

## SZAKMAI ZÁRÓ BESZÁMOLÓ

A pályázat munkatervében 4 cél megvalósítását foglalmaztuk meg, melyek elvégzésével pontosabb betekintést kaptunk a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek szénhidrát anyagcserében betöltött szerepére vonatkozóan. Az eredeti munkatervnek megfelelően az elvégzett kísérletek az alábbiak szerint 4 részre tagolódtak:

1. Megvizsgáltuk, hogy a 2-es típusú cukorbetegségben a hasnyálmirigy inzulintermelő béta sejtjeinek számának csökkenésében és az inzulin rezisztencia kialakulásában a kapszaicin-érzékeny szenzoros rostok milyen szerepet játszanak.
2. Megvizsgáltuk, hogy a hasnyálmirigyet szenzoros idegekkel ellátó gerincvelői hátsó gyöki idegdúc (dorsal root ganglia, röviden: DRG) lokális kapszaicin kezelése lassítja-e a betegség progressióját
3. Megvizsgáltuk a kapszaicin-érzékeny idegek szerepét a krónikus thiazolidinedione terápia hatékonyságában
4. Mintákat gyűjtünk annak vizsgálatára, hogy az emberi hasnyálmirigyben hogyan változik a Langerhans szigetsejtek neuropeptid- és hormon tartalma

A kapott eredményeimet az alábbiakban foglalom össze, részletesen kitérve az alkalmazott vizsgálati módszerekre, a kapott eredményekre valamint az ezen eredményekre támaszkodó, további kutatási lehetőségekre és azok gazdasági hasznosíthatóságára, valamint (amennyiben volt) a tervezettől való eltérés okára.

*Ad 1. Annak vizsgálata, hogy a NIDDM-ban a béta sejtek számának csökkenésében és az inzulin rezisztenciában a kapszaicin érzékeny szenzoros rostok milyen szerepet játszanak.*

A kísérlethez Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) patkányokat használtunk, melyeket standard állatházi körülmények között (12-12 órás nappal-éjszaka periódus, 20-25 °C, 50-70% relatív páratartalom, standard laboratóriumi táp és csapvíz) tartottunk. E modell állatok jellegzetessége, hogy a CCK-1 receptor genetikai hibája következtében az állatok folyamatosan esznek, elhíznak és ez inzulin rezisztenciához és végül NIDDM-hez vezet (1). Az állatokat 6 hetes korukban (érkezést követően 1 héttel) 2 csoportra osztottuk (csoportonként 12-12 állattal), az egyik csoportot

szisztémásan kapszaicinnal (lásd alább), míg a kontroll csoportot a kapszaicin vivőanyagával a korábban már leírt módon (2) előkezeltük E kezelést követően az állatok metabolikus paramétereit folyamatosan regisztráltuk 19 héten keresztül. Ennek során heti rendszerességgel meghatároztuk a testsúlyban bekövetkezett változást, az átlagosan elfogyasztott napi étel és víz mennyiségét valamint az ürített széklet és vizelet mennyiségét. Az anyagcsere paraméterek mérését metabolikus ketrec (Tecniplast, Olaszország) felhasználásával végeztük. A kezelést követő 18. héten orális glükóz tolerancia tesztet végeztünk, majd ezt 1 héttel követően hyperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp mérést végeztünk, illetve mindkét kezelési csoportból 3-3 állatban <sup>3</sup>H-glükóz felhasználásával meghatároztuk a bazális (éhgyomri) és a HEGC steady state állapotban az inzulin stimulált endogén glükóz termelést. Az éhgyomri vércukor és plazma inzulin eredményekből meghatároztuk a hasnyálmirigy  $\beta$  sejteinek funkciójára utaló HOMA-B% indexet.

## **ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

### **Kapszaicin előkezelés**

Az állatokat elbódítottuk (30 mg/kg pentobarbital ip), majd a dorsalisán subcutan a nyak bőre alá 50 mg/kg kapszaicin fecskendeztünk. A teljes éberségi állapot visszatérése után az állatok visszakerültek az állatházba. A kezelés sikerét a szembe cseppentett kapszaicinre adott válasz hiánya igazolta. Csak olyan állatot vontunk be a kapszaicinnal kezelt csoportba, amelyeknél ily módon sikerült a kapszaicin előkezelés hatékonyságát visszaigazolni. A kontroll csoportot hasonló módon, a kapszaicin oldószerével kezeltük (fiziológiás sóoldat, Tween 80 és etanol 8:1:1 arányú oldata).

### **Metabolikus változók meghatározása**

A metabolikus paraméterek meghatározásához metabolikus ketrecet (Tecniplast, Olaszország) használunk és a következő paraméterek mérését foglalja magába: napi testsúly változás (g), naponta elfogyasztott táp (g) és víz mennyisége (ml), napi ürített vizelet (ml) és széklet (g) mennyisége. E paraméterek meghatározását 3 napos (péntek-vasárnap) akklimatizáció előzi meg.

### **Orális Glükóz Tolerancia Teszt**

Az állatokat a kísérlet előtti nap estéjétől (kb. 16 órán át) éhezettük. A kísérlet napján a farok vénájából nyert vénás vérből meghatároztuk az éhgyomri vércukorszintet, majd orálisan

gyomorszondán keresztül 1g/kg glükózt adtunk és az ezt követő 15., 30., 60. 90. és 120. percben a farokvénából nyert vérből meghatároztuk a vércukor szintet. A kísérlet végén az állatok visszakerültek az állatházba.

### **Teljes test inzulinérzékenység meghatározása**

A teljes test inzulinérzékenység meghatározására hyperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp (HEGC) módszerrel, a kapszaicinnel vagy oldószerrel történt előkezelést követő 19. héten került sort (3). A kísérletet megelőzően az állatokat 16 órán át éhezettük, majd tiopentállal (Trapanal 50mg/kg, i.p.) elaltattuk. Behelyeztünk 2 vénás kanült a véna juguláris két szárába cukor és inzulin adás céljából, egy artériás kanült vérvétel (vércukor és plazma inzulin meghatározáshoz) valamint szisztémás vérnyomásmérés céljából illetve légcső kanült, az átjárható légutak biztosítása céljából. A műtétet követően az állatokat kb. 30 percig magukra hagytuk, hogy az esetlegesen a műtét során fellépő stressz hatása lecsillapodjék. Ezt követően vért vettünk (1 ml) az éhgyomri vércukor és a plazma inzulin meghatározáshoz, majd elindítottuk az inzulin infúziót 6 mU/kg/min sebességgel. Az inzulin infúzió 120 percen keresztül tartott, ez alatt az idő alatt a vércukorszinten 5-10 percnként ellenőriztük és az inzulininfúzióval párhuzamosan elindított cukorinfúzió sebességét úgy változtattuk, hogy a vércukor értéke folyamatosan  $5.5 \pm 0.5$  mmol/L maradjon. A 120. perc végén újra vérvétel történt plazma inzulinszint meghatározáshoz. A teljes test inzulinérzékenységet a 90. és 120. perc között mért átlagos cukorinfúziós sebesség (mg/kg/min) jellemzi. A HEGC végén az állatokat túlaltattuk (thiopental 100 mg/kg iv). A vércukor meghatározás 1 csepp vérből történt glükóz oxidáz módszer segítségével (Accu Check Active, Roche, Magyarország).

