

A Proteoglycanok Szerepe a Spondylitis Ankylopoeticaban

TEMATIKUS OTKA PÁLYÁZAT 2004-2007

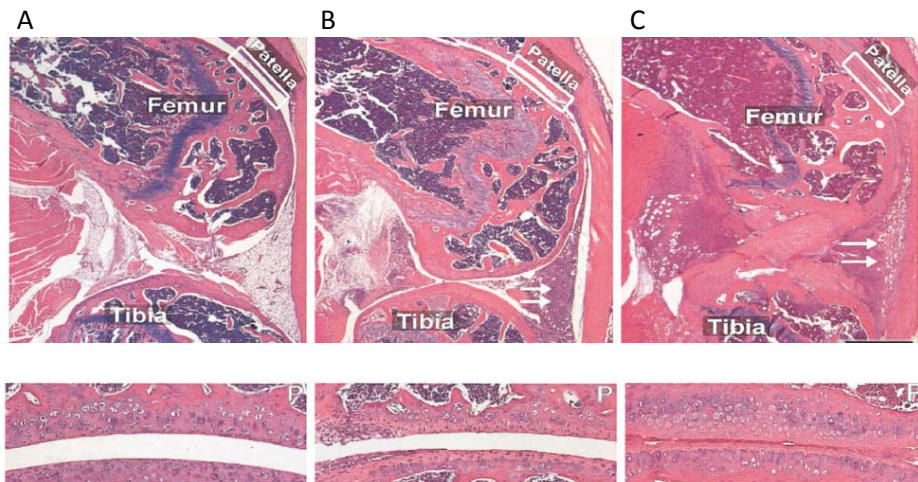
Szakmai zárójelentés

Az autoimmunitás kutatásában az állatmodellek használata felbecsülhetetlen értéket képviselnek, hiszen e modellek segítségével a betegségek lefolyása és pathológiája mellett jól követhetjük az immun rendszerben végbemenő folyamatokat, azok immundinamikáját.

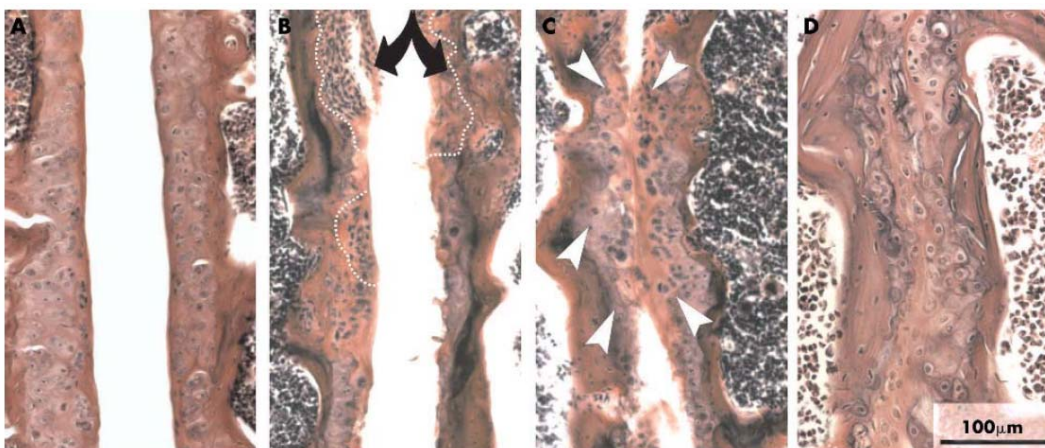
A chicagói Rush University-vel való közös kutatásunk során egy, korábban már jól megvizsgált állatmodellt, a proteoglycan (PG)/aggrekán indukálta arthritis modelljét használtuk fel. Ezen modell a humán rheumatoid arthritis egyik széles körben elfogadott állatmodellje, mely már számos tanulmányban részleteiben is ki lett vizsgálva. Néhány egéren észrevettük, hogy a harmadik injekció után kialakult perifériás arthritis mellett a gerinc mozgásai is erősen beszűkültek. Erre alapoztuk jelen kutatásunkat, mely során a PG immunizált egereknél a spondylitis, spondylarthrosis megjelenését vizsgáltuk.

