

# **ZÁRÓJELENTÉS „A GABA, GLUTAMÁT, ÉS NITROGÉN MONOXID TARTALMÚ MYENTERICUS NEURONOK TÉRBELI MINTÁZATÁNAK ONTOGENETIKUS ÉS PATHOLÓGIÁS VÁLTOZÁSA” CÍMŰ, F46201 OTKA-AZONOSÍTÓJÚ PÁLYÁZATHOZ**

Jól ismert, hogy a központi idegrendszerben a sejtek térbeli mintázata alapvetően meghatározza a sejtek közötti kölcsönhatást, az egyes idegrendszeri struktúrák fejlődését, a sejtek degenerációs vagy regenerációs képességét, egy adott neurodegenerációs betegség terjedését vagy megállását. Ugyanakkor a bélidegrendszerben még csak hipotézis sincs arra vonatkozóan, hogy a sejtek térbeli eloszlásának milyen törvényszerűségei vannak.

A dúcléc különböző területéről érkező sejtekből a bél mikrokörnyezetében, a bélcső teljes hosszában morfológiailag, neurokémiaiilag és funkcionálisan is heterogén sejtpopuláció alakul ki. Az érző, motoros és interneuronok önálló reflexíveket alkotnak, és így létrehozzák az autonóm idegrendszer harmadik, önálló divízióját, a bélidegrendszert.

A térbeli mintázat kialakulásának vizsgálata segíthet az egyes sejtcsoportok közötti összefüggések megértésében, illetve annak megismerésében, hogy a bél mikrokörnyezetének milyen szerepe van a különböző sejtcsoportok elrendeződésében. A mintázatgeneráló erők megismerése ugyanakkor fontos lehet egyes, a bélidegrendszert érintő neurodegeneratív betegségek vagy neurogén gyulladásos folyamatok diagnosztizálásában, terápiájában is.

Kísérleteinket részben állatmodelleken (alkoholkezelt, diabeteses), részben embrionális humán vizsgálati anyagon végeztük.

## **1. Kísérletes állatmodellek**

### **1.1. Krónikus alkoholkezelt patkánymodell vizsgálata**

A nitrogén monoxid (NO) tartalmú (nitreg) neuroncsoport, mind a fejlődési, mind a patofiziológiás folyamatokban fontos. A bélidegrendszerben a nitreg neuronok nagy számban fordulnak elő, és a bélperisztaltikában a nem adrenerg-nem kolinerg gátló mechanizmusokat irányítják. Kvantitatív vizsgálatok bizonyították, hogy a nitreg neuronok jellegzetes regionális különbségeket mutatnak a béltraktusban.

A klinikumban közzismert, hogy a krónikus alkoholfogyasztás számos pathológiás elváltozást okoz alkoholisták emésztőrendszerében. A NO szintéziséért a NO szintáz (NOS) enzim 3 izoformája: a neuronális (nNOS), az endotheliális (eNOS) és az indukálható NOS (iNOS) a felelős. A nNOS és az eNOS együtt konstitutív NOS-ként (cNOS) is ismert.

Munkánk során a krónikus alkoholkezelés NOS izoformákra gyakorolt hatását vizsgáltuk a bélcsatorna különböző szakaszaiban.

Az alkoholkezelt patkányok 8 héten át ethanol vizes oldatát, míg a kontroll állatok csapvizet kaptak. A NOS enzimaktivitás és a fehérjetartalom meghatározásához, valamint az immunhisztokémiai vizsgálatokhoz a duodenum, a jejunum, az ileum és a colonból származó mintákat használtunk. A nitreg neuronok azonosítására nNOS, míg a teljes neuronszám meghatározására HuC/D immunhisztokémiai festést végeztünk.

A kontroll állatokban a konstitutív NOS (cNOS) aktivitása regionális különbségeket mutatott, a cNOS aktivitása mintegy hússzor nagyobb volt a colonban, mint a vékonybélben. A cNOS aktivitása alkoholkezelt állatokban a kontroll állatokhoz képest szignifikánsan csökkent a jejunum, az ileum és a colon területén, míg a duodenumban változatlan maradt.

A iNOS aktivitás fiziológiás értéke magasabb volt az ileum és a colon területén, mint a duodenumban és a jejunumban, és ezek az értékek nem változtak szignifikánsan az alkoholkezelt állatokban.