### **Bazális és Inzulin-stimulált Endogén Cukortermelés Meghatározása**

A műtéti előtti előkészületek és a műtét során elvégzett beavatkozások mindenben megegyeznek a HEGC során leírtakkal, azzal az eltéréssel, hogy egy 3. vénás kanül került beültetésre a  $^3\text{H}$ -glükóz infúzió számára. A műtétet követő nyugalmi periódus után 5  $\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -glükózt adtunk bolusban, majd 0.15  $\mu\text{Ci}/\text{min}$  sebességgel folyamatos, 180 percig tartó infúziót indítottunk. A radioaktív cukorinfúzió indítása előtt (a 0. percben), majd a 60., 120., 150., 160., 170. és 180. percben vérmintát vettünk a radioaktivitás meghatározása céljából. A 0. percben vett minta szolgált az éhgyomri mintaként a vércukor és plazma inzulinszint illetve a HOMA indexek kiszámításához. A 60. percben levett minta alapján számítottuk a bazális, míg a 150-180 perc között levett minták átlagából az inzulin-stimulált endogén cukortermelés értékeit.

## **Plazma inzulinszint meghatározás, HOMA-IR és HOMA-B% indexek**

A kísérlet elején, az inzulin infúzió megkezdése előtt, valamint a HEGC steady state (90.-120. perc) alatt került sor vérvételre plazma inzulinszint meghatározás céljából. A levett vért (4 °C, 2 perc, 10.000 rpm) lecentrifugáltuk és a plazmát levettük és lefagyasztottuk -70 °C-ra amíg nem került sor az inzulinszint meghatározásra. A plazma inzulinszintet kereskedelmi forgalomban kapható RIA kitt segítségével határoztuk meg (4).

A HOMA-IR index meghatározás a szervezet inzulinérzékenységének meghatározására szolgáló egyszerű módszer, mely az éhgyomri inzulin és vércukorszint ismerete alapján ad felvilágosítást a teljes test inzulinérzékenységre (éhszint vércukor (mmol/L) x éhszint plazma inzulin ( $\mu\text{U/ml}$ )/22.5). Minél alacsonyabb ez az érték, az inzulinérzékenység annál jobb (5).

A HOMA-B% index a hasnyálmirigy inzulintermelő sejtjeinek a szekréciónak kapacitására ad felvilágosítást és az alábbi képlet szerint számítható: éhszint plazma inzulinszint ( $\mu\text{U/ml}$ ) x 20/(éhszint vércukor (mmol/l)-3.5). Minél magasabb ez az érték, a sejtek szekréciónak annál kifejezettebb (5).

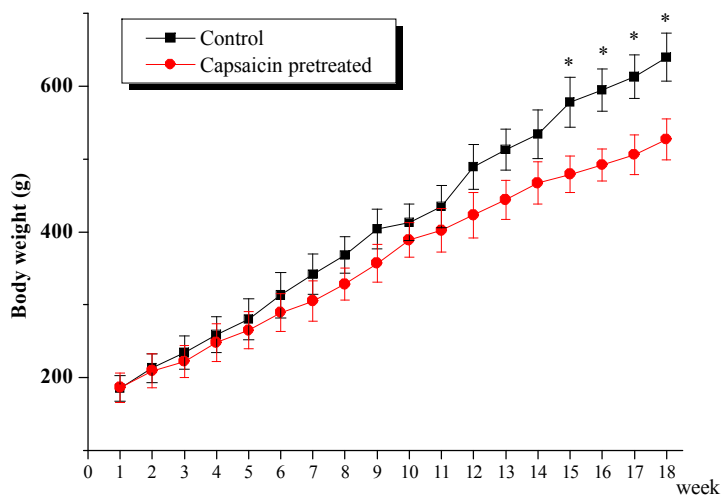
## **Statisztika**

Az eredmények a statisztikai átlagot és annak a standard deviációját mutatják. A statisztikai számítás ANOVA szerint végeztük, majd Bonferroni szerint módosított t-próbát végeztünk. Akkor tekintettünk valamit szignifikáns eltérésnek, ha  $p < 0.05$  volt (6).

## **EREDMÉNYEK**

### **A kapszaicin kezelés hatása a metabolikus változókra**

A kapott eredményeket az 1. ábra illetve az 1. táblázatban foglaltam össze. A kapszaicin előkezelt csoport testsúlynövekedése elmaradt az oldószerrel kezelt kontroll csoporttól, mely eltérés a kezelést követő 15 héten vált szignifikánssá. A többi metabolikus változóban nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns különbség.



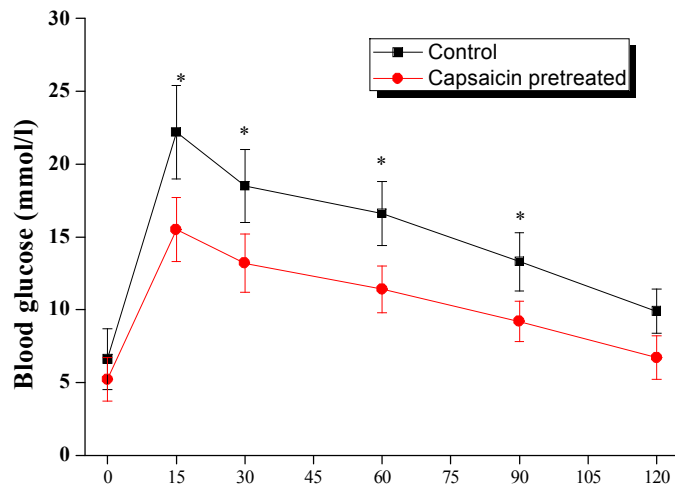
1. ábra. A kapszaicin előkezelés hatás a testsúly változására OLETF patkányban. A \*-gal jelölt értékek szignifikáns eltérést mutatnak az oldószerrel kezelt kontroll csoport hasonló értékeitől.

