Az 1-es típusú diabetes mellitus patomechanizmusának immunogén háttere és kardiovaszkuláris szövődményei

Doktori értekezés

Dr. Szebeni Andrea

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola

Témavezető:	Dr. Kecskeméti Valéria egyetemi tanár, Ph.D.
Hivatalos bírálók:	Dr. Darvas Zsuzsanna egyetemi docens, Ph.D. Dr. Szelényi Judit tudományos tanácsadó, MTA doktora
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Török Tamás egyetemi tanár, MTA doktora
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Somogyi Anikó egyetemi docens, MTA doktora Dr. Farsang Csaba, egyetemi tanár, MTA doktora

Budapest

2009

Tartalomjegyzék

1. RÖVIDITÉSEK JEGYZÉKE
2. A DOLGOZAT TÉMÁJA
3. KÍSÉRLETI MUNKÁM IRODALMI HÁTTERE
    3.1. Autoimmunitás
    3.2. Hősokk fehérjék
        3.2.1. A hősokk fehérjék szerepe az immunregulációban
        3.2.2. Hősokk fehérjék, mint az autoimmun folyamatok célpontjai
    3.3. Az 1-es típusú diabetes mellitus
        3.3.1. A lehetséges cél-antigének a diabetes patomechanizmusában
        3.3.2. Immunizálás hősokk fehérjével
    3.4. A diabetes kardiovaszkuláris szövődményei
4. CÉLKITŰZÉSEK
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK
    5.1. Anyagok
        5.1.1. Peptid szintézis
        5.1.2. Reagensek és kit-ek
    5.2. Vizsgálati alanyok
        5.2.1. Betegek és egészséges kontrollok
        5.2.2. Állatok
    5.3. Módszerek
        5.3.1. Kísérleti protokollok, in vivo vizsgálatok
            5.3.1.1. Diabetes indukció
            5.3.1.2. Vércukor mérés
            5.3.1.3. Vizsgálati csoportok
        5.3.2. In vitro vizsgálati protokollok, módszerek
            5.3.2.1. T helper sejt meghatározás. Citokin vizsgálatok. (ELISPOT)
            5.3.2.2. Az antitest szint mérése (ELISA)
            5.3.2.3. Akciós potenciál vizsgálata konvencionális mikroelektród technikával
    5.4. Statisztikai analízis

6. EREDMÉNYEK
6.1.Humán vizsgálatok
6.1.1. A háttér/alap citokin termelés és a pozitív kontrollok kiváltotta citokin termelés meghatározása
6.1.2 Stimuláció a hsp60 peptidekkel
6.1.2.1. Th1 (IFN-γ) válasz
6.1.2.2. Th2 (IL-13) válasz
6.1.2.3. Th1/Th2 arány
6.1.2.4. PI stimulushoz viszonyított p277- és LAK-válaszok összehasonlítása
6.2. HDC-KO és WT egerek immunizációs vizsgálata
6.2.1. Vércukor-szint változás és STZ hatás
6.2.2. Immunizálás p277-el és hsp65-el
6.2.3. Antitest szint vizsgálat
6.2.3.1. Anti-p277 antitest szint
6.2.3.2. Anti-hsp60 antitest szint
6.2.3.3. Anti-hsp65 antitest szint
6.3. STZ indukált diabeteses patkányok immunizációs vizsgálata
6.3.1 Vércukor és antitest szint változás STZ és immunizálás hatására patkányon
6.4. Elektrofiziológiai paraméterek vizsgálata
6.4.1. Elektrofiziológiai paraméterek összehasonlítása kontroll WT és HDC-KO egerekből származó szív-preparátumokon
6.4.2. A diabetes hatása a WT és HDC-KO egerek elektrofiziológiai paramétereire
7. MEGBESZÉLÉS
7.1. Th1 és Th2 típusú sejtválasz vizsgálatok frissen diagnosztizált 1-es típusú diabeteses betegekben.
7.2.1. A STZ-diabetes modell eltérő technikai sajátságai a különböző kísérleti állatcsoportokban
7.2.2. A hősokk fehérjével történő immunizálás hatása a STZ indukálta autoimmun diabetesre WT és HDC-KO egerekben illetve patkányokban

7.3. WT és HDC-KO egerek jobb kamrai papilláris izmának elektrofiziológiai paraméterei kontroll és diabeteses állatok esetén
8. KÖVETKEZTETÉSEK
9. ÖSZEFOGLALÁS
10. SUMMARY
11. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK
12. IRODALOMJEGYZÉK
13. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE
14. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

1. RÖVIDITÉSEK JEGYZÉKE

1TDM: 1-es típusú diabetes mellitus

2TDM: 2-es típusú diabetes mellitus

anti-IA-2A: tirozin-foszfatáz elleni antitest

AP: akciós potenciál

APCs: antigén prezentáló sejtek (Antigen Presenting Cells)

APD: akciós potenciál időtartamának (action potential duration)

BSA: bovine serum albumin

CD: cluster of differentiation

DIC: N, N'-diizopropil-karbodiimid

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ELISPOT: enzyme-linked immunosorbent spot

GABA: gold labeled anti-biotin anti

GAD AA524-543: polipeptid-protein láncban a határoló aminosavak sorrend-számai által meghatározott szakasz.

GAD: glutaminsav dekarboxiláz

GADA: glutaminsav dekarboxiláz ellenes antitest

gp96: tumor eredetű hsp

HbA1c: glikohemoglobin

HDC-KO: hisztidin dekarboxiláz knockout

HLA: humán leukocita antigén

HOBt: 1-hidroxi-benztriazol

Hsp: hősokk fehérje

Hsp60 AA394-408 (LAK peptid): a hsp60 polipeptid-protein láncban a határoló aminosavak sorrend-számai által meghatározott szakasz.

Hsp60AA437-460 (p277 peptid): a hsp60 polipeptid-protein láncban a határoló aminosavak sorrend-számai által meghatározott szakasz.

I: Ionomycin

IAA: inzulin autoantitest

IBD: krónikus gyulladásos bélbetegség

ICA: szigetsejt-citoplazmatikus autoantitest

$\mathbf{I_{CaL}}$: L-típusú kalcium csatorna

Ig: immunglobulin

$\mathbf{I_{K1}}$: inward rectifier K^+ csatorna

$\mathbf{I_{Kr}}$: gyors delayed rectifier K^+ csatorna

$\mathbf{I_{Ks}}$: lassú delayed rectifier K^+ csatorna

IL: interleukin

INF: interferon

$\mathbf{I_{to}}$: tranzient outward K^+ csatorna

Kv4.3, Kv1.4: K^+ csatorna proteinek

LADA: Latent Diabetes of Adulthood

MBHA: 4-metil-benzhidril-amin

MHC: major hisztokompatibilitási komplex

NK: természetes ölő sejt (natural killer cell)

NO: nitrogén monoxid

NOD: non-obese diabetes

nTreg: természetes regulátoros (regulatív) T-sejt

PBMC: perifériás mononukleáris sejtek

PBS: phosphate buffered saline

PI: phorbol myristát acetát + Ionomycin

PKC: protein kináz C

PMA: phorbol myristát acetát

QT: Q és T hullám közti szakasz

RPMI: roswell park memorial institute medium

SLE: szisztémás lupus erythematosus

STZ: Streptozotocin

TGF: transforming growth factor

Th1: T-helper1-sejt

Th2: T-helper2-sejt

Th3: T-helper3-sejt

TNF: tumor nekrózis faktor

Tr1: T-regulatív1-sejt

Treg: regulátoros (regulatív) T-sejt

TT: Tetanus toxoid

$\mathbf{V_{max}}$: a depolarizáció maximális sebessége

WT: wild type (vad típusú)

2. A DOLGOZAT TÉMÁJA

Doktori munkám középpontjában az 1-es típusú diabetes mellitus-al és annak patomechanizmusában jelentős szereppel bíró hősokk fehérjékkel kapcsolatos kutatások álltak. A vizsgálataim azonban nem korlátozódtak kizárólagosan a diabetes patomechanizmusának feltárására. Nagyon fontosnak tartottam a diabetes patomechanizmusa mellet, az ugyanolyan fontossággal bíró, és nagyon jelentős népegészségügyi gondokat okozó diabetesben fokozott gyakorisággal jelentkező kardiovaszkuláris szövődmények vizsgálatát is.

