

A magyarországi halálozások több mint fele szív-érrendszeri betegségeknek tulajdonítható, második helyen pedig a daganatos megbetegedések állnak. A nukleáris orvostan módszerei lehetővé teszik, hogy kórjelzési, gyógyító és követési célból radioizotópokkal jelzett vegyületek felhasználásával adatokat nyerjünk az egyes szív-és érrendszeri betegségekről és a daganatok kialakulásáról. Kimutattuk, hogy a vérből előállított és jelzett lipoprotein származékok alkalmasak a lipoprotein anyagcsere zavar, az érlemezés elváltozások vizsgálatára. Radioaktív lipoprotein készítményeink felhasználhatók lehetnek a daganatok méretének és az áttéteknek a megállapításához, mivel egyes rákos megbetegedésekben a daganatos sejtek LDL kötőhely számának sűrűsége az egészséges sejtek kötőhely sűrűségének akár 40 - 50 szeresét is elérheti, ami jó lehetőséget ad a szcintigráfias kimutatásukhoz. A kóros szabad gyökös reakciók számos betegségben szerepet játszanak. A szabad gyökök által kiváltott lipid peroxidáció mértékét és toxicitását a lipoproteinek „natív” vagy oxidációs állapota nagymértékben befolyásolja. Eredményeink szerint e változások az LDL szerkezetében oda vezetnek, hogy az LDL molekulát az élő sejtek gyökfogó kötőhelyei felismerik. Az ún. „lipid infiltrációs” elmélet az „atheroma” képződést a vérből beáramló lipidek (lipoproteinek) és az érfal közötti bonyolult kölcsönhatás következményének tekinti. Az oxidált LDL jelentős szerepet játszik az érlemezés kialakulásában és biológiai jelzőnek tekinthető. Az oxidáció egyaránt érintheti a részecske apoprotein részét (így fragmentált fehérjék keletkeznek), valamint a zsírsavláncok acilgyökeit illetve a részecske koleszterintartalmát. A lipid peroxidációs láncreakció beindulása során először a szervezet saját antioxidáns készlete merül ki és ezután képződnek a mérgező aldehidek. Az oxidáció miatt módosult lipoproteinek kizárólag a gyökfogó kötőhelyeken jutnak be a sejtekbe. Az érintett érszakasz keresztmetszetének a beszűkülése a károsodás szövődményeként több szakaszban megy végbe. Az elváltozás súlyosságával arányosan egyre több LDL- eredetű koleszterin-észter rakódik le. A károsodás legfontosabb szereplői a makrofágokból származó habossejtek. Különös figyelmet érdemelnek a módosított LDL származékok (az oxidált, glikolizált, acetilált, malonaldehiddel konjugált) elemzése.

Kísérleteinkben izotópokkal jelzett lipoprotein alegységeket állítottunk elő, és a radioaktív készítményeket nyomjelzőként felhasználtuk állatkísérletes modellekben a plakkok és daganatok kimutatására, valamint a keringő vér mononukleáris sejtjeinek in vitro LDL fagocitózis vizsgálatára. Kimutattuk, hogy a lipoprotein alegységekkel szemben képződő ellenanyagok radioaktív jelzése az érlemezés elváltozások kimutatására és kórjelző, készletek kifejlésére alkalmas. Az érlemezés kórfejlődésében, megfigyeléseink szerint a magas vér-koleszterin szint mellett, epesavhiány esetén, a bélből a keringésbe kerülő

lipopoliszaharid endotoxinok az érfalban, a helyhez kötött falósejtekben citokinek termelését váltják ki, melyek a helyi elindítói lehetnek az érlelmeszesedésnek.