	Elfogyasztott táp (g)	Elfogyasztott víz (ml)	Ürített széklet (g)	Ürített vizelet (ml)
<b>Kontroll</b>	32.3±3.2	36.7±4.2	28.8±3.0	18.5±1.9
<b>Kapszaicin kezelt</b>	31.9±3.1	37.8±3.8	29.4±2.7	18.9±1.8

1. táblázat. A kapszaicin előkezelés hatása a metabolikus változókra OLETF patkányban. Az egyes összetartozó értékek között nincs statisztikailag szignifikáns eltérés.

### A kapszaicin kezelés hatása a vércukorváltozásra Orális Glükóz Tolerancia Teszt során

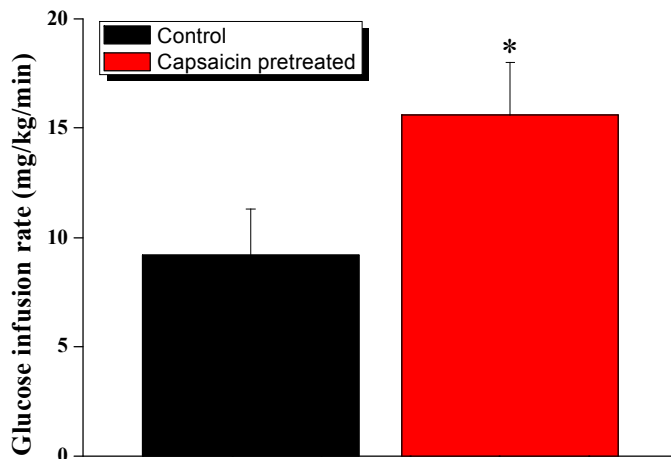
A kapszaicinnal kezelt állatok éhgyomri vércukorértéke valamivel alacsonyabbnak adódott, mint a kontroll csoporté, azonban nem ért statisztikailag szignifikáns szintet. Ugyanakkor az orális glükózterhelésre kapott vércukor emelkedés a kapszaicin kezelt állatokban szignifikánsan kisebb volt, amit mutat az egyes időpontokban mért alacsonyabb vércukorérték (2. ábra.) illetve a görbe alatti területek közötti szignifikáns különbség is mutat (kontroll: 1844±124 vs kapszaicin kezelt: 1287±87).



2. ábra. A kapszaicin előkezelés hatása a vércukorváltozásra OGTT során OLETF patkányban. A \*-gal jelölt értékek szignifikáns eltérést mutatnak az oldószerrel kezelt kontroll csoport hasonló értékeitől.

### A kapszaicin kezelés hatása a teljes test inzulinérzékenységre valamint a bazális és inzulin-stimulált cukortermelésre

A kapszaicinnal kezelt állatok perifériás szöveteinek inzulin iránti érzékenysége szignifikánsan javult a kontroll OLETF patkányokhoz képest (3. ábra), azonban nem éri el az egészséges patkányokban mérhető szintet (Long Evans Tokushima Otsuka (LETO) patkány inzulinérzékenysége HEGC alatt:  $28.2 \pm 3.5$  mg/kg/min – korábbi kísérletek alapján).



3. ábra. A kapszaicin előkezelés hatására a teljes test inzulinérzékenység szignifikánsan javul OLETF patkányban HEGC mérés során. A \*-gal jelölt érték szignifikáns eltérést mutatnak az oldószerrel kezelt kontroll csoport hasonló értékétől.

Hasonló eredményt kaptunk, amikor  $^3\text{H}$ -glükóz felhasználásával meghatároztuk a bazális és inzulinstimulált endogén cukortermelésértékeit. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a kapszaicin kezelt állatokban kevésbé súlyos inzulinrezisztencia alakul ki a kontroll OLETF patkányokhoz képest (2. táblázat).

	Bazális endogén glükóz termelés (mg/kg/min)	Inzulin stimulált endogén glükóz termelés (mg/kg/min)
Kontroll	7.54±1.5	6.77±1.2
Kapszaicin kezelt	12.9±3.1*	2.8±1.1*

2. táblázat. A kapszaicin előkezelés hatás a vércukorváltozásra OGTT során OLETF patkányban. A \*-gal jelölt értékek szignifikáns eltérést mutatnak az oldószerrel kezelt kontroll csoport hasonló értékeitől.

A kapszaicin kezelés hatása az éhgyomri vércukor és plazma inzulin értékekre illetve az ezekből számított HOMA-IR és HOMA-B% indexekre

A kapszaicin kezelt állatok éhgyomri vércukorszintje alacsonyabb volt, mint a kontroll csoporté, azonban az eltérés nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. Az éhgyomri plazma inzulinszint a kapszaicin kezelt állatokban szintén alacsonyabb volt, mint a kontroll OLETF állatoké (3. táblázat). Ugyanakkor az egészséges LETO patkányok vércukor ( $4.2 \pm 0.6$  mmol/L) és plazma inzulinszintje ( $13.3 \pm 2.3$   $\mu$ U/ml) szignifikánsan alacsonyabb, mint a kapszaicin kezelt OLETF állatoké (a LETO adatok nem e pályázat keretében készültek).

	Éhgyomri vércukorszint (mmol/L)	Éhgyomri plazma inzulinszint ( $\mu$ U/ml)	HOMA-IR	HOMA-B%
<b>Kontroll</b>	$6.6 \pm 0.7$	$80.2 \pm 9.2$	$23.5 \pm 2.1$	$517 \pm 36$
<b>Kapszaicin kezelt</b>	$5.7 \pm 0.6^*$	$48.4 \pm 6.2^*$	$11.2 \pm 0.9^*$	$569 \pm 32$

**3. táblázat.** A kapszaicin előkezelés hatás az éhgyomri vércukor és plazma inzulinszintre illetve az ezen értékek alapján számított HOMA-IR és HOMA-B% indexekre. A \*-gal jelölt értékek szignifikáns eltérést mutatnak az oldószerrel kezelt kontroll csoport hasonló értékeitől



*Ad. 2. Annak vizsgálata, hogy a pankréaszt szenzoros idegekkel ellátó DRG lokális kapszaicin kezelésével elérhető-e a betegség progressziójának lassítása*

A kísérlethez non-obese diabetic (NOD) egereket használtunk, melyeket standard állatházi körülmények között (12-12 órás nappal-éjszaka periódus, 20-25 °C, 50-70% relatív páratartalom, standard laboratóriumi táp és csapvíz) tartottunk. E modell állatok jellegzetessége, hogy az elhízás következtében a humán 2-es típusú cukorbetegsége jellemző tüneteket produkálják. Az állatokat 3 csoportra osztottuk (csoportonként 12-12 állattal), az egyik csoportot szisztémásan, egy másikat lokálisan kezeltük kapszaicinnel (lásd alább), míg a kontroll csoport a kapszaicin oldószerét (lásd fentebb) kapta szubkután.

