

ÚJ TERÁPÁS LEHETŐSÉGEK SZEMÉSZETI BETEGSÉGEK KEZELÉSÉBEN

PH.D TÉZISEK

DR. GALLYAS ÉVA

SZEGED, 2006.

Bevezetés

A szem betegségeinek hátterében zajló molekuláris mechanizmusok megismerése kiemelkedő fontosságú a szemészetben is, hiszen ezáltal új terápiás lehetőségek körvonalazódhatnak. Kísérletes bizonyítékok sora utal arra, hogy a szemet érintő számos kórfolyamatban a sejthalál különböző formái és azok kombinációi jelennek meg.

Az apoptotikus sejthalál genetikailag meghatározott program szerint zajlik a szöveti homeostasis fenntartása céljából. A sejthalál programját beindító jel eredetétől függően az apoptosis biokémiai lépései intrinsic és extrinsic úton játszódhatnak le. Bár eddig a legtöbb vizsgálat a retinális szinten zajló apoptosissra irányult, ismeretes az, hogy e folyamatban a szem elülső szegmentuma, elsődlegesen az okuláris felszín is érintett.

Az apoptosis folyamatának különböző szinteken történő módosítása hatékony terápiás lehetőséget jelenthet különböző szemészeti betegségek gyógyításában. Az ischemiás retinopathia kezelésében a sejthalált kiváltó faktorok, folyamatok különböző származékokkal történő gátlása új terápiás beavatkozások elméleti lehetőségét rejtik magukban, míg egyes malignus szemészeti folyamatok esetén az apoptosis indukciója nyújthat új, alternatív terápiás lehetőséget.

Az értekezés anyagát képező eredmények két téma köré csoportosulnak:

I. Az apoptosis folyamatának befolyásolása ischemiás retinopathiában

II. Malignus sejtek apoptosisának indukciója oncolyticus vírussal

I. Az apoptosis folyamatának befolyásolása ischemiás retinopathiában

Heme oxygenase-1 függő CO és flavonoidok ischemiás/reperfundált patkány retinában

Az endothelium függő relaxációs faktor felfedezése a 70-es években és ennek azonosítása NO-ként a 80-as évek második felében, az endogen gázok újabb lehetséges szerepére világított rá. A NO-hoz hasonlóan más gáznemű anyagok, így szén monoxid (CO)

is termelődik fiziológias körülmények között. Az élő sejtekben és szervekben a heme oxygenase (HO) enzim rendszer az elsődleges felelőse a CO termelésnek.

A sejtek és a szövetek alkalmazkodása az ischémiához és a hypoxiához alapvető jelentőségű a fejlődési-, a fiziológiai és a pathofiziológiai folyamatokban. A humán és az emlős sejtek, szövetek, és szervek az alacsony oxigén szintre fiziológiailag releváns gének, fehérjék és enzimek csoportjának igen finoman összehangolt expressziójával reagálnak.

A microsomális HO katalizálja a hem oxidatív lebomlását biliverdinné, amit ezt követően a biliverdin reductase bilirubinná alakít. Az emlős hem oxygenasnak, ami a celluláris hemet biliverdinné, szén monoxidá, és szabad vassá (Fe) alakítja, három isoformája ismeretes, az egymástól eltérő gének által kódolt HO-1, -2, -3.

Újabb bizonyítékok azt mutatják, hogy a HO által generált CO fiziológias jelző molekula lehet, a HO-1 pedig kulcsfontosságú endogén faktorként szerepelhet az oxidatív és celluláris stress elleni és/vagy ahhoz történő adaptációban. Ennek megfelelően a HO rendszer és az endogén CO termelés között kapcsolat állhat fenn. Bár a HO-1 funkcióját celluláris szinten számos tanulmány vizsgálta, a HO-1 függő endogén CO képződés vizsgálatát az ischémiás/reperfundált retinában korábban nem. Feltevéseink szerint a HO-1 által regulált endogén CO termelés vasodilatátor vagy cytoprotektív hatása szerepet játszhat a reperfúzió indukálta retinális károsodás kivédésében.

