

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 progresszióját
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 eredményeim 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 ³H-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 β 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 oldószerral 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 percenként ellenőriztük és az inzulininfúzióval párhuzamosan elindított cukorinfúzió sebességét úgy változtattuk, hogy a vércukor értéke folyamatosan 5.5 ± 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 ^3H -glükóz infúzió számára. A műtétet követő nyugalmi periódus után 5 μCi ^3H -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 (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).

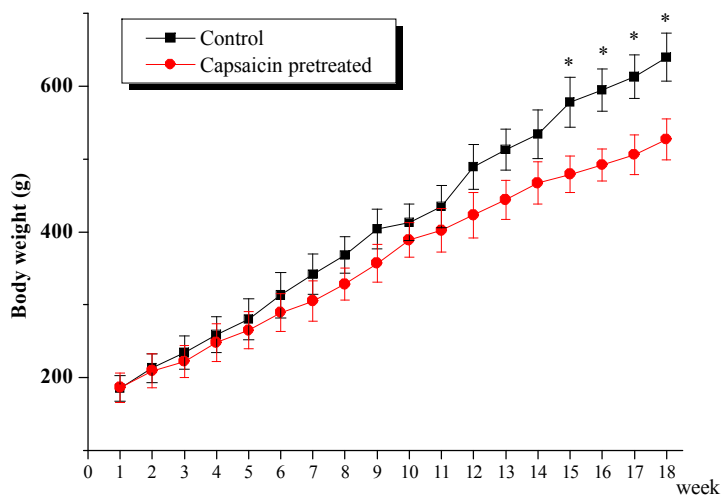
Statisztika

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.



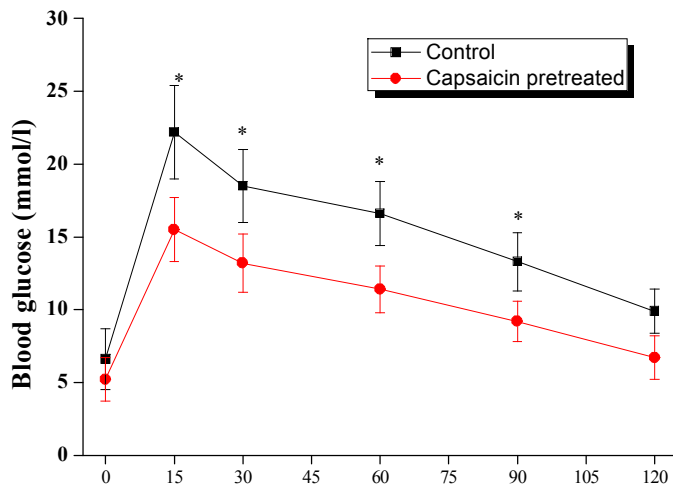
1. ábra. A kapszaicin előkezelés hatás a testsúly változására OLETF patkányban. A *-gal jelölt értékek szignifikáns eltérést mutatnak az oldószerrel kezelt kontroll csoport hasonló értékeitől.

	Elfogyasztott táp (g)	Elfogyasztott víz (ml)	Ürített széklet (g)	Ürített vizelet (ml)
Kontroll	32.3±3.2	36.7±4.2	28.8±3.0	18.5±1.9
Kapszaicin kezelt	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

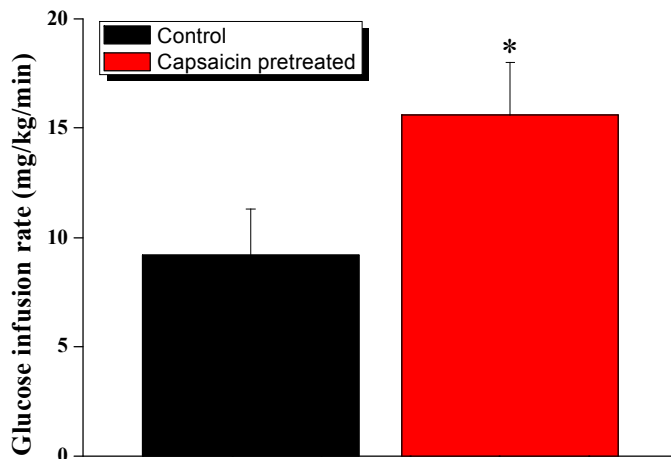
A kapszaicinnal kezelt állatok éhgyomri vércukorértéke valamivel alacsonyabbnak adódott, mint a kontroll csoporté, azonban nem ért statisztikailag szignifikáns szintet. Ugyanakkor az orális glükózterhelésre kapott vércukor emelkedés a kapszaicin kezelt állatokban szignifikánsan kisebb volt, amit mutat 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 ± 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 ^3H -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 ± 0.6 mmol/L) és plazma inzulinszintje (13.3 ± 2.3 μ 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 (μ U/ml)	HOMA-IR	HOMA-B%
Kontroll	6.6 ± 0.7	80.2 ± 9.2	23.5 ± 2.1	517 ± 36
Kapszaicin kezelt	$5.7 \pm 0.6^*$	$48.4 \pm 6.2^*$	$11.2 \pm 0.9^*$	569 ± 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).

