

XXXI. OTDK Biológia Szekció

A lizil-oxidáz enzim expressziójának változása streptozotocin-indukált krónikus diabéteszes állatok különböző bélszakaszaiban

Giricz Zsófia

Biológia Bsc szakos hallgató



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszék

TÉMAVEZETŐ

Bódi Nikolett, PhD.
egyetemi adjunktus

Szeged

2014.

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések magyarázata	2
I. BEVEZETÉS	3
I. 1. A bélidegrendszer felépítése és működése	3
I. 2. A cukorbetegség és krónikus szövődményei	4
I. 3. A bazális membrán szerkezete és megváltozása diabéteszben	5
I. 4. A lizil-oxidáz szerepe cukorbetegségben	8
II. CÉLKITŰZÉSEK	9
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	10
III. 1. I. típusú krónikus diabéteszes állatmodell előállítása	10
III. 2. Szöveti mintavétel	10
III. 3. A szövetminták előkészítése elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz	11
III. 4. Lizil-oxidáz posztembbeding immunhisztokémia	11
III. 5. Kvantitatív transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok	12
III. 6. Statisztikai analízis	13
IV. EREDMÉNYEK	14
IV. 1. A kísérleti állatok tömege és vércukorszintje	14
IV. 2. A lizil-oxidáz enzim expressziójának mintázata myentericus ganglionok neuropil régiójában	15
IV. 3. A lizil-oxidáz enzim expressziójának mintázata myentericus neuronok sejtestjében	17
IV. 4. A lizil-oxidáz enzim expressziójának mintázata a bélfal simazomsejtjeiben	19
IV. 5. A lizil-oxidáz enzim expressziójának mintázata a myentericus plexus közelében futó kapillárisok endoteliumában	21
V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE	23
VI. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS	25
VII. FELHASZNÁLT IRODALOM	26

Rövidítések magyarázata

ANOVA	egyfaktoros varianciaanalízis (variance of analysis)
BM	bazális membrán
BSA	borjú szérum albumin (bovine serum albumin)
ECM	extracelluláris mátrix
ENS	bélidegrendszer (enteric nervous system)
LOX	lizil-oxidáz
LOXL	lizil-oxidáz-like protein
MMPk	mátrix metalloproteinázok
MP	myentericus plexus
mtsai.	munkatársai
PB	foszfát puffer (phosphate buffer)
proLOX	lizil-oxidáz proenzim
SEM	standard error of mean
SP	submucosus plexus
STZ	streptozotocin
TBS	TRIS-pufferes sóoldat (TRIS buffered saline)
TRIS	2-amino-2-(hidroximetil)-propán-1,3-diol

Az idegen kifejezéseket az Orvosi Helyesírási Szótár (Akadémia Kiadó, Bp., 1992) szabályainak megfelelően alkalmaztam, az ún. vagylagos írású címszavak esetén általában a magyaros írásmódnak megfelelően.

I. BEVEZETÉS

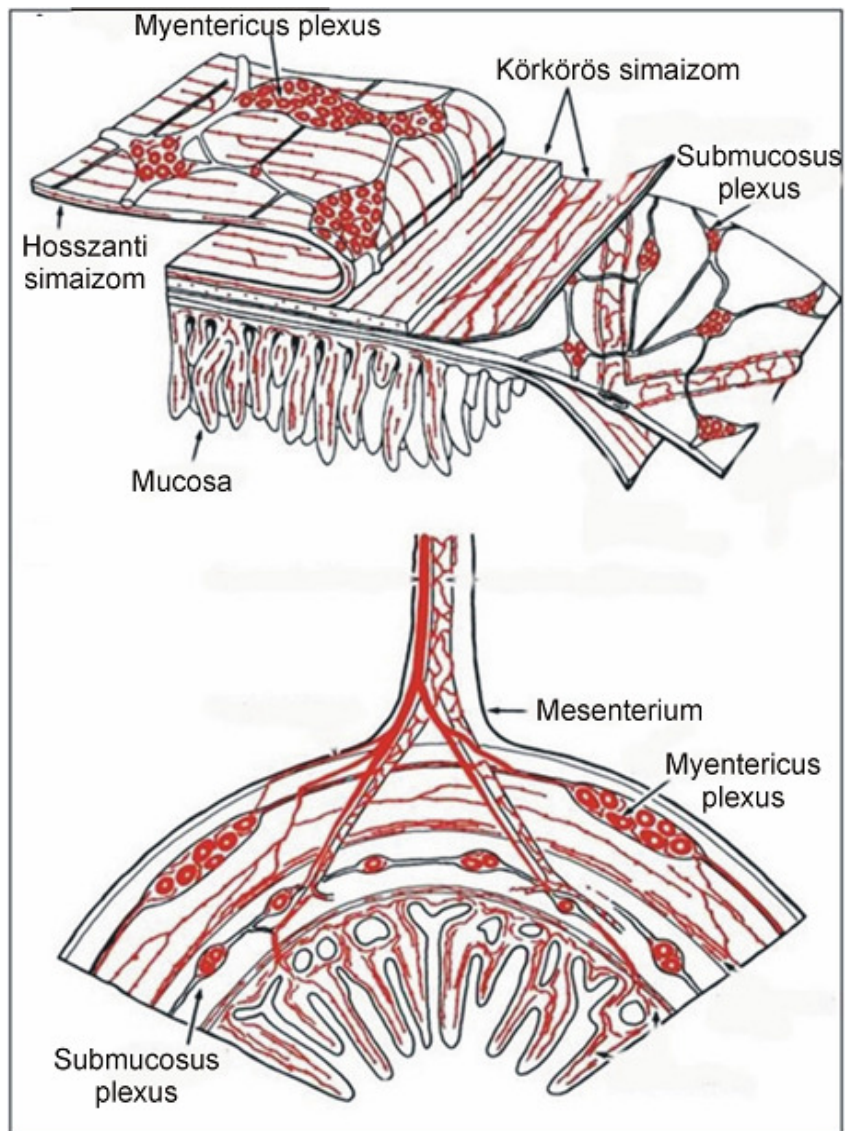
I. 1. A bélidegrendszer felépítése és működése

A bélidegrendszer (ENS; enteric nervous system) a szimpatikus és a paraszimpatikus idegrendszer mellett az autonóm idegrendszer harmadik divíziója (Langely, 1921). A ENS a bélcsatorna teljes hosszában, a nyelőcsőben, a gyomorban, a vékony- és vastagbélben, valamint a hasnyálmirigy és az epehólyag falában is végighúzódik (Furness, 2006). Az entericus neuronok száma közel azonos a gerincvelőt felépítő idegsejtek számával és szinte az összes ismert ingerületátvivő anyag fontos szabályozó szerepet játszik a ENS működésében is (Costa és mtsai., 2000).

Az entericus neuronok morfológiailag és működésüket tekintve is jól elkülöníthető csoportokba sorolhatók. Funkcionálisan beszélhetünk saját elsődleges érző neuronokról, mozgató- és interneuronokról (Furness és mtsai., 1998), melyek lokális reflexívet alakítanak ki. Ezeknek a helyi reflexíveknek köszönhetően a ENS működése a központi idegrendszertől nagymértékben független (Gershon és mtsai., 1994), szabályozza a bél perisztaltikus működését, a nyálkahártya váladéktermelését, valamint a víz- és ionszekréciót is (Furness és Costa 1987).

Az entericus neuronok és gliasejtek idegfonatokat, plexusokat alkotnak a bélfal egyes szövettani rétegei között. Az emlős ENS területén két nagyobb ganglionált és több kisebb nem ganglionált plexus van (Meissner, 1857). Az entericus ganglionokban érző-, motoros- és interneuronok együttesen megtalálhatók, a ganglionok mérete és a bennük lévő neuronok száma függ a vizsgált állatfajtól, a bélszakasztól, és az életkortól is (Bódi és mtsai., 2009).

A myentericus plexus (MP) ganglionjai a bélfal külső hosszanti és belső körkörös simaizomrétege között helyezkednek el, s a bélcsatorna motoros funkcióinak szabályozásáért felelősek. A submucosus plexus (SP) a körkörös simaizomréteg és a submucosa között található, s a bél szekretomotoros működését szabályozza (1. ábra; Furness and Costa, 1987).



1. ábra A bélfal szöveti rétegei. Az emlős bélidegrendszer két nagyobb ganglionált plexusa: a myentericus és a submucosus plexus (Furness, 2007, nyomán).

I. 2. A cukorbetegség és krónikus szövődményei

Napjainkban a diabetes mellitus egy igen gyakori népbetegség, mely minden korosztályt érint. Két fő típusa az I. és II. típusú cukorbetegség. Az I. típusú diabetes mellitus az autoimmun betegségek egyik fajtája, melynek tünetei már gyermekkorban megfigyelhetők. A betegség során a hasnyálmirigy Langerhans-szigeteiben található inzulintermelő béta-sejtek autoimmun gyulladásos folyamat során elpusztulnak, így a pankreász nem lesz képes az inzulin termelésére, s ezáltal a vércukorszint szabályozásának érzékeny egyensúlya felborul. A II. típusú diabetes mellitusban a hasnyálmirigy által termelt inzulint a sejtek nem tudják megfelelően érzékelni, ezért inzulinrezisztencia alakul

ki. A cukorbetegség e típusa főként az erre genetikailag hajlamos vagy nem megfelelő életmódot folytató idősebb egyéneknél jellemző, de ma már az elhízott gyermekek körében is egyre elterjedtebb. A két kórkép patomechanizmusa különböző, de a megemelkedett vércukorszint mind az I. és mind a II. típusú diabetes mellitus jellemző tünete.