Immunhisztokémiai vizsgálataink azt mutatták, hogy az alkoholkezelt állatok minden vizsgált bélszakaszában szignifikánsan alacsonyabb volt a nNOS-immunreaktív (nitreg) neuronok száma, mint a kontroll állatoké, ugyanakkor az összneuronszám nem változott. A

Western blot analízis szerint a colonban szignifikánsan csökkent a nNOS fehérje szintje az alkoholkezelt állatokban, a többi bélszakaszban nem volt detektálható különbség.

Vizsgálataink elsőként bizonyították, hogy a krónikus alkoholkezelés bélszakaszfüggő módon befolyásolja NOS aktivitást és a nitrerg neuronok számát a myentericus plexusban. A központi idegrendszerrel ellentétben a nitrerg entericus neuronok alkoholkezelés hatására nem pusztulnak el, hanem megváltoztatják neurokémiai karakterüket, így a nitrerg egyensúly felborul a bélidegrendszerben, amely jelentős pathológiás elváltozásokhoz vezethet.

**Eredményeinket az „Alcoholism Clinical and Experimental Researches” című folyóiratban publikáltuk 2006-ban.**

A három NOS izoforma közül a myenterikus neuronokban csak a nNOS jelenléte bizonyított. Korábbi eredményeink szerint krónikus alkoholfogyasztás hatására a nNOS-pozitív myentericus neuronok száma szignifikánsan lecsökkent, ugyanakkor a NO szintézise fokozódott. Ezért a fentebb említett krónikus etanolkezelt patkánymodellel további kísérleteket végeztünk, amelynek során az nNOS, az eNOS és az iNOS jelenlétét vizsgáltuk posztembedding elektronmikroszkópos technikával myentericus neuronokban.

Az nNOS-immunreaktív neuronok mellett elsőként azonosítottunk eNOS- és iNOS-pozitív myentericus neuronokat. Kvantitatív vizsgálataink azt mutatták, hogy az alkoholkezelt patkányokban a nNOS-immunreaktív neuronok száma szignifikánsan alacsonyabb ( $P < 0,01$ ), mint a kontroll patkányokban. Ugyanakkor az iNOS és eNOS-immunreaktív neuronok mennyisége szignifikánsan magasabb (rendre  $P < 0,05$  és  $P < 0,001$ ).

Eredményeink elsőként bizonyítják, hogy alkoholkezelés hatására megemelkedett NO-szintért a myentericus neuronokban jelenlevő iNOS és eNOS felelős.

Ezen eredményeinket a közeljövőben szeretnénk publikálni.

## **1.2 Diabetesz patkánymodell vizsgálata**

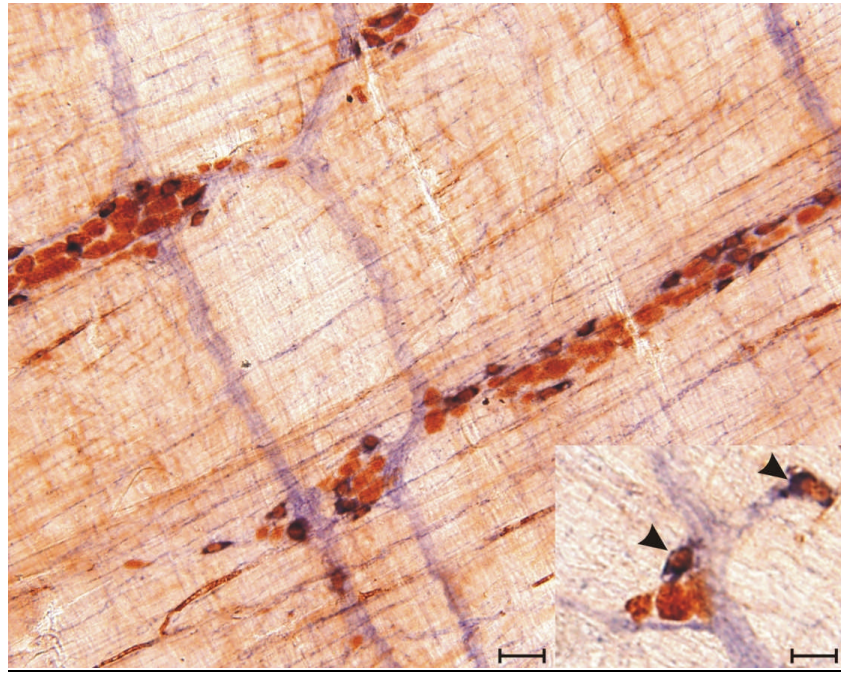
Az elmúlt évek kutatási eredményei szerint a myentericus neuronok nitrerg szubpopulációja különösen érzékeny a diabetes okozta neuropáthiára. Mivel a bélidegrendszerben a NO igen jelentős gátló neurotranszmitter, így a nitrerg innerváció sérülése a diabetes során kialakuló motilitási problémákhoz nagy mértékben hozzájárulhat. Ennek mechanizmusa azonban még nem tisztázott.

