

A syndecan-1 szerepe a máj fibrosisában és ezt követő gyógyulásában

Regös Eszter SE ÁOK VI.
eszter.regos.88@gmail.com

Célok. A syndecan-1 egy transzmembrán proteoglikán, mely több patológiás folyamatban, így a sebgyógyulásban, gyulladásban és a daganatok kialakulásában is szerepet játszik. Ép májban a syndecan-1 a hepatocyták basolateralis felszínén található. Munkacsoportunk korábbi adatai szerint humán májcirrhiszban mennyisége a sejtfelszínen fokozódik. Ezt a változást értelmezendő, olyan transzgén egeret hoztunk létre, mely a májában fokozottan termeli a human syndecan-1-et. A vad (WT) és syndecan transzgén (SynTG) egerekben tioacetamiddal (TA) májcirrhiszt hoztunk létre, és összehasonlítottuk annak súlyosságát és gyógyulási hajlamát.

Módszerek. A syndecan-1 túltermelését immunhisztokémiával és Western blot-tal igazoltuk. A kötőszövet százalékos arányát morfometriai analízissel határoztuk meg. A kollagén-1 mRNS szintű expresszióját qRT-PCR-rel mértük. A kötőszövet bontását végző MMP-2 és -9 aktivitását zselatináz teszttel vizsgáltuk. Kettős fluoreszcens immunhisztokémiával kimutattuk a kollagén-1 és syndecan-1 mennyiségét és lokalizációját. Az α -SMA és SMAD 3 jelenlétét és változását fluoreszcens immunhisztokémiával igazoltuk.

Eredmények. A SynTG állatok stabilan termelik a rekombináns fehérjét. Károsítás nélkül a proteoglikán túltermelése a májban nem okoz patológiás elváltozást. A morfometriai mérések adatai szerint tioacetamid expozíció hatására szignifikáns eltérést alakult ki a WT és a SynTG májak között: a transzgén példányokban a kezelés első két hónapjában a fibrosis mértéke a WT állatokhoz képest alacsonyabb volt, azonban a 3. hónapra a különbség kiegyenlítődött és a 4. hónapban már a transzgén állatokban tapasztalunk nagyobb mértékű fibrosist. A TA elhagyását követő regenerációs szakaszban a SynTG egerek nem mutattak gyógyulási hajlamot. A fibrózis változásait követte a kollagén-1 expressziója, de ez a 4. hónapban a két csoportban kiegyenlítődik. A zselatináz teszt a SynTG állatokban csökkent MMP-2 és -9 aktivitást igazolt. Mind az α -SMA, mind a SMAD 3 is követi a kötőszövet felhalmozódásának mértékét.

Következtetések. Eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a syndecan-1-ugyan véd a fibrosis kialakulásától, de a regenerációt gátolja. Ez arra utal, hogy a syndecan-1 túltermelése befolyásolja mind a kötőszövet felépítését, mind annak lebontását. Célunk a jelenség hátterében álló mechanizmusok további tisztázása.

A témában korábbi publikáció nem jelent meg.

Témavezető(k): Dr. Kovalszky Ilona egyetemi tanár,
I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet,
Dr. Baghy Kornélia tudományos főmunkatárs,
I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet

Az angiostatin felhasználási lehetőségei a tumorellesztésben

Szabó Bálint Gergely SE ÁOK V., Kis Ibolya SE ÁOK V.
mc_amigo@freemail.hu; ibolya.ks@gmail.com

A tumorok angiogenezis indukálásával csatlakoznak az érhalózatához. Ezt gátolva tumorsejtpusztulást, az eredeti tömeg csökkenését idézhetjük elő. Az angiostatin (endogén angiogenezis-inhibitor) a plazminogén N-terminális kring doménjeinek több proteáz katalizálta hasításával keletkezik, azonban a molekula instabil, terápiás felhasználásra nem alkalmas.

Célunk olyan molekula tervezése, amely in vivo és in situ képes angiostatint termelni. Létrehoztunk egy proteáz-angiostatin kimérát, mely az extracelluláris térben aktiváció után felszabadítja az angiostatint.

Módszerek: Ismert molekuláris módszerekkel, PCR-rel amplifikált angiostatint és proteáz azonos leolvasási keretben megfelelő vektorba ligáltunk. A plazmidkonstrukció tartalmazta a bakteriális és eukarióta expresszióhoz szükséges elemeket. A vektorral in vitro és in vivo angiostatin-termelés céljából E. coli törzset, humán és egér sejtvonalakat transzfektáltunk.

Aortatesztet végeztünk, melyben matrigelbe ágyazott 3 napos patkány aortagyűrűk VEGF-indukált endothelproliferációját monitoroztuk a kimérát termelő sejtvonal jelenlétében. A plazmidot 4T1 mellrák vonalba transzfektáltuk, a transzfektált és vad típusú sejtvonallal BALB/c egereket fertőztünk, a tumorképződést időben követtük.

Eredmények. A kimérát E. coli-ból tisztítottuk, bomlását SDS-PAGE-gel értékeltük. Proteázinhibitor mellett a teljes kimérát (80 kDa), hiányában a hasított angiostatint (55 kDa) és proteáz (25 kDa) detektáltuk. Függőcsepp-kultúrában növesztett endothelsejtek proliferációja, migrációja gátlódott a kimérát termelő sejtvonal jelenlétében. A kimérát termelő szövettenyészetben elvégzett aortateszt negatívnak bizonyult.

A tumornövekedés in vivo tesztrendszerben, 20 független klón-vonal esetében vizsgálva kb. 10 nappal később indult meg a transzfektált sejtekkel fertőzött egerekben. A kontroll állatoknál már volt elhullás, ugyanakkor a transzfektált vonallal injektált állatokban nem.

Jelenleg a plazmid in vivo bevitelén, egérmodellben történő további lokális és távolhatások jellemzésén dolgozunk más csoportokkal kollaborációban.

Összegzés. Sikerült a célnak megfelelő konstrukciót létrehozni. Megállapítottuk, hogy molekulánk a terv szerint aktív angiostatint szabadít fel, mely mind in vitro szövettenyésztési, mind in vivo állatkísérletekben tumorrepresszív hatást fejt ki. A molekula iparjogvédelmi oltalmának megszerzése folyamatban van

Témavezető(k): Dr. Tímár József egyetemi tanár,
II. Sz. Patológiai Intézet, Dr. Szilák László tudományos munkatárs, II. Sz. Patológiai Intézet