## **ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

### **Kapszaicin előkezelés**

A szisztémás kapszaicin előkezelést ugyanúgy csináltuk, mint az OLETF patkányok esetében (lásd fentebb). A lokális kapszaicin kezeléskor állatokat elbódítottuk (30 mg/kg pentobarbital ip), majd a dorsalisán a gerinc mentén a thoracalis 8-11 szakasz mentén felkerestük a hátsó gyöki idegdúcokat és kapszaicinnel átitatott vatta darabot helyeztünk köréjük 20 percre, majd eltávolítottuk és a sebet aseptikus körülmények között bezártuk. A kezelés sikerét a szembe cseppentett kapszaicinre adott válasz megléte illetve a TRPV1 pozitív szenzoros idegek hasnyálmirigybeli hiánya igazolta. Azokból a kapszaicinnel kezelt állatokból nyert minden eredményt kizártuk, ahol a post mortem elvégzett szövettani vizsgálat TRPV1 pozitív idegeket mutatott a hasnyálmirigyben (hatástalan lokális kapszaicin kezelés). Az oldószerrel kezelt kontroll csoportot az OLETF patkányoknál ismertetett módon, a kapszaicin oldószerével kezeltük (fiziológiás sóoldat, Tween 80 és etanol 8:1:1 arányú oldata).

### **Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálat**

Az állatokat elvéreztettük és hasi feltárásból eltávolítottuk a hasnyálmirigyet, amit 4%-os formalinos fixáló oldatba tettünk 24 órára, majd felszálló alkoholsorozat segítségével a vizet eltávolítottuk és végül a mintákat paraffinba ágyasztuk. Ezt követően került sor a metszetek elkészítésére, melyeken a vizsgálat céljától függően vagy haematoxinin-eozin festést végeztünk a T-sejtes infiltráció mértékének

kimutatására vagy immunfluoreszcens festést a TRPV1 és CGRP pozitív idegek kimutatására. Az T-sejtes infiltráció mértékének megállapításához 3 egymástól független megfigyelő legalább 200 sziget T-sejtes infiltrációjának kiterjedését értékelte az alábbi pontrendszer szerint: 0 pont, ha normális Langerhans sziget, 1 pont, ha sziget körüli gyulladás kiterjedése kevesebb, mint 25%, 2 pont, ha az infiltráció mértéke 25-50% és 3 pont, ha az infiltráció kiterjedése több, mint a sziget területének 50% (7).

### **Plazma inzulinszint meghatározás, HOMA-IR és HOMA-B% indexek**

A kísérlet elején került sor vérvételre éhgyomri vércukor és plazma inzulinszint meghatározás céljából. A vércukor meghatározás 1 csepp vérből történt glükóz oxidáz módszer segítségével (Accu Check Active, Roche, Magyarország). A levett vért (4 °C, 2 perc, 10.000 rpm) lecentrifugáltuk és a plazmát levettük és lefagyasztottuk -70 °C-ra amíg nem került sor az inzulinszint meghatározásra. A plazma inzulinszintet kereskedelmi forgalomban kapható RIA kitt segítségével határoztuk meg (4).

A HOMA-IR index meghatározás a szervezet inzulinérzékenységének meghatározására szolgáló egyszerű módszer, mely az éhgyomri inzulin és vércukorszint ismerete alapján ad felvilágosítást a teljes test inzulinérzékenységre (éhszintű vércukor (mmol/L) x éhszintű plazma inzulin ( $\mu\text{U/ml}$ )/22.5). Minél alacsonyabb ez az érték, az inzulinérzékenység annál jobb (5).

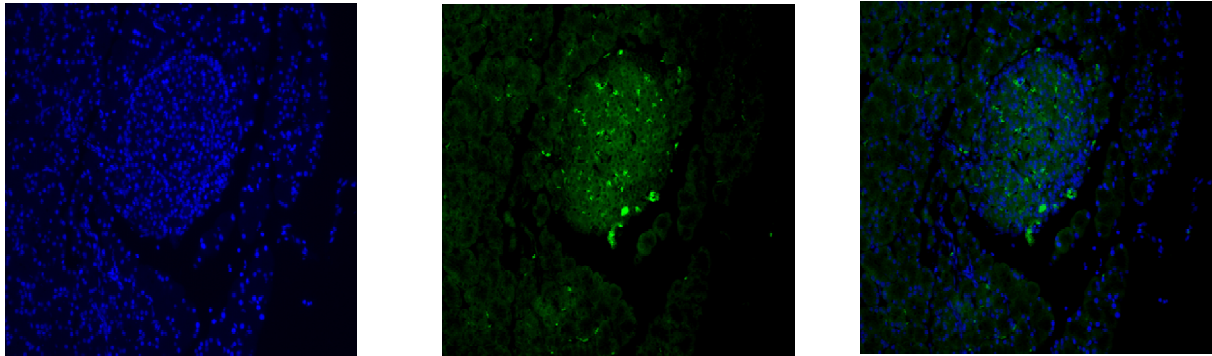
A HOMA-B% index a hasnyálmirigy inzulintermelő sejtjeinek a szekréciónak kapacitására ad felvilágosítást és az alábbi képlet szerint számítható: éhszintű plazma inzulinszint ( $\mu\text{U/ml}$ ) x 20/(éhszintű vércukor (mmol/l)-3.5). Minél magasabb ez az érték, a sejtek szekréciónak annál kifejezettebb (5).