A hyperglykaemia kísérletes kiváltására a szakirodalomban általánosan elterjedt a streptozotocin (STZ) alkalmazása. A STZ egy olyan diabetogén ágens, mely a hasnyálmirigy inzulintermelő béta-sejtjeire fejt ki citotoxikus hatását. Miután a STZ bejut ezekbe a sejtekbe, DNS károsodást és reaktív oxigén gyökök felszabadulását indukálja, így idézi elő a béta-sejtek pusztulását (Szkudelski, 2001). Ezért a STZ-kezelt állatok alkalmasak az I. típusú diabetes mellitus kísérletes modellezésére.

A hyperglykaemia tartós fennállása következtében olyan szövődmények alakulhatnak ki, melyek szinte minden szervet, szervrendszert érintenek. A cukorbetegség krónikus szövődményei közé tartozik a makro- és mikroangiopátia, vagyis a közepes és nagy átmérőjű erek illetve a kisebb kapillárisok károsodása. A makroangiopátia kialakulásában a hyperglykaemia mellett a magas vérnyomás is jelentős szerepet játszik, melynek következtében súlyosan károsodnak a szív koszorúerei, az agyi erek és a végtagok artériái is (Bortolotto, 2007). A kis artériák és hajszálerek endotheliumának működészavara pedig súlyosan érinti a különböző szervek tápanyag- és oxigénellátását. Diabéteszes retinopátia során a szemfenék ereinek sérülését, nefropátia során a vese kapillárisainak elváltozását, míg neuropátia során az idegelemeket ellátó hajszálerek károsodását figyelhetjük meg (Barnett, 1991; Roy és mtsai, 2003).

A cukorbeteg páciensek több, mint háromnegyedénél fordulnak elő gasztrointestinális tünetek, mint a hányás, hasi fájdalom, székrekedés vagy hasmenés (Maleki és mtsai., 2000; Tang és Friedenberg, 2011). A diabéteszes gasztroenteropátia patogenezise egy rendkívül összetett és bonyolult folyamat, melynek kialakulásában a ENS sérülése kritikus szerepet tölt be (Yarandi és Srinivasan, 2014).

I. 3. A bazális membrán szerkezete és megváltozása diabéteszben

A bazális membrán (BM) egy bonyolult és magasán szervezett extracelluláris mátrix (ECM), mely sokféle sejtípussal, többek között endothelsejtekkel is érintkezik. Az ereket körülvevő BM egy filtrációs gátként működik, fontos szerepe van a transzendotheliális transzportban és így az erek permeabilitásának szabályozásában,

emelett mechanikai támaszt és stabilitást biztosít. A transzendotheliális transzport során a különböző makromolekulák transzcitózissal közlekednek az endothelsejteken keresztül. Ez a folyamat nagyon fontos a vér és a szövetek közötti kétirányú anyagtranszportban, ezáltal nélkülözhetetlen a szervezet homeosztázisának fenntartásában (Simionescu és mtsai., 2002).

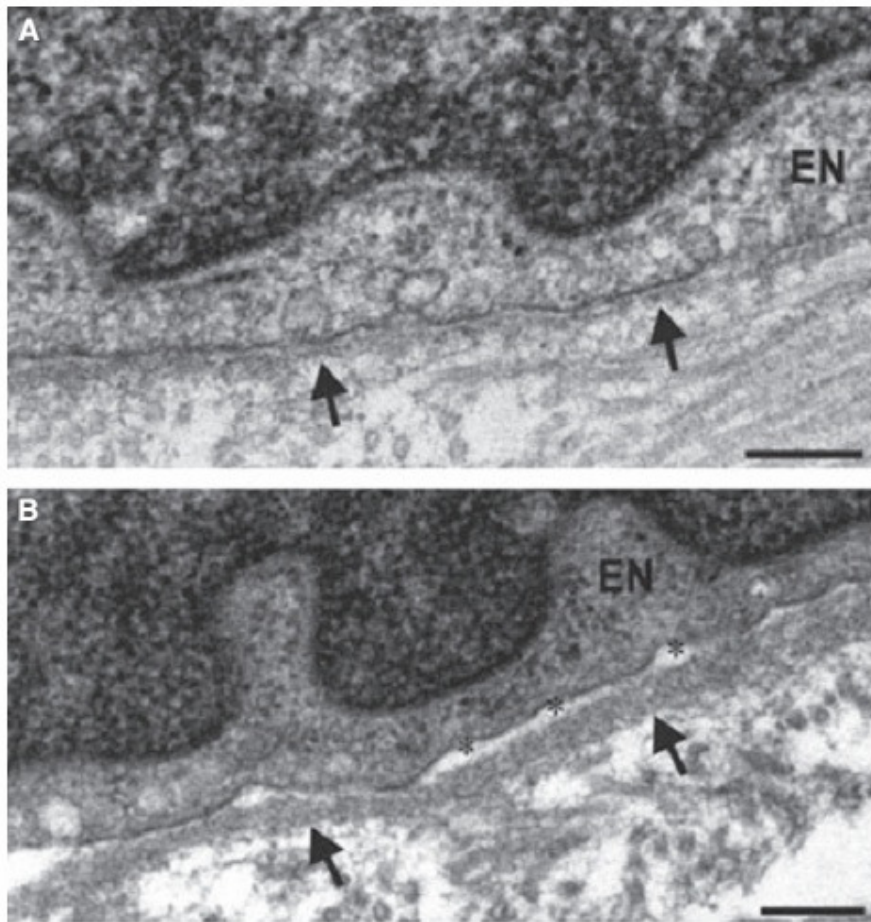
A BM fő alkotói olyan ECM komponensek, mint a IV. típusú kollagén, a laminin, a proteoglikánok vagy a fibronectin (Paulsson, 1992). A BM elősegíti a sejtek kapcsolódását, a sejtek migrációját, növekedését, a szöveti regenerációt és a sejtdifferenciációt is (Ffrench–Constant és mtsai., 1989; Podesta és mtsai., 1997; Brander és mtsai., 2008).

Diabétesz során az elsőként jelentkező szövettani elváltozás az endothelialis BM megvastagodása (2. ábra). Korábban megfigyelték azt is, hogy a BM vastagodása nem csak a diabéteszes retinopátia során meghatározó (Roy és mtsai., 1990), hanem a diabéteszes nefropátia és neuropátia patogenezisében is kritikus szerepet tölt be (Pinchback és mtsai., 1996; Roy és mtsai., 2010a).

A BM megvastagodásának hátterében két folyamat is fontos szerepet játszhat. Egyrészt az ECM komponensek fokozott szintézise, másrészt az ECM molekulák degradációjának csökkenése is az ECM alkotók megnövekedett mennyiségét, s így a BM megvastagodását eredményezi (Roy és mtsai., 1996). Roy és mtsai. (1990) a diabéteszes retinopátia vizsgálata során megállapították, hogy a retina endothelsejtek BM-ja megvastagszik, mely során a BM alkotók közül főként a IV. típusú kollagén, a laminin és a fibronectin halmozódnak fel. Megfigyelték azt is, hogy a BM vastagodásának következtében megnőtt az erek permeabilitása diabéteszes patkányok retinájában (Oshitari és mtsai., 2006), azonban e két folyamat közti kapcsolatról még nincsenek egyértelmű kísérletes bizonyítékok. A BM komponenseinek lebontásáért a mátrix metalloproteinázok (MMPk) felelősek. Ezek a cink-függő enzimek fontos szerepet játszanak a BM lebontásának és felépítésének dinamikus egyensúlyában (Visse és Nagase, 2003). Irodalmi adatok szerint a MMPk expressziója és aktivitása hyperglükæmia hatására nagymértékben csökken a glomerulus endothelsejtekben, mely a BM komponensek csökkent degradációját, s így a BM vastagodását eredményezi (Kitsiou és mtsai., 2003).

A BM komponensek fokozott szintézise eddigi ismereteink szerint megváltoztatja a BM integritását és funkcióját, mely a retina kapillárisainak sérüléséhez vezet diabétesz során (Roy és mtsai., 2010a). Több kutató csoport is megfigyelte, hogy a hyperglükæmia

miatt megemelkedett fibronectin szintézis hozzájárul az erek átteresztőképességének növekedéséhez (Roy és mtsai., 1996), míg a mátrix komponenseket összekapcsoló fibronectin gátlása során csökkent a BM vastagsága és az erek permeabilitása is (Roy és mtsai., 2003). Chronopoulos és mtsai. (2010) szolgáltatották az első funkcionális bizonyítékot arra, hogy a lizil-oxidáz megváltozott expressziója és a BM megvastagodása között összefüggés van.



2. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel kontroll (A) és diabéteszes (B) patkány colonjában található kapillárisok endotheliumáról (EN). Az ereket körülvevő BM (nyíl) a cukorbeteg állatok vastagbelében megvastagodott és helyenként elvált (csillag) a kapillaris endotheliumtól (Bódi és mtsai., 2012, nyomán). Lépték: 200 nm.

I. 4. A lizil-oxidáz szerepe cukorbetegségben

A lizil-oxidáz (LOX; EC 1.4.3.13) enzim egy réz-függő amin-oxidáz, mely az ECM komponensek, mint a kollagén és elasztin lizin tartalmú oldalláncait oxigén jelenlétében deaminálja, így azok spontán keresztkötéseket alakíthatnak ki egymással. Ez a folyamat nélkülözhetetlen a szövetek megfelelő működéséhez.

A LOX egy glikozilált proenzim formájában szekretálódik (proLOX, 50 kDa), mely extracelluláris proteolitikus hasításokon megy keresztül mielőtt érett és biológiailag aktív enzimmé alakul (LOX, 32 kDa) (Trackman, 1992). A LOX-nak különböző izoformáit ismerjük (LOXL; LOX-like proteinek), melyek genetikailag jól megkülönböztethetők (Molnar és mtsai., 2003). Minden LOX-családba tartozó enzim rendelkezik a C-terminális végén egy konzervált aminosav szekvenciával, mely meghatározza a réz-kötő és a citokin receptor-szerű domént. Ez a C-terminális vég felelős az enzim amin oxidáz aktivitásáért, míg az N-terminális vég minden izoforma esetében egyedi funkciót hordoz (Csiszar, 2001).

Tekintve, hogy a LOX-mediált keresztkötések nélkülözhetetlenek a szövetek integritásához és megfelelő működéséhez, a LOX enzim előfordulását már számos szervben, így a bőrben, a retinában, az aortában, a tüdőben, az agyban, a szívben és a vesében is kimutatták (Gilad és mtsai., 2005). A LOX megváltozott aktivitása szoros kapcsolatban hozható különböző betegségekkel. Az enzim aktivitásának csökkenését figyelték meg a latirizmus (toxikus aminosavak okozta betegség) során (Wilmarth és mtsai., 1992), míg az enzim felhalmozódása daganatos áttétek, metasztázisok kialakulásához járulhat hozzá (Erler és mtsai., 2006). Már korábban megfigyelték azt is, hogy a megnövekedett LOX-függő keresztkötések elősegíthetik fibrotikus betegségekben is az ECM felhalmozódását (Rodriguez és mtsai, 2008). Chronopoulos és mtsai. (2010) kísérleteik során megállapították, hogy a diabéteszes retinopátia hozzájárul a LOX és a proLOX mRNS megnövekedett expressziójához és aktivitásához, mely során megnő a kollagén keresztkötések száma. Megfigyelték azt is, hogy a BM komponensek, különösen a IV. típusú kollagén túlzott szintézise hozzájárul az erek BM-jának megvastagodásához és így a retina kapillárisainak barrier funkciójának zavarához is.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Számos tanulmány bizonyítja, hogy hyperglykaemia hatására az ereket körülvevő BM megvastagodik, valamint a kapillárisok áteresztőképessége is fokozódik. Azonban az első funkcionális bizonyítékot, miszerint a BM vastagodása ténylegesen összefügg a kapillárisok permeabilitásának növekedésével, csak nemrégiben írták le (Chronopoulos és mtsai. 2010). Munkacsoportunk bizonyította, hogy diabétesz során a myentericus ganglionok közelében futó kapillárisok endotheliumát körülvevő BM bélszakasztól függően vastagodott, s az inzulinkezelésre is eltérően reagált (Bódi és mtsai., 2012).

Chronopoulos és mtsai. (2010) a diabéteszes retinopátia vizsgálata során megállapították, hogy a BM megvastagodásával egyidejűleg a LOX enzim expressziója is megnő. Bár a LOX fiziológiás expressziójának mintázatára a bélcsatorna különböző szakaszaiban még nem állnak rendelkezésre irodalmi adatok, feltételezzük, hogy az enzim bélszakasz-specifikus expressziója, illetve ennek diabéteszben történő változása fontos szerepet játszik a BM vastagodásában.

Ezért munkánk során célul tűztük ki a LOX enzim expressziójának vizsgálatát a myentericus ganglionok neuropil régiójában és a neuronok perikaryonjában, a MP közelében futó kapillárisok endotheliumában és a bélfal simaizomsejteiben, kontroll, STZ-indukált kezeletlen diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban. A LOX régió-specifikus vizsgálata során kvantitatív posztembedding immunhisztokémia segítségével a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Mutat-e bélszakasz-függő különbségeket a LOX enzim expressziója fiziológiás körülmények között?
- Változik-e a LOX enzim mennyisége a diabétesz illetve az azonnali inzulinkezelés hatására?
- Megfigyelhetünk-e régió-specifikus különbségeket az enzim termelődésében a diabéteszes és az inzulin-kezelt patkányok különböző bélszakaszaiban?
- Összefügg-e a LOX enzim expressziós mintázata a BM bélszakasz-specifikus vastagodásával diabétesz során?

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A kísérleti állatok tartása és felhasználása az Európai Unió etikai előírásainak (86/609/EEC) és a magyar törvényi szabályozásnak (XXVIII/1998 és 243/1998) megfelelően, az intézményi etikai bizottság engedélyével történt.

III. 1. I. típusú krónikus diabéteszes állatmodell előállítása

Kísérleteinkben fiatal felnőtt, hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat random módon kontroll (n=3), STZ-indukált kezeletlen diabéteszes (n=4) és inzulin-kezelt diabéteszes (n=5) csoportokba osztottuk. A hyperglikémiát egyszeri STZ (Sigma, USA) injekció segítségével váltottuk ki, melyet intraperitoneálisan 60 mg/kg dózisban adtunk be az állatoknak. 48 órával a STZ-kezelés után a farokvénából vett vérből megmértük az állatok vércukorszintjét. A patkányokat akkor tekintettük cukorbetegnek, ha a vércukor-koncentrációjuk 18 mM fölé emelkedett. Az inzulin-kezelt diabéteszes csoport állatai az inzulint (Humulin M3, Eli Lilly Nederland) szubkután injekció formájában, napi két dózisban (délelőtt 4 egység és délután 2 egység) kapták. Az inzulin dózisokat rendszeres vércukormérés mellett, az állatok aktivitását figyelembe véve állítottuk be. A kontroll és a kezeletlen diabéteszes csoport állatai azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot kaptak szintén szubkután injekció formájában. A patkányok vércukor-koncentrációját és testtömegét a kísérleti periódus időtartama alatt (10 hét) hetente mértük és ellenőriztük.

III. 2. Szöveti mintavétel

Tíz héttel a diabétesz kiváltása után az állatokat cervikális diszlokációval áldoztuk fel. A patkányok hasüregét U-alakban felvágtuk és az egész bélcsatornát kiboncoltuk. Vizsgálatainkhoz a duodenumból (1 cm-re disztálisan a pylorustól), az ileumból (1 cm-re proximálisan az ileocecalis junctiontól) és a colon közepső területéről vettünk mintákat. A kivett bélszakaszokból eltávolítottuk a béltartalmat, majd foszfát pufferrel (PB, 0,05 M) alaposan átmossuk. Ezt követően a 2-3 mm-es béldarabokat 2 % paraformaldehid és 2 % glutáraldehid keverékében (0,1 M PB-rel készült az oldat) fixáltuk, majd elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz készítettük elő.

