

Beszámoló az OTKA 43207 téma zárójelentéséhez

1. A pályázat célkitűzései

A pályázat célkitűzéseiben folytatni kívántuk a megelőző OTKA témáink (19206, 29624) keretében elkezdett kísérletes diabetes mellitusra vonatkozó kutatásainkat, kiterjesztve vizsgálatainkat az immunológiai folyamatokra, illetve a hő-shock fehérjék és egyéb endogén anyagok (nociceptin stb.) szerepére.

Jelen kutatásban választ kerestünk az alábbiakra:

1. A 60 kD-os hő-shock fehérje család egyes komponensei kivédik-e a streptozotocin (STZ) által kiváltott diabetes kialakulását (a jellegzetes kardiális elektrofiziológiai tulajdonságokat, az oxidatív stress állapotát) patkányon. Miként változtatják a T-sejt választ, hogyan alakul a hő-shock fehérjék elleni antitest szint immunizált és immunizálatlan állaton, valamint van-e összefüggés a hő-shock protein/antitest szintek és a különböző gyógyszerek (pl. antidiabetikumok) között?

2. Beállítható-e a hisztidin-dekarboxiláz (HDC) knock out egerekben a streptozotocin indukálta diabetes mellitus modell (megfigyelhető-e a jellegzetes kardiális elektrofiziológiai és az oxidatív stress paraméterek) és kivédhető-e a diabetes kialakulása hsp-vel történő immunizálás esetén, milyen a hsp60 és 65 elleni antitest szint, ill a specifikus T-sejt aktivitása?

3. Kísérletes diabetesben mutatkozik-e változás a központi idegrendszer vagy a plazma nociceptin-szintjében és az agy különböző területeiben ill. a lymphocitán a ³H-nociceptin-receptor-kötésében, továbbá a hőshock-proteinek/antitestek befolyásolják-e lymphocitákon a ³H-nociceptin-receptor-kötést anyagcsere egészséges és diabeteszes állaton?

4. Van –e eltérés emberi lymphociták ³H-nociceptin-receptor kötésében anyagcsere egészséges és cukorbetegben?

5. Hogyan változik a hypothalamus és a liquor hisztamin szintje nociceptin és hisztamin receptorra ható szerek hatására

2. Eredmények

2.1. Hő-shock fehérjék szerepe az autoimmun diabetesben

A diabetes mellitus inzulin dependens típusa (IDDM) autoimmun betegségként is felfogható, melynek kialakulásában a hő-shock fehérjék (hsp) bizonyított szerepet játszanak. IDDM-ben szenvedő betegek szérumában megemelkedett hsp elleni antitest szintet mutattak ki. A különböző hsp-k (hsp60, hsp65) és hsp peptidek (p277) diabetesben betöltött szerepét 57BL/KSJ egértörzsön is igazolták, ahol a hsp-vel és peptidekkel végzett immunizálás kivédte a streptozotocin (STZ) által kiváltott diabetes kifejlődését. Kísérleteink célja az volt, hogy az irodalmi adatokat két új állattörzsben, patkányon és hisztidin dekarboxiláz knockout (KO) egéren is igazoljuk valamint az, hogy meghatározzuk azt a legalkalmasabb STZ dózist és adagolási módot melynek segítségével a béta sejteket károsító autoimmun folyamatot tudunk indukálni.

2.1.1. Patkányon végzett kísérletek

Munkánk során meghatároztuk azt a legalkalmasabb STZ dózist és adagolási módot (3x30 mg/tskg) melynek segítségével a béta sejteket lassan károsító autoimmun folyamatot tudunk indukálni. Az immunreakció ebben az esetben többek között az STZ hatására a sejtek felszínén expresszáldó hsp-k ellen irányul.

Kísérleteinket hím 100-200g-os Wistar patkányokon végeztük. A kontroll csoport csak STZ-t kapott, további két csoportba sorolt STZ-vel kezelt állatainkat pedig a hsp-65-tel immunizáltuk. Az egyik csoport tagjait egyszer, a STZ-vel való kezelés előtt 7 nappal (-7 nap), a másik csoportba tartozó egyedeket pedig két alkalommal, a STZ beadása előtt és után 7 nappal (-7, +7 nap), kezeltük hsp65-el (100 µg) intaperitoneálisan.