## **EREDMÉNYEK**

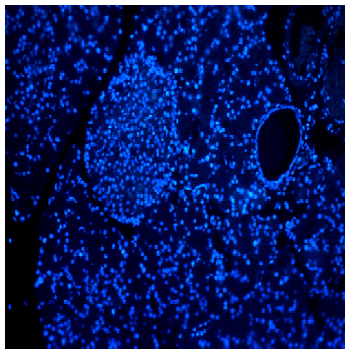
### **A szisztémás és lokális kapszaicin kezelés hatása a hasnyálmirigyet ellátó hátsó gyöki idegdúc idegeire és a Langerhans szigetek T-sejtes infiltrációjára**

A kapszaicin oldószerrel kezelt állatoknál a hasnyálmirigy Langerhans szigetei körül TRPV és CGRP pozitív neuronokat lehetett kimutatni, míg a szisztémás és lokális DRG kapszaicin előkezelte állatokban e neuron populáció nem volt kimutatható (4. és 5. ábra). A Langerhans szigetek gyulladásos infiltrációjának értékelésekor az insulinitis kifejezett volt ( $2.17 \pm 0.06$  pont) az oldószerrel kezelt

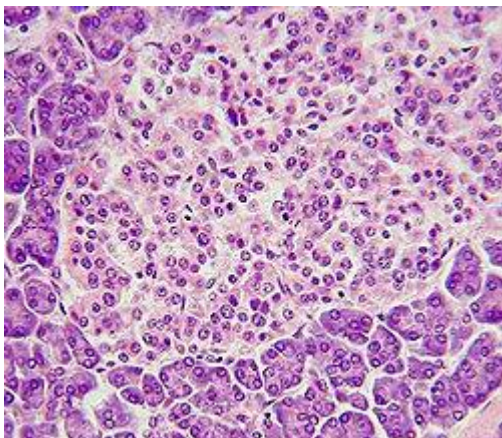
csoporthoz, ugyanakkor a T-sejtes infiltráció nagymértékben lecsökkent mind a szisztémás ( $0.23 \pm 0.1$  pont), mind a lokális DRG kapszaicin előkezelés ( $0.31 \pm 0.2$  pont) hatására (6. és 7. ábra).



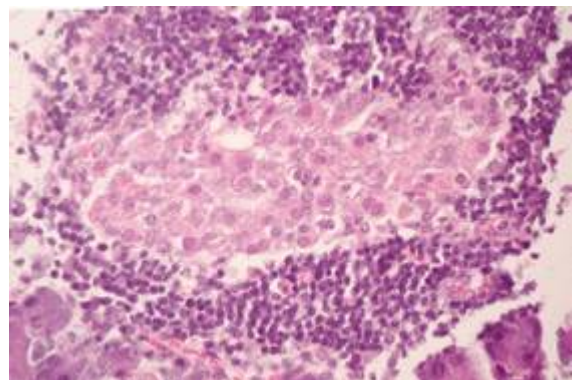
**4. ábra.** Hasnyálmirigy Langerhans szigetsejtet beidegző szenzoros idegfonat CGRP tartalmú rostjainak kimutatása 40-szeres nagyítás mellett.



**5. ábra.** Langerhans szigetsejt negatív kontroll, nincsenek zölden festődő, CGRP tartalmú szenzoros idegek.



**6. ábra.** NOD egér egészséges Langerhans szigete.



**7. ábra.** NOD egér fehérvérsejtekkel infiltrált Langerhans sziget. A limfociták a sziget peremén lévő sötét magok, míg a sziget belseje nem infiltrált.

#### A szisztémás és lokális kapszaicin kezelés hatása az inzulinérzékenységre és a $\beta$ sejt funkcióra

A kontroll csoport éhgyomri vércukor és plazma inzulin szintje szignifikánsan emelkedett az egészséges egérre (C57BL – ezen egerekből származó eredmények korábbi vizsgálatok során születtek) jellemző értékekhez (vércukor:  $4.3 \pm 0.6$  mmol/l ill.  $11.3 \pm 2.1$   $\mu$ U/ml) képest.

	Vércukor (mmol/L)	Plazma inzulin ( $\mu$ U/ml)	HOMA-IR	HOMA-B%
<b>Kontroll</b>	10.4 $\pm$ 2.1	50.6 $\pm$ 7.1	23.4 $\pm$ 2.1	146 $\pm$ 9.5
<b>Szisztémás Kapszaicin</b>	6.7 $\pm$ 1.6*	24.7 $\pm$ 2.7*	7.4 $\pm$ 0.8*	154 $\pm$ 12.4
<b>Lokális Kapszaicin</b>	7.2 $\pm$ 1.8*	27.6 $\pm$ 3.1*	8.8 $\pm$ 1.1*	149 $\pm$ 14.9

4. táblázat. A szisztémás és lokális kapszaicin kezelés hatás az éhgyomri vércukor és plazma inzulinszintre illetve az ezen értékek alapján számított HOMA-IR és HOMA-B% indexekre. A \*-gal jelölt értékek szignifikáns eltérést mutatnak az oldószerrel kezelt kontroll csoport hasonló értékeitől.

*Ad 3. Annak vizsgálata, hogy a kapszaicin-érzékeny idegek szerepet játszanak-e a krónikus thiazolidinedione terápia hatékonyságában*

Ebben a kísérlet sorozatban OLETF és Wistar patkányokat használtunk, melyeket a korábban részletezett módon tartottunk állatházban.

#### **ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

*A 2-es típusú diabetes modell:* Az OLETF patkányok esetében a szisztémás kapszaicin kezelést (lásd fentebb) az állatok 6 hetes korában végeztük, majd ezt 12 hetes, 3 mg/kg per os adott roziglitazon (Avandia®) kezelés követte. Az Avandia kontrolljaként az állatok csapvizet kaptak, ugyanolyan volumenben, mint amennyiben az Avandiát adtuk. A vizsgálat során az OLETF állatok között 4 csoport került kialakításra (lásd: 6. ábra).

*Az 1-es típusú diabetes modell:* A Wistar patkányokat 6 hetes korukban intraperitoneálisan 70 mg/kg streptozotocinnal illetve a korábban leírt módon kapszaicinnal kezeltük. Ezt követően 12 héten át napi 1 alkalommal per os 3 mg/kg roziglitazonnal (Avandia) kezeltük az állatokat. Az Avandia kontrolljaként az állatok csapvizet kaptak, ugyanolyan volumenben, mint amennyiben az Avandiát adtuk. A vizsgálat során a Wistar állatok között 6 csoport került kialakításra (lásd: 6. ábra).

Egészséges kontroll csoportként hasonló életkorú Wistar patkányok szolgáltak.

A kezelés végén a korábban ismertetett menet szerint HEGC-et végeztünk teljes test inzulinérzékenység meghatározás céljából. A HOMA-IR és HOMA-B% indexek értékeit a HEGC elején levett éhgyomri vércukor és plazma inzulinszintek alapján számítottuk a korábban részletezett módon. Minden csoportban 12-12 állat volt.

#### **Immunhisztológia és Radioimmunoassay**

Az immunhisztológiai vizsgálatot a korábban leírt módon végeztük el. A hasnyálmirigy neuropeptid tartalmának kvantitatív meghatározásához radioimmunoassay (RIA) módszert használtuk. Ennek során az állatok kivéreztetése után kivett hasnyálmirigy mintákat azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogén segítségével a további vizsgálatok elvégzéséig. A mintákat felolvasztást követően homogenizáltuk, lecentrifugáltuk és a felülúszót eltávolítottuk RIA mérés céljára. Az egyes neuropeptidek (SP, CGRP) meghatározására saját fejlesztésű RIA assay állt rendelkezésünkre (8;9).