Munkánk elsődleges célja ezért az volt, hogy megvizsgáljuk a diabetes-indulálta motilitási problémák és a nitrerg myentericus neuronszám változás összefüggéseit streptozotocin-(STZ) indukálta diabeteszes patkányok bélcsatornájának különböző szakaszaiban.

A másodlagos cél az inzulinkezelés preventív hatásának feltárása volt a bélperisztaltika elváltozásaira és a nitrerg neuronszám változásra.

Vizsgálatainkat kontroll, diabeteszes és inzulinkezelt diabeteszes patkányokon végeztük. Az állatokat a diabeteszes állapot kialakulása utáni 10. héten áldoztuk fel.

A nitrerg neuronpopuláció azonosítására NADPH-diaforáz enzimhisztokémiai festést, az összneuronszám meghatározására HuC/HuD immunhisztokémiai festést végeztünk (1. ábra). A myentericus neuronok kvantitatív változásának nyomonkövetésére a laboratóriumunkban kifejlesztett Plexus Pattern Analysis (PPA) szoftvert használtuk.



**1. ábra** Myentericus neuronok NADPH-diaforáz enzimhisztokémiai és HuC/D immunhisztokémiai festés után. A nyílhegyek a kettősen jelölt neuronokat jelölik. Skála: 50  $\mu\text{m}$ , inzert: 30  $\mu\text{m}$ .

A motilitási rendellenességeket a vékony- és a vastagbélben tranzitmérésekkel vizsgáltuk, melyet a SZTE ÁOK I. számú Belgyógyászati klinikájával való kooperációban végeztünk.

A diabeteses állatokban a tranzit szignifikánsan gyorsabb volt, mint a kontroll állatokban, ugyanakkor az inzulinkezelt állatok tranzitideje nem különbözött a kontroll csoportétól.

A diabeteses állatok duodenumában a nitrerg neuronok száma szignifikánsan alacsonyabb volt (~35 %), mint a kontroll állatokéban, ugyanakkor az összneuronszám nem mutatott szignifikáns különbséget.

A jejunumban, az ileumban és a colonban az összneuronszám és a nitrerg neuronok száma is szignifikánsan alacsonyabb volt a diabeteses állatokban. A duodenumban és a jejunumban az inzulinkezelés nem védte ki a nitrerg neuronszám csökkenését, ugyanakkor az ileumban és a colonban megelőzte a sejtszám csökkenését.

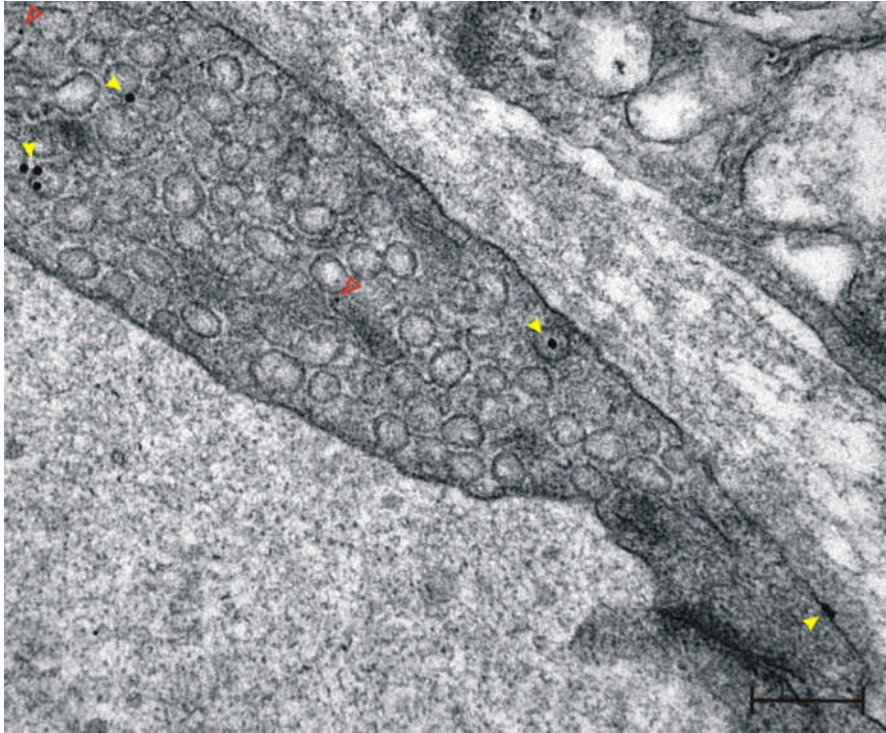
Eredményeink mutatták az első bizonyítékát annak, hogy a bélcsatorna különböző szakaszaiban a nitrerg neuronok eltérő mértékben érzékenyek a diabeteses állapotra és az inzulinkezelésre.