Az 1-es típusú diabetes mellitus (1TDM) pontos patomechanizmusának minden egyes lépése ma sem tisztázott egyértelműen. Az már elfogadott tény, hogy olyan autoimmun betegségnek tekinthető, amit a hasnyálmirigy szigetekben lévő inzulint termelő β-sejtek T-sejt mediálta destrukciója okoz. Számos feltételezett target/cél-antigénje van a T-sejteknek. A feltételezett antigének elleni antitestek már a betegség legelején kimutathatók. Ezek közül a legfontosabbak a szigetsejt-citoplazmatikus autoantitestek (ICA), inzulin autoantitestek (IAA), glutaminsav dekarboxiláz ellenes antitestek (GADA) a tirozin-foszfatáz elleni (anti-IA-2A) antitestek és legújabban a hősokk fehérjék (hsp) elleni antitestek.

A hősokk fehérjék egyik legfontosabb jellemzője, hogy az evolúció során szerkezetük csak alig változott. A hősokk fehérjék elleni immunválasz megváltozása és az autoimmun betegségek közötti összefüggést számos munkacsoport igazolta.

Több elmélet van arra vonatkozóan, hogy mi okozhatja a fokozott immunválaszt a hsp60/hsp65-ellen, és ez hogyan vezethet a β-sejtek pusztulásához illetve diabetes kialakulásához.

Az általunk feltételezett és vizsgált elmélet szerint a hősokk fehérjék elleni immunválasz a természetes autoimmunitás részének tekinthető és ennek a rendszernek a regulációs zavara vezet a fokozott autoimmunitás kialakulásához.

A természetes autoimmunitást szabályozó regulátoros sejtek működésének zavara - a regulátoros sejtek (a $CD4^{+}CD25^{+}$ nTreg -sejtek, Tr1 és Th3 sejtek) csökkent működése,

illetve a Th1/Th2 sejtválasz eltolódása - vezethet a fokozott immunválaszhoz és a β-sejtek autoimmun T-sejtek okozta pusztulásához.

Ha elfogadjuk ezt az elméletet, akkor az 1-es típusú diabetes mellitus terápiájának és megelőzésének egyik lehetséges útja a hősokk fehérjével történő immunizálás lehet. A cél az lenne, hogy olyan immunizálási protokollt alkalmazzunk, mellyel preferenciálisan aktiválhatjuk a regulátoros T-sejteket, amelyek aztán képesek lesznek visszaszorítani és gátolni az autoreaktív T-sejteket.

A diabetes mellitussal kapcsolatban nem szabad megfeledkeznünk a súlyos kardiovaszkuláris szövődményeiről sem. Régóta ismert tény, hogy a diabetes megnöveli a hirtelen halál és a kardiovaszkuláris betegségek kockázatát. Ez azonban nagyon gyakran nem magyarázható egyszerűen a diabetest kísérő egyéb problémákkal, a hiperlipidémiával és a hipertóniával. A diabeteses betegek nagy százalékában fejlődik ki kardiomiopátia, amelyet mechanikai és elektromos változások egyaránt jellemeznek. A diabetes okozta kóros elektrofiziológiai változások közül a legszembetűnőbb a repolarizáció idejének a megnyúlása.

A fentiek tükrében a doktori munkám három részre osztható:

- Elsőként a humán vizsgálataim során frissen diagnosztizált 1-es típusú diabeteses betegek esetén a különböző cél-antigénekkel, hősokk fehérje peptidekkel, történő *in vitro* stimuláció során a Th1/Th2 arányt és Th1 típusú sejtválasz irányába eltolódó immunválaszt elemeztem.
- Másodsorban az állatkísérleteim során streptozotocinnal diabetesessé tett hisztidin dekarboxiláz knockout (HDC-KO) és vad típusú (WT) egereken illetve patkányokon vizsgáltam a különböző hősokk fehérjével történő immunizálás terápiás hatását és az immunizálás következtében kialakult antitest-szint változást.
- Kísérleteim harmadik elemeként konvencionális mikroelektród technikával vizsgáltam a kontroll és diabeteses HDC-KO és WT egérszív akciós potenciáljának paramétereit és ezeknek a változását diabetes hatására.

3. KÍSÉRLETI MUNKÁM IRODALMI HÁTTERE

3.1. Autoimmunitás

Az élő szervezeten belül a saját-nem saját megkülönböztetésének molekuláris-celluláris alapja és az autoimmun betegségek kialakulásának mechanizmusa az immunológiai rendszer egyik legtöbbet kutatott területe.

Az immunrendszer alapvető feladata, hogy felismerje és különbséget tudjon tenni a saját-nem saját sejtalkotók között. A felismerésben és az ellenük kialakított immunválaszban a veleszületett (természetes, innate) immunrendszer, melynek elemei a fagociták (monociták/ makrofágok, granulociták), dendritikus sejtek és a specifikus védekezést biztosító szerzett (adaptív) immunrendszer vesznek részt, melynek elemei a T és B limfociták. Azokat a struktúrákat, melyeket az adaptív immunrendszer felismer, antigénnek, azokat pedig amelyeket a szervezet a saját alkotók közül ismer fel autoantigénnek nevezzük (1).

Az egészséges immunrendszer tehát két alapvető funkciót lát el:

Egyrészt a szervezet számára idegen antigéneket a saját szövetek károsítása nélkül semlegesíti és távolítja el miközben immunmemória alakul ki, másrészt ezzel párhuzamosan a sajátnak felismert antigénekre aktív tolerancia, immuntolerancia alakul ki és ezen belül a nélkülözhetetlen saját struktúrák aktív védelmet kapnak (1).

Autoimmun betegségekről akkor beszélünk, amikor az immunrendszer a saját autoantigén struktúrájával szemben olyan immunológiai reakciót indít el, amelynek a hatására betegség lép fel, az adott betegségre jellemző funkcionális rendellenességgel, sajátságos hisztopatológiai és morfológiai elváltozásokkal (2).

Az immuntolerancia kialakulásáról és az aktív védelem kialakulásának mechanizmusáról számos elmélet született.

Az elsők között volt 1949-ben a klasszikus Burnet-féle klónszelekciós elmélet mely szerint a saját antigéneket felismerő, és az ezekkel reagálni képes sejtklónok kiszelektálódnak, elpusztulnak. Napjainkra világossá vált, hogy ez az elmélet nem teljes

egészében állja meg a helyét, mert az autoimmunitás jelensége sokkal általánosabb és az immunrendszernek az önfelismerés is természetes eleme. A jól szabályozott autoreaktivitás nem veszélyezteti sem a szervezet épségét, sem az immunhomeosztázist, és biztosítja az immunológiai toleranciát. Ezt az bizonyítja, hogy az egészséges emberek szérumában egyaránt kimutathatóak autoreaktív T- és B- limfociták, illetve autoantitestek csak toleráns magatartást tanúsítanak és így nem jön létre autoimmun betegség (3). Ezek az antitestek specifikus antigén stimuláció nélkül keletkező ellenanyagok (4), melyek többsége legalább egy vagy több saját antigénnel képes reagálni, ezért természetes autoantitesteknek nevezzük őket (5, 6).