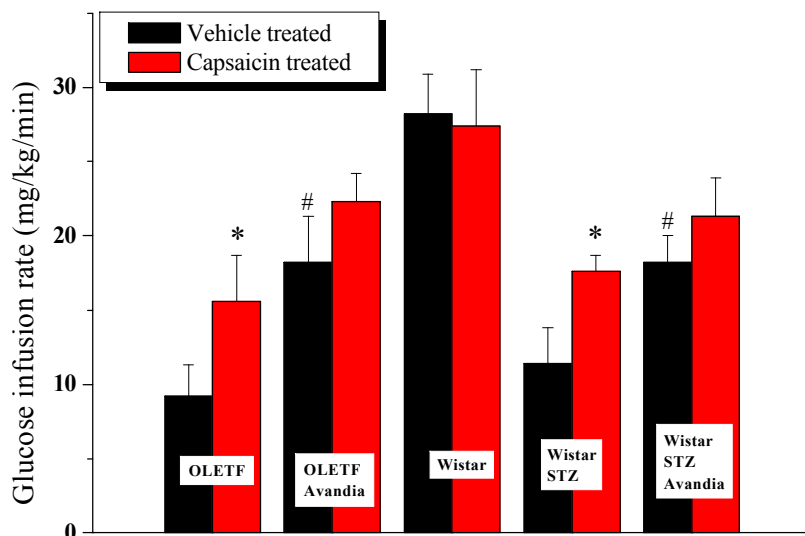
## **A kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek funkciójának vizsgálata izolált szervi preparátumon**

Az inzulinérzékenység meghatározását követően az állatokat kivéztettük, majd a légcsövet a gégeporc és a 2 főhörgő közötti szakaszon kiperaráltuk és megtisztítottuk a környező kötőszövetektől. Minden esetben két, azonos kezelési csoportba tartozó állatból származó légcső preparátumot tettünk egy szervfürdőbe. Ezt követően a szervfürdőben a preparátumokat átmostuk oly módon, hogy 60 percen keresztül 1 ml/perc sebességgel 37 °C-os, 7.2 pH-jú, oxigenizált (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Krebs oldatot (NaCl 118.1 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.0 mM, glükóz 11.1 mM) áramoltattunk át a szervfürdőn (1.8 ml). Az egy óra letelte után az atmoszfért leállítottuk. Ezt követően indult a kísérlet érdemi része, mely 3, egyenként 8 percig tartó részből tevődött össze és mindegyik rész a szervfürdő folyadék összegyűjtésével ért véget. A szervfürdő folyadék összegyűjtését követően a szervfürdőt átmostuk, majd újra feltöltöttük. Az első rész az ún. ingerlés előtti frakció volt, a második az ingerlés alatti, míg a harmadik frakció az ingerlés utáni volt. Az ingerlés téringertést jelentett és a következő paraméterekkel történt: 40V, 0.1 ms, 10 Hz, 120 mp. A levett mintákat jéghideg csövekbe tettük, hogy az enzimikus fehérje degradációt megakadályozzuk. Ezt követően a légcsövek nedves súlyát lemértük. A levett szervfürdő mintákból történt a substance P (SP) és a CGRP meghatározás a korábban leírt metodika szerint (8;9). A kapott eredményeket a légcső nedves tömegére vonatkoztatva adtuk meg (fmol/mg).

## **EREDMÉNYEK**

### **A roziglitazon kezelés hatása az inzulin érzékenységre**

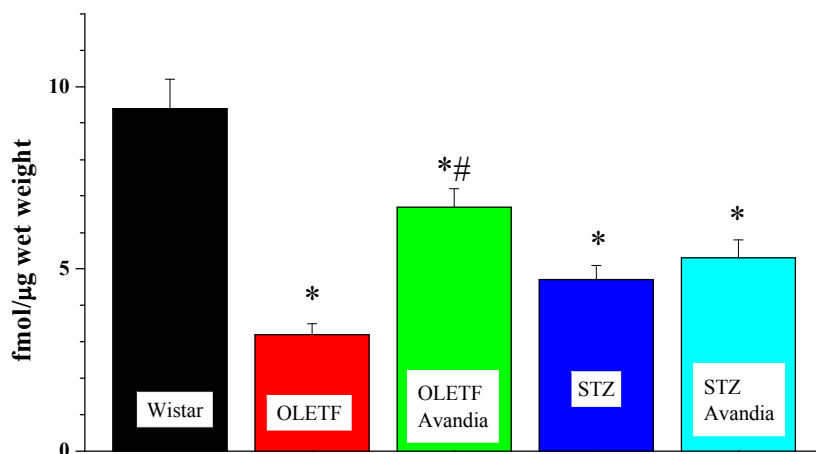
Mind az OLETF (2-es típusú cukorbeteg modell), mind az STZ-vel kezelt (1-es típusú cukorbeteg modell) állatok inzulinérzékenysége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollnak tekintett egészséges Wistar patkányoké. Ugyanakkor a szisztémás kapszaicin kezelés minden inzulin rezisztens csoportban az inzulinérzékenység javulását eredményezett, míg az egészséges Wistar patkányok inzulinérzékenységét nem befolyásolta. A 3 hónapos, 3 mg/kg per os roziglitazon kezelés javulást eredményezett az egyes inzulin rezisztens csoportok inzulinérzékenységében, azonban ez statisztikailag szignifikáns szintet csak a kapszaicin oldószerrel kezelt csoportokban eredményezett, a kapszaicin kezeltknél a javulás nem érte el a szignifikáns szintet. Az egészséges Wistar patkányok inzulinérzékenységét sem a kapszaicin előkezelés, sem a roziglitazon kezelés (ezek az adatok nincsenek benne a grafikonban) nem befolyásolta (8. ábra).