Lipoproteinek előállítása

Lipoproteinek elválasztását „szekvenciális-flotációs” és „preparatív sűrűséggrádiens” sáv centrifugálási módszerrel végeztük. A preparatív szögrotorra alkalmazott sűrűséggrádiens centrifugálási módszer rövid idő alatt (2 órán belül) lehetővé tette a fő lipoprotein osztályok (VLDL, LDL, HDL) hidratált sűrűségi értékeik szerinti, jól ismételhető elválasztását és így a lipoproteinek kémiai összetételének a vizsgálatát. A preparatív csőben az élettani sóoldat alá rétegzett, KBr-dal beállított sűrűségű szérum „grádiense” a forgatás alatt a térerő függvényében folytonossá vált. Az egyes lipoprotein osztályok sűrűségi értéküknek megfelelő oldószer sűrűségű helyre csapódtak ki és sávokban elkülönültek, majd a forgatás után a csőből frakciószedéssel elválaszthatók voltak. A VLDL sáv a cső tetejénél, az LDL sáv a cső felső felénél, a HDL sáv a cső alsó harmadában, a szérumfehérjék a cső alján helyezkedtek el. A csőben sávokban elkülönült (VLDL, LDL, HDL) lipoproteineket frakciószedéssel elválasztottuk. Az elválasztott lipoproteineket féligáteresztő hártyán keresztül dializáltuk. A sóoldatoktól megtisztított lipoprotein oldatokat aseptikusan szűrtük és a lipoproteineket fagyasztva szárítottuk. A mennyiségeket fehérje és koleszterin tartalom alapján határoztuk meg. Az ultracentrifugás módszer megismételhetőségét igazoló összehasonlító vizsgálatok szerint az elválasztott lipoproteinek elektroforetikus mozgékonyág, elektronmikroszkópos kép, apolipoprotein összetétel, koleszterin és triglicerid tartalom alapján tulajdonságaikban azonosak voltak.

Lipoproteinek vizsgálata:

Analitikai, preparatív ultracentrifugás és polianionos kicsapási módszereket (polietilén-glikol, dextrán-szulfát, foszforwolframsav, heparin) együttesen alkalmaztuk a natív és oxidált lipoprotein alegységek vizsgálatára. A lipoprotein alosztályok fizikokémiai tulajdonságai tükröződtek a heterogén makromolekulák szerkezetében, a lipoprotein anyagcsere jellegében és az oxidatív érzékenységükben. A lipoprotein osztályok (VLDL, LDL, HDL) vizsgálatára kidolgozott analitikai ultracentrifugális módszerek elvégezhetőek voltak közvetlenül a teljes szérumból vagy plazmából, preparatív centrifugálással elválasztott valamint kicsapott és visszaoldott lipoprotein alegységekből.

A lipoproteinek Schlieren „flotációs” eloszlásgörbéinek felvétele sűrűséggrádiens nem-egyensúlyi centrifugálással történt. A grádiens az analitikai cellában a forgatás során képeztük: adott sűrűségértékre beállított mintát élettani sóoldat alá rétegezve. A

megismételhető sűrűséggrádiens alapján az LDL flotációja a teljes fordulatszám elérése után (50.000 ford/perc) kialakult. Az ultracentrifuga optikájával a 80. percben készített fényképek kiértékelése során a Schlieren felvételek 'integrált' görbéit nem 'lineáris regressziós' eljárással Gauss görbék összegévé alakítottuk át és a görbék adatait „deconvolúciós algoritmussal” becsültük. A Gauss görbék alapján volt meghatározható a lipoproteinek mennyisége és heterogenitásának a mértéke. Az analitikai rotorra kidolgozott ultracentrifugális módszerekkel alapján a különböző kórképekben képződő érlemeszesedést okozó lipoprotein alegységek kimutatása és kísérletesen előállított lipoprotein származékok vizsgálatai is elvégezhetőek voltak. Az ultracentrifugás módszerrel megállapítható volt a lipoprotein „eloszlásprofilok” alapján a különböző típusú hiperlipoproteinémiákban képződő lipoprotein alegységek jelenléte. A lipoprotein eloszlásprofilok egyidejűleg Schlieren refraktometriás és ultraibolya abszorpciós optikai rendszerrel is vizsgálhatók voltak.

Radioaktív kórjelző készítmények

Radioaktív LDL készítmények nyomjelzőként felhasználhatók, pl. az LDL anyagcsere és eloszlás vizsgálatához. ^{99m}Tc-mal jelzett LDL állatkísérletben lehetővé tette a plakkok kimutatását. Az oxidált LDL-nek nagyobb affinitása volt a monocita makrofágokhoz a károsodott területen, így a jelzett anyagok származékai feldúsultak bennük és alkalmassá váltak a plakkok „non-invazív” kimutatására. Állatkísérletekben érlemeszesedésre fogékony fajban (nyúl), technéciummal jelzett 10 mCi aktivitású natív és oxidált LDL vagy VLDL készítmények intravénás beadása után a radioaktív eloszlás a szervekben gamma kamerával vizsgálható volt. A ^{99m}Tc 140 KeV-es monochromatikus gammasugárzás szervezetben történő eloszlása jól kimutatható volt gamma kamerával. Alapkövetelmény volt, hogy a lipoprotein makromolekulák megtartsák eredeti fizikokémiai, biológiai tulajdonságaikat .