Célkitűzések

- (1) az endogén CO képződés szintjének kimutatása gázkromatográfiával,
- (2) a HO-1 protein expresszió és az endogén CO képződés szerepének vizsgálata reperfúzió során,
- (3) a flavonoidokban gazdag meggy mag kivonat hatása a HO-1 protein expresszióra, és a szöveti Na^+ , K^+ , és Ca^{2+} szint alakulására ischémiás /reperfundált retinában.

Anyag és módszer

A kísérleti állatokban az arteria centralis retinae okkluzióját intraperitoneális anesztéziában hoztuk létre trakciós típusú okkluder alkalmazásával, okkludálva a nervus opticust, az arteria centralis retinae-t, a ciliáris arteriákat és a retrobulbáris kötőszövetet. Az ischémiát varrat meghúzásával tetszőleges ideig tarthattuk fenn. A kívánt idejű ischémiát az okkluder felengedése után reperfúzió követte. A fundust ophthalmoscoppal vizsgáltuk atropinos pupilla tágításban.

A retinális CO tartalom mérése gáz chromatográfiával történt. A 90 perces ischémiát 24 órás reperfúzió követte, majd a retinát eltávolítottuk és homogenizáltuk. A

homogenizátumot centrifugáltuk, a felülúszót használtuk a szöveti CO tartalom meghatározására.

A relatív HO-1 protein expressziót denzitometriával, patkány rekombináns HO-1 protein elleni ellenanyag segítségével, Western blot analysis-sel határoztuk meg.

A HO aktivitás meghatározáshoz szükséges reakciós elegy kálium foszfátot, hemint, bovine szérum albumint, biliverdin reductase-t és a retinalis szövet microsomális frakcióját tartalmazta. Scanning spectrophotometert használtunk, a protein tartalmat Folin-phenol reagenssel határoztuk meg a microsomális frakcióban.

A reperfüziót követően a kísérleti állatok szívébe az aortán keresztül perfúziós kanült helyeztünk ismételt altatásban. A szív jobb kamráját megnyitottuk, az ionokat és a vért az erekből és az extracelluláris térből hideg oldattal kimostuk, hogy leállítsuk, ill. csökkentjük a különböző membrán ion transzportért felelős membrán enzimek aktivitását a retinában. A retina fixálása előtt rövid átmosási periódust alkalmaztunk, mert az elnyújtott perfúzió műtermék képződést (pl. oedema képződést) eredményez az idegszövetben. Az átmosás után a szemet enukleáltuk, megnyitottuk, a retinát a retinális epitheliumról leválasztottuk, majd az opticust átvágtuk. A retina szárítását, oldatba vitelét követően a szöveti ion tartalmat különböző hullámhosszon atom abszorpciós spectrophotometerrel határoztuk meg.

A szövettani vizsgálatokhoz az enukleált szemet az ora serratánál körben megnyitottuk. Az üvegtestet eltávolítottuk, a szemet fixáló oldatba helyeztük, majd a fixálást dehidráció, paraffinba ágyazás, hematoxylin-eosin festés követte. Az ischemia/reperfüzió okozta sejt duzzadás (oedema képződés) jól látható volt a belső plexiform rétegben. Azt átlagos retinális vastagságot minden szemnél az optikus közelében mértük meg. Neutrophil migrációt észleltünk a 90 perces ischemiát követő 24 órás reperfüzió után.

Az állatokat a retinális ischemia és reperfüzió, valamint a retinális izoláció előtt per os különböző adagú (napi 5, 10 vagy 30 mg/kg) meggy-mag kivonatból származó flavonoidokkal kezeltük 14 napig. A reperfüziót követően a HO-1 protein expressziót, HO enzim aktivitást, HO-1 függő CO termelődést, és a retinális Na⁺, K⁺ és Ca²⁺ tartalmat mértük a flavonoiddal előkezelt és elő nem kezelt csoportban. Vizsgálatunk célja kettős volt: egyrészt a HO-1 függő CO termelődés mértékét vizsgáltuk ischemiás/reperfundált retinában, másrészt azt, hogy a flavonoidban gazdag meggy-mag kivonat hatására hogyan változik meg az ion tartalom a retinában ischemia/reperfüzió után.