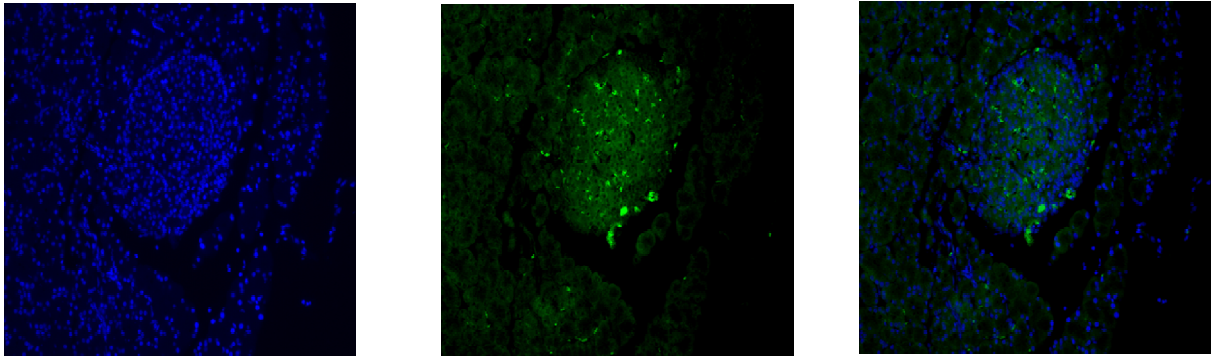
A HOMA-B% index a hasnyálmirigy inzulintermelő sejtjeinek a szekréciónak kapacitására ad felvilágosítást és az alábbi képlet szerint számítható: éhszintű plazma inzulinszint ($\mu\text{U/ml}$) x 20/(éhszintű vércukor (mmol/l)-3.5). Minél magasabb ez az érték, a sejtek szekréciónak annál kifejezettebb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

EREDMÉNYEK

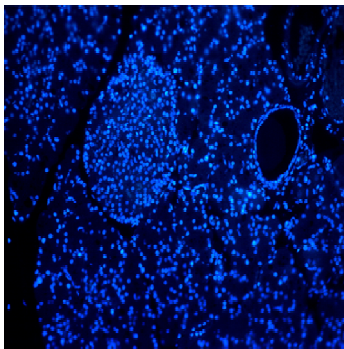
A szisztémás és lokális kapszaicin kezelés hatása a hasnyálmirigyet ellátó hátsó gyöki idegdúc idegeire és a Langerhans szigetek T-sejtes infiltrációja

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

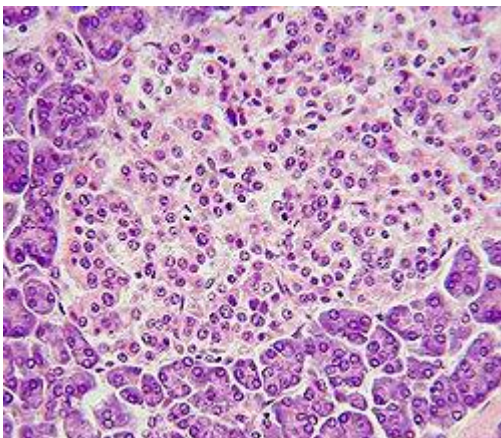
csoporthoz, ugyanakkor a T-sejtes infiltráció nagymértékben lecsökkent mind a szisztémás (0.23 ± 0.1 pont), mind a lokális DRG kapszaicin előkezelés (0.31 ± 0.2 pont) hatására (6. és 7. ábra).



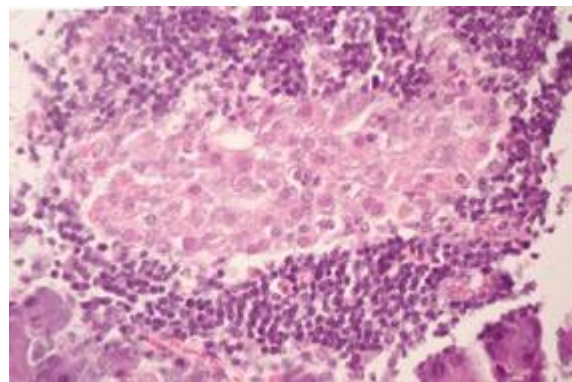
4. ábra. Hasnyálmirigy Langerhans szigetsejtet beidegző szenzoros idegfonat CGRP tartalmú rostjainak kimutatása 40-szeres nagyítás mellett.