**Eredményeinket a Diabetes Research and Clinical Practice című folyóiratban publikáltuk 2008-ban.**

Mivel a diabetes gyakran jár együtt kardiovaszkuláris rendellenességekkel, feltételeztük, hogy a diabeteses állatmodellben megfigyelt enterális neuropathia hátterében is a myentericus neuronokat ellátó kapillárisok strukturális elváltozásai állnak.

A nitrerg myentericus neuronok számának változása és a vaszkuláris elváltozások közti összefüggések feltárására a fentebb ismertetett diabeteses patkánymodellen megvizsgáltuk a bazális lamina vastagságát, valamint a transzendothelialis transzportban fontos szerepet játszó caveolák és a Caveolin-1 fehérje kvantitatív változásait a myentericus plexus szomszédságában elhelyezkedő kapillárisok endothélsejtjeiben a bélcsatorna különböző szakaszaiban.

Munkánk során elektronmikroszkópos morfolometriai és posztembedding immunhisztokémiai módszereket alkalmaztunk. A Caveolin-1 és eNOS közötti molekuláris kölcsönhatás tanulmányozásához Caveolin-1 – eNOS kettős jelölést végeztünk. Másodlagos antitestként 10 és 18 nm-es arany szemcsével jelölt szérumokat használtunk (2. ábra). A morfolometriai vizsgálatokat AnalySIS 3.2 szoftver segítségével végeztük.



**2. ábra** Mesenterialis kapilláris endothelium elektronmikroszkópos képe STZ-indukált diabeteses patkány vékonybelében Caveolin-1- eNOS kettős jelölés után. A 10 nm-es arany szemcse (piros nyílhegy) a Caveolin-1 fehérjét, a 18 nm-es arany szemcse (sárga nyílhegy) az eNOS-t jelöli. Lépték: 100 nm.

Eredményeink azt mutatták, hogy a bazális lamina szignifikánsan vastagabb ( $P < 0.001$ ) volt a diabeteses patkányok kapilláris endothelsejtjei mellett, mint a kontroll állatokban. Az inzulinkezelt állatokban a bazális lamina szignifikánsan vékonyabb volt ( $P < 0.01$ ), mint a diabeteses állatokban, de a kontroll állatokénál ( $P < 0.01$ ) szignifikánsan vastagabb volt ( $P < 0.01$ ).

A diabeteses mintákban a Caveolin-1 overexpresszióját és a kaveolák számának a megnövekedését figyeltük meg.

Eredményeink rávilágítottak a vaszkuláris elváltozások és a nitrogén neuronok neuropáthiája közötti összefüggésekre, így az endothelsejtek vizsgálata fontos diagnosztikai eszköz lehet a neuropathiát megelőző vaszkuláris elváltozások felismerésében.

**Ezen munkáról a 2007. júniusában Groningenben megrendezésre került „14th International Student Congress of Medical Sciences” konferencián számoltunk be.**

## **2. Humán minták vizsgálata**

### **2.1. A nitrerg neuronok mintázatának vizsgálata fejlődő humán bélidegrendszerben**

Vizsgálataink célja az volt hogy a nitrerg myentericus neuronok mintázatának fejlődési folyamatáról nyerjünk információkat a bélcsatorna különböző szakaszaiban. Munkánk során a 14-22 hetes humán magzatok myentericus plexusából készült wholmount preparátumokat használtunk. A nitrerg neuronok jelölésére NADPH-diaforáz enzimhisztokémiai festést alkalmaztunk. A megfestett preparátumokról digitális képeket készítettünk, majd ezeken a laboratóriumunkban kifejlesztett Plexus Pattern Analysis (PPA) szoftver segítségével mintázatanalízist végeztünk.