III. 3. A szövetminták előkészítése elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz

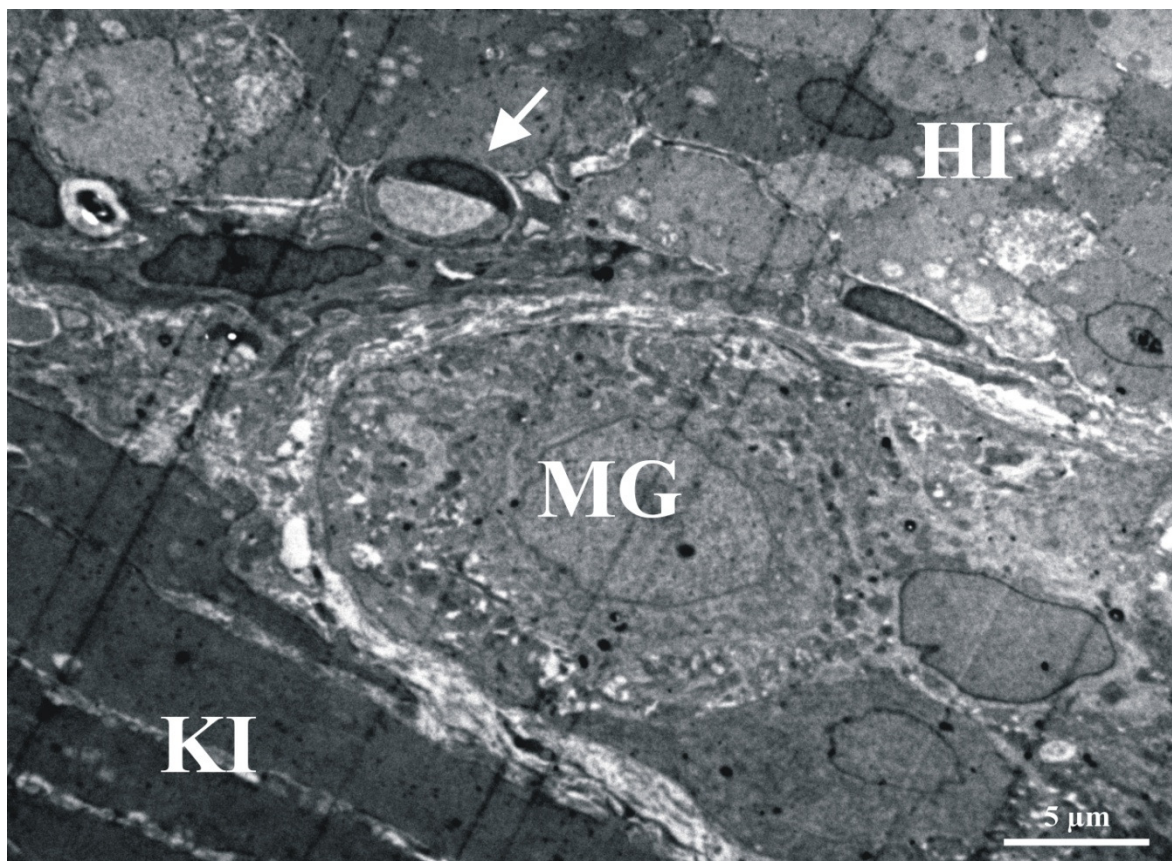
A különböző bélszakaszokból származó mintákat fixálás és mosás után 1 %-os OsO_4 oldatban egy órán keresztül utófixáltuk. A mintákat 0,1 M PB-ben mostuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük. Az 50, majd 70 %-os alkohol oldattal való kezelés után a mintákat 5 percig uranil-acetáttal telített 70 %-os etanolba tettük, majd 96 %-os etanolban, abszolút alkoholban és acetonban folytattuk a víztelenítést. Ezt követően a mintákat aceton intermédiumon át Epon gyantába ágyztuk, majd a gyantát 60°C-on polimerizáltattuk. Az ultravékony metszeteket (70 nm) Reichert típusú ultramikrotómmal készítettük. A kontrasztfestés Reynolds-féle módszerrel (1963) történt. A mintákat 20 percre uranil-acetát oldatcseppekre helyeztük, majd desztillált vízzel mostuk, ezután 3 percre ólom-citrát oldatba tettük és ismét mostuk.

III. 4. Lizil-oxidáz posztembedding immunhisztokémia

A lizil-oxidáz enzim expressziós mintázatát, posztembedding immunhisztokémiai módszerrel vizsgáltuk. A festés során nedves kamrában dolgoztunk, a festés egyes lépéseit parafilmre helyezett cseppeken végeztük. Az ultravékony metszeteket először 1 % perjódsvába tettük (9 perc), majd desztillált vizes mosás (3x5 perc) után 2 %-os Na-perjodátba helyeztük (10 perc). Ezt követően a mintákat ismét mostuk (3x5 perc), majd TRIS-pufferes sóoldat (TBS)-cseppekre (pH 7,4) helyeztük (3x2 perc). Ezután a mintákat 30 percig 1 %-os borjú szérumban (BSA) [0,05g BSA + 5 ml TBS (pH=7,4)] blokkoltuk. Ismételt desztillált vizes mosást (2x5 perc) követően a grideket 2x3 percre TBS-oldatban inkubáltuk. Ezután a grideket az elsődleges szérumban (anti-LOX; Novus Biologicals, USA; 1:50 hígítás) inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Az elsődleges antitestet az 1 % BSA-nal hígítottuk ki. Másnap a metszeteket ismét TBS-oldatba (2x10 perc), majd 2x5 percig GOLD-GAR cseppekre [0,05g BSA + 25 µl Tween-20 + 5 ml TRIS (pH=7,6)] tettük. A továbbiakban a mintáinkat a másodlagos szérumban (anti-nyúl IgG 18 nm-es aranyzemcse; Jackson Immuno Research Laboratories, USA; 1:20 hígítás) inkubáltuk 3 órán keresztül. A másodlagos antitestet a GOLD-GAR-pufferrel hígítottuk ki. Az immunfestés végén a metszeteket desztillált vízben alaposan átmostuk (3x5 perc). A festési eljárás során az antitestek kivételével minden oldatot átszűrtünk, hogy csökkentsük a mikroszenyveződések mértékét.

III. 5. Kvantitatív transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok

A posztembedding immunhisztokémia során megfestett ultravékony metszeteket MEGAVIEW II kamerával felszerelt Philips CM 10 típusú transzmissziós elektronmikroszkóppal vizsgáltuk. Digitális felvételeket készítettünk minden vizsgált bélszakaszban és kísérleti csoportban a myentericus ganglionokban elhelyezkedő neuronok sejtestjéről (20-20 kép) és neuropil régiójáról (15-15 kép), valamint a simaizom sejtekről (5-5 kép, montázs) és a myentericus ganglionok közelében futó kapillárisokról (5-5 db) (3. ábra). A képek minden esetben azonos felbontással és nagyításon (25000x) készültek. A digitális képeken meghatároztuk az egységnyi területen lévő lizil-oxidázt jelölő 18 nm-es arany szemcsék számát, melyből a lizil-oxidáz enzim expressziós mintázatára következtettünk.



3. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel inzulin-kezelt diabéteszes patkány duodenumából. MG- myentericus ganglion, KI- körkörös izomréteg, HI- hosszanti izomréteg, nyíl- kapilláris. Lépték: 5 μ m.

III. 6. Statisztikai analízis

Az adatokat statisztikai analízisnek vetettük alá (GraphPad Prism 4.0 Software), mely során egyfaktoros varianciaanalízist (ANOVA) és Newman-Keuls tesztet végeztünk. A varianciaanalízis feltételei – a random mintavétel, a függetlenség és a varianciák homogenitása – teljesültek. A szignifikancia szintjét $p < 0,05$ értékben határoztuk meg. Eredményeinket oszlopdiagrammokon ábrázoltuk, az értékeket átlag $\pm$ SEM formában tüntettük fel.

IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. A kísérleti állatok tömege és vércukorszintje

A hyperglukaemiát kísérleteink során STZ-nal váltottuk ki. A STZ injekció hatására az állatok vércukorszintje szignifikánsan megnövekedett ($p < 0,001$) a kontroll csoport állatainál mért értékekhez képest. Az inzulin-kezelt diabéteszes csoport patkányainak vércukor-koncentrációját a napi két dózisban adott inzulin a kontroll szint közelében tartotta (1. táblázat).

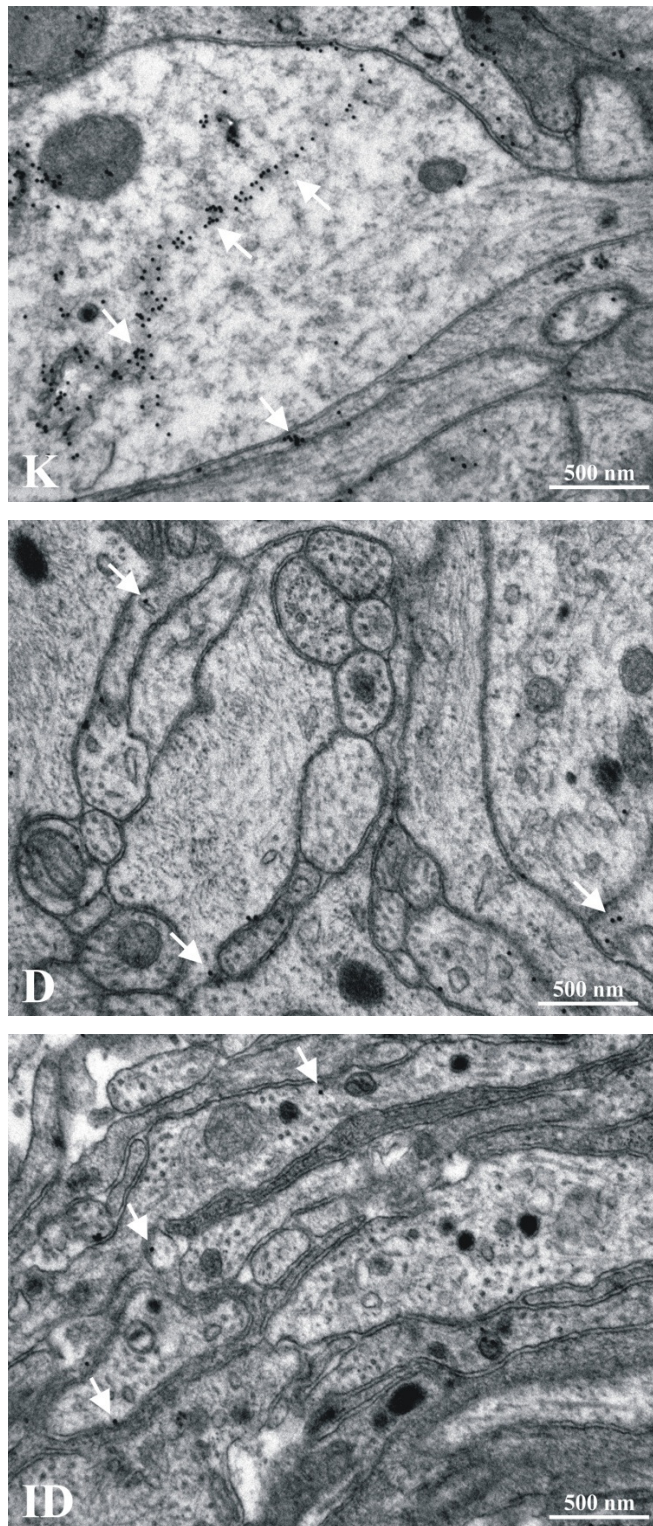
A tíz hetes kísérleti periódus alatt a kezeletlen diabéteszes patkányok ugyan híztak, de testtömegük kisebb mértékben gyarapodott a másik két csoport állataihoz képest. A diabéteszes állatoknál a testtömeg kisebb mértékű növekedése mellett megjelentek a cukorbetegségekre jellemző tünetek, mint a fokozott folyadékbevitel és vizeletürítés, a csökkent aktivitás, illetve a tizedik hét végére két állatnál egyértelműen retinopátiára utaló jeleket figyeltünk meg.

