

A kutatást a kutatási terv 2. pontjában tervezett tevékenységekkel kezdtük. Tekintettel arra, hogy 2008-ban érkezett meg az etikai engedély állatkísérlet elvégzésére, a projekt elkezdése elhúzódott.

A vizsgálatok első lépéseként egérmodellt állítottunk be az UV fény toleranciakeltésben fontos optikai paramétereinek meghatározásához.

CBA és Balb/c nőstény egerek bőrét kezeltük fénykezeléssel. Fényforrás: a Rhinolight Kft. által készített kevert UV/VIS fényforrást használtuk, mely 5% UVB, 25% UVA, 70% látható (VIS) fényt tartalmaz.

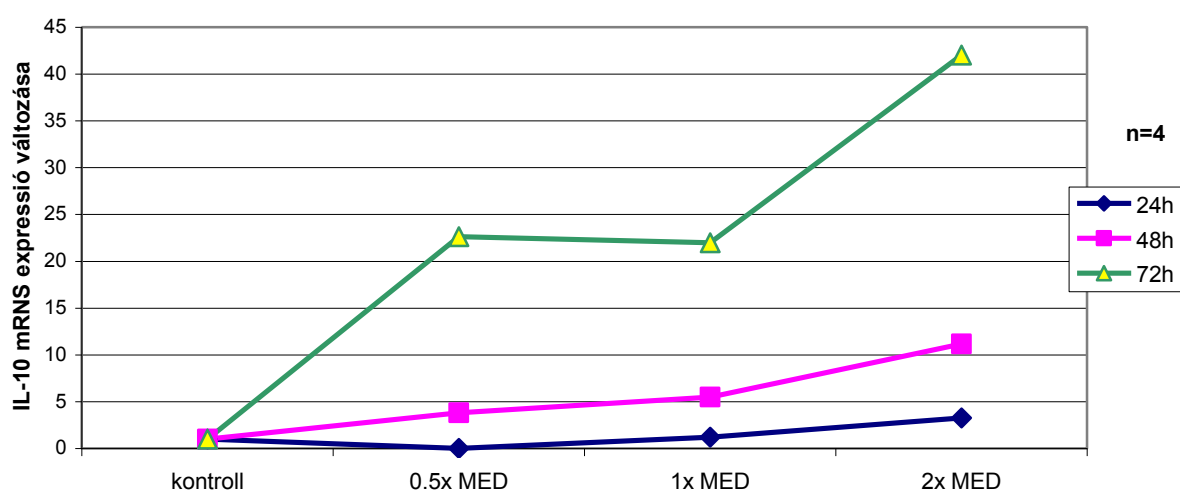
Besugárzás: minden esetben meghatároztuk a minimális erythema dózist (MED). A hasi bőr besugárzása után az egereket 24, 48, 72h elteltével feláldoztuk, a besugarazott és a kontroll területeket eltávolítottuk.

IL10 és TGF- β mRNS meghatározása: az eltávolított irradiált és kontrollszövetmintából az mRNS-t kivontuk, majd real-time PCR-t végeztünk IL-10 és TGF- β primerrel. A message mértékét a konstitutívan expresszálódó 18s message mértékéhez viszonyítottuk.

TGF- β mRNS expresszió mértéke nem növekedett a fénykezelést követően, ezért azt a továbbiakban nem vizsgáltuk.

Az a korábbi eredményeknek megfelelően igazolható volt, hogy a kevert fényforrás hatékonyan indukál IL-10 mRNS expressziót