Eredményeink azt mutatták, hogy a nitrerg neuronok térbeli mintázta a 14. és a 22. gesztációs hét között jelentősen megváltozott. A nitrerg neuronok denzitása szignifikánsan lecsökkent mind a 7 vizsgált bélszakaszban, ugyanakkor bélszakasz-specifikus változásokat is megfigyeltünk. A 14. héten a neuronok még random módon helyezkedtek el a myentericus plexusban, a 19. hétre azonban a nitrerg neuronok elrendeződése már aggregált volt.

Eredményeinkről a 2006. március 26-29. között New Yorkban, Development of Enteric Nervous System, Cells, Signals and Genes címmel megrendezésre került konferencián számoltunk be. Ezen a rangos konferencián az elmúlt 10 év eredményei kerültek összefoglalásra bélidegrendszer embrionális fejlődésével kapcsolatban.

### **2.2 A három vezikuláris glutamát transzporter izoforma mintázatának vizsgálata fejlődő humán bélidegrendszerben**

A központi idegrendszerben a három vezikuláris glutamát transzporter izoforma (VGLUT1-3) jelenlétét a közelmúltban azonosították, valamint igazolták, hogy a VGLUT1-3 a glutamáterg fenotípus meghatározásáért felelős és expressziójuk igen szigorúan szabályozott az agy embrionális fejlődése során.

A glutamáterg jelátviteli út a fejlődő és kifejlett bélidegrendszerben is jelentős, ugyanakkor a VGLUT1-3 jelenléte és megoszlása a bélidegrendszerben nem ismert.

Munkánk során immunhisztokémia módszerekkel vizsgáltuk a VGLUT1-3-immunreaktivitás jelenlétét 14 és 23. hetes humán magzatok myentericus plexusában.

A VGLUT1-3-immunreaktivitás főként a ganglionok neuropil régiójában, az interganglionális varikózus rostokban és periszomatikus ponttákként volt megfigyelhető, de különböző intenzitású citoplazmatikus jelöléseket is láttunk.

Mindhárom vezikuláris glutamát transzporter egyedi térbeli és időbeli megoszlást mutatott. A VGLUT1-immunreaktivitás volt a legkifejezettebb az egész vizsgált periódus alatt. A VGLUT1- és a VGLUT2-immunreaktivitás a 20. gesztációs héten érte el a maximumát. A VGLUT3-immunreaktivitás volt a legkevésbé kifejezett a fejlődő myentericus plexusban. A ganglionok neuropil régiójában és a periszomatikus ponttákként az egész vizsgált gesztációs periódusban jelen volt a VGLUT3-immunreaktivitás, VGLUT3-pozitív perikarionok azonban csak a 18. és a 20. gesztációs héten és kizárólag a duodénumban voltak megfigyelhetők.

**Ezen eredményeinket a „Histology and Histopathology” című lapban publikáljuk 2008-ban.**

### **3. A nitrerg myentericus neuronok térbeli megoszlásának összehasonlító vizsgálata különböző emlősfajok myentericus plexusában**

Bár az entericus neuronok plexusban való elrendeződése meghatározó jelentőségű a működésük szempontjából, kevés adat áll rendelkezésünkre a különböző fajok entericus neuronjainak térbeli megoszlásáról.

Munkánk során patkány, kutya, egér, tengerimalac, macska, nyúl és majom duodenumból készült wholemout preparátumokat vizsgáltunk. NADPH-diaforáz enzimhisztokémiai festés után PPA szoftverrel elemeztük a nitrerg neuronok térbeli mintázatát, és arra kerestük a választ, hogy a neuronok elrendeződése random-e vagy valamiféle szabályosságot mutat.

Eredményeink azt mutatták, hogy a nitrerg sejtek denzitása jelentős különbségeket mutat (12-56 cells/mm<sup>2</sup>), a legkisebb denzitás a nyúlban, a legnagyobb a macskában figyelhető meg. A vizsgált fajok közül egyedül a patkány myentericus plexusában volt random a neuronok elrendeződése, míg a többi faj duodenumában a nitrerg neuronok mintázata aggregáltságot mutatott.