Állatmodellel kapcsolatos kutatásunk ennek megfelelően alapvetően két fontos részből állt. A betegség megjelenését, annak lokalizációját szerettük volna pontosan leírni, valamint megérteni ezen gerincet érintő gyulladásos folyamat kapcsolatát a perifériás arthritisszel.

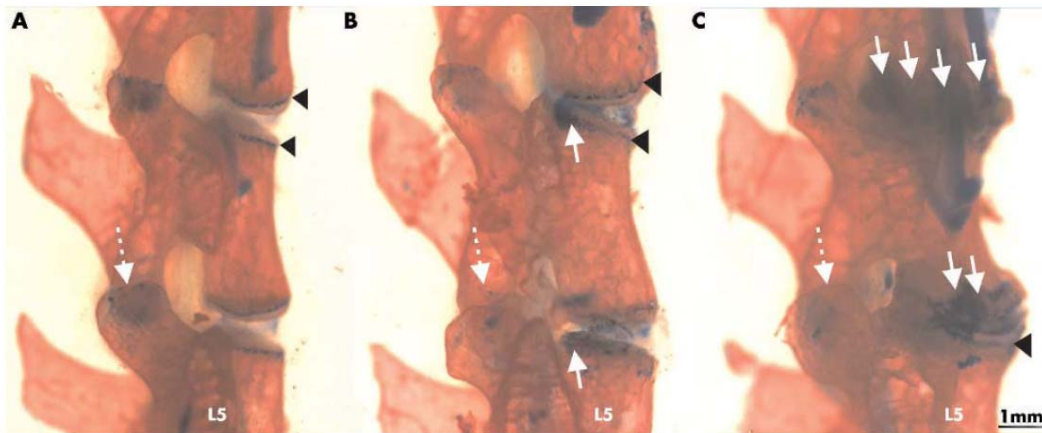
Az ízületek, és a gerinc érintettségét makroszkópos analízis mellett hisztológiai munkával vizsgáltuk. Szövettanilag a perifériás ízületek mellett (1. Ábra) a sacroiliacalis (2. Ábra) és a gerinc érintettségét is vizsgáltuk (3-4. Ábra). Nagyszámú egér kísérlet segítségével sikerült a betegség minden stádiumában vizsgálni az egereket, mind a perifériás ízületekben, mind pedig a centrális-axiális skeletont érintően. Ezek pontos előrehaladását részletes hisztológiai munkával dokumentáltuk.



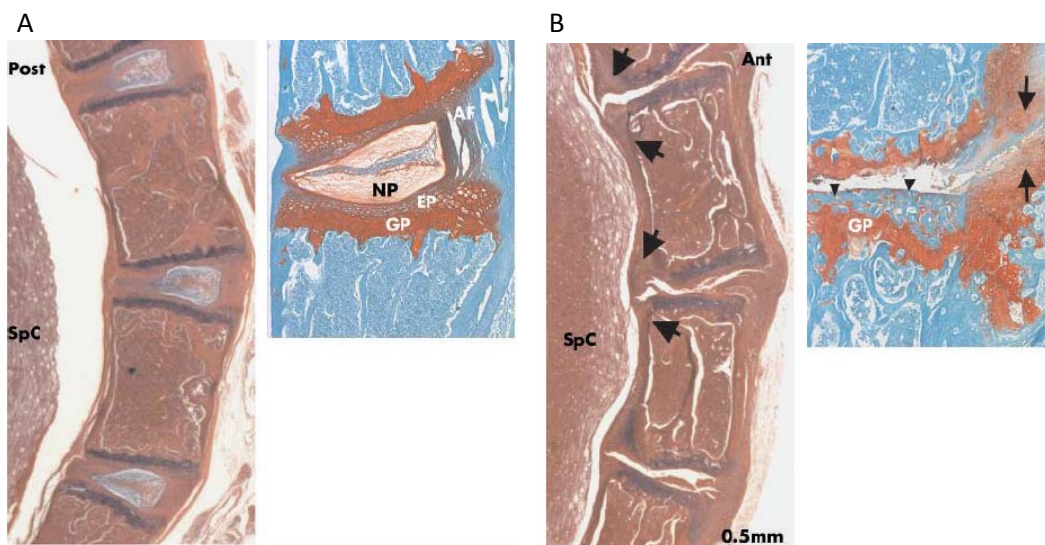
1. Ábra A perifériás arthritisz megjelenése egérenél proteoglikán indukálta arthritiszben. Az alsó sorban mutatott panelek a felső paneleken kiemelt patellofemorális ízületi részek nagyított képei. A-normál térdízület, B-kezdődő arthritisz gyulladással infiltrációval, C- előrehaladott arthritisz fulmináns gyulladással invázióval és porcárosodással.