A kezelt és kezeletlen állatokban kéthetente mértük a vércukor szintet. A vércukor értékeket enzimatisz úton határoztuk meg, amihez a vért a patkányok szemzugából nyertük. A vizsgálatokat 12 hétig végeztük.

Eger és patkány kísérleteink során azt is vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a hőshock fehérjékkel történő immunizálás a hsp elleni antitest szintet. Az antitest szint méréshez ELISA technikát alkalmaztunk, (lásd a módszer részletes leírását (1)).

Eredményeink a következők: A vércukor emelkedés már a 2. hét után bekövetkezett és a 12. hét végéig állandónak mutatkozott (20-25 mmol/l). A diabeteszes állatok sulya a 12. hét végére fokozatosan csökkent (kb 220 g-ról kb 110 g-ra). A hsp65-el történő immunizálás (mind az egyszeri mind a kétszeri immunizálás) nem befolyásolta a magas vércukor értéket (25-30 mmol/l), viszont mérsékelte a sulycsökkenés mértékét (kb 320 g-ról 250 g-ra). Jelentős különbséget tapasztaltunk a kezelt és kezeletlen állatok életidejében. Amíg a csak STZ-vel kezelt állatok 75%-a elpusztult a kísérlet végére, addig az egyszer kezelt állatok 83,3%-a, a kétszer kezelt állatok 100%-a életben maradt. ***A hsp-vel történő kezelés hatása a diabeteszes állatok túlélésére szignifikánsnak ($p < 0,05$) bizonyult. A hsp65-et történő immunizálás azonban, nem befolyásolta hsp65 ellenanyag szintet (1).***

Hemodinamikai hatások

A hő-shock fehérjékkel diabeteszben történő immunizálás hemodinamikai hatásának vizsgálata izolált patkány szíven Langendorff technikával történt.

Összehasonlítottuk a kontrol, a fenti STZ dózissal (3x30 mg/kg) diabeteszessé (8.hét) tett állatok és a hsp 65 elő- és utókezeléssel (-7, +7 nap) immunizált diabeteszes patkányok szívének hemodinamikai paramétereit.

Mind a kezeletlen mind az immunizált állatok szív/testsúly aránya nagyobb volt a 8. héten mint a kontrol állatoké. A 30. perces perfúzió után a diabeteszes csoportban szignifikánsan csökkent a frekvencia (25%), a kontrakció (40%) és a relaxáció (35%) mértéke, valamint nem szignifikánsan a bal kamrai nyomás (LVP). A hsp65-el immunizált diabeteszes állatokon a fenti csoporthoz hasonló hemodinamikai tulajdonságokat (20%-os szívfrekvencia, valamint 35%-os és 28%-os csökkenést a kontrakció és relaxáció mértékében) figyeltünk meg.

Eredményeink arra mutatnak, hogy a kisebb STZ dózissal előidézett autoimmun diabetesznek tekintett állapotú patkányok szívfunkciói károsodnak. A megfigyelt szívfunkció károsodás hasonló a hagyományos, nagyobb STZ dózissal (45-60 mg/kg i.v.) kiváltott diabeteszes patkányokéhoz, a funkció csökkenés mértéke azonban, kisfokban elmarad e csoport adataitól.

Bár a hsp65-el történő immunizálás megnövelte a diabeteszes csoport túlélési arányát, de nem volt képes kivédeni a diabeteszes szívfunkció romlást.

A hő-shock fehérjékkel diabeteszben történő immunizálás hemodinamikai hatásai jelenleg csak kongresszusi absztraktok tartalmazzák. Ezeket az eredményeket az elektrofiziológiai adatokkal együtt tervezzük a közel jövőben publikálni.

2.1.2. Vizsgálatok histidin dekarboxiláz knock out egereken

Kísérleteinket hím 25-30g-os a HDC knock-out egereknek megfelelő kontrol egereken (Balb/c) valamint a KO egértörzsen végeztük. Mindkét egértörzset a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet Falus professzor vezette munkacsoporttól kaptuk.

