyek a vizsgálatok előtt 24 óra hosszat éheztek, de folyadékot korlátozás nélkül fogyaszthattak. Agresszív faktorként sc. adott indomethacin alkalmaztunk. A gasztrointesztinális mukóza kapilláris permeabilitásának mérésére az állatok leölésük előtt 15 perccel intravénásan steril festéket (100 g/tskg Evans kék) kapnak. A jelzőanyag jellegzetessége, hogy a keringésben a szérumfehérjékhez kötődik és a permeabilitás megnövekedésének helyén kilép a keringésből a szövetekbe, illetve a bélumenbe. A mintákból feltárást követően spektrofotometriás módszerrel visszamérhető, majd a vizsgált anyag festék koncentrációja meghatározható. Eredményeink igazolták, hogy az atropinnal végzett „kémiai vagotómia” jelentősen csökkentette a bélrendszerben az indomethacin okozta nyálkahártya permeabilitás növekedést, amely bizonyította a paraszimpatikus innerváció szerepét a nyálkahártya károsodásának mechanizmusában (Z. Gastroenterol. 40:340, 2002; Magyar Belorvosi Archívum 57(S1):73, 2004; Z. Gastroenterol. 43:241, 2005).

Folytatva vizsgálatainkat kerestük, hogy a fenti eredmény háttérben milyen mechanizmusok játszhatnak szerepet. Tekintettel arra, hogy a később tervezett bélpermeabilitásméréseket a fenti modellben az atropin bélmotilitást csökkentő, így oro-coecal tranzit időt növelő hatása befolyásolhatja elvégeztük az atropin dózisfüggő hatásának vizsgálatát a gyomorürülésre patkányban. Kísérletünkben megállapítottuk az atropin gyomorürülést csökkentő hatásának ED50 értékét, amely alapján a későbbiekben tervezett vizsgálatokban az alkalmazott dózisokat kiszámolhatjuk (Z. Gastroenterol. 43:243, 2005).

Vizsgálatuk továbbá a teljes n. vagus innerváció kiesésének következményeit az indomethacin okozta bélpermeabilitás növekedésre patkányban. A fenti kísérleti körülmények között kétoldali sebési vagotómiát követően adtuk az agresszív faktort. Eredményeinkben a sebési vagotómia szignifikánsan tovább fokozta az indomethacin okozta permeabilitás növekedést a gasztrointesztinális rendszerben patkányban, ami az ép n. vagus innerváció preventív szerepét igazolta a nyálkahártya integritásának megőrzésében (Magyar Belorvosi Archívum 56(S2):64, 2003).

Állatkísérletekben próbáltuk a laktulóz-mannitol tesztet alkalmazni a bélpermeabilitás mérésre, azonban patkányokon a hosszas vizeletgyűjtést megoldani nem sikerült, a vérből a tesztanyagok a beállított módszerrel nem kimutathatóak, így értékelhető eredmény nem született.

2. A bélpermeabilitás változásával kísért kórképek súlyosságát, illetve lefolyásukat számos tényező befolyásolhatja, amelyek közül több közvetlen összefüggésben is állhat a bélnyálkahártya átjárhatóságával. Az érintett betegségek közül vizsgálatokat végeztünk a vasszívódás és -tárolás rendellenességeivel járó haemochromatosis és a jelentős bélpermeabilitásváltozással kísért Crohn betegség esetében. Vizsgáltuk továbbá a transzport mechanizmusokban szerepet játszó víz-csatorna molekulák elrendeződését egyes emésztőszervi kórképekben.

Az állatkísérletes eredményeket követően humán gyomornyálkahártya mintán vizsgálatuk az aquaporin víz-csatorna molekulák (AQP) eloszlását gyomorbetegségek esetén. Az egészséges mintákban az AQP1 a kapillárisokon, míg az AQP4 a parietalis sejteken expresszálódott. Savfüggő gyulladáshoz kísért kórképek (erozív gastritis, peptikus fekély) esetén erős AQP1 tartalmat észleltünk a gyulladáshoz kísért immunsejteken, míg gyomorfekély esetén nem volt AQP4 detektálható a parietalis sejteken. Gyomortumor esetén változó képet kaptunk, egyes atípusos sejteknél észleltünk AQP4 expressziót, míg más esetben nem. Az AQP1 eloszlása nem változott. Eredményeink alapján a különböző gyomorbetegségek esetén különböző az AQP1 és az AQP4 eloszlásának mintázata (Z. Gastroenterol. 41:431, 2003).

Vizsgálatuk az aquaporin (AQP) két subtípusának (AQP1 és 4) eloszlást különböző duodenum betegségekben is. Eredményeinkben az egészséges nyombél nyálkahártyában AQP1 expresszió volt észlelhető a kapillárisokon, amely jelentősen erősebben jelentkezett

duodenitis és nyombélfekély esetén. AQP4 nem volt detektálható a fekélyes esetekben. Totál bélboholy atrófia esetén fokozott AQP4 expresszió volt látható a nyálkahártya felszínén (Z. Gastroenterol. 42:406, 2004).