Eredeti és oxidált LDL ^{99m}Tc-vel jelzett származékainak előállítása

Eredeti és oxidált LDL-nek ^{99m}Tc-vel jelzett vegyületét a technécium atomok Na-dithionittal történő redukciójával állítottuk elő, és Sephadex G-50-es oszlopkromatográfiával tisztítottuk és a Tc-mal jelzett LDL-t elválasztottuk a szabad Tc-től.

Az alábbi lipoprotein készítményeket állítottuk elő:

Kis Sűrűségű Lipoprotein, (Low Density Lipoprotein , LDL)

Nagy Sűrűségű Lipoprotein,(High Density Lipoprotein, HDL)

Nagyon Kis Sűrűségű Lipoprotein, (Very Low Density Lipoprotein ,VLDL)

LIPOPROTEIN A Lp(a)

A különböző lipoproteinek elválasztását emberi plazmából, illetve szérumból preparatív ultracentrifugálással, a homogenitás meghatározását analitikai ultracentrifugálással, agaróz gél elektroforézissel végeztük el.

A lipoprotein alegységeket liofilizált alakban is előállítottuk.

Oxidált LDL jelzése ^{99m}Tc izotóppal in vivo és in vitro kórjelzési célra

Állatkísérletes vizsgálatok nyulakban az érlelmeszesedéses területek kimutatására:

Állatkísérletekben érlelmeszesedést kiváltó táp hatására (koleszterin-teretetés) kifejlődő plakkok és szervenozslás vizsgálatára a radioaktív lipoprotein készítményeket használtunk fel intravénás beadás után gamma kamerával készített szcintigrammok alapján.

Szcintigráfias vizsgálatok alapján meg tudtuk határozni az érlelmeszesedéses területek kimutatásához a legalkalmasabb lipoprotein jelzési módszert, aktivitási értékeket.

Az érlelmeszesedéses területek szövettani vizsgálata során zsír-festési eljárással és elektronmikroszkópos kép alapján azonosíthatók voltak a lipid származékok. Sejtfeltárás után az érből élettani sóoldattal a lipoproteineket kivontunk és preparatív ultracentrifugálással az LDL flotációs sávban elhelyezkedő anyagokat elválasztottuk. Az érlelmeszesedéses területekből kivont és preparatív ultracentrifugálással elválasztott lipoproteineket tovább vizsgálatuk annak megállapítására, hogy az érben lerakódott lipoproteinek mennyire egyeznek meg az LDL flotációs tulajdonságával. Ezek a vizsgálatok elvégezhetőek voltak nemcsak az kísérletes hiperlipidémiában nyúl aortából izolált lipoproteinekkal, hanem az áthidaló (by pass) műtéten átesett betegek koszorús ereiből kivont lipoproteinekkal is.

Az általunk kidolgozott analitikai ultracentrifugás módszer lehetőséget adott a lipoproteinek közvetlen vizsgálatára. A lipoproteinek jelzése ^{99m}Tc -vel és visszaadása a kísérleti állatokba lehetővé tette a lipoproteinek szervenozslási és érlerakódási vizsgálatát. Az érből szerves oldószerrel készült kivonatok koleszterin, triglicerid, foszfolipid tartalma kolorimetriás enzimikus módszerekkel meghatározhatóak voltak. Ezek az értékek összevethetőek egészséges érből kivont mennyiségekkel és a lerakódás mértékére lehet következtetni. Az állatkísérletes modellünk lehetőséget adott a lipoproteinekhez kötött béta sugárzású izotópok hatásának vizsgálatára is. Ez a modell alkalmasnak látszik a lipoprotein makromolekulához, mint hordozó vivőanyaghoz kapcsolt gyógyszerek hatásának és mikroszomás gyógyszer-technológiai eljárások értékmérésére.