Először meg kellett határozni a diabeteszt kiváltó dózist. A patkányoknál alkalmazott STZ dózis (3x30mg/kg i.p.) nem okozott szignifikáns vércukor érték különbséget a STZ-al kezelt és kontroll csoport között, ezért további kísérletek váltak szükségessé a megfelelő dózis meghatározása érdekében, mely 40 mg/kg ipSTZ-nak bizonyult. A vizsgálatokat 10 héten keresztül végeztük

Az immunizálásnál a hsp65-t (100 µg i.p.) és a hőshock fehérje epitop p277-t (100 µg i.p.) 7 nappal a STZ alkalmazása előtt adtuk.

Vizsgáltuk az állatok testsúlyát, vércukor szintjét továbbá a hsp 60, hsp 65 és a p277 ellenanyag szinteket ELISA módszerrel(1).

Kísérleti csoportosításunk a következő volt:

Vad Balb/c egerek		Knockout egerek	
Csoport	Kezelés	Csoport	Kezelés
W1 (n=10)	P277+3XSTZ	K1 (n=10)	P277+3XSTZ
W2 (n=10)	HSP65+3XSTZ	K2 (n=10)	HSP65+3XSTZ
W3 (n=10)	3XSTZ	K3 (n=10)	3XSTZ
W4 (n=10)	Control	K4 (n=10)	Control

Megállapítottuk, hogy mind a Balb/c mind a HDC egértörzs kisebb érzékenységet mutatott a STZ hatása iránt, vagyis a vércukor növekedés kisebb volt összehasonlítva az irodalomban autoimmun diabeteszt mutató C57BL/KSJ egértörzsekével

Összehasonlítva a hsp65-el és p277-el történő immunizálás hatásait a KO, vad és STZ-al kezelt állatok esetén, mindkét hőshock fehérje szignifikáns vércukor érték emelkedést okozott az első heten. Ez később lecsökkent és a 8. héten a hőshock fehérjékkel történő immunizálás már szignifikánsan alacsonyabb vércukor értéket okozott a kontroll állatokhoz képest. A hsp65 azonkívül még a negyedik héten is szignifikánsan lecsökkentette a kezelt állatok vércukor szintjét. Az ellenanyag szintet vizsgálva csak a vad egerek esetén tudunk szignifikáns különbséget kimutatni. A hsp65-el és p277-el immunizált vad egerekben szignifikánsan megnőtt az immunizálásra alkalmazott hsp elleni antitest szint.

Megállapíthatjuk tehát, hogy a KO és vad egerek esetén a STZ kevésbé hatékony. A hőshock fehérjékkel immunizált állatokban a vércukorérték csökkenés irányába mutató

tendencia detektálható. Továbbá az immunizálás csak a vad egerekben okozott szignifikáns hsp 65 és p277 elleni antitest szint növekedést (1).

2.1.3. A humán hő-shock fehérje, hsp60AA437-460-ra és hsp60AA394-408-ra adott Th1 és Th2 típusú immunválasz vizsgálata inzulin dependens diabetes mellitusos (IDDM) betegekben és egészséges kontrollokban

Ismert adat, hogy IDDM-ben szenvedő betegek szérumában megemelkedett a Hsp elleni antitest szint, továbbá 83 diabeteses gyermek szérumát vizsgálva a Hsp60 egy GAD szerű epitopja ellen (Hsp60 AA394-408) is megemelkedett antitest szint volt kimutatható. Feltehetően az IDDM kialakulásában a T sejt immunválasznak is szerepe lehet. Frissen diagnosztizált IDDM betegek esetén az immunválasz típusa Th1 irányába eltolódik, a Th1-es típusú cytokinek szintje megemelkedett, míg a Th2 típusú cytokinek szintje csökkent.

A T sejt vizsgálatok segítenek eldönteni, hogy egy immunválasz Th1 vagy Th2 típusú. Az ELISPOT technika az ELISA egy módosított formája, melynek segítségével meghatározható a Th sejt típusa cytokin termelése alapján.

Kísérleteink során 9 egészséges kontroll és 11 IDDM-ban szenvedő beteg vérének vizsgáltuk meg. A T sejtek stimulálásához pozitív kontrollt, lásd (2), Hsp60 AA394-408 peptidet és p277-et (Hsp60 AA437-460) használtunk. Detektált cytokinek: IFN (Th1 cytokin) és IL-13 (Th2 cytokin).