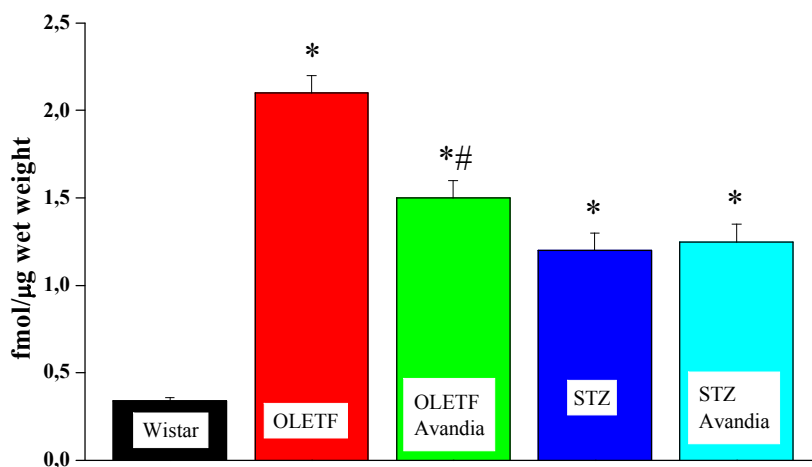
8. ábra. A thiazolidinedion kezelés (3 mg/kg roziglitazon; Avandia) hatása az 1-es és 2-es típusú cukorbetegség állatmodelljeinek inzulinérzékenységére kapszaicin előkezelés nélkül illetve mellette. A \*-gal jelölt érték szignifikáns eltérést mutat az összetartozó csoportok között. A roziglitazon kezelés hatására az 1-es és 2-es típusú cukorbeteg állatmodellek inzulinérzékenysége minden esetben javult, bár statisztikailag szignifikáns értéket nem érte el. A #-el jelölt oszlopok szignifikáns eltérést mutatnak a csapvízzel (roziglitazon oldószere) kezelt csoporthoz képest.

#### A thiazolidinedione terápia hatása a szigetsejtek szenzoros neuropeptid tartalmára

A kapszaicinnek kezelt állatokban a Langerhans szigetek körül végződő szenzoros idegek nem voltak kimutathatók és a RIA meghatározás során sem érte el a neuropeptid tartalom az érzékelés alsó határát, így azokat nem mutatom be ábrán. Az kapszaicin oldószerevel kezelt OLETF és STZ patkányokban a TRPV és CGRP pozitív idegek kimutathatók voltak a Langerhans szigetek körül, míg a RIA meghatározás során az egészséges kontrollhoz képest a CGRP tartalom emelkedett, míg a P anyag mennyisége csökkent. A roziglitazon kezelés hatására az OLETF patkányok hasnyálmirigyében meghatározott emelkedett CGRP mennyiség lecsökkent, míg a P anyag tekintetében a roziglitazon kezelés nem okozott változást (9. és 10. ábra).



9. ábra. A krónikus TZD terápia hatása a hasnyálmirigy P anyag mennyiségére OLETF és STZ kezelt patkányban. A \*-gal jelölt érték szignifikáns eltérést mutat az egészséges Wistar patkányhoz képest. A #-el jelölt érték szignifikáns eltérést mutat a TZD-vel nem kezelt csoporthoz képest.

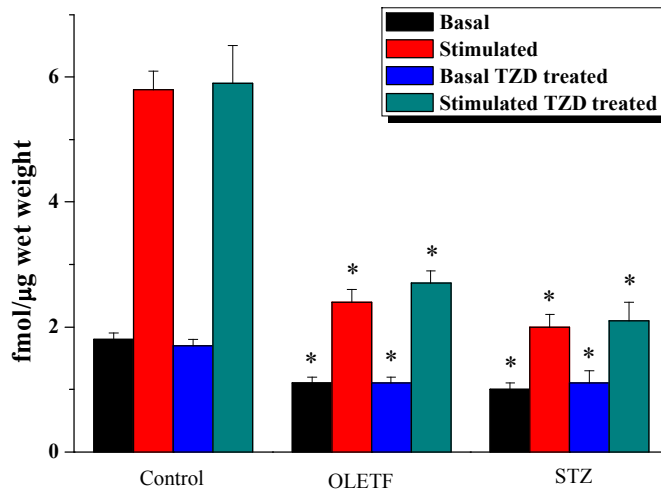


10. ábra. A krónikus TZD terápia hatása a hasnyálmirigy CGRP mennyiségére OLETF és STZ kezelt patkányban. A \*-gal jelölt érték szignifikáns eltérést mutat az egészséges Wistar patkányhoz képest. A #-el jelölt érték szignifikáns eltérést mutat a TZD-vel nem kezelt csoporthoz képest.

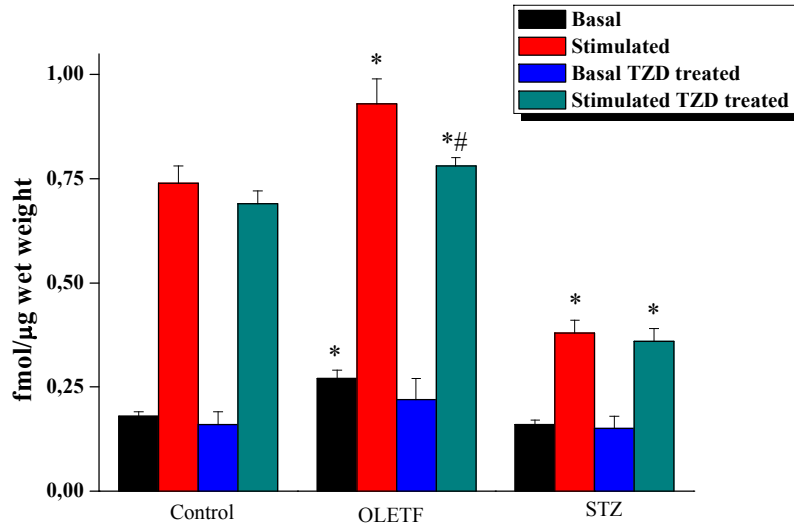
A krónikus TZD kezelés hatása a szenzoros idegek neuropeptid tartalmára izolált szervi preparátumban



Az egészséges állatokhoz viszonyítva a légcső bazális és stimulált P anyag tartalma lecsökkent mind az OLETF, mind az STZ kezelt állatokban. A krónikus TZD kezelés egyik csoportban sem okozott szignifikáns változást a trachea P anyag mennyiségében (11. ábra). Ugyanakkor más a helyzet a CGRP tekintetében. AZ OLETF patkányok esetében a bazális és stimulált CGRP mennyiség a kontrollhoz képest megemelkedett, míg az STZ állatoknál lecsökkent. A krónikus TZD kezelés hatására OLETF állatban a CGRP mennyiség lecsökkent (12. ábra).



11. ábra. A krónikus thiazolidinedione terápia hatása a trachea bazális és stimulált P anyag tartalmára. A \*-gal jelölt érték szignifikáns eltérést mutat az összetartozó csoportok között.



12. ábra. A krónikus thiazolidinedione terápia hatása a trachea bazális és stimulált CGRP tartalmára. A \*-gal jelölt érték szignifikáns eltérést mutat az összetartozó csoportok között. A #-el jelölt érték szignifikáns eltérést mutat a TZD-vel nem kezelt csoport stimulált értékéhez képest.