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 β 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 ± 0.6 mmol/l ill. 11.3 ± 2.1 μ U/ml) képest.

	Vércukor (mmol/L)	Plazma inzulin (μ U/ml)	HOMA-IR	HOMA-B%
Kontroll	10.4 \pm 2.1	50.6 \pm 7.1	23.4 \pm 2.1	146 \pm 9.5
Szisztémás Kapszaicin	6.7 \pm 1.6*	24.7 \pm 2.7*	7.4 \pm 0.8*	154 \pm 12.4
Lokális Kapszaicin	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).

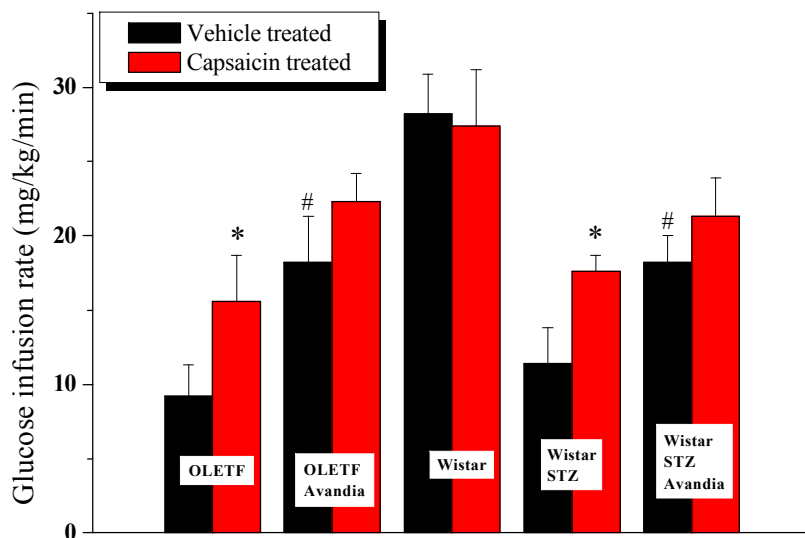
A kapszaicin-érzékeny szenzoros idegek funkciójának vizsgálata izolált szervi preparátumon

Az inzulinérzékenység meghatározását követően az állatokat kivéztettük, majd a légcsövet a gégeporc és a 2 főhörgő közötti szakaszon kibepráltuk 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% O₂, 5% CO₂) Krebs oldatot (NaCl 118.1 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.0 mM, KH₂PO₄ 1.0 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 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

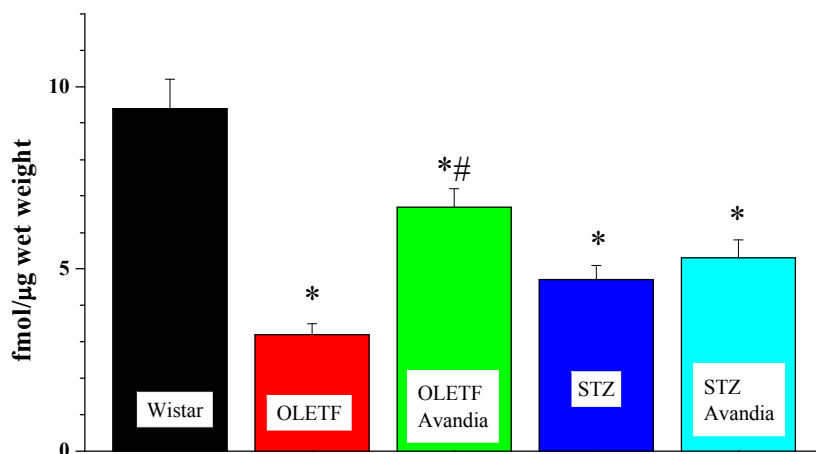
Mind az OLETF (2-es típusú cukorbeteg modell), mind az STZ-vel kezelt (1-es típusú cukorbeteg modell) állatok inzulinérzékenysége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontrollnak tekintett egészséges Wistar patkányoké. Ugyanakkor a szisztémás kapszaicin kezelés minden inzulin rezisztens csoportban 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 kezelteknél 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).