A Crohn betegség súlyosságát eddigi adatok szerint a NOD2/CARD15 gén egyes mutációi fokozzák. Ugyanakkor feltételezhető, hogy az IBD aktivitása és a bélpermeabilitás növekedés kapcsolatban állnak egymással. Klinikánk beteganyagában megvizsgáltuk a NOD2/CARD15 gén három, leggyakoribb mutációjának előfordulását és szerepüket a Crohn betegség kialakulásában. Megállapítottuk, hogy az Arg702Trp és a Leu1007fsinsC mutációk hordozása a magyar betegekben is összefüggésbe hozhatók a Crohn betegség kialakulásával, míg a Gly908Arg mutációról ez nem igazolódott (Magyar Belorvosi Archívum 57(S1):97, 2004; Autoimmunity Review 3(S2):73, 2004; Z. Gastroenterol. 42:428, 2004; Ann.N.y.Acad.Sci. 1051:45-51, 2005). A génmutációt hordozó és nem hordozó betegek bélpermeabilitás vizsgálata és azok összehasonlítása folyamatban van.

Irodalmi adatok utaltak arra, hogy a gyulladással járó bélbetegségek előfordulása összefüggésben állhat egyes genetikailag determinált thrombophylia hajlammal, mint az V faktor 1691G-A, másnéven Leiden mutáció előfordulásával. Vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy a Leiden mutáció a colitis ulcerosában szenvedő betegekben magasabb csak szignifikánsan az egészséges populációhoz képest, a Crohn betegekben nem, így ennek további összehasonlítását a bélpermeabilitás növekedéssel nem végeztük (Orvosi Hetilap 143:447-450, 2002; Z. Gastroenterol. 41:449, 2003).

Több intézet beteganyagában vizsgáltuk kooperáció keretében a vasszűrődés zavarával járó haemochromatosis (HFE) előfordulását a magyar populációban és kapcsolatát különböző betegségekkel (Gastroenterology 122(S1):A308, 2002; Liver International 24:16-20, 2004). Ennek keretében kiszűrtünk számos, fokozott vasszűrődéssel járó haemochromatosisban szenvedő beteget, akik bélpermeabilitás vizsgálata és az eredményeik összehasonlítása a normál populáció eredményeivel folyamatban van.

3. A kutatási tervben megfogalmazott fő célkitűzésünknek a humán bélpermeabilitás vizsgálatok bevezetését tekintettük. Az ehhez szükséges eszközök (HPLC detektor, HPLC oszlopok, a softvert futtató számítógépes háttér) beszerzése az árnövekedés és a közbejött pályázati összeg csökkentés miatt elhúzódott, így érdemi vizsgálatok megkezdésére csupán az utolsó évben nyílt lehetőségünk. Elsődleges feladatunk a laktulóz-mannitol teszt metodikájának beállítása volt, amely kivitelezési eljárását több közölt technikai leírás közül választottuk ki. 6 órája ételt-italt nem fogyasztott pácienseknek adtunk vízzel isoosmolarisra hígított 10 gr lactulose-t és 1 gr mannitolt. 1 óra további éhezést követően folyadék és könnyű diéta fogyasztását megengedtük. A tesztanyagok beadását követően 6 óra hosszat gyűjtötték vizeletüket, amelyből az ürített laktulóz és mannitol hányadosát határoztuk meg és dolgoztuk fel statisztikai analízissel. A rendelkezésünkre álló irodalmi adatokban a HPLC mérés beállításának, illetve a vizelet minták előkészítésének részleteire nem tértek ki a szerzők. Ezeket a mérés-technikai problémákat magunknak kellett megoldani, ami közel fél év és számtalan minta- olykor végeredményben téves eredményt adó – feldolgozása árán sikerült. A metodika beállítását követően a Crohn betegek mintáit mértük le, akik fokozott bélpermeabilitás eredményei a nemzetközi irodalomban közölt adatokkal jól egybevágtak. A vizsgálatok kivitelezése során azonban felmerült, hogy a bélpermeabilitás mérés alkalmazott metodikája számos endogén tényezőtől is függhet, amelyek kiküszöbölése esetén a várható eredmények pontosíthatók. Ilyen tényezőnek véltük az életkor és a nem mellett a különböző szomatometriai adatokat (testmagasság, -súly, -felszín, body-mass index), a vesefunkciót (kreatinin-clearance), illetve a bélmotilitást reprezentáló oro-coecal tranzit időt. Vizsgáltuk ezen paraméterek összefüggését a laktulóz-mannitol teszttel mért bélpermeabilitás adatokkal. Eredményeink alapján egyértelmű korrelációt igazoltunk a testsúly, a testfelszín és a BMI valamint a bélpermeabilitás mérési adatok között (Magyar Belorvosi Archívum 2:92, 2006;

Achievements in Research and Clinical Practice Abstract book, 2007). A többi paraméter vizsgálata és az esetszámok növelése folyamatban van. A fenti adatok regisztrálásával kiegészítve ismételten megkezdjük a munkatervünkben megcélzott betegcsoportok mintáinak összegyűjtését, így a citosztatikus és nem-szteroid fájdalomcsillapító kezelés alatt állók, a Crohn betegek, a cöliákiások, az egyéb ételallergiások és ekcémások vizsgálatát végezzük.

A kutatási terv fő célkitűzéseinek megvalósítása a pályázat ideje alatt nem került befejezésre. Az érdemi munka csupán az utolsó évben indulhatott, így a nagyobb számú új eredmény és azok közzlése csak a következő években várhatók.