Irun Cohen volt az első, aki érdekes elméletet alkotott és azt feltételezte, hogy a szenzoros és motoros homunkulusz mintájára létezik egy „immunológiai homunkulusz" is, ahol a szervezet számára legfontosabb elemeknek, sejtalkotóknak szintén külön immunológiai reprezentációjuk van (7, 8).

Ezen elmélet szerint tehát létezik egy viszonylag kis méretű úgynevezett „belső" rendszer, amely a szervezet saját antigénjeivel reagál, és működését az önszabályozás jellemzi. Ez a rendszer a saját szervezetben jelen levő, nagymértékben konzervált, a biológiai funkciók szempontjából alapvető fontosságú antigéneket szelektíven ismeri fel és létfontosságú a „saját" szerkezetek, molekulák megvédésében. Ha ugyanis patogén támadja meg a szervezetet, az a gazdaszervezethez hasonlóan hordozza az élet számára nélkülözhetetlen konzervatív komponenseket (például a baktériumok nagy része a hősokk fehérjéket) is. Ha a gazdaszervezet immunrendszere nem tudná megkülönböztetni a patogénben a „sajátot", illetve a tőle eltérő jellemzőket, akkor minden bakteriális fertőzés után súlyos autoimmun betegséget okozó folyamatsor indulna meg. Így viszont - az „immunológiai homunkulusz" jóvoltából - az antigén-bemutatásnál az immunrendszer két részre választja a patogén antigénjeit. A sajáthoz hasonló és esszenciális, tehát konzervált antigénekre az „immunológiai homunkulusz" alacsony kötőerejű antitestekkel reagál, és lefedi azokat. Ezzel szemben a baktériumra specifikus (de nem közös) antigénekre a normális, hatékony, elimináló immunválasszal reagál. Eszerint a természetes autoimmunitás, az „immunológiai homunkulusz" az ép, egészséges immunrendszer részeként arra hivatott, hogy regulátoros elemei révén megakadályozza a kóros autoimmunitást, az autoimmun betegség kialakulását és ezért

az egészség feltételének is tekinthető. A megfelelően működő szervezetben tehát nem azért nem lép fel autoimmun betegség, mert nincsenek benne vagy feltétlenül inaktívak az autoimmun limfocita klónok, hanem éppen ellenkezőleg, azért mert vannak, méghozzá a legfontosabb struktúrák védelmében (9). Ezen elmélet szerint tehát átmeneti autoimmun válasz egészséges emberekben is előfordulhat. A természetes autoimmunitás az egyik legfontosabb tényező, amely védi a szervezetet az autoimmun betegségek kialakulásával szemben (9).

A normál körülmények között is kimutatható autoreaktív T-sejtek leggyakrabban a gamma/delta T-sejtek. Az autoreaktív autoantitesteket a $CD5^+$ B1a-sejtek termelik (CD=Cluster of Differentiation, a thymus-dependens sejtek „járulékos" markerei, illetve a differenciálódási antigénjei) melyek viszonylag hosszú élettartalmú B-sejtek és bizonyos autoimmun betegségekben jelentősen felszaporodnak (10).

A természetes ellenanyagokra az jellemző hogy nagyon alacsony kötőerejűek, általában IgM-antitestek, és szenzitizáció nélkül termelődnek, illetve nem képesek receptorokhoz kapcsolódni és komplementet aktiválni. Az ilyen ellenanyagok által felismert struktúrák főleg azon saját antigének, amelyek immunológiailag dominánsak, és az evolúció során megőrzött (auto)antigének, mint például acetilkolin receptor, hősokk fehérjék (hsp60 hsp70, hsp90), enzimek, inzulin, membrán fehérjék, interleukin-1 (IL-1), IL-6 valamint intracelluláris és plazmafehérjék, mint az aktin, mioglobin, albumin és a kollagén.

Az „immunológiai homunkulusz" fontos alkotó elemei azok a sejtek is, amelyek fékezni és szabályozni tudják az autoimmun repertoárt. Ilyenek az anti-idiotípusú T- és B-sejtek, a $CD4^+CD25^+$ regulátoros T-sejtek és az anti-inflammatorikus T-sejtek (Th2). Ezen regulátoros mechanizmusoknak az a funkciója, hogy kivédjék az autoimmun betegségeket (11, 12). Az autoreaktív sejtek közötti kapcsolat dinamikusan blokkolja a sejteket egy biztonságos állapotban, így kontrollált alacsony aktivitású állapotban vannak. Ugyanígy a természetes antitestek is blokkolják a potenciálisan veszélyes immunválaszt is a sajátot utánzó antigénekkel szemben. Úgy működnek, hogy kapcsolódnak, és elfedik azon mikrobiális antigén epitopokat azaz antigén determinánsokat (antigén azon része, amelyet egy adott B-sejt receptor, ellenanyag, vagy T-sejt receptor felismerni képes), amelyek kereszt-reaktívak a saját epitopokkal (13). Ennek a rendszernek az öröklött vagy szerzett hiánya, illetve károsodása (a

„homunkulusz” védőhálójának romlása) az, ami az autoimmun választ kórossá esetenként szisztémássá, azaz autoimmun betegség formájában megjelenővé teszi. Ha elfogadjuk az „immunológiai homunkulusz” teóriát és az autoimmun betegségek patomechanizmusának ezen legújabb magyarázatát, az autoimmun betegségek kezelésnek egyik lehetséges módjának az tekinthető, ha aktiváljuk a regulátoros mechanizmusokat, tehát specifikus vakcináció lehet a megfelelő terápia. A vakcináció lényege az immunrendszert aktiválása, hogy kontrollálja a saját autoimmun effektor sejtjeit. Ez ad elméleti alapot az autoimmun betegségek vakcinációs terápiájának (11).

3.2. Hősokk fehérjék

A hősokk fehérjék minden sejtalkotóban jelen vannak, és a sejtek legfontosabb fehérjéi közé tartoznak.

A hősokk fehérjék egyik legfontosabb jellemzője a konzervatív természetük, vagyis az, hogy az evolúció során szerkezetük csak részben változott, a bakteriális és az emberi hősokk fehérjék között 50 %-ot is meghaladja a szerkezeti egyezés (14, 15).

A hsp fehérje családot molekulatömegük alapján csoportosítjuk 10 és 110 kDa között. Ez alapján a következő családokba sorolhatjuk őket: Hsp10, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp110. Emellett ismerünk un. minor hsp-ket (34, 47, 56, 75, 78, 94 és 174 kDa molekulatömegű), amelyek glükóz regulált fehérjék (glucose regulated proteins) és glükóz megvonás hatására termelődnek (16).

A hsp-k az intracelluláris fehérjék 5%-át teszik ki. Stimulus hatására a mennyiségük megnő 15%-ra és irodalmi adatok szerint expresszálódnak a sejtek felszínén is (17, 18).

A hősokk fehérjék fokozott expressziójához vezető hatásokat 3 csoportba lehet osztani. Az elsőbe tartoznak az élettani hatások, melyek közül a legfontosabbak a növekedési faktorok, a sejtdifferenciálódás, a szöveti fejlődés és a hormonális stimuláció. A második csoport a kóros hatásokat foglalja magába. Ezek közül kiemelendő a vírus-, bakteriális- és parazitafertőzés, a láz, gyulladás, hipo- és hiperglikémia, ischemia, oxidatív károsodás, malignitás, endotoxinok, citokinek, komplement fragmentumok, akut fázis fehérjék és lipopoliszacharidok. Végül a környezeti hatások - a

hőmérsékletváltozás (hősokk és hidegsokk), nehézfémek, toxinok, alkohol, antibiotikumok és az UV sugárzás - alkotják a harmadik csoportot (19).