A T sejt válasz típusa mellett azt is vizsgáltuk, hogy van-e eltolódás valamelyik T sejt válasz irányába (Th1/Th2).

Eredményeink a következők: Hsp60 AA437-460 esetében a beteg csoportban szignifikánsan ($p=0,0401$) lecsökkent IL-13 termelést találtunk. A Th1-es immunválaszt vizsgálva nem volt szignifikáns különbség a kontroll és beteg csoport között, de a Th1/Th2 eltolódást vizsgálva szignifikáns ($p=0,012$) eltolódást volt megfigyelhető a beteg csoportban a Th1 típusú immunválasz irányába Hsp60 AA437-460 esetében. Nem találtunk szignifikáns különbséget a Th1 és Th2-es típusú immunválaszban az AA394-408 peptid esetén (2).

Az alacsony betegszám ellenére megállapítható, hogy az IDDM-ban szenvedő betegekben szignifikáns eltolódás van a T sejt immunválaszban a Th1 immunválasz irányába a Hsp60 AA437-460 peptid esetén (2).

2.2. Kísérletes diabetes mellitus hatása a központi idegrendszeri és perifériás nociceptin és nocistatin szintekre

Az azonos prekursorból, a prepro-nociceptinből hasadó két biológiai aktivitással rendelkező peptidnek, a nociceptinnek és a nocistatinnak a meghatározására validált módszert (^{125}I -Nociceptin/OrphaninFQ RIA és ^{125}I -Nocistatin RIA) dolgoztunk ki patkányok vérplazmájából, liquorából valamint májszövetéből történő mérésekhez. Ezek a vizsgálatok szükségesek az egyes agy részek nociceptin szint, illetve jelzett nociceptin-receptor kötődési vizsgálatok megkezdéséhez.

Miután irodalmi adatok Wistar patkányok plazma és a liquor (CSF) endogén nociceptin-szintjére vonatkozóan nem álltak rendelkezésre vizsgálatunk első szakaszában az endogén nociceptin-szint életkor-függését vizsgáltuk.

Megállapítottuk, hogy a plazma nociceptin szintje a vizsgált életkor-tartományban az életkorral nő, és a 14 hetes életkorra látszik stabilizálódni. A CSF nociceptin-szintje hasonló

életkor-függést mutatott viszont közel egy nagyságrenddel magasabb nociceptin-koncentráció volt mérhető a CSF-ben, mint a plazmában. Ennek alapján további vizsgálatainkban 16 hetes életkorú patkányokat használtunk.

Ismert, hogy a nocistatin (a prepronociceptin másik hasadási terméke) a nociceptinnel számos vonatkozásban ellentétes hatású. Ezért, miután a szakirodalomban erre a peptidre sem találtunk alapértékeket, megvizsgáltuk a felnőtt (> 16 hetes) him patkányok plazma és CSF nocistatin szintjét. Azt találtuk, hogy a nocistatin ellentétben a nociceptinnel egy nagyságrenddel magasabb koncentrációban volt jelen a plazmában mint a liquorban.

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a diabetes (mint a perifériás neuropathia egyik állatkísérletes modellje) hatással van-e a fent peptidok plazmában, CSF-ben, ill. a májszövetben mérhető szintjére.

A diabetes pentobarbitál altatásban (50 mg/kg, i.p.) a *v. femoralis*ba juttatott streptozotocinnal (60 mg/kg) indukáltunk. A kontroll állatokat azonos módon, de csak az oldószerrel kezeltük. A diabetes kialakulását és fennállását a súlygyarapodás követésével valamint a vércukorszint rendszeres ellenőrzésével igazoltuk, melyet a szemzúgából nyert vérből GOD-POD enzimátikus módszerrel mértünk. A kísérletekben azokat az állatokat tekintettük cukorbetegnek, melyek éhgyomri vércukorszintje a kontroll értéknek legalább a négyszerese volt.