A meggy-mag kivonat 4 %-ban tartalmazott flavonoidot, benne quercetint, apigenint, rhamnetint, scutecellint és pinocembrint.

Eredmények

A nem kezelt állatok retinájának belső magvas rétegében a ganglion sejtekben számos pyknotikus, vakuolizált üreget és degeneratív elváltozásokat figyeltünk meg. Ezek az elváltozások sokkal kevésbé voltak kifejezettek a flavonoiddal előkezelt állatok retinájában.

A retinális vastagságot, mint az oedema képződés indikátorát mértük. A belső plexiform réteg vastagságának kifejezett csökkenését észleltük a flavonoiddal előkezelt állatokban, továbbá a neutrophilok migrációja is 75 %-kal kevesebb volt ebben a csoportban.

A CO szint meghatározása során a csúcsok gázkromatográfiás regisztrációjakor a levegővel perfundált retinában mérhető endogén CO termelődésre utaló csúcshoz képest lényegesen kisebb csúcsot mértünk a flavonoiddal nem előkezelt állatok retinájában, míg az előkezelt esetében enyhe emelkedést észleltünk az endogén CO produkcióban.

A HO-1 protein expresszójának csökkenését figyeltük meg ischemiás/reperfundált retinában a levegővel perfundált nem ischemiás kontrollhoz képest. A flavonoiddal előkezelt állatok esetében a HO-1 mRNA expressziója kifejezett volt a nem előkezeltékhez képest. A HO enzim aktivitás szignifikánsan csökkent 24 órával a reperfúziót követően a flavonoiddal nem előkezelt állatok retinájában a nem ischemiás csoporthoz képest. A flavonoiddal előkezelt állatok retinájában szignifikáns HO enzim aktivitás növekedést mértünk.

A flavonoidban gazdag meggy-mag kivonat hatását vizsgáltuk patkány retinában, hogy kimutassuk protektív hatását a retinális kation tartalom ischemia/reperfúziót követő változására. Az ischemia/reperfúziót követő retinális Na^+ , Ca^+ szint változás, és a K^+ veszteség szignifikánsan csökkent a flavonoidokkal előkezelt állatokban.

Megbeszélés

Az arteria centralis retinae okklúziója a szemészetben sürgősségi ellátást igénylő, súlyos folyamat, mely esetében minden eltelt perc növeli a retina elhalásának, és a látás elvesztésének veszélyét. Bár a reperfúzió az ischemiás szövet állapotának javulását, túlélését segítheti, de a reperfúzió további károsodást okozhat. A HO-mediált endogén CO termelődést mint protektív mechanizmust azonosították az ischemia/reperfúzió indukálta károsodásban különböző szervekben, de a retinális endogén CO szint direkt méréséről eddig nem számolt be az irodalom.

Vizsgálataink során a retinális CO szint direkt mérésével annak a hipotézisnek adtuk bizonyítékát, hogy a retinális CO produkció kulcsszerepet játszhat a reperfúzió indukálta károsodás csökkentésében a HO-1 fehérje indukcióján keresztül. Flavonoidokban gazdag meggy-mag kivonatot alkalmazva a HO-1 protein expresszió és az endogén CO produkció stimulálható. A flavonoidok antioxidáns és gyulladáscsökkentő hatással egyaránt

rendelkeznek. Specifikus hatásuk lehet, hogy javítják az elektron transzfer hatékonyságot a NADPH-cytochrome P-450-reductase és a P-450 enzim között. Eredményeink alátámasztják továbbá a Na^+ , K^+ és a Ca^{2+} fontosságát a sejtmembrán ion egyensúly fenntartásában, aminek felborulása különböző, látásvesztéssel járó klinikai kórképekben egyaránt észlelhető, s ennek az oedema képződéstől az apoptoticus vagy nekrotikus sejtpusztulásig igen sokféle következménye lehet. Vizsgálataink azt mutatják, hogy a Na^+ és a Ca^{2+} akkumulálódik a retinában. Flavonoidokban gazdag meggy-mag kivonat hatására a HO-1 protein expresszió és a CO képződés fokozódik, aminek eredménye szignifikáns celluláris Na^+ és Ca^{2+} szint csökkenés lesz. Ez az oedema képződést és a mitochondriális calcium vezérelt sejt pusztulást csökkenti, mely folyamat pedig kulcsfontosságú mediátorként vagy jelként szerepel necrosis és/vagy apoptosis esetén.