Érelmeszesedést kiváltó táp alkalmazásával előidézhető hiperlipoproteinemia és érelmeszesedéses területek vizsgálata patkány (érelmeszesedésre nem érzékeny faj !) esetében.

2 hónapos tápetetés után a érelmeszesedéses elváltozásokat vizsgáltuk.

Azt tapasztaltuk, hogy patkányok és a nyulak között a lipoproteinek anyagcseréjében jelentős különbségek vannak. Patkányokban hatékony „tisztító rendszer” működik a lipoprotein maradványok (chylomicron,VLDL) eltávolítására. Ezek a maradványok legnagyobb mértékben a kísérletes hiperlipoproteinémiában, koleszterin etetés hatására képződnek. Megállapítottuk, hogy nagyobb koleszterinterhelés után a patkányokban is előidézhető érelmeszesedéses elváltozás.

Beültetett daganatok vizsgálata.

(csupasz, szórtelen egerekben)

A jelzett 'ligandumok' daganat szövetekben történő dúsulását szórtelen egér „xenograftokban” vizsgáltuk. Öt hetes, 17 – 20 gramm élősúlyú, szórtelen egerek hátbőre alá emberi daganat sejtszuspenzió (emberi eredetű osteosarcoma, vastagbél adenokarcinóma, gyomor adenokarcinóma) $10^7/0,1$ ml-ét oltottuk. A daganat beültetés után 3 héttel az egerek hátbőre alatt 0,2 –0,5 mg tömegű, jó vérellátású, sok osztódó sejtet, vérzéses- ill. elhalt területeket nem, vagy alig tartalmazó daganatszövet fejlődött ki.

A szórtelen egereket 15-30 MBq / 20 – 100 μ l jelzett ligandummal intravénásan oltottuk. Az oltás után 10, 30 perccel, 1, 2, 4, 24 órával, időpontonként 3-3 állatot öltünk le a vizsgálatokhoz. Az állatokból a következő mintákat gyűjtöttük: farok, vér, izom, csont, szív, pajzsmirigy, tüdő, máj, lép, vese, gyomor, vékony- és vastagbél, daganat. A vértelenített szervek súlyát és aktivitását mértük, majd a beadott dózist , teljes szerv/és grammszerv értékeket számoltuk ki.

A szórtelen egereket ketamin-HCl altatásban oltottuk, 50-150 MBq / 50 – 500 μ l jelzett ligandummal. Sorozatos felvételsorozatot készítünk a 0 –30 perc között 30x1 min idővel, majd egésztest felvételeket az befecskendezés után 30 perccel, 1, 2, 4, 24 órával. Az adatokat mennyiségileg (ROI-technika, idő-aktivitás görbék) értékeltük. A statikus felvételeken jól látható daganathalmozódás időpontjaiban mikro SPECT-technikával rétegfelvételeket is készítettünk.

A „standard bioassay” vizsgálat során a beadás után különböző időpontokban eltávolított teljes daganatszövet formalinos oldatba kerül. A félbe metszett daganatok egyik feléből HE festés után szövettani feldolgozás, a másik feléből autoradiográfias felvétel készült.

Lipoprotein hordozó makromolekulához kapcsolt vegyületek vizsgálata daganatos csupasz egereken:

Az LDL-ről ismeretes, hogy a daganatgátló, gyulladáscsökkentő gyógyszerek fő szállítója a véráramban. Gyógyszerek liposzómás vegyületei is a véráramban a lipoproteinekhez kötődnek és jutnak el a célsejtekhez. Megállapítottuk, hogy a csupasz egérbe ültetett daganatos sejtek és az áttétek terjedésének, illetve gátlásának vizsgálatára alkalmas modell az általunk módosított és jelzett lipoproteinek pl. ^{99m}Tc -vel jelzett oxidált-LDL. Jelzett lipoproteinnel megállapítható volt, hogy kb. 20-40 ezer oxidált-LDL kötőhely található a falósejteken.