	Testtömeg (g) $\pm$ SEM		Vércukor-koncentráció (mM) $\pm$ SEM	
	kezdeti	végő	kezdeti	végő
Kontroll (n=3)	296,0 $\pm$ 4,35	508,3 $\pm$ 18,56***	6,16 $\pm$ 0,17	5,73 $\pm$ 0,26
Diabéteszes (n=4)	314,3 $\pm$ 6,86	452,8 $\pm$ 26,05***	6,35 $\pm$ 0,06	28,05 $\pm$ 2,19***
Inzulin- kezelt diabéteszes (n=5)	300,2 $\pm$ 4,03	502,6 $\pm$ 23,16***	6,16 $\pm$ 0,21	2,82 $\pm$ 0,28

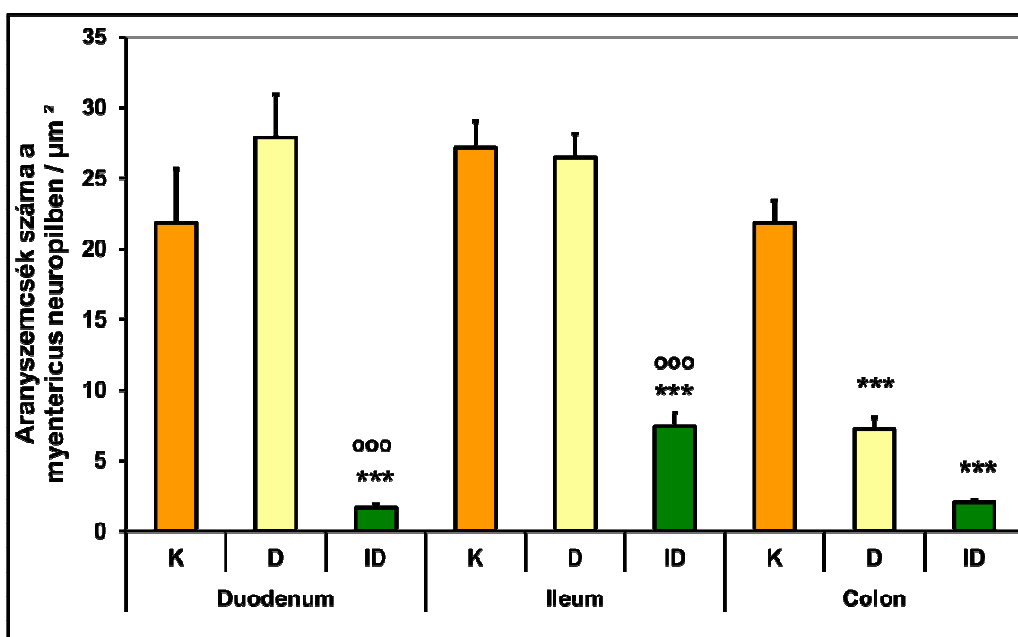
1. táblázat A kísérletek során használt kontroll, STZ-nal indukált kezeletlen diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes patkányok testtömege és vércukorszintje. *** $p < 0,001$ (kezdeti és végő érték között).

IV. 2. A lizil-oxidáz enzim expressziójának mintázata myentericus ganglionok neuropil régiójában

A myentericus ganglionok neuropil régiójában található aranyszemcsék száma, melyek a LOX enzim expresszióját jelzik, régió-specifikus mintázatot mutatott a bélcsatorna különböző szakaszaiban minden kísérleti csoportban. A LOX-t jelölő 18 nm-es aranyszemcsék legnagyobb hányada elsősorban membránhoz kötötten lokalizálódott (4. ábra). Az aranyszemcsék egységnyi területre vonatkoztatott száma a diabéteszes állatok duodenumában kis mértékben megnövekedett, az ileum területén nem változott, míg a colonban szignifikánsan csökkent ($p < 0,001$) a kontroll értékekhez képest. Azonnali inzulinkezelés hatására mindhárom bélszakaszban nagymértékű csökkenést ($p < 0,001$) figyeltünk meg az aranyszemcsék számában a kontroll és a kezeletlen diabéteszes csoporthoz képest (5. ábra).



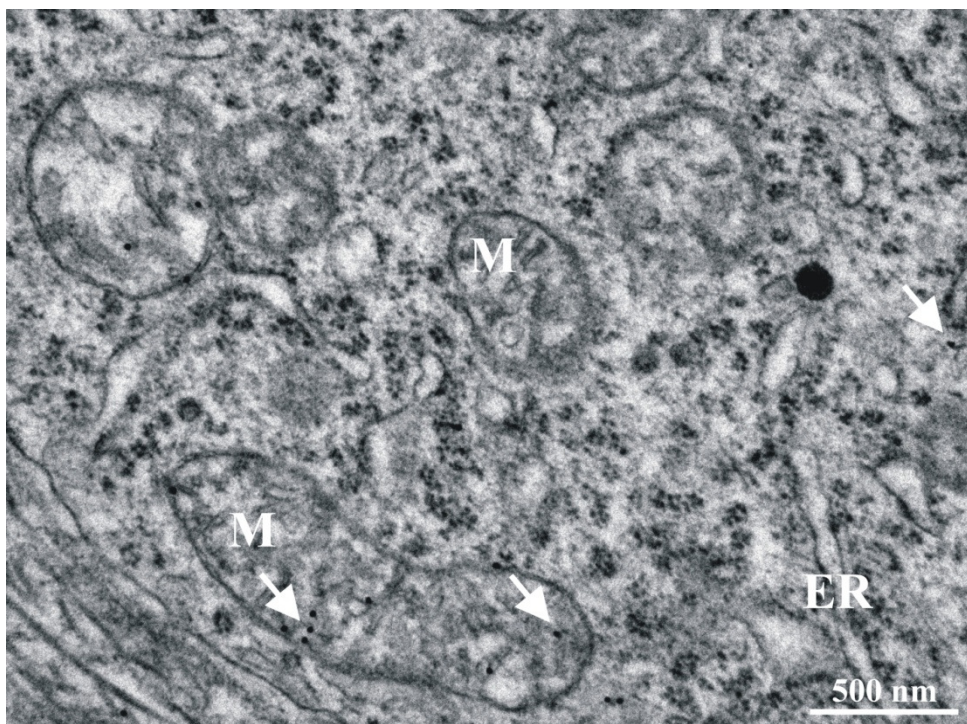
4. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvételek kontroll (K), kezetlen diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) állatok vastagbeléből származó myentericus ganglionból LOX posztembedding immunhisztokémiai festést követően. Nyíl-LOX enzimet jelölő 18nm-es arany szemcse. Lépték: 500 nm.