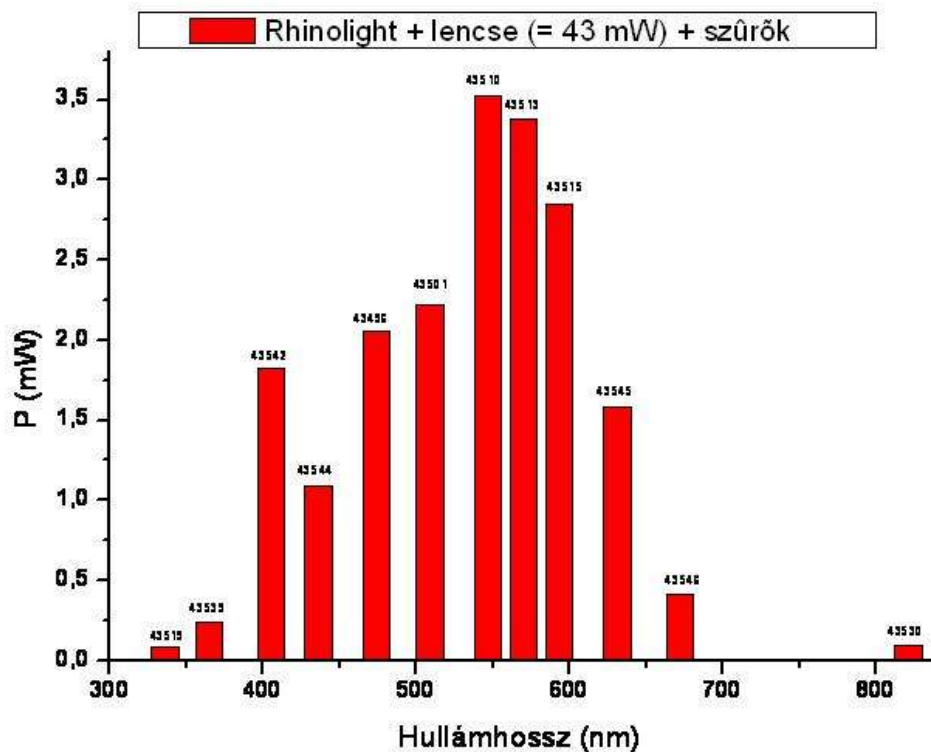
IL-10 relatív expresszió növekedés egérbőrben a besugarazatlan kontrollhoz képest



1. ábra: IL-10 mRNS mennyisége egér bőrben kevert UV/VIS besugárzást követően. 4 párhuzamos átlagolt eredménye

Ezt követően a munkatervnek megfelelően az IL-10 mRNS indukció függését vizsgáltuk a legfontosabb optikai paramétereiktől. Tehát a különböző hullámhosszú fény által indukált IL-10 mRNS indukció mértékének különbsége alapján az UV és látható fény akció spektrumának meghatározását tűztük ki célul.

Már korábban meghatároztuk a fényforrás emissziós spektrumának csúcsait, majd ezen 12 csúcsonk megfelelő 20 nm szélességű optikai filtert gyártattunk le. A filterekhez egy olyan fókuszáló lencsét használtunk, mellyel a fényt a fényforrás 6 mm átmérőjű kör alakjában emittálja. A különböző filterek által átengedett fény intenzitását spektrométerrel kvantitáltuk.

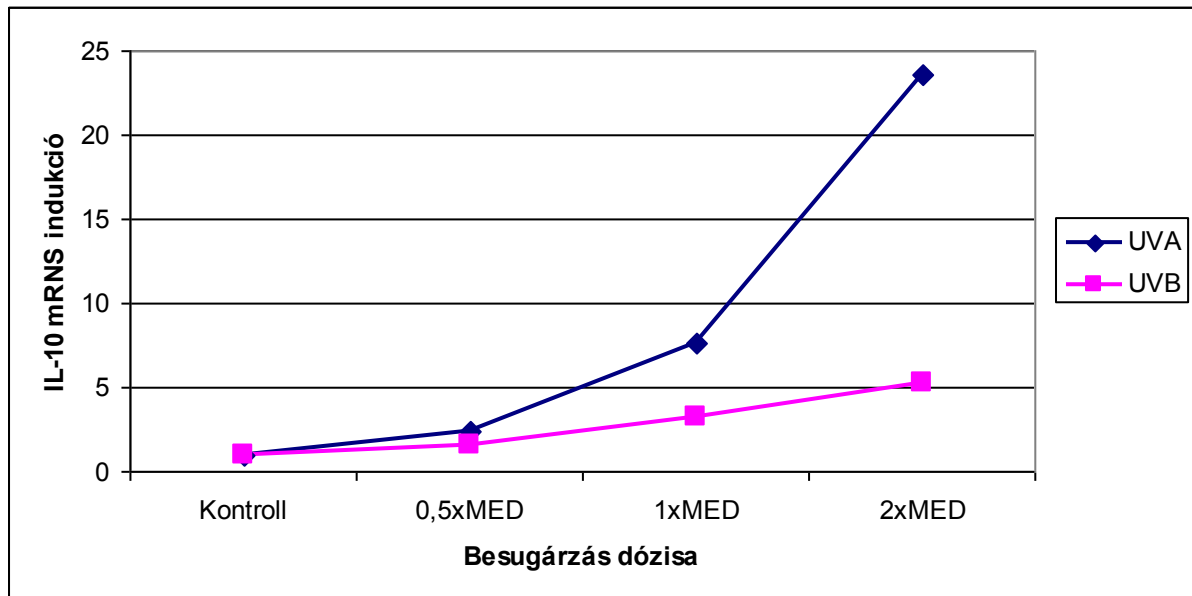


2. ábra: A Rhinolight fényforrás fényintenzitása az általunk legyártatott különböző filterek alkalmazása után.