II. *Malignus sejtek apoptosisának indukciója oncolytic vírussal*

***In vitro* modellkísérletek a squamosus conjunctivatumorok viroterápiával történő kezelésére**

A vesicularis stomatitis virus apoptosist indukál a Chang conjunctivális sejtvonal Wong-Kilbourne sejtklónjában

Bevezetés

Az utóbbi évtizedben végzett alap kutatások nagymértékben elősegítették a daganatképződés molekuláris patogenezisének jobb megértését. Az új ismeretekre építve megindultak azok a vizsgálatok, melyek daganatos betegségek génterápiával történő gyógyításának lehetőségeit kutatják. Az antitumor génterápia hatásmechanizmusát tekintve több csoportba sorolható.

Bizonyos génterápiás beavatkozások citotoxikus molekulákat juttathatnak a daganatsejtekbe, vagy celluláris gének működésének módosítása révén okozzák a tumorsejtek pusztulását. Más esetekben a génterápiás vektorba citokingéneket klónoznak. A daganatos betegségek génterápiájának további lehetősége a tumorspecifikus oncolytic vírusok alkalmazása, melyek a daganatsejtekben szaporodva lysis, illetve apoptosist idéznek elő. Ezek a vírusok vagy eredendően tumorszelektívek, vagy genetikai módosításuk szükséges az antitumor hatás biztosításához.

Számos kísérleti rendszerben igazolták, hogy a vesicularis stomatitis vírus (Rhabdoviridae) hatékonyan aktiválja mind az extrinsic, mind az intrinsic apoptotikus utat, ami fontos szerepet játszik a fertőzött daganatsejtek pusztulásában.

Célkitűzés

Mivel a vesicularis stomatitis virus (VSV) potenciális oncolitikus hatását a conjunctiva és a sclera squamosus daganataiban még nem vizsgálták, kutatásaink során az immortalizált Wong-Kilbourne conjunctivalis sejtvonal VSV iránti fogékonyságát és a vírus sejtkárosító hatásának molekuláris mechanizmusát tanulmányoztuk.

Anyag és módszer

A WK sejtvonalat 7.5% borjúsavóval kiegészített DMEM tápfolyadékban tenyésztettük 37 °C-on 5% CO₂ atmoszférában.

A VSV Indiana törzsét L929 sejtekben szaporítottuk, koncentrációját plakk titrálással határoztuk meg. A kísérletekhez 0,001; 0,01; 0,1 és 1 plakk képző egység per sejt (PKE/sejt) koncentrációban alkalmaztuk.

A VSV-vel fertőzött sejtek arányát indirekt immunfluoreszcenciával határoztuk meg. A fixált sejteket VSV G proteinjére specifikus monoklonális ellenanyaggal inkubáltuk, mostuk, majd fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelölt anti-egér ellenanyaggal festettük. A citoplazmatikus fluoreszcenciát konfokális mikroszkóppal értékeltük.

Az apoptotikus sejtpusztulás kimutatására a terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) módszert alkalmaztuk. A kísérletekhez a MEBSTAIN direct kitet használtuk. Az apoptózis mértékét ELISA kit segítségével határoztuk meg.

A VSV G proteinjét, a Bax és a Bcl-2 fehérjéket Western blot analízissel mutattuk ki. A sejteket lízis pufferben oldottuk fel. A sejt lizátumok fehérje tartalmát Bio-Rad protein assay kittel határoztuk meg. A fehérjéket 12% denaturáló polyacrylamid gélelektroforézis segítségével molekulatömeg szerint elválasztottuk, és nitrocellulóz filterre juttattuk. A filtereket először VSV G proteinre, Bax illetve Bcl-2 fehérjékre specifikus ellenanyagokkal majd torna peroxidázzal konjugált species-specifikus másodlagos ellenanyagokkal inkubáltuk. A vizsgált fehérjéket kemiluminescens detektáló rendszer segítségével azonosítottuk.