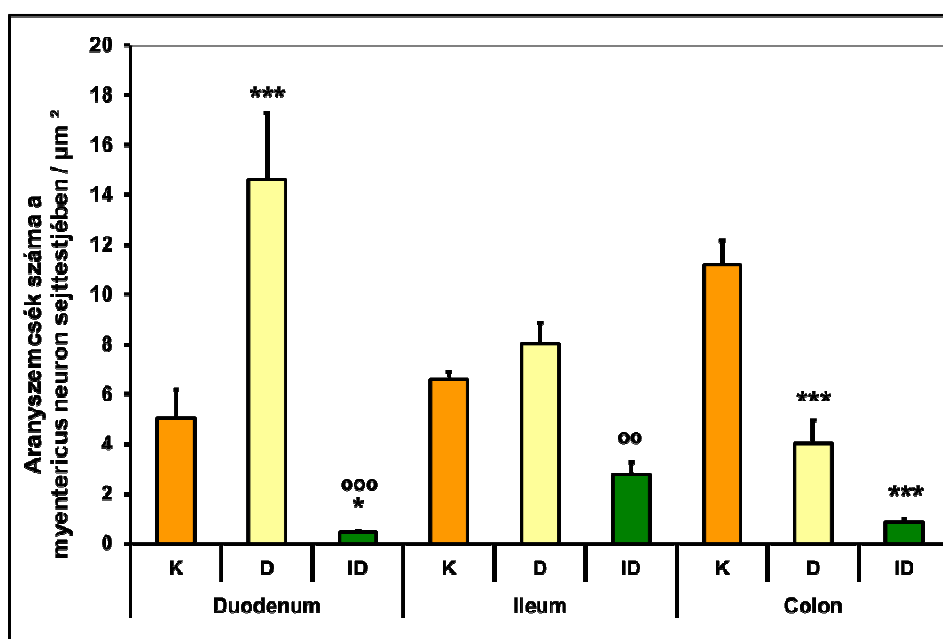
5. ábra A LOX enzimet jelölő arany szemcsék száma a myentericus ganglionok neuropil régiójában kontroll (K), kezeletlen diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. Az adatokat $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formájában tüntettük fel. *** $p < 0,001$ (kontroll és diabéteszes csoportok között); °°° $p < 0,001$ (kezeletlen diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes csoportok között).

IV. 3. A lizil-oxidáz enzim expressziójának mintázata myentericus neuronok sejttestjében

A myentericus neuronok sejttestjében a neuropil régióhoz hasonlóan szintén bélszakasz-specifikus különbségeket figyeltünk meg a LOX enzim expressziójában. Munkánk során a perikaryon területét vizsgáltuk, a LOX enzimet jelölő szemcsék itt is elsősorban membránokhoz kötődtek (mitokondriális membrán, plazmamembrán, endoplazmatikus retikulum membránja), azonban a jelek száma lényegesen kevesebb volt, mint a ganglionáris neuropil területén (6. ábra). A kezeletlen diabéteszes állatok duodenumában az arany szemcsék száma közel háromszorosára növekedett ($5,03 \pm 1,15$ vs. $14,62 \pm 2,64$), az ileumban alig változott ($6,55 \pm 0,33$ vs. $8,01 \pm 0,85$), míg a colonban majdnem harmadára csökkent ($11,18 \pm 0,97$ vs. $4,03 \pm 0,94$) a kontroll állatokhoz képest. Az inzulinkezelés hatására minden állatcsoportban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk a szemcsék számában a kontroll és a kezeletlen diabéteszes csoportok értékeihez viszonyítva (7. ábra).



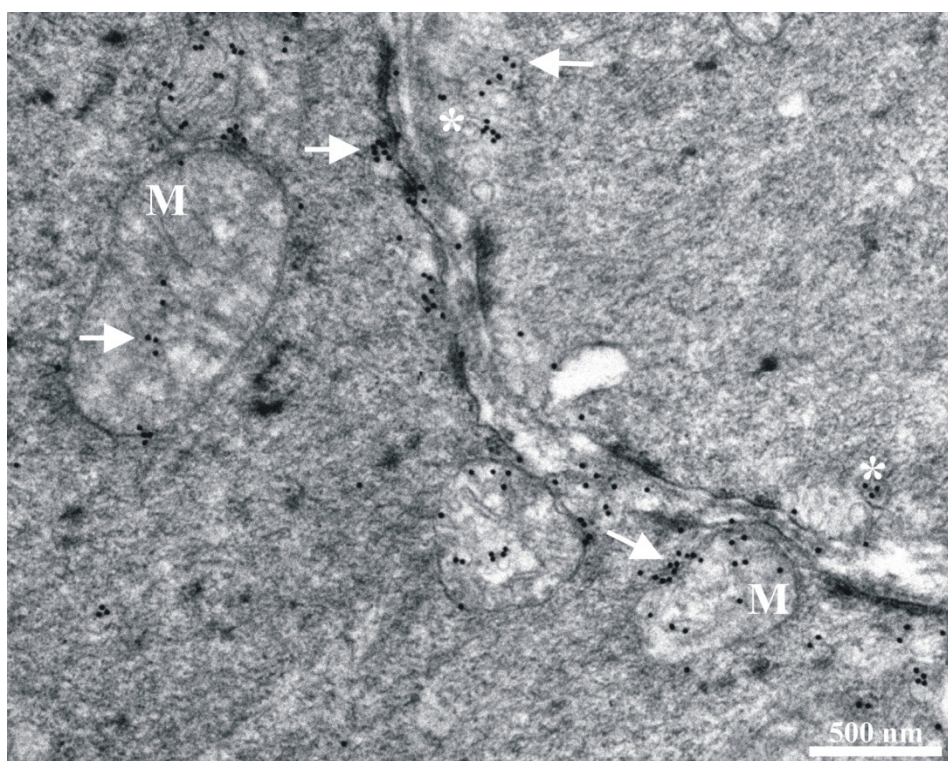
6. **ábra** Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel a myentericus neuronok sejttestjéről kontroll patkány duodenumából LOX posztembedding immunhisztokémiai festést követően. M-mitokondrium, ER-endoplazmatikus retikulum, nyíl-LOX enzimet jelölő 18 nm-es aranyzemcsé. Lépték: 500 nm.



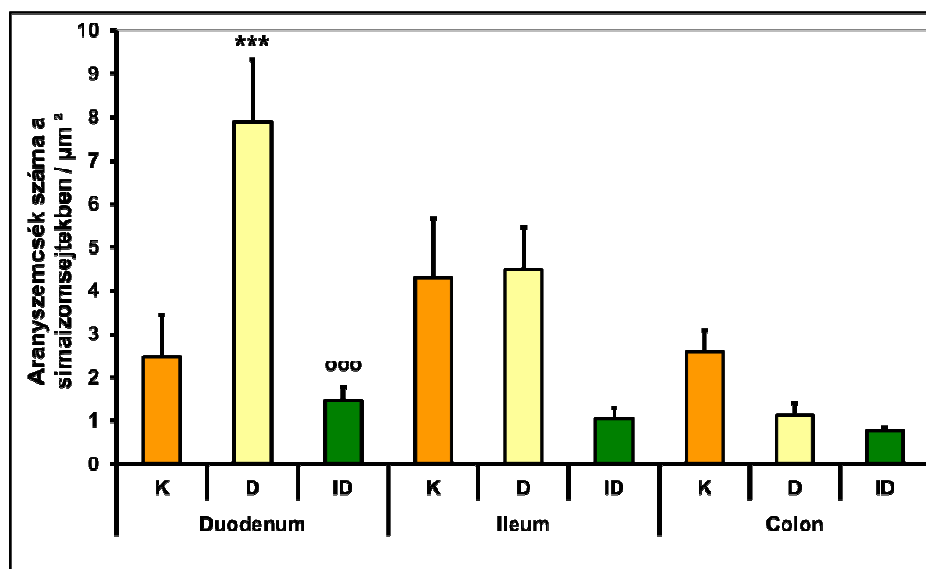
7. **ábra** A LOX enzimet jelölő aranyzemcsék száma a myentericus neuronok perikaryonjában kontroll (K), kezeltlen diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formájában tüntettük fel. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (kontroll és diabéteszes csoportok között); °° $p < 0,01$, °°° $p < 0,001$ (kezeltlen diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes csoportok között).

IV. 4. A lizil-oxidáz enzim expressziójának mintázata a bélfal simaizomsejtjeiben

Az enzimet jelölő aranyszemcsék a simaizomsejtekben főként a mitokondriumok membránjához és a plazmamembránhoz kötődtek vagy a caveolákban helyezkedtek el (8. ábra). Diabéteszes patkányok duodenumában több mint háromszorosára nőtt a szemcsék száma a kontroll értékekhez képest, míg az azonnali inzulinkezelés ezt az emelkedést meggátolta. A diabéteszes állatok ileumában az aranyszemcsék száma nem változott a kontroll értékekhez képest, inzulinkezelés hatására azonban csökkenést figyeltünk meg. A diabéteszes állatok colonjában a LOX expressziója körülbelül felére csökkent a kontroll értékekhez viszonyítva, az inzulinkezelés azonban nem fokozta az aranyszemcsék számának csökkenését (9. ábra).