Nyulak immunizálása eredeti és módosított lipoprotein alegységekkel:

Ismert, hogy ellenanyagok mutathatók ki az oxidált LDL-el szemben, bizonyos hiperlipoproteinemiás betegek vérsavójában

Az emberi natív és a módosított LDL is jó antigén tulajdonságokkal rendelkezik. A nyulak megfelelő immunizálásával magas titerű immunszérumokat tudunk termelni. A makromolekula antigenitása nem csak a fehérjéhez kötött, hanem a „lipidmagvaknak” is szerepe van az immunválasz kialakulásában. Magasabb titerű ellenanyag kinyerése érdekében Freud adjuvánssal kevert lipoprotein eleggyel immunizáltuk a nyulakat. Három hónapos immunizálás során 3-4 alkalommal megismételt lipoprotein antigén beadásával magas ellenanyag titerű vérsavót nyertünk.

In vitro sejtkötődési vizsgálatok

A jelzett ligandum daganatsejtekhez való kötődésének vizsgálata

Az in vitro sejtkötődés vizsgálatához a következő daganatsejtvonalakat használtuk:

MKN-45 (emberi gyomor adenokarcinóma), HT-29 (emberi kolon adenokarcinóma), LS-180 (emberi kolorektális adenokarcinóma), DMS-79 (emberi kissejtes tüdőkarcinóma), ZR-75-1 (emberi emlőkarcinóma), CMT-8 (kutya emlőkarcinóma), Saos-2 (emberi oszteosarkóma).

A felsorolt daganatokból tápfolyadékkal legalább 8, különböző sejtmennyiséget tartalmazó elegyet készítettünk. A jelzett ligandum azonos moláris mennyiségét 15-30 MBq / 10 μl fajlagos radioaktív koncentrációban mértük a sejtszuszpenziókhoz, majd 1 óráig, 37°C-on folyamatos keverés mellett történő inkubálás után 600 g-vel 5 percig történő centrifugálással a sejtfázist a felülúszótól szétválasztottuk. A két fázis aktivitásának mérésével meghatározzuk a sejthez kötődő és a szabad ligandumok arányát, majd a telítési görbék felvételével

vizsgáltuk a sejtek ligandum kötődési sajátságait. Az in vitro sejt-kötődés során fajlagos kötődést mutató sejtvonalakat a továbbiakban in vivo vizsgáltuk.

Jelzett LDL falósejtes jellegű felvételének a vizsgálata:

A keringő vér mononukleáris és polimorfonukleáris sejtjei a könnyű elválaszthatóság miatt alkalmas közegei az LDL részecskék endocitózis vizsgálatának. A sejtek inkubációs közegéből a jelzett LDL radioaktivitásának meghatározásával megállapítható volt az LDL felvételének a mértéke. Mononukleárisok elválasztása Ficoll-Uromiro grádiensen történt. Kimutattuk, hogy a normál mononukleárisok (Mo) és polimorfonukleárisok (PMN) a vérkeringésből az LDL „makromolekuláris komplexet” kötőhely közvetítette endocitózis (RME) révén, illetve az oxidált származékokat „scavenger” mechanizmussal, 5-10-szer gyorsabb mértékben vették fel.

Az eredmények hasznosítására vonatkozó elképzelés összefoglalása:

Vizsgálataink alapján lehetőség lesz „autológ” lipoproteinek kórjelzési vagy gyógyászati alkalmazására. Eredményeink hozzájárulhatnak, az érlelmeszesedés kórfejlődésének jobb megismerése mellett a lipoprotein készítmények hazai előállításához, mivel ilyen készítmények jelenleg nem kaphatók. A külföldi lipoprotein készítményeknek jelenleg szinte megfizethetetlen az áruk. Másrészt a termékek klinikai alkalmazásának helytől és időtől függő korlátai vannak – gondoljunk az izotópjelzésekre és lebomlási időre -, ezért elsősorban helyi előállítás szükséges az eredményes felhasználáshoz. Ezeknek a termékeknek a kifejlesztéséhez lipid- és radioaktív kutatási tapasztalatok és műszeres háttér kell. Hazánkban az érlelmeszesedéssel és rákos megbetegedésekkel összefüggő vizsgálatok száma milliós nagyságrendű. A betegellátásban a szűréshez és a kezeléshez számos különleges vizsgálat elvégzése szükséges és ehhez kínálnak lehetőséget az általunk kifejlesztett lipoprotein készítmények.