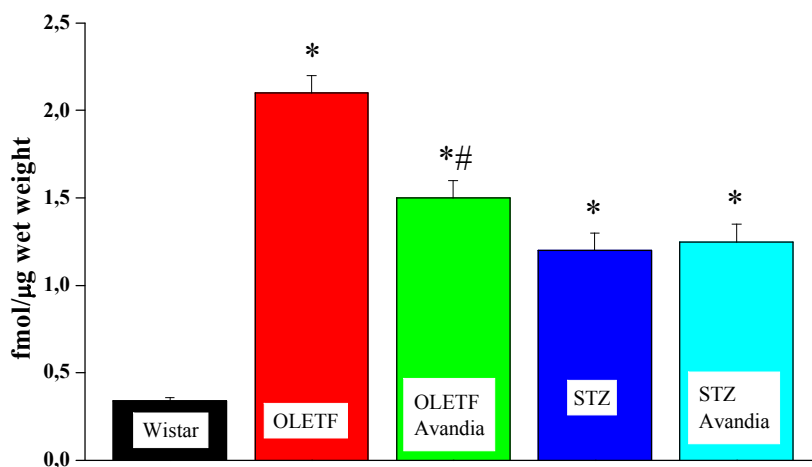
8. ábra. A thiazolidinedion kezelés (3 mg/kg roziglitazon; Avandia) hatása az 1-es és 2-es típusú cukorbetegség állatmodelljeinek inzulinérzékenységére kapszaicin előkezelés nélkül illetve mellette. A *-gal jelölt érték szignifikáns eltérést mutat az összetartozó csoportok között. A roziglitazon kezelés 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).



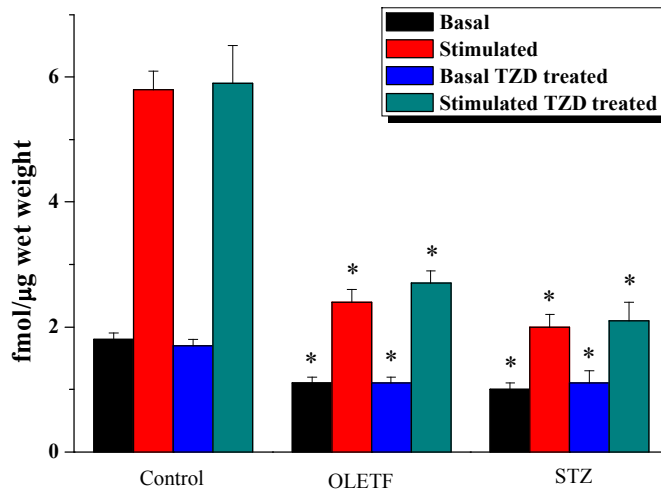
9. ábra. A krónikus TZD terápia hatása a hasnyálmirigy P anyag mennyiségére OLETF és STZ kezelt patkányban. A *-gal jelölt érték szignifikáns eltérést mutat az egészséges Wistar patkányhoz képest. A #-el jelölt érték szignifikáns eltérést mutat a TZD-vel nem kezelt csoporthoz képest.



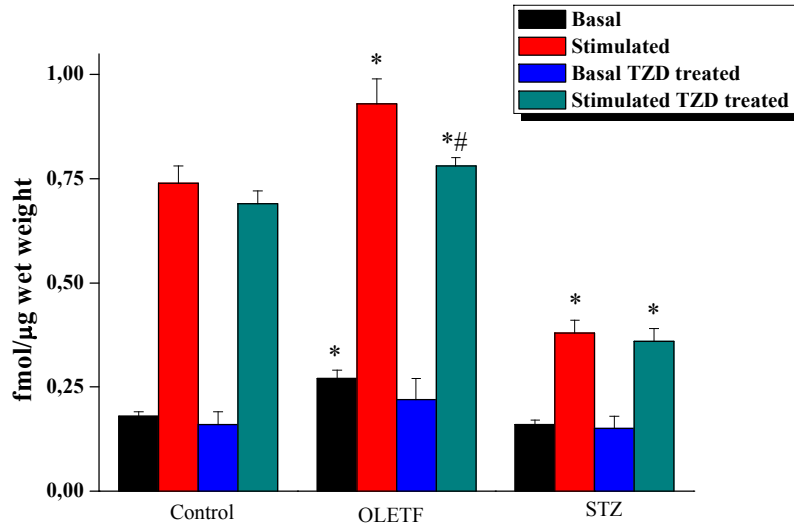
10. ábra. A krónikus TZD terápia hatása a hasnyálmirigy CGRP mennyiségére OLETF és STZ kezelt patkányban. A *-gal jelölt érték szignifikáns eltérést mutat az egészséges Wistar patkányhoz képest. A #-el jelölt érték szignifikáns eltérést mutat a TZD-vel nem kezelt csoporthoz képest.

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 β -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