2. Ábra A sacroiliacalis (SI) ízület gyulladásának és teljes elmerevedésének lépései időrendben A-normál SI ízület, B- gyulladással, pannusos infiltráció, C-porcsoz elfajulás az ízületben, D- a SI ízület teljes elmerevedése



3. Ábra Makroszkópos lumbalis gerinc készítmények a gerinc érintettségének vizsgálatára. A- normál gerinc, B-kezdődő spondylitis, C- teljes ankylosis a lumbalis gerincen. Alzarin vörös és alcian kék festés.



4. Ábra A cervikális gerinc histológiai elemzése normál (A) és spondylarthritis (B) egerekben. A kis nagyítású hematoxylin eosin metszeteken jól látszik a kialakuló discopathia, mely a gerincvelő kompresszióját is okozza. A SafraninO-fast green metszeteken jól követhető az intervertebrális diszkuszok proteoglikán vesztése.

A betegség genetikai meghatározottságának megállapításához fontosak a betegség incidenciá mutatói. Azt találtunk, hogy az egyébként 100%-ban arthritiszre hajlamos egértörzsből (BALB/c) a gerinc érintettsége mintegy 70% volt. Míg a kísérlet 11. hetére az egerek 98%-a már mutatott perifériás arthritiszre utaló klinikai jeleket, a gerinc érintettsége csak jóval ezen jelek megjelenése után, kb. a 16-36. héten jelent meg. Ez a jelenség már arra figyelmeztetett bennünket, hogy elképzelhetően itt két, valamelyest különálló betegségről van szó, de ennek bizonyítását csak olyan esetben tudnánk vizsgálni, ahol a perifériás arthritisz megjelenése nem éri el a 100 %-ot. Mivel a BALB/c egerek szingenikusak, tehát genetikai állományuk teljes egészében azonos ezen egereket egy olyan egértörzsszel kereszteztük (DBA/2) mely teljes egészében rezisztens a PG indukálta perifériás arthritiszre. Az F1 generáció hasonlóan a szülőkhöz teljes egészében egységes genetikával rendelkezik (minden egyed tisztán heterozigóta) és ezen egyedek teljes egészében rezisztensek a perifériás arthritiszre. (Érdekes módon már ezen egerek között is találtunk spondylitises egyedeket, bár csak igen alacsony számban.) Az F2 generáció már teljes egészében inhomogén, hiszen minden egyedben keverednek a szülőktől származó gének, és azon betegségek, melyek genetikailag determináltak, illetve melyekre való hajlam ezúton meghatározott, ebben a generációban a gének dominanciájának megfelelő hányadban meg is jelennek.

A BALB/c-DBA/2 F2 generációban mintegy 44%-ban arthritisz alakult ki az egereknél, és meglepő módon az egerek 61%-ban találtunk gerinc érintettséget. Volt kb. 5%, ahol az arthritisz spondylitisz nélkül alakult ki és mintegy 23%, ahol pedig a spondylitisz jelent meg az egereknél anélkül, hogy perifériás arthritist találtunk volna. Ezen eredmények birtokában kijelenthetjük, hogy bár nagy valószínűséggel van számos olyan gén, mely mindkét betegség kialakításában részt vesz, a PG indukálta spondylitisz, valamint a PG indukálta perifériás arthritisz külön entitást képvisel. Ezen eredményünk alapját képezheti egy későbbiekben tervezett genomiális szűrésnek, mely során az F2 populációban megjelenő betegségek genetikai hátterét elemezve betegségért felelős gén lokuszokat tudunk azonosítani, melyet összevetve az egér és a humán genom térképekkel, úgynevezett

candidate géneket azonosíthatunk, melyek a humán autoimmun arthritisben, ill. spondylitisben fontos szerepet játszanak.

Az hogy pontosan mely antigén, mely fehérjének melyik epitópja az, mely ezen betegségek triggereként szerepel még további vizsgálatok tárgya kell, hogy legyen. Feltételeztük azonban, hogy a humán betegeknél is hasonló autoimmun folyamatok eredményeként alakulhat ki olyan betegség, mint a spondylitis ankylopoetica, vagy éppen a postoperatívan ismert és rettegett failed-back szindróma. Annak érdekében, hogy ezen betegek immunfolyamatait vizsgáljuk, klinikánkon 35 gerincműtéten átesett betegtől vettünk preoperatívan, majd korai postoperatív szakban, és a késői után követés során szérumot azzal a céllal, hogy a betegeknél esetlegesen kialakuló autoantitesteket azonosíthassuk. Munkánk során a tisztított és megfelelően fagyasztva tárolt szérumokból humán porcból kivont crude extractum, valamint speciális humán porcból származó fehérje (kollagén, proteoglikán) ellenes antitest vizsgálatokat végeztünk. A gerinc műtétek során számos kisízület megbontása történik, az ott jelenlevő porc egy részét eltávolítjuk, a kisízületek tokját felnyitjuk. Ennek megfelelően azt vártuk, hogy bizonyos porc konstituens ellenes antitestek egyértelmű felszaporodását kapjuk a műtétek után. Ennek ellenére, az általunk összegyűjtött mintákban nem találtunk szignifikáns emelkedést a porc ellenes autoantitestek között, mely arra utal, hogy a human esetekben csak az ízületi immunoprivilegizált antigének megjelenése nem elég arra, hogy komoly autoantitest termelés induljon be. Azt feltételezzük, hogy az immunoprivilegizált antiének expozíciója nem elégséges egy autoimmun folyamat megindulásában, hanem ehhez hasonlóan fontos a hajlamosító genetikai háttér is. Nagy valószínűséggel ezen eredményeink birtokában további méréseket végzünk majd olyan, genetikailag veszélyeztetett betegeknél, (pl. RA), akiknél egy ilyen, vagy valamely ehhez hasonló porc invazív műtét nagyobb eséllyel indukálhat autoantitest termelést.

Eredményeinket összefoglalva kijelenthetjük azt, hogy a pályázat során kitűzött célt illetően (a proteoglycanok szerepe a spondylitisekben), valamelyest közelebb kerültünk a megoldáshoz. Bár elsősorban állatkísérleti eredményekre alapozzuk jelen teóriánkat, jelenleg úgy tűnik, hogy az arthritis és a spondylitisek genetikai háttere nem teljesen egyezik meg, ugyanakkor nagy valószínűséggel a porcban és a porckorongokban megtalálható aggregán szerepe mindkét esetben egyértelmű. Kísérleteink alapján nagyobb genetikai szűrést tervezünk a közeljövőben, mely akár egy gén szintjére is képes szűkíteni ezen betegségek okát.