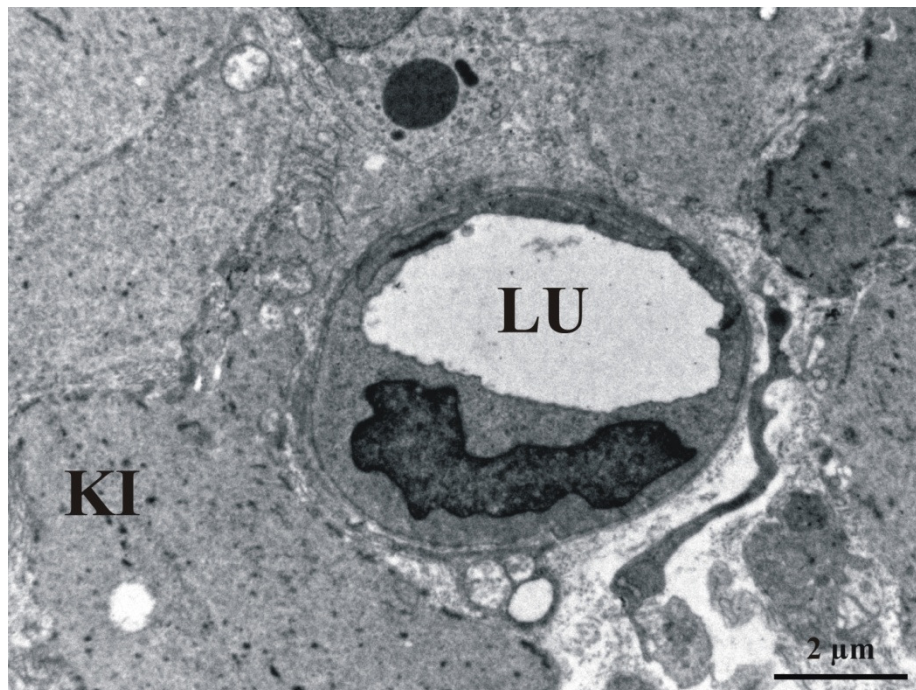
8. **ábra** Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel a bélfal simaizomsejtjéről diabéteszes patkány duodenumából LOX posztembedding immunhisztokémiai festést követően. M-mitokondrium, nyíl-LOX enzimet jelölő 18 nm-es arany szemcse, csillag-caveola. Lépték: 400 nm.



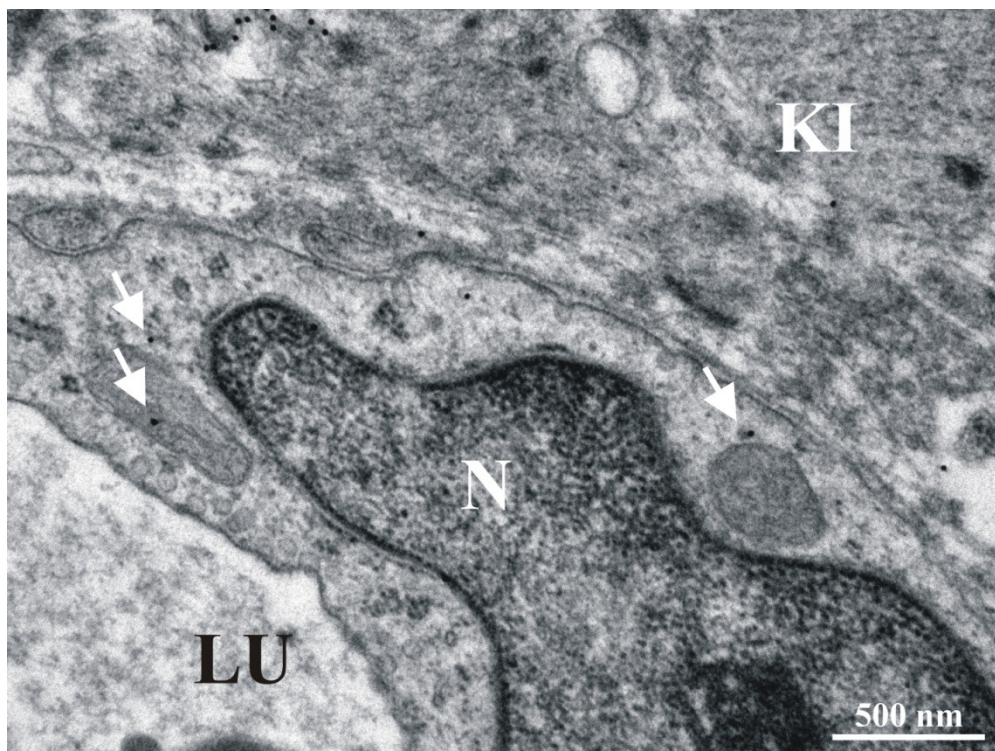
9. **ábra** A LOX enzimet jelölő arany szemcsék száma a bélfal simaizomsejtjeiben kontroll (K), kezeletlen diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formájában tüntettük fel. *** $p < 0,001$ (kontroll és diabéteszes csoport között); ⁰⁰⁰ $p < 0,001$ (kezeletlen diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes csoport között).

IV. 5. A lizil-oxidáz enzim expressziójának mintázata a myentericus plexus közelében futó kapillárisok endotheliumában

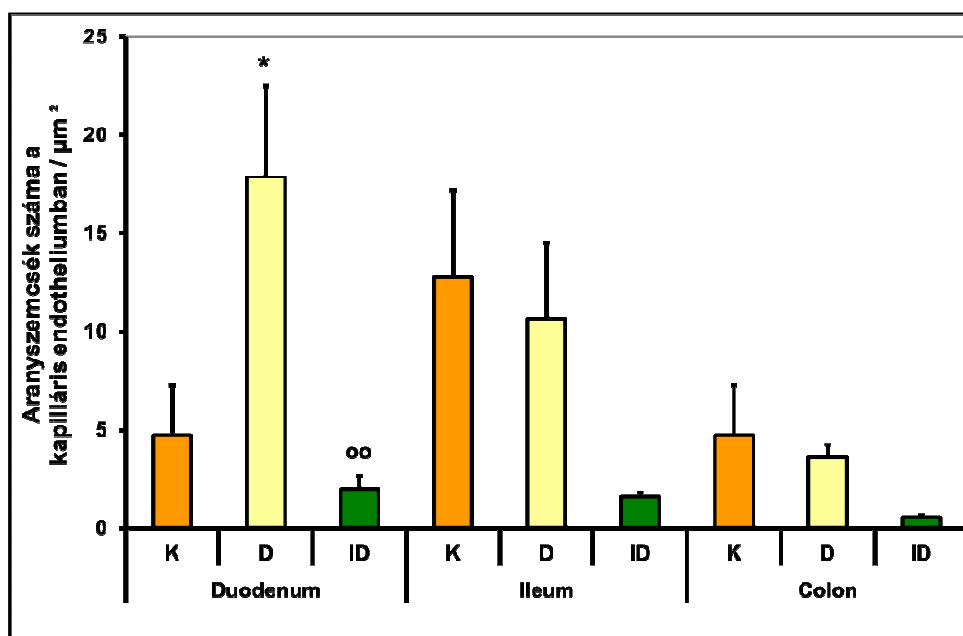
A MP közelében futó kapillárisok fontos szerepet töltenek be a myentericus ganglionok vér- és tápanyagellátásában. Kísérleteinkben olyan kapillárisokat vizsgáltunk, melyek keresztmetszeti képe 5800x nagyításon belefért a látótérbe (10. ábra). A LOX enzim a kapilláris endotheliumban is bélszakasz-specifikusan expresszálódott. A LOX enzimet jelölő arany szemcsék az erek endothelsejtjeiben is főként membránhoz kötődve lokalizálódtak (11. ábra). A diabéteszes csoportban a duodenumban az arany szemcsék száma több mint négyszeresére növekedett, míg az inzulinkezelés ezt a növekedést megakadályozta. Az ileumban, valamint a colonban egymáshoz hasonló változásokat figyeltünk meg. Az arany szemcsék denzitása diabétesz során kis mértékben csökkent és az inzulin-kezelt állatok esetében a csökkenés tovább fokozódott (12. ábra).



10. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel egy myentericus ganglion közelében futó kapillárisról inzulin-kezelt patkány colonjában. KI-körkörös izomréteg, LU-kapilláris lumen. Lépték: 2 μm.



11. ábra Reprezentatív elektronmikroszkópos felvétel a myentericus plexus közelében futó kapilláris endotheliumáról kontroll állat duodenumában. LU-kapilláris lumen, N-nucleus, KI-körkörös izomréteg, nyíl- LOX enzimet jelölő 18 nm-es aranyzemcse. Lépték: 500 nm.



12. ábra A LOX enzimet jelölő aranyzemcsék száma a kapilláris endotheliumban kontroll (K), kezeletlen diabéteszes (D) és inzulin-kezelt diabéteszes (ID) patkányok különböző bélszakaszaiban. Az adatokat átlag $\pm$ SEM formájában tüntettük fel. * $p < 0,05$ (kontroll és diabéteszes csoport között); ^{oo} $p < 0,01$ (kezeletlen diabéteszes és inzulin-kezelt diabéteszes csoport között).

V. EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

A bélcsatorna különböző funkcióinak szabályozásáért a ENS felelős. A ENS területén a neuronok és gliasejtek ganglionált plexusokba rendeződnek, s a ganglionok környezetében futó kapillárisok fontos szerepet játszanak a bélcsatorna idegelemeinek vér- és tápanyagellátásában. A hyperglykaemia tartós fennállásának következtében kialakuló szövődmények az entericus neuronok és a bélfal kapillárisainak működését egyaránt érintik. I. típusú diabéteszben a myentericus neuronok bélszakasztól függően pusztulnak (Izbéki és mtsai., 2008) és a ganglionok tápanyag- és oxigénellátásában fontos szerepet játszó véredények is régió-specifikus módon sérülnek (Bódi és mtsai., 2012).