A legfontosabb szerepük a fehérjék térszerkezetének kialakítása (folding, unfolding), részt vesznek a fehérjék lebontásában (20, 21, 22, 23) a több alegységes sejtalkotók összeillesztésében, a hő toleranciában, szabályozzák a mutációk expresszálódását, részt vesznek a stressz válaszban, illetve a molekuláris evolúcióban (24) és befolyásolják az enzimek és receptorok aktivitását is (25, 26). Részt vesznek továbbá a citoplazmatikus anyagforgalom irányításában (27), a sejtes jelátvitelben, a sejtmembránon keletkező sérülések kijavításában, illetve a programozott sejthalál szabályozásában (28, 29, 30, 31). Immundomináns molekulákként a patogén mikroorganizmusok elleni immunválasz fő meghatározói, a természetes és szerzett immunválasz szabályozásában egyaránt fontos szerepük van (32, 33, 34).

3.2.1. A hősokk fehérjék szerepe az immunregulációban

A már említett funkciókon kívül a hősokk fehérjéknek fontos szerepe van az immunrendszer működésében is a kóros és a fiziológiás folyamatokban egyaránt.

Konzervatív természetükből következik, hogy a hősokk fehérjék számos baktérium immundomináns antigénjei, tehát a fertőzés során erős immunológiai reakciót adó antitestek és immunsejtek keletkeznek ellenük, amelyeknek jelentős szerepük van a későbbi bakteriális infekciók elleni védekezésben (35, 36).

Korábban kizárólag ezzel a keresztreakcióval magyarázták azt a megfigyelést, hogy az egészséges egyének túlnyomó többségének vérében is kimutathatók a hősokk fehérjék elleni antitestek. Ma már tudjuk, hogy az „immunológiai homunkulusz” részét képezik (37).

Az utóbbi évek során fény derült arra is, hogy bizonyos sejttípusok specifikus felszíni hősokk fehérje-receptorokkal rendelkeznek. Néhány felszíni receptorról, mint például először a Drosophilákban felfedezett Toll-like receptor családról (transzmembrán receptorok, amelyek aktiválni képesek az adaptív immunrendszert, összekapcsolják a természetes és a szerzett immunrendszert) és az alfa-2-makroglobulin receptorról

(CD91) írták le, hogy valószínűleg hősokk fehérje receptor molekulák. Legújabban azt is felismerték, hogy a baktériumokból a keringésbe kerülő endotoxinok fő alkotórészei, a lipopoliszacharidok CD14-nek nevezett receptorai is részt vesznek a hsp60 molekulák sejtaktivációs folyamataiban. (38)

A hősokk fehérjéknek komplement aktiváló képessége is van. A hsp70 és hsp60 esetében a klasszikus útvonal jelentős aktivációját figyelték meg (39, 40) bár az utóbbi esetében az aktiváció fő szabályozói a specifikus hsp60-ellenes antitestek. A hősokk fehérjék komplement aktiváló hatásának eredményeképpen igen erős gyulladáskeltő fehérje fragmentumok keletkezhetnek, melyek jelentős szerepet játszhatnak egyes emberi megbetegedések, így például az érelmeszesedés keletkezésében is.

Igen lényeges megfigyelés az is, hogy a hősokk fehérjék (legfőképpen a gp96 és a hsp70) képesek beindítani a tumorokkal és a vírusokkal szemben a T-sejtek által közvetített immunválaszt (41). Az erős immunválasz molekuláris mechanizmusa azzal a ténnyel magyarázható, hogy a hsp-k természetes adjuvánsként aktiválják az antigén prezentáló sejteket. Feltételezhetően szerepük van abban is, hogy protein darabokat (vagy peptideket) prezentáljanak a sejt felszínén ezzel segítve az immunrendszert a sejt betegségének felismerésében (42).

A hősokk fehérjék, a természetes immunrendszer monocitáit/makrofágjait is képesek aktiválni. Mind a humán, mind az egér makrofág exogén humán hsp60 hatására tumor nekrózis faktor-α (TNF-α) termeléssel reagál. A hősokk fehérjék indította jelátvitel következtében gyulladásos citokinek és kemokinek, antimikrobiális peptidek, ko-stimulációs molekulák (CD40, CD80, CD86), MHC (major hisztokompatibilitási komplex) molekulák termelődnek, illetve egyéb effektorok, melyek a gazdasejtet védik a patogénekkel szemben (43, 44, 45, 46, 47, 48).

Összefoglalva tehát a hősokk fehérje elsősorban a monocita–makrofág illetve Th1 sejtek aktiválása miatt egy celluláris immunválaszt beindító „veszély szignál” a természetes immunrendszer számára, amikor expresszálódik vagy szekretálódik a stressznek kitett sejtekben (49).

3.2.2. Hősokk fehérjék, mint az autoimmun folyamatok célpontjai

Az utóbbi években az is kiderült, hogy a hősokk fehérjék fontos cél-antigénjei a T-sejtes és antitest mediálta immunválasznak krónikus gyulladásokban és az autoimmun betegségekben egyaránt (50 ,51, 52, 53). Különböző autoimmun kórképekben vagy azok kísérletes modelljeiben is leírtak már hősokk fehérjék elleni immunválaszt. Hsp reaktív T-sejteket izoláltak juvenilis krónikus arthritisben a synovialis folyadékból (54), rheumatoid arthritisben a perifériás keringésből (55) és nyulak atheroscleroticus elváltozásaiból (56). Hősokk fehérje elleni antitesteket mutattak ki SLE-ben (57), 1TDM-ban (58), sclerosis multiplexben, szisztémás sclerosisban és nem differenciált kötőszöveti betegségben (59, 60, 61) is.

Az autoimmun betegségek és hsp-k kapcsolata akkor merült fel először, amikor kiderült, hogy a bakteriális hsp-k elleni T-sejtek autoimmun folyamatokat indíthatnak be a saját hősokk fehérjék ellen, azaz a különböző fertőzések autoimmun folyamatokat generálhatnak (62).

Két dolog teszi a hsp-t vonzó célponttá az immunrendszer számára az autoimmun folyamat során:

- Az első az, hogy a patogének nagy mennyiségű hsp-t expressziót váltanak ki a gazdaszervezetben a makrofágok általi fagocitózis során. E folyamat során a hsp-t elsősorban a MHCII molekulák prezentálják (63).
- A másik ok, hogy a hsp-k erősen konzervatív fehérjék, és az immunrendszer nagymértékben fókuszál a konzervatív molekulákra. A molekuláris mimikri teória szerint a hősokk fehérjék azért válhatnak autoimmun reakciók célpontjává, mert a mikrobiális és humán hsp-k közötti 50%-nál magasabb szekvencia homológia következtében a fertőzések hatására indukálódó és stimulálódó T-limfociták/antitestek kereszt reagálhatnak a saját hsp molekulákkal (melyek a stresszhatás miatt fokozottan expresszált állapotban lehetnek). A közös epitopok infekció alatti kiterjedt prezentációja miatt a saját molekulák irányában fennálló tolerancia csökkenhet, és ha ehhez társulva még az „immunhomunkulusz” és autoreaktív sejtek regulációja is sérült, autoimmun betegség alakulhat ki (64).

Az autoimmun folyamat kialakulásához természetesen további tényezőkre is szükség van. Ilyen lehet például az a tény, hogy a hősokk fehérjék képesek indukálni a Th1

citokinek génjének expresszióját illetve a hsp60 képes beindítani a Th1-es típusú választ indukáló útvonalat (65, 66). Nem megfelelő regulációs mechanizmusok esetén tehát (Treg és Th2-sejtek zavara esetén) felboríthatják a Th1-Th2 egyensúlyt. De természetesen egyéb genetikai és környezeti tényezők is igazolt módon szerepet játszanak.