*Ad 4. Annak vizsgálata, hogy humán hasnyálmirigy mintában hogyan változik a szigetsejtek neuropeptid- és hormon tartalma*

Ez az a programpon, ahol nem sikerült elérni a kitűzött céljainkat, mivel nem sikerült elegendő mintát összegyűjtenünk ahhoz, hogy statisztikailag is értékelhető eredményeket kapjunk. Azonban szeretnénk mindenképpen lemérni a begyűjtött mintákat, a pályázat futamidejét követő időszakban. Az ehhez szükséges vegyszerek és műszerek a rendelkezésünkre állnak, a minták összegyűjtése folyamatban van. Ehhez a vizsgálathoz tumoros beteg rezekciós műtéteinél a széli ép részből nyert mintákat gyűjtjük. A cadaverből történő mintavételezéstől eltekintettünk a technikai nehézségek és a pancreas gyors önemésztődése miatt. Azon tervünk, hogy IDDM és NIDDM-es betegekből származó pankreasz mintákhoz juthassunk nem vált megvalósíthatóvá, mivel a pankreasz biopszia igen nagy kockázattal jár és nem találtunk olyan sebészi csapatot, aki ezt felelősséggel felvállalta volna. Ilyen mintavétel lehetősége a donációra kerülő agyhalottakból lenne lehetséges, azonban az elmúlt időszakban nem jutottunk ilyen mintához.

## ÖSSZEFOGLALÁS

A vizsgálataink legfontosabb eredménye annak igazolása, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek szerepet játszanak az NIDDM kialakulásában azáltal, hogy kóros funkciójuk a perifériás szövetek inzulin iránti csökkenéséhez és inzulin rezisztencia kialakulásához vezet. Ugyanakkor a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek szerepét a HOMA-B% index számítása alapján a  $\beta$ -sejt funkció romlásában nem sikerült igazolni. Emellett elsőként igazoltuk, hogy a hasnyálmirigyet ellátó kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek a gerincvelői hátsó gyöki idegdúcokból erednek. Végezetül kimutattuk, hogy krónikus thiazolidinedione terápia hatására a hasnyálmirigy CGRP tartalma csökken és P anyag tartalma növekedik, mely hatások hozzájárulnak a TZD terápia hatékonyságához, azonban arra vonatkozóan nem sikerült egyértelmű eredményt elérni, hogy a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegeknek szerepe van-e a TZD hatás kialakulásában, hiszen a kapszaicin kezelt állatokban bár a TZD kezelés hatására az inzulinérzékenység javulást mutatott, azonban mértéke nem érte el a szignifikáns szintet. Ugyanakkor igazoltuk azt is, hogy a TZD kezelés nemcsak a hasnyálmirigyet ellátó kapszaicin érzékeny érző idegek funkcióját befolyásolja, hanem a szervezet egyéb helyein is, de legalábbis a légcső esetében. Ennek jelentőségét az adja, hogy a TZD kezelés a vércukorszint javítása mellett, képes helyreállítani a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek lecsökkent neuropeptid tartalmát.

Kísérleteinkkel igazoltuk a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek szerepét a cukorbetegség és inzulin rezisztencia kialakulásában valamint, hogy a TZD kezelés inzulinérzékenyítő hatásában a kóros szenzoros neuropeptid arányok helyreállítása is szerepet játszik. További kísérleteket tervezünk arra vonatkozóan, hogy feltárjuk azokat a lépéseket melyek a kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek diszfunkcióját összekapcsolják a perifériás szövetek inzulin rezisztenciájának kialakulásával.

## IRODALMI HIVATKOZÁSOK

1. Kawano,K, Hirashima,T, Mori,S, Natori,T: OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new NIDDM rat strain. *Diabetes Res Clin Pract* 24 Suppl:S317-S320, 1994
2. Peitl,B, Petho,G, Porszasz,R, Nemeth,J, Szolcsanyi,J: Capsaicin-insensitive sensory-efferent meningeal vasodilatation evoked by electrical stimulation of trigeminal nerve fibres in the rat. *Br J Pharmacol* 127:457-467, 1999
3. Peitl,B, Nemeth,J, Pankucsi,C, Szilvassy,Z: Insulin sensitization induced by oral cicletanine in conscious rabbits. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 373:429-439, 2006
4. Peitl,B, Dobronte,R, Nemeth,J, Mezey,G, Kovacs,P, Paragh,G, Szilvassy,Z: The prandial insulin sensitivity-modifying effect of vagal stimulation in rats. *Metabolism* 54:579-583, 2005
5. Matthews,DR, Hosker,JP, Rudenski,AS, Naylor,BA, Treacher,DF, Turner,RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28:412-419, 1985
6. Wallenstein,S, Zucker,CL, Fleiss,JL: Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47:1-9, 1980
7. Winer,S, Tsui,H, Lau,A, Song,A, Li,X, Cheung,RK, Sampson,A, Afifiyan,F, Elford,A, Jackowski,G, Becker,DJ, Santamaria,P, Ohashi,P, Dosch,HM: Autoimmune islet destruction in spontaneous type 1 diabetes is not beta-cell exclusive. *Nat Med* 9:198-205, 2003
8. Nemeth,J, Gorcs,T, Helyes,Z, Oroszi,G, Kocsy,T, Pinter,E, Szolcsanyi,J: Development of a new sensitive CGRP radioimmunoassay for neuropharmacological research. *Neurobiology (Bp)* 6:473-475, 1998
9. Nemeth,J, Oroszi,G, Than,M, Helyes,ZS, Pinter,E, Farkas,B, Szolcsanyi,J: Substance P radioimmunoassay for quantitative characterization of sensory neurotransmitter release. *Neurobiology (Bp)* 7:437-444, 1999
10. Nemeth,J, Helyes,Z, Gorcs,T, Gardi,J, Pinter,E, Szolcsanyi,J: Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol Hung* 84:313-315, 1996
11. Nemeth,J, Jakab,B, Reglodi,D, Lubics,A, Jozsa,R, Hollosy,T, Tamas,A, Lengvari,I, Gorcs,T, Szolcsanyi,J: Comparative distribution of VIP in the central nervous system of various species measured by a new radioimmunoassay. *Regul Pept* 109:3-7, 2002
12. Jakab,B, Reglodi,D, Jozsa,R, Hollosy,T, Tamas,A, Lubics,A, Lengvari,I, Oroszi,G, Szilvassy,Z, Szolcsanyi,J, Nemeth,J: Distribution of PACAP-38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *J Biochem Biophys Methods* 61:189-198, 2004