Eredmények

Munkánk kezdeti szakaszában a VSV szaporodását tanulmányoztuk az immortalizált conjunctivalis WK sejtvonalon. A VSV Indiana törzsének különböző koncentrációival fertőztünk WK sejkultúrákat. Western blot analízis, indirekt immunfluoreszcens módszer és plakk titrálás segítségével vizsgáltuk a vírus szaporodását. Eredményeink szerint a VSV hatékonyan és gyorsan szaporodik a WK sejtvonalon.

Munkánk következő szakaszában a VSV sejtkárosító hatását tanulmányoztuk a fertőzött sejt kultúrák mikroszkópos vizsgálatával. Megállapítottuk, hogy a VSV, a sejtek morfológiai változásával járó cytopathiás hatást eredményez.

Ezt követően az apoptotikus folyamatok szerepét tanulmányoztuk a VSV sejtkárosító hatásának mechanizmusában. Az apoptosira jellemző internukleoszómális DNS károsodás kialakulását TUNEL és ELISA módszerek alkalmazásával vizsgáltuk. Adataink szerint a WK sejtvonalon a VSV fertőzés rendkívül nagymértékű sejtpusztulást eredményez, és a vírus *in vitro* cytopathiás hatása apoptosissal indukcióra alapul.

További kísérleteink során a VSV által indukált apoptosissal molekuláris mechanizmusát tanulmányoztuk. Western blot analízis segítségével vizsgáltuk a VSV-nek a Bax és Bcl-2 fehérjék expressziójára gyakorolt hatását. Kísérleteink a fertőzetlen kontroll kultúrák esetében a p21 Bax és a Bcl-2 endogén expresszióját igazolták. A vírus hatására a p21 Bax kifejeződése csökkent, de jelenléte kimutatható volt minden vírus koncentráció esetén. A VSV fertőzés érdekes módon egy 18 kDa molekulatömegű Bax isoforma felhalmozódását váltotta ki, míg a p18 Bax protein a fertőzetlen kontroll kultúrákban nem érte el a kimutathatóság határát. VSV hatására a Bcl-2 fehérje szintje jelentősen csökkent a kontroll kultúrákhoz viszonyítva.

Megbeszélés

Számos korábbi tanulmányban beszámoltak arról, hogy a VSV hatékonyan szaporodik különböző szövettani típusú tumorokban és a fertőzés a daganat sejtek pusztulását eredményezi. Immortalizált conjunctivális sejtek VSV iránti fogékonyságát azonban eddig még nem vizsgálták. Munkánk során ezért a VSV potenciális oncolitikus hatását vizsgáltuk *in vitro* kísérleti rendszerben, WK sejtvonalon. Eredményeink szerint a VSV hatékonyan szaporodik az immortalizált conjunctivális WK sejtekben. A fertőzés nagyfokú cytopathiás hatás kialakulását eredményezi, ami a kultúrák pusztulásához vezet. Az elvégzett TUNEL assay azt igazolta, hogy a VSV *in vitro* cytopathiás hatása apoptosissal indukcióra alapul. Irodalmi adatok szerint a Bcl-2 családba tartozó apoptosissal gátló (anti-apoptotikus) és apoptosissal serkentő (pro-apoptotikus) molekulák aktivitása és aránya az apoptotikus folyamatok szabályozásának jelentős tényezője. Munkánk során ezért a VSV fertőzés anti-apoptotikus Bcl-2 és pro-apoptotikus Bax szintjére gyakorolt hatását is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy VSV fertőzés hatására a Bcl-2 és a p21 Bax izoforma szintje csökken, míg a p18 Bax fehérje expressziója fokozódik. Ezen adatok arra utalnak, hogy a VSV pro-apoptotikus irányú eltolódást eredményez a Bcl-2 családba tartozó fehérjék arányában, ami

fontos szerepet játszhat a fertőzött sejtek apoptotikus válaszában és érzékenyítheti a sejteket egyéb apoptotikus hatásokkal szemben.

Vizsgálati eredményeink alapján összefoglalásként megállapítható, hogy a VSV virotherápia hatékony, alternatív módszer lehet a malignus conjunctiva tumorok kezelésében.