Az egyik első autoimmunnak tekinthető kórállapot ahol felfedezték a betegség patomechanizmusa és a hsp közötti összefüggést az atherosclerosis volt (67, 68, 69, 70, 71, 72, 73). Számos kísérletben mutattak ki szoros összefüggést az emberi hsp60 elleni antitestek magas szintje és a súlyos coronariabetegség között (74, 75, 76, 77).

Az autoimmun betegségek közül az 1-es típusú diabetes mellitus esetén is fontos szerep jut a hősokk fehérjéknek a patomechanizmusban.

3.3. Az 1-es típusú diabetes mellitus

Az 1-es típusú diabetes mellitus több mint négymillió embert érint Európában és Észak-Amerikában és a betegség incidenciája továbbra is emelkedik. Magyarország ezen belül a közepes rizikójú országok közé tartozik. Az 1TDM poliuriával, polidipsziával és fogyással, gyermekkorban kezdődő, relatíve gyorsan kialakuló betegség. A felnőtteket érintő, lassan 1TDM-be progrediáló diabetes-alcsoport – Latent Diabetes of Adulthood (LADA) – feltehetően szintén közel 10%-át teszi ki a 2-es típusú diabeteses (2TDM) betegeknek (78). Azon kívül, hogy az 1TDM egész életre szóló betegséget jelent, számos akut és krónikus szövődmény, igen gyakran kardiovaszkuláris szövődmény kialakulásához vezethet.

Az 1-es típusú diabetes mellitus alapvetően inzulinhiányos állapot, amely az inzulintermelő β-sejtek krónikus, feltehetően autoimmun hátterű pusztulása miatt alakul ki (79, 80).

1965-ben Gepts a hasnyálmirigy inzulint termelő β-sejtjei körül kereksejtes beszűrődést és „steril” gyulladásra utaló jeleket talált (81). A szöveti kép mindenben megfelelt az autoimmun folyamatnak és Langerhans-szigetek már részben vagy egészben elpusztultak. Ez a lelet az elsők között bizonyította, hogy az inzulinhiányos diabetes

autoimmun eredetű. Az inzulintermelő β-sejtek T-sejt függő destrukcióját támogatják azok az inzulitist leíró szövettani vizsgálatok is, melyeket újonnan diagnosztizált 1TDM-os betegek autopsiája során találtak (82).

A β-sejt pusztulás mechanizmusáról több elmélet is született, direkt és indirekt sejtpusztulást egyaránt feltételeznek.

A β-sejtek direkt pusztulása: Az autoantigéneket, amelyeket az MHCI komplex molekulái prezentálnak a β-sejtek felszínén, felismerik az antigén-specifikus $CD8^+$ citotoxikus T limfociták melyet direkt sejtkontaktuson keresztül a β-sejtek apoptotikus pusztulása követ (83, 84, 85).

A β-sejtek indirekt pusztulása: Az autoantigének, amelyeket az MHCII komplex molekulái prezentálnak az APCs sejtek felszínén (pl. makrofágok vagy dendritikus sejtek) felismerik a $CD4^+$ helper T-sejtek. Ez indukálja ko-stimulátoros molekulák kifejeződését (pl. CD28/CD80), és fokozza a különböző citokinek (pl. IFN-γ, TNF-α) és nitrogén monoxid (NO) felszabadulását a $CD8^+$ sejtekből, amelyek aztán apoptosist okoznak (86, 87, 88).

Sajnos mind a mai napig nem teljesen tisztázott, milyen tényező(k) vezethet(nek) odáig, hogy a szervezet a saját β-sejtjei ellen autoimmun folyamatot indítson, de több kóroktani tényezőt tart számon ma a kutatás.

A genetikai tényezők fontos szerepet játszanak a betegség kialakulásában. A diabetesesek 10%-a esetében van diabeteses a közvetlen rokonságban és 50%-os az esély a diabetes kialakulására egypetéjű ikrek esetén, ha az egyiknél már kialakult (89). Populáció vizsgálatok alapján megállapítható, hogy kapcsolat van az 1TDM és a HLA allélek (DR3, DR4) között (90). Az autoimmun megbetegedésekre való hajlam kialakításában a HLA alapvető szerep nem meglepő, hiszen az autoreaktív T–sejtek autoantigénre adott válaszkészsége HLA függő. A HLA-molekulák (MHC humán megfelelői) határozzák meg, hogy mely autoantigének kerüljenek bemutatásra a T-sejtek számára (91). Kialakulhat autoimmunitás úgy is, hogy korábban rejtett antigének válnak elérhetővé az immunrendszer számára például fertőzés vagy trauma következtében, továbbá az immunrendszer érzékenyítéséhez vezethet az is, ha egy patogén ellen termelődött antitestek keresztreakciót adnak egy autoantigénnel, az

autoantigén és a mikroorganizmus közötti molekuláris mimikri miatt. Ez a teória magyarázná a tejfehérje vagy a vírusfertőzés szerepét a 1TDM patogenezisében. A vírusfertőzés szerepét támasztja alá a frissen diagnosztizált eseteknél mért emelkedett Coxsackie-vírus elleni antitest titer, sőt, néhány esetben vírusfertőzött β-sejteket is kimutattak néhány post mortem vizsgálatban (92). Felmerült a védőoltás lehetősége e mikroorganizmusok ellen, azonban a szóba jövő vírusok – pl. Echo, rubeola, Coxsackie – száma olyan nagy, hogy ez kivitelezhetetlen (93). Úgy tűnik, a szabad gyököknek is komoly β-sejtet károsító hatásuk van, amit szabadgyökfogók adagolásával – részben – ki lehet védeni (94).

Az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulásában a T-sejtes immunitásnak kulcsszerepe van. A $CD8^+$ T-sejtek mellett a $CD4^+$ alcsoport is kimutathatóan érintetett a diabetogén folyamatban (95).

A $CD8^+$ sejtek fontos szerepet játszanak a β-sejt pusztítás korai és késői szakaszában is (96, 97, 98); azok a mechanizmusok azonban, melyek ezeknek a sejteknek az aktivációjához vezetnek, még nem ismertek. Bár a diabetes kísérletesen átvihető a non-obese diabeteses (NOD) egerekbe akár $CD4^+$ (99) akár $CD8^+$ (100) sejt-klónokkal, sokkal valószínűbb, hogy e két sejt típus közötti interakció a legfontosabb (101, 102).

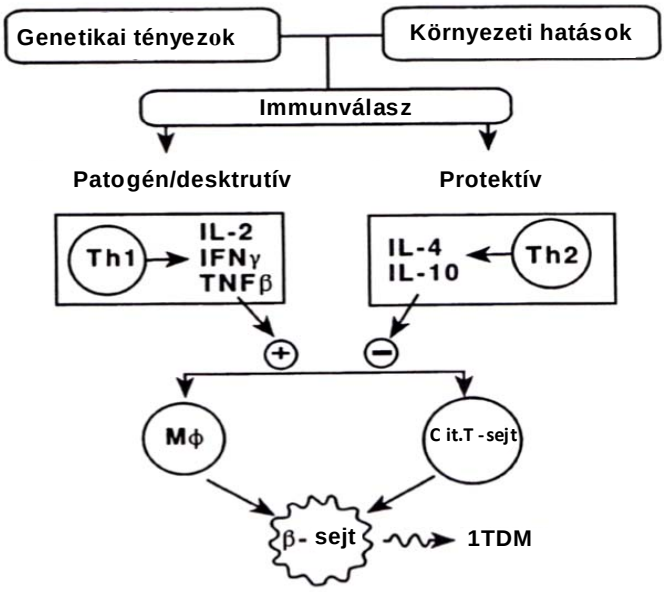
A $CD4^+$ T helper sejtek a citokin termelésük alapján osztályozhatók. A Th1 és Th2 sejtek eltérő citokin termelő karakterisztikával rendelkeznek. A Th1 sejtekre az IL-12, IFN-γ, IL-2, TNF-α és TNF-β termelés jellemző, míg a Th2 típusú sejtek többek között IL-4-et IL-10-et és IL-13-at termelnek. Az eltérő citokin termelésből adódóan a Th1 és Th2 sejtek funkciói is eltérnek egymástól (103, 104).