A diabetes kialakulása után négy, nyolc, tizenkettő és tizennyolc héttel az állatok egy-egy csoportját – éter narkózis alkalmazása mellett- a belső szemzúgon át elvéreztettük és a *foramen occipitale magnum*on át vettük a liquor mintát. A K-EDTA-val alvadástól védett vérhez és a liquorhoz egyaránt 0,6 TIU/ml aprotinint adtunk proteáz inhibitorként. A hasüreg megnyitását követően a májszövet mintákat mindig azonos lebeny kivételével nyertük és feldolgozásig -80°C-on tároltuk. A szövetfeltárást 1M ecetsavval végeztük és C18 SPE kolonnán történő minta-előkészítést alkalmaztunk. Az eredményeket Student féle t-próbával (95%-os szignifikancia szint mellett), Mann-Whitney U teszttel, ill. Spearman korrelációs-számítással értékeltük ki.

Megállapítottuk, hogy a tartósan fennálló diabetes (4, 8, 12 és 16 hétig) szignifikáns változást a plazma liquor és májszövet nociceptin-szintjében nem okozott. Ugyanakkor, ellentétben a nociceptin esetében tapasztaltakkal, mindhárom vizsgált szövet nocistatin-tartalma szignifikánsan emelkedett a 12. hétig fennálló diabetes hatására(3)

Eredményeink összefoglalásaként vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy Wistar patkányokban a CSF mintegy egy nagyságrenddel magasabb nociceptin-szintet mutat, mint a plazma, viszont a nocistatin a plazmában található egy nagyságrenddel magasabb koncentrációban, mint a CSF-ben. A nociceptin plazma-koncentrációja Wistar patkányokban életkorfüggő, a 14. hétre stabilizálódik és éri el a felnőtt állatokra jellemző szintet. Megállapítottuk továbbá, hogy a tartósan fennálló streptozotocin-indukálta diabetes, mint a perifériás neuropathia egyik ismert állatkísérletes modellje, a nociceptin-szintre nincs hatással, viszont a nocistatin koncentrációját mind a három vizsgált szövetben (plazma, CSF és májszövet), azaz mind perifériásan, mind a központi idegrendszerben igen jelentős mértékben emeli (3).

Wistar patkányokon elsőként megfigyelt nociceptin és nocistatin endogén szintekre vonatkozó adataink jól korrelálnak a humán szöveteken nyert adatokkal (Brooks et al.,: Pain 1998,78:71-73).

Az irodalmi adatok tükrében ma már egyértelmű, hogy a preproorphaninból hasadó nociceptin és a vele több szempontból ellentétes hatásúnak bizonyult, a saját receptorán (mely nem azonos a nociceptin NOP receptorával) ható nocistatin, mint az endogén ópiátok tagjai számos biológiai hatással rendelkeznek mind a központi idegrendszerben mind a periférián. Ezen hatások közül kiemelendő a fájdalomérzést, annak modulálását és az immunrendszert befolyásoló hatás, mely hatások a NOP receptor ingerlése révén részben közvetlenül, részben közvetett módon, pl. a klasszikus biogénamin ingerületátvivő anyagok (hisztamin, catecholamin, szerotonin) felszabadulását befolyásoló hatással jönnek létre.

2.3. A nociceptinerg és hisztamin rendszer közötti kölcsönhatás vizsgálata.

A nociceptinerg és biogén aminerg rendszer kapcsolatára utal a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetével. együttműködésben kapott eredményeink, amelyekben többek között kimutattuk, hogy a szerotonin/hisztamin antagonistá mianserin jelentős változást okozott patkányokon a liquor biogén amin és nocistatin szintjére (Csaba, G., B. et al. K. Tekes: Life Sci.. 75: 939-946, 2004.).

Megvizsgáltuk, hogy az intracerebroventrikulárisan adott 10 µg nociceptin milyen hatást gyakorol patkány liquor és különböző agyrészek (hypothalamus, hippocampus, frontális kéreg) homogenizátumok izotopos microassayvel meghatározott hisztamin tartamára.

Megállapítottuk, hogy a nociceptin mind a liquorban, mind a frontális cortex kivételével minden általunk vizsgált agy részben jelentős hisztamin szint növekedést okozott (4).