Kutatócsoportunk nemrégiben bizonyította, hogy a bélfal kapillárisainak endotheliumát körülvevő BM a diabéteszes állatok különböző bélszakaszaiban különböző mértékben megvastagodott és az inzulinkezelés hatására is eltérően reagált (Bódi és mtsai., 2012).

Ahhoz, hogy megértsük milyen molekuláris mechanizmusok állnak az endothelialis BM diabéteszszel összefüggő vastagodásának hátterében, kísérletesen indukált diabéteszes patkánymodell segítségével kezdtük el vizsgálni a LOX enzim expressziós mintázatát. A LOX az extracelluláris mátrix komponensek, a kollagén és az elasztin rostok közötti keresztkötések kialakításáért felelős. Munkánk során a LOX expresszióját a myentericus ganglionok neuropil régiójában és a neuronok sejttestjében, a ganglionok közelében futó kapillárisok endotheliumában, valamint a bélfal simaizomsejtjeiben követtük nyomon kontroll, STZ-indukált kezeletlen és inzulin-kezelt diabéteszes patkányok különböző bélszakaszaiban.

Kvantitatív posztembedding immunhisztokémiai vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a LOX enzim expressziója mindhárom kísérleti csoportban és minden vizsgált kompartmentben bélszakasz-specifikus módon változott, s az enzim kifejeződésében tapasztalt változások hasonló mintázatot mutattak. A LOX enzimet jelölő arany szemcsék denzitása a diabéteszes állatok duodenumában megnövekedett, az ileumban csak kis mértékben vagy egyáltalán nem változott, míg a colon területén lecsökkent. Az azonnali inzulinkezelés hatására az arany szemcsék száma mindhárom vizsgált bélszakaszban nagymértékben lecsökkent a myentericus ganglionok neuropil régiójában és

a neuronok sejtestjében, a kapillárisok endotheliumában, illetve a bélal simaizomsejtjeiben egyaránt.

Eddigi eredményeink alapján egyértelműen látszik, hogy a LOX expressziója régió-specifikus mintázatot mutat a bélcsatorna hossztengelye mentén, mely feltételezhetően összefügg az ereket körülvevő BM bélszakasz-függő megvastagodásában. Ennek az összefüggésnek a pontosabb megértéséhez azonban további vizsgálatokra van szükség. Ezért elkezdtük vizsgálni az egyes bélszakaszokban a LOX mRNS mennyiségét valós idejű kvantitatív PCR segítségével. Ezenkívül a továbbiakban tervezzük az extracelluláris mátrix komponensek lebontásában fontos mátrix metalloproteináz-9 expressziójának regionális vizsgálatát is. Reméljük, hogy eddigi elvégzett és tervezett vizsgálataink hozzájárulnak az erek átteresztőképességének diabétesz során kialakuló bélszakasz-függő sérülésének megértéséhez.

VI. TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott Giricz Zsófia a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- STZ-indukált diabétesz állatmodell előállítását
- az állatok inzulinkezelését
- állatok feláldozását és szöveti mintavételt
- postembedding immunhisztokémiát
- kvantitatív elektronmikroszkópos vizsgálatot
- statisztikai analízist

végeztem el.

aláírás

Szeged, 2014. április 14.

VII. FELHASZNÁLT IRODALOM

Barnett AH (1991) Pathogenesis of diabetic microangiopathy: an overview. *Am J Med* 90(6A):67S-73S.

Bódi N, Battonyai I, Talapka P, Fekete E, Bagyánszki M (2009) Spatial pattern analysis of nitrergic neurons in the myenteric plexus of the duodenum of different mammalian species. *Acta Biol Hung* 60(4):347-358.

Bódi N, Talapka P, Poles MZ, Hermes E, Jancsó Zs, Katarova Z, Izbéki F, Wittmann T, Fekete É, Bagyánszki M (2012) Gut region-specific diabetic damage to the capillary endothelium adjacent to the myenteric plexus. *Micirculation* 19:316-326.

Bortolotto LA (2007) Modifications of structural and functional properties of large arteries in diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51(2):176-184.

Brandner JM, Zacheja S, Houdek P, Moll I, Lobmann R (2008) Expression of matrix metalloproteinases, cytokines; and connexins in diabetic and nondiabetic human keratinocytes before and after transplantation into an ex vivo wound-healing model. *Diabetes Care* 31:114-120.

Chronopoulos A, Tang A, Beglova E, Tranckmen PC, Roy S (2010) High glucose increases lysyl oxidase expression and activity in retinal endothelial cells: mechanism for compromised extracellular matrix barrier function. *Diabetes* 59:3159-3166.

Costa M, Brookes SJ, Hennig GW (2000) Anatomy and physiology of the enteric nervous system. *Gut* 47 (Suppl 4): iv15-19 discussion iv26.

Csiszar K (2001) Lysyl oxidase: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol* 70:1-32.

Erler JT, Giaccia AJ (2006) Lysyl oxidase mediates hypoxic control of metastasis. *Cancer Res* 66:10238-10241.

Ffrench-Constant C, Van de Water L, Dvorak HF, Hynes RO (1989) Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol* 109:903-914.

Furness JB, Costa M (1987) The enteric nervous system. Edinburgh, Churchill Livingstone.

Furness JB, Kunze WAA, Bertrand PP, Clerc N, Bornstein JC (1998) Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol* 54, 1-18.

Furness JB (2006) The organisation of the autonomic nervous system: peripheral connections. *Auton Neurosci* 130 (1-2):-1-5.

Furness JB (2007) Enteric nervous system. *Scholarpedia*, 2(10):4064.

Gershon MD, Kirchgessner AL, Wade PR (1994) Physiology of the Gastrointestinal Tract (Vol. 1). New York, Raven Press, pp 381-422.

Gilad GM, Kagan HM, Gilad VH (2005) Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* 376:210-214.

Izbéki F, Wittman T, Rosztóczy A, Linke N, Bódi N, Fekete E, Bagyánszki M (2008) Immediate insulin treatment prevents gut motility alterations and loss of nitrergic neurons in the ileum and colon of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 80(2):192-198.

Kitsiou PV, Tzinia AK, Stetler-Stevenson WG, Michael AF, Fan WW, Zhou B, et al. (2003) Glucose-induced changes in integrins and matrix-related functions in cultured human glomerular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F671-F679.

Langley JN (1921) The autonomic nervous system-part 1. Heffer, Cambridge.

Maleki D, Locke GR, 3rd, Camilleri M, Zinsmeister AR, Yawn BP, Leibson C, Melton LJ 3rd (2000) Gastrointestinal tract symptoms among persons with diabetes mellitus in the community. *Arch Intern Med* 160(18):2808-2816.

Meissner G (1857) Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med N F* 8:-364-366.

Molnar J, Fong KSK, He QP, et al. (2003) Structural and functional diversity of lysyl oxidase and the LOX-like proteins. *Biochim Biophys Acta* 1647:220-224.

Oshitari T, Polewski P, Chadda M, Li AF, Sato R, Roy S (2006) Effect of combined antisense oligonucleotides against high-glucose- and diabetes-induced overexpression of extracellular matrix components and increased vascular permeability. *Diabetes* 55:86-92.

Paulsson M (1992) Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27(1-2):93-127.

Pinchback JS, Taylor BA, Gibbins JR, Hunter N (1996) Microvascular angiopathy in advanced periodontal disease. *J Pathol* 179:204-209.

Podesta F, Roth T, Ferrara F, Cagliero E, Lorenzi M (1997) Cytoskeletal changes induced by excess extracellular matrix impair endothelial cell replication. *Diabetologia* 40:879-886.

Rodriguez C, Rodriguez-Sinovas A, Martinez-Gonzalez J (2008) Lysyl oxidase as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect* 21:218-224.

Roy S, Sala R, Cagliero E, Lorenzi M (1990) Overexpression of fibronectin induced by diabetes or high glucose: Phenomenon with a memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:404-408.

Roy S, Cagliero E, Lorenzi M (1996) Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(2):258-266.

Roy S, Sato T, Paryani G, Kao R (2003) Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes* 52(5):1229-1234.

Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E (2010a) Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 35(12):1045-1056.

Simionescu M, Antohe F (2006) Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies. *Handb Exp Pharmacol* 176(Pt 1):41-69.

Szkudelski T (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50:536-546.

Tang DM, Friedenberg FK (2011) Gastroparesis: approach, diagnostic evaluation, and management. *Dis Mon* 57(2):74-101.

Trackman PC, Bedell-Hogan D, Tang J, Kagan HM (1992) Post-translational glycosylation and proteolytic processing of a lysyl oxidase precursor. *J Biol Chem* 267:8666-8671.

Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839.

Wilmarth KR, Froines JR (1992) In vitro and in vivo inhibition of lysyl oxidase by aminopropionitriles. *J Toxicol Environ Health* 37:411-423.

Yarandi SS, Srinivasan S (2014) Diabetic gastrointestinal motility disorders and the role of enteric nervous system: Current status and future directions. *Neurogastroenterol Motil* doi: 10.1111/nmo.12330.