**Eredményeinket „Cytometry Part A” című folyóirathoz küldtük el publikációra.**

### **4. Vezikuláris glutamát transzporter-immunreaktív myentericus neuronok macska duodenumában**

Macska myentericus plexusában számos VGLUT1-immunreaktív neuront figyeltünk meg. A VGLUT1-pozitív neuronok főként a myentericus ganglionok szélén helyezkedtek el. A neuronok neurokémiai és morfológia karakterizálása céljából kettős immunhisztokémiai jelöléseket végeztünk HuC/D, neurofilament 200 (NF) és nNOS fehérjék ellen termeltetett antitestekkel. A wholemout preparátumokat konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk és szemikvantitatív méréseket végeztünk.

Minden VGLUT1-immunreaktív sejt HuC/D-pozitivitást is mutatott, ugyanakkor nem jelölődött az anti-nNOS szérummal. A VGLUT1-pozitív neuronok 35-40 százaléka mutatott NF-immunreaktivitást. A NF-VGLUT1-pozitív neuronok morfológiai sajátosságai alapján legalább 3 csoportba voltak sorolhatók.

**Eredményeinket a „Histochemistry and Cell Biology” című folyóirathoz küldtük el publikációra.**

A SZTE TTIK Biológus Tanszékcsoportja a közelmúltban jelentősen átszerveződött. Számos tanszék fuzionált és az új biológus épületrész elkészültével minden tanszék egy épületbe került. Szöveti laboratóriumunk korábban az Állattani és Sejtbiológiai Tanszékhez tartozott. Ez a tanszék azonban a közelmúltban összeolvadt a korábbi Összehasonlító Élettani Tanszékkel, és így megalakult az Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék.

Az új körülmények lehetővé tették az ottani laboratóriumi felszerelések (analitikai mérleg, pH-mérő, mikroszkópok, digitális kamerák, elszívófülkék stb.) használatát. További előny jelentett a Szegedi Biológiai Kutatóintézet közelsége, így a kutatóintézettel való kooperáció is hatékonyabbá vált. A megváltozott körülmények miatt a pályázati periódus alatt már nem volt indokolt a szerződésben rögzített analitikai mérleg és pH-mérő beszerzése, ezért az arra szánt összegből az OTKA Irodától való engedély kérése után antitesteket, pipettákat, adathordozót vásároltunk.

A pályázati periódus alatt Krecsmarik Mónika és Román Viktor PhD fokozatot szerzett, Linke Nikolett pedig 2008. őszén fogja megvédeni disszertációját. Emellett 6 biológus hallgató készítette el diplomamunkáját laboratóriumunkban. Hallgatóink helyi és országos diákköri konferenciákon is szerepeltek, illetve fognak szerepelni a közeljövőben.

Bízunk abban, hogy a fenti eredmények meggyőzően mutatják azt, hogy jól és eredményesen használtuk fel a F46201 OTKA-azonosítójú pályázat nyújtotta anyagi támogatást, és hogy a pályázatunk bírálói további támogatásra is érdemesnek tartják a megkezdett vizsgálatokat.

### Közleményeink

Krecsmarik M, Izbéki F, **Bagyánszki M**, Linke N, Bódi N, Kaszaki J, Katarova Z, Szabó Á, Fekete É, Wittman T. Chronic ethanol exposure impairs neuronal nitric oxide synthase in the rat intestine. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006 30(6):967-73.

**Bagyánszki M**, Horváth A, Román V, Resch BÁ, Fekete É, Krecsmarik M. A new computational model to study the spatiotemporal pattern of myenteric neurons in the developing human fetal intestine. *Development of Enteric Nervous System, Cells, Signals and Genes*, New York, 2006

Bódi N, Linke N, Izbéki F, **Bagyánszki M**, Fekete É. Loss of nitrergic myenteric neurons in diabetic rats coincides with structural alterations in capillaries supplying the myenteric plexus 14th International Student Congress of Medical Sciences, Groningen, The Netherlands, 2007

Izbéki F, Wittman T, Rosztóczy A, Linke N, Bódi N, Fekete E, **Bagyánszki M**. Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Jan 31; [Epub ahead of print]

Linke N, Bódi N, Resch BE, Fekete É, **Bagyánszki M**. Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the myenteric plexus of the human fetal small intestine. *Histol Histopathol* 2008 in press

Linke N, Bódi N, Battonyai I, Fekete É, **Bagyánszki M**. Vesicular glutamate transporter immunoreactive myenteric neurons in the feline duodenum. *Histochem Cell Biol* 2008 (submitted)

L. Bódi, I. Battonyai, É. Fekete, **M. Bagyánszki**. Spatial Pattern Analysis of Nitrergic Neurons in the Myenteric Plexus of the Duodenum of Different Mammalian Species *Cytometry Part A* 2008 (submitted)