Ezek az eredmények a nociceptin és a hisztamin rendszer közötti kölcsönhatásra utalnak. A kölcsönhatás pontos természetének feltárásához további vizsgálatok szükségesek..

A fenti eredmények alapján folytatjuk vizsgálatainkat a hisztidin dekarboxiláz knock-out egerek anyagcsere egészséges és diabeteszes csoportján. Vizsgáltuk a kontrol, a 8. hetes diabeteszes és a hőshock proteinnel előkezelt diabeteszes, vad és knock out egerek plazma és liquor nociceptin szintjét. Ezekből a vizsgálatokból még csak előzetes erdményekkel rendelkezünk, a kísérletek még folynak, de reméljük, hogy 2006 végére megbízható adatok birtokában ezt a célkitűzést is teljesíteni tudjuk

3. Eltérések a célkitűzésektől és ennek okai

Az eredeti kutatási terv és célkitűzések néhány részét sajnos technikai problémák (elektrofiziológiai rendszer korszerűsítése miatti idővesztés, hibás, illetve nem megfelelő vizsgálati kiték ,stb), személyi okok (váratlan ösztöndíj, családi), továbbá anyagi (jelzett nociceptin ligandok) miatt nem tudtuk teljesíteni, vagy még most is folyó munkák eredményeit végleges formában csak a jövőben leszünk képesek dolgozat formájában bemutatni.

Igy elmaradt a hő-shock protein/antitest szintek és a különböző gyógyszerek (pl. antidiabetikumok) közötti kölcsönhatás vizsgálata;
a hisztidin-dekarboxiláz (HDC) knock out egerekben a streptozotocin indukálta diabetes mellitus oxidáns/antioxidáns paramétereinek a feltérképezése;
továbbá az összes ³H-nociceptin receptor kötésre tervezett kísérlet.

Jelenleg is folyó kísérleteink a következők:

A hő-shock fehérjékkel immunizált diabeteszes patkányszívek elektrofiziológiai vizsgálata

A T-sejt válasz kutatása hő-shock fehérjék és epitópjai ellen immunizált és immunizálatlan patkányon;

Hisztidin-dekarboxiláz knock out egerek és ezen a törzsen indukált diabeteszes szív elektrofiziológiai és oxidáns/antioxidáns állapotának vizsgálata;

A nocistatin és nociceptin liquor, különböző agyrészek szintjének összehasonlító vizsgálata;

A nociceptin szint alakulása a hő-shock proteinnel immunizált és nem immunizált HDC knock out egerekben streptozotocin indukálta diabetes mellitusban.

A fenti, most is folyó kísérleteinkben jelenleg csak előzetes eredményeink vannak, de reméljük, hogy a következő 2 éven belül a végleges eredmények közlemény formájában realizálhatók lesznek. ***Kérem, tehát, hogy a tervezett, később megjelenő publikációk ismeretében a jelenlegi jelentés alapján született minősítést az OTKA Bíráló Bizottság kiegészítő eljárásban később módosítsa.***

A téma tárgyát érintő dolgozatok

1. Szebeni A., Prohaszka Z., Buzaás E., Kecskeméti V.: Effects of heat shock proteins on streptozotocin-induced diabetes in rats and histidine decarboxylase knock out mice. Immunol Invest. közlésre beküldve

2. Szebeni A., Schloot N., Kecskeméti V., Hosszúfalusi N., Pánczél P., Prohaszka Z., Füst G., Uray K., Hudecz F., Meierhoff G.: Th1 and Th2 cell responses of type 1 diabetes patients and healthy controls to human heat-shock protein 60 peptides AA437-460 and AA394-408. Inflamm Res 54, 415-419, 2005.(IF=1.45)

3. Tekes K., Hantos M., Gyenge M., Bizderi B., Kecskeméti V.: Diabetes and endogenous orphanin FQ/nociceptin levels in rat CSF and plasma. Int J Diabetes and Metabolism 13, 147-153, 2005. (IF=0.61)

4. Tekes K., Hantos M., Bizderi B., Gyenge M., Kecskeméti V., Huszti Z.: Stimulating effect of nociceptin on histamine release in the rat. Inflamm Res 54 Suppl 1, S38-39, 2005. (IF=1.45)