A Th1 sejtek és citokinek, mint pl. TNF-α és IFN-γ, elősegítik a leukociták felhalmozódását a szövetekben, aktiválják a makrofágokat. Emellett az IL-2 és IFN-γ aktiválja a citotoxikus T-sejteket, amelyek elpusztítják a megfelelő MHC kapcsolt antigént expresszáló sejteket. Végül aktiválják a természetes ölő sejteket (NK) is melyek MHC-tól függetlenül pusztítják el a cél sejteket. Összefoglalva tehát a Th1 sejtek aktiválják a celluláris immunválaszt. Ezzel ellentétben a Th2 sejtek a humorális immunválasz mediálásában játszanak fontos szerepet (105, 106, 107).

Mindezen hatások mellet a Th sejtek egymás működésére is hatással vannak. A Th1 eredetű IFN-γ gátolja a Th2 eredetű citokinek (IL-4 és IL-10) termelését. A Th2 eredetű IL-10 egyik legfontosabb hatása pedig az, hogy erőteljesen gátolja a Th1 sejtek citokinek termelését (105, 106). Az is bizonyított továbbá, hogy a Th1 igen, de a Th2 sejtek nem képesek átvinni a diabetest az egyik állatból a másikba (108, 109).

Az egyik legújabb elképzelés szerint az 1TDM-ban eltolódás van a Th2 típusú immunválasz irányából a Th1 típusú immunválasz irányába. Tehát az autoimmun diabetesre hajlamos egyedekben sokkal jelentősebb a Th1 típusú celluláris immunválasz (110, 111, 112, 113), ezért a diabetes feltehetően kivédhető, ha a Th sejtes aktivitást Th1 irányból eltoljuk Th2 irányba (114, 115).

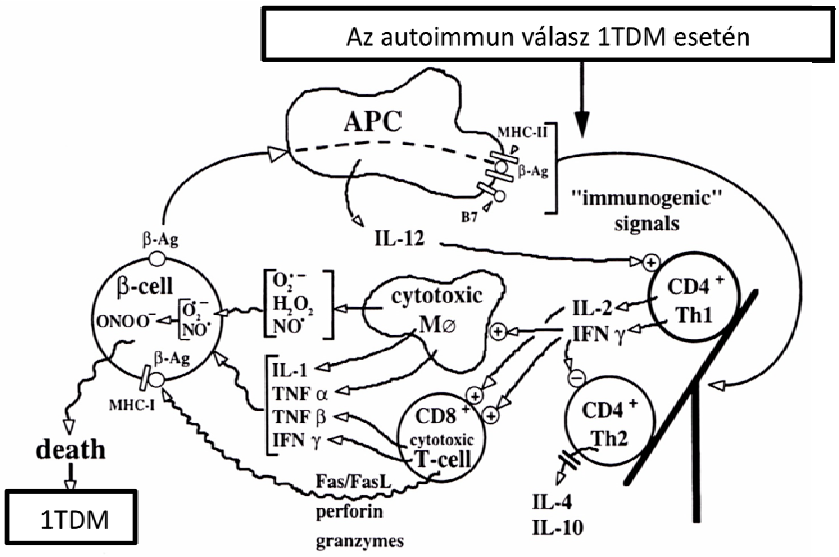
A β-sejtekkel szembeni saját tolerancia fenntartásában a $CD4^+$ Th2 típusú sejteknek a szerepe jelentős, mert gátolják az autoreaktív Th1 sejtek aktivációját. Th1/Th2 egyensúly eltolódás esetén az autoreaktív Th1 T-sejtek aktiválódnak és beindítják a β-sejt pusztulást. Ezek a Th1 sejtek aktiválják továbbá a B-sejtek IgG2a típusú autoantitest termelését a β-sejtek autoantigénjei ellen. A Th2-sejt mediálta immunreguláció elvesztése az autoreaktív folyamatok szétterjedéséhez vezet, és kialakul az 1TDM (115, 116) (1 ábra).



1. ábra. Az 1TDM kialakulásához vezető tényezők. A genetikai és környezeti tényezők egyaránt befolyásolhatják az immunválasz irányát (destruktív vagy protektív). A destruktív immunválasz –ami a pankreász β-sejtjeinek a pusztulásához vezet- T-sejt mediálta autoreaktív folyamat. A legújabb elmélet szerint ezek az autoreaktív sejtek Th1 típusú T-sejtek. Az immunválasz protektív ágában, a szabályozásban a Th2-sejteknek van kiemelkedő szerepe. Ennek az elméletnek megfelelően a Th1-sejtek és citokinjei mozgósítják az aktivált makrofágokat (Mϕ) és citotoxikus T limfocitákat amelyek elpusztítják a β-sejteket és kialakul az 1TDM. A Th2-sejtek és citokinek gátolják a Th1-sejteket ezáltal kivédik az 1TDM kialakulását (116).

A Th sejtek működésének a zavara citokin szinten is igazolható (116). A diabetes tekintetében magas rizikójú betegekben az IFN-γ szekréció szignifikánsan magasabb, mint a már manifeszt betegekben. Ezekben a magas rizikójú személyekben nagyobb az IFN-γ/IL-4 arány is. Ezzel ellentétben a Th2 citokinek mennyisége nem nő, hanem csökken (117, 118, 119). Az olyan IL-4 transgenikus NOD egerek, amelyekben fokozott IL-4 expresszió a β-sejteken védve vannak a diabetes ellen (120). Az IL-4, IL-10 és IL-13 önmaga is képes védelmet nyújtani a diabetest ellen, mivel fokozza a Th2 sejt funkciót (121, 123, 124, 125).

A perifférián mért citokin szintek tehát ígéretes előrejelző markerei (surrogate marker) a diabetes kialakulásának, mivel a destruktív inzulitisre Th1 típusú citokinek dominanciája (IFN-γ, IL-2, TNF-α) jellemző (126) (2 ábra).



2. ábra. Az 1TDM autoimmun patomechanizmusában feltehetően szerepet játszó citokinek és immunsejtek. Az elképzelés szerint a β-sejtek bizonyos proteinjeit (pl. hsp) az APC-k autoantigénként prezentálják az MHCII komplexen keresztül a Th1 sejtek számára. Az antigén aktiválta Th1-sejtekből felszabaduló citokinek gátolják a Th2 sejtek anti-inflammatorikus citokin termelését, illetve serkentik a makrofágokat és a citotoxikus T–sejteket melyek a β-sejtek pusztulását okozhatják. Ennek két mechanizmusa lehet: (1) direkt sejtkontaktuson alapuló citotoxikus T-sejt mediálta apoptózis és/vagy (2) nem specifikus gyulladásos mediátorok okozta sejtpusztulás (116).

Az autoimmun válasz kialakulásában – a jelenlegi ismeretek alapján - az úgynevezett regulátoros T-sejtek defektusa is fontos szerepet játszik (127, 128). Ezek a regulátoros sejtek a T-sejtek $CD4^+$ csoportjához tartoznak.

A regulátoros T sejteknek 3 szubpopulációját ismertük meg eddig: természetes $CD4^+CD25^+$ regulátor T-sejtek (nTreg); indukált Tr1 és indukált Th3-sejtek.

Az nTreg-sejtek csökkentik a $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejtek proliferációját és citokin termelését (128, 129, 130), de a természetes és adaptív immunrendszer egyéb sejtjei is (dentritikus sejtek, antigénprezentáló B-sejtek és monociták) a Treg célsejtjei lehetnek. A Tr1 vagy iTreg-sejtek jellegzetes sajátsága a sok IL-10, kevesebb TGF-β és IFN-γ termelés, amelyeknek szerepe lehet a naiv $CD4^+CD25^+$ T-sejtek, a Th1 és Th2 sejtek proliferációjának és citokin termelésének gátlásában (131). A TGF-β-t termelő Th3 iTreg sejtek pedig a Th1 és Th2 proliferációját gátolják (131).

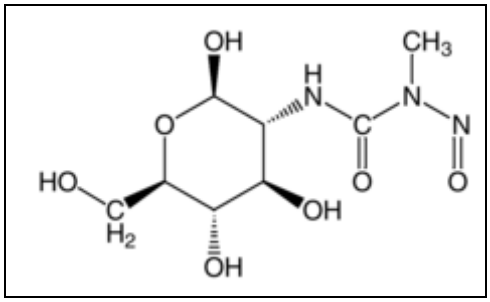
Ezen regulátoros T-sejtek illetve a már korábban említett Th2 típusú citokineket termelő $CD4^+$ T-sejteknek a csökkent működése elengedhetetlen az autoimmun folyamat beindulásában (132, 133, 134).

A 1TDM kutatásában az egyik legnagyobb nehézséget az jelenti, hogy humán pankreász szövetminták korlátozottan állnak rendelkezésre. A diabetes vizsgálatára ezért leginkább állatmodelleket használnak, melyek segítenek feltárni az autoimmun folyamat egyes lépéseit és a folyamatban szereplő cél-antigéneket illetve immunsejteket.

Az állatkísérletekhez általában kétféle diabetes modellt használnak. Az egyik a non-obese diabetes-es (NOD) egér, ami egy egyedi állat-modell a veleszületett I típusú diabetesre (135, 136, 137, 138). Ezekre az egerekre az Idd3 (insulin-dependent diabetes3) lokusz polimorfizmusa jellemző, amely lokusz az IL-2-t kódolja. Az IL-2 koncentráció függő módon az immunválasz és az immuntolerancia szabályozásában egyaránt részt vesz. Szerepe van a Th sejtek, a citotoxikus T-sejtek és NK sejtek aktiválásában, de kisebb koncentrációban a Treg sejtek kifejlődésében is szerepet játszik. Ezért az IL-2-t kódoló gén polimorfizmusa autoimmun folyamat kialakulásához vezet a NOD egerekben (139). Az a spontán diabetes, ami ezekben az állatokban kialakul, nagymértékben hasonlít a humán autoimmun 1TDM-re, mivel itt is kimutathatók a pankreász specifikus autoantitestek, autoreaktív $CD4^+$ és $CD8^+$ T-sejtek és a genetikai háttér is (140).

Egy másik állat modell a streptozotocin (STZ) indukálta diabeteses állatmodell.

A STZ (2-Deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) (3 ábra) egy széles spektrumú antibiotikum (hatékony a gram-pozitív és gram-negatív mikroorganizmusokkal szemben) amelyet a *Streptomyces achromogenes* termel és melynek diabetogén hatása van (141-142). Ez a hatás onnan ered, hogy a molekula szelektíven képes pusztítani a β-sejteket a pankreászban. Alkiláló szer mely gátolja a glukóz transzportot (143), a glukokináz funkciót (144) és többszörös DNS töréseket okoz (145). Nagyon jól alkalmazható kísérleti diabetes indukálására állatkísérletekben, a terápiában pedig különböző malignus inzulint termelő tumorok, elsősorban a Langerhans sziget tumorjának a kezelésére alkalmas, bár a sok mellékhatás miatt ma már háttérbe szorult.



3. ábra. A STZ szerkezete

Intravénásan, egyszeri nagy dózisban (65mg/tkg) alkalmazva a β-sejtek pusztítása miatt diabetest képes indukálni. A β-sejt destrukció néhány órával a STZ beadása után már detektálható (146, 147, 148).

Többszöri kis dózisban (pl. 40 mg/tkg 3-5 egymás utáni napon) alkalmazva azonban az előzőtől eltérő immun mediálta pusztulást és autoimmun diabetest (a humán 1TDM-hoz hasonló kórképet) hoz létre, az arra érzékeny állat törzsekben (pl. hím C57BL/6KsJ egérben). A többszöri kis dózisú STZ hatására morfológiailag a pankreászban inzulitis fejlődik ki limfocitás infiltrációval, illetve makrofágokkal és végül β-sejt nekrózis is kialakul. Ez a modell is alkalmas tehát arra, hogy a β-sejt pusztulást és inzulitiszt okozó immunológiai útvonalat vizsgáljuk (149, 150, 151).

3.3.1. A lehetséges cél-antigének a diabetes patomechanizmusában

Mivel az 1-es típusú diabetes mellitus kialakulása egy autoimmun folyamatnak a következménye az autoimmun gyulladásos folyamat módosításával befolyásolni lehetne a betegség kimenetelét.

Ha egy autoantigén nagyon nagy mennyiségben prezentálódik a T-sejtek számára, az autoreaktív T-sejtek inaktiválódnak, mindez terápiás lehetőséget jelenthet, ezért az elsődleges cél-antigén kutatása a mai napig az érdeklődés középpontjában áll. A diabetes patomechanizmusával kapcsolatban több lehetséges cél-antigén is felmerült. Nemrégiben néhány olyan adat is napvilágot látott, mely szerint a primer antigén maga az ***inzulin***, vagy a pro-inzulin, illetve annak egy részlete lehet (152**,** 153).

Másik lehetséges cél-antigén a hasnyálmirigyben jelenlévő ***GAD65*** (154). A GAD target antigén létét számos kísérleti eredmény alátámasztja. Évekkel a diabetes manifesztációja előtt GAD65 és ***GAD67*** elleni antitest detektálható a betegekben illetve szignifikáns proliferatív választ észleltek GAD65 ellen is 1TDM-os betegekben (155, 156). A GAD65, inzulin, és ***egyéb szigetsejt antigének*** elleni antitestek (***ICA, IA-2A, IAA***) kimutatása nem csak a diabetes diagnosztizálására lehet alkalmas, hanem az 1TDM kezdetének előrejelzésére is (157, 158, 159).

A GAD szerepe, mint cél-antigén azért is merült fel, mert hordozza azokat a tulajdonságokat melyek cél-antigénné teszik a diabetesben: expresszálódik a pankreász sejteken, az 1TDM-os betegek T-sejtjei reagálnak a GAD epitopra, a NOD egerekben spontán jelentkezik a GAD ellenes immunválasz a betegség korai szakaszában és GAD-dal történő immunizálás kivédi a betegség kialakulását ezekben az egerekben (160, 161, 162). Azt is kimutatták, hogy a GAD65 ellenes antitestek képesek késleltetni a humán diabetes kialakulását (163, 164, 165, 166, 167, 168).

Sok más autoimmun kórképhez hasonlóan a diabetes mellitus patomechanizmusával kapcsolatban is felmerül a hsp-k szerepe, ezért egy további lehetséges cél-antigén az immunfolyamatban, a β-sejtekben is jelen levő ***60 kD-os hősokk fehérje a hsp60***.

Elias és kollégái voltak az elsők, akik a hsp60-at illetve egy epitopját a p277-et (hsp60AA437-460) feltételezték a korai cél-antigénnek az 1TDM patomechanizmusában. A feltételezéshez több kísérleti eredmény is vezetett (169).

Az első ilyen megfigyelés az volt, hogy hsp ellenes antitestek és T-sejtes immunválasz előzi meg a betegséget. Hsp65, hsp60 reaktív T-sejtek, és hsp60 illetve hsp65 elleni antitestek egyaránt megjelennek NOD egerekben az autoimmun inzulitis folyamata során (170). Ezek az antitestek illetve T-sejtek eltűnnek, illetve csökken a mennyiségük, ahogy a diabetes mellitus kialakul. Ezen felül a NOD egerekben spontán alakul ki egy hsp60 epitop, a p277 elleni T-sejt válasz (171). A NOD egerekhez hasonlóan a STZ indukálta diabeteses C57BL/6KsJ egerekben is megjelennek a hsp60 ellenes specifikus autoantitestek és hsp60 reaktív T-sejtek. Az antitestek és a hsp60 reaktív T-sejtek a STZ hatására jelentkeznek és jelen vannak a diabetes klinikai manifesztációjáig. Ugyanezen vizsgálat során nem csak hsp60-ra, hanem egy hsp60 epitopra, a p277-re is érzékeny T-

sejteket is kimutattak (172). A többszöri kis dózisú STZ által kiváltott diabetes modell jól demonstrálja, hogy a hsp60 ellenes immunitás fontos faktor a toxin indukálta illetve a spontán diabetes patomechanizmusában (172). Ezen eredmények alapján azt feltételezik, hogy a többszöri kis dózisú STZ azért képes autoimmun diabetest létrehozni, mert a hatására hsp60 expresszálódik a sejtek felszínén és ezáltal a β-sejtek fogékonyabbak lesznek a hsp60 ellenes immunitásra (172).

1TDM-os betegekben egy másik hsp60 epitop, a ***LAK peptid*** (hsp60 AA394-408) ellen is kimutattak megnövekedett antitest szintet, ezért ennek a szerepe is felmerült, mint cél-antigén. Ennek a peptidnek az a jellegzetessége, hogy viszonylag nagy homológiát mutat a már említett GAD antigénnel (173).

Szintén a hősokk fehérjék patológiai szerepét támasztja alá az a tény, hogy hsp (hsp60, hsp65) és a hsp peptid (p277) egyszeri dózisban alkalmazva (174) képes diabetest indukálni NOD egerekben, C57BL/6KsJ egerekben, illetve olyan törzsekben is melyek nem fogékonyak a diabetesre (175). Nem csak maga a hősokk fehérje, hanem a hsp elleni T-sejt klónok is képesek inzulitist és hiperglikémiát okozni a fiatal NOD és nem NOD egerekben egyaránt (174).

További bizonyíték, hogy különböző hsp-vel (hsp60, hsp65) és hsp peptiddel (p277) történő immunizálás/vakcinálás kivédte NOD egerekben a spontán, illetve C57BL/KSJ egerekben az alacsony dózisú STZ indukálta diabetes kialakulását (176, 177, 178, 179***).*** Ezzel szemben a hsp70-nek nincs ilyen hatása (174) és a GAD sem nem tudta kivédeni a STZ indukálta diabetest (178).

3.3.2. Immunizálás hősokk fehérjével

A diabetes klasszikus terápiája az inzulin kezelés, ami azonban nem jelent oki terápiát. A legújabb kutatások arra irányulnak, hogy immunterápia segítségével megelőzzük, illetve ha kialakult megszüntessük a diabetest kiváltó autoimmun folyamatot.

Az immunterápiának több típusa létezik. A legegyszerűbb immunterápiás lehetőség az immunszupresszió.

Azok a kísérleti terápiák ahol immunszupresszáns Cyclosporin A kezelést használtak hatékonynak bizonyultak (180), de az általános immunszupresszió és a szer egyéb toxikus hatásai miatt csak rövid ideig alkalmazható. Szintén ígéretesnek bizonyult az immunszupresszió utáni szigetsejt beültetés, ami azt bizonyítja, hogy a β-sejt pusztulás (destrukció) nem progresszív, ha a T-sejt mediálta immunválasz gátolva van (181).

Egy másik immunterápiás lehetőség az antitesten alapuló immunterápia. Ennek a kezelések a lényege az, hogy monoklonális antitestekkel inaktiválják az autoimmun folyamatban résztvevő különböző immunkomponenseket. Próbálkoztak már citokin, kemokin és antigén prezentáló sejt elleni antitestekkel, de nem meglepő módon a legtöbb próbálkozás a $CD4^+$ és a $CD8^+$ T-sejtek elleni monoklonális antitestekkel történt. A főleg NOD egereken végzett kísérletekből az is kiderült, hogy az anti-CD4 és anti-CD8 képesek voltak stimulálni a $CD4^+CD25^+$ regulátoros sejteket is (182, 183, 184).

A legmegfelelőbb megoldás azonban az lenne, ha a cél-antigén ismeretében, a megfelelő cél-antigénnel immunizálnánk. A diabeteses egyedbe bejuttatott cél-antigén két, egymást nem kizáró, módon képes az autoreaktív T-sejtekre hatni. Képes T-sejt anergiát/delétiót okozni és/vagy aktiválni az "immunológiai homunkulusz" regulátoros T-sejtjeit.

Tehát, az egyik feltételezett cél-antigénnel a hsp-vel való immunizáció során a terápiás hatás úgy jöhet létre, hogy a vakcináció fokozza a Th2 típusú, illetve egyéb regulátoros mechanizmusokat és ezzel egyidejűleg gátolja a β-sejteket pusztító Th1 típusú immunválaszt (185, 186, 187, 188, 189).

Különböző állatkísérletekben vizsgálták már a hsp-k protektív hatását. A hsp60-al illetve p277-el történő immunizálás kivédte NOD egerekben a spontán, illetve C57BL/6KsJ egerekben az alacsony dózisú STZ indukálta diabetes kialakulását (176, 177, 178, 179).

NOD egerekben p277-el történő immunizálást követően a β-sejteket pusztító destruktív T-sejtes proliferatív immunválasz eltolódott a humorális immunválasz irányába, növekedett a Th2 típusú citokinek mennyisége (178, 186, 190).

A legújabb kutatások és kísérletek már kiterjedtek humán vizsgálatok irányába is. Az első próbálkozások során, egy randomizált, kettős vak Fázis II klinikai kísérletben próbálták ki a p277-el (DiaPep277) történő immunizálás hatását frissen manifesztálódott diabetesben (191, 192). A p277-el kezelt betegekben nem csökkent tovább a C-peptid koncentráció, csökkent a betegek inzulin igénye. A Hsp60 és p277 elleni T-sejtek a DiaPep277 csoportban fokozott Th2 citokin fenotípust mutatott. A p277-el történő immunizálás tehát képes fenntartani az endogén inzulin termelést, azáltal, hogy a Th1 típusú immunválaszt eltolja Th2 irányba.

A kezdeti nagyon kecsegtető eredményekhez képest (193, 194), az utóbbi két évben végzett immunizálások, már nem hoztak olyan széles körűen kedvező eredményt. Ezekben a kísérletekben, ugyanúgy magasabb volt a C- peptid szint a kezelt csoportban, de az inzulin igény már nem csökkent a placebo csoporthoz képest (195). Ugyanakkor nagy előnye az immunizálásnak, hogy nem okoz allergiát (pl. IL-5 termelés, eosinophilia) és alig van mellékhatás (196).

Az immunizálásról végeredményben megállapítható, hogy kedvező hatással van az immunválaszra, azaz visszaszorítja a pro-inflammatorikus és patogén Th1 típusú sejtválaszt. Ez a gátlás valószínűleg a p277 által aktivált IL-10 típusú citokint termelő T-sejteken keresztül valósul meg, amelyek azonban nem csak Th2 típusú sejtek, de a $CD4^{+}CD25^{+}$ nTreg és az adaptív Tr1 sejtek is lehetnek. Nagy valószínűséggel azonban mindhárom fenti sejttípusnak szerepe lehet az