Látható, hogy az általunk korábban beszerzett 20 nm hullámhossz szélességű szűrők túl kicsiny intenzitású fényt transzmittáltak. A biológiai hatás szempontjából elégséges energiasűrűség leadásához olyan hosszú ideig tartó besugárzás lenne szükséges, mely technikailag kivitelezhetetlen. Ezért elhatároztuk, hogy az UV spektrumot csupán két részre, UVA és UVB spektrumra bontottuk filterek segítségével és ezen tartományok IL-10 mRNS

expresszióra gyakorolt hatását vizsgáljuk.

A vizsgálatok alapján a kombinált UVA+UVB+VIS fény hatékonyan indukál IL-10 expressziót egérbőrben. Az indukció dózis-és időfüggést mutat.



3.ábra. Megszűrt UVA, illetve UVB fény által okozott IL-10 expressziónövekedés egérbőrben (24h)

Amennyiben a fényspektrumot UVA és UVB komponensekre bontottuk, mindkét tartomány IL-10 expressziónövekedést okozott. Mind az UVA, mind az UVB fény 0,5x MED-et elérő dózis felett hatékonyan indukált IL-10 mRNS-t az egérbőrben. Ez UVA fény esetében 4 percnél hosszabb, UVB fény esetében legalább 8 másodperc besugárzást jelentett az általunk használt Rhinolight fényforrással. Ebből következik, hogy a klinikailag használatos besugárzási dózisok és idők alatt (8-64 sec) az UVA fény nem képes sem erythemát, sem jelentős IL-10 expressziót indukálni, a kombinált UVA+UVB fényforrás IL-10 indukációs képessége adataink szerint elsősorban az UVB hullámhossz tartománynak tulajdonítható. Ezek alapján megállapítható, hogy az IL-10 mRNS indukció szempontjából egy UVB túlsúlyú, 0,5xMED és 4xMED közötti dózisú fénnel történő besugárzás az ideális, legalább 24 órával a kívánt hatás elérése előtt.

AZ is egyértelművé vált, hogy a kevert fény által okozott, immuntoleranciakeltés szempontjából fontos IL-10 expressziónövekedés elsősorban az UVB komponensnek

köszönhető.

A 2. kutatási pont így teljesítettnek tekinthető.

Az 1. kutatási ponthoz ezt követően láttunk.

Először a Treg sejtszám vizsgálatának módszerét állítottuk be. Balb/c egerek lépéből sejtszuspenziót készítettünk. Erythrocyta lysis követően a sejteket fixáltuk és anti-CD4-APC, valamint anti-CD25-PE monoklonális ellenanyagokkal jelöltük. A méréseket FACS Calibur áramlási citométeren végeztük. A lymphocyták méret-és granuláltság alapon történő kiválasztása után a CD4+ és CD25+hi (erősen pozitív) kettős pozitív sejtek arányát számoltuk meg. Mintánként 10000 lymphocytát elemeztünk.

A Treg sejtszám beállítása megtörtént.

Az állatetikai engedély megszerzése elhúzódott, ezért az állatkísérleteket a tervezettnél később tudtuk elkezdni.

Eközben a vezető kutató munkahelye megváltozott, a Szegedi Egyetemen csak részállásban maradt, és az Országos Onkológiai Intézetben kapott állást. Az ingázás és a technikai nehézségek is erősen hátráltatták a tervezett ütem szerinti haladást.

2010. januártól a vezető kutató Franciaországban dolgozik, ezt be is jelentettem, emiatt idő előtt kellett lezárnom a projektet.

A CBA/JxDBA/2J vetélő egérmodell beállítására, a vetélések során a Treg sejtszám elemzésére és a fotoadjuváns immunterápia elvégzésére már nem maradt idő a fenti nehézségek miatt.

Ezért az OTKA pályázat munkatervét nem tudtam teljesen kivitelezni, az 1. munkatervi pont részben, a 2. pont teljesen, a 3. pont egyáltalán nem került teljesítésre.

Természetesen a tervezett költségek töredékét költöttük csak el. Az anyagbeszerzésre kapott összeg nagyrésze, a kongresszusi részvételre allokált pénz egésze visszafizetésre kerül.

Nagyon sajnálom, hogy a fentiek miatt nem tudtuk a kísérleti munkát befejezni, de meggyőződésem, hogy az OTKA által biztosított források kisebb részét költöttük el, mint amekkora részét teljesítettük a munkatervnek.

Közlemény nem született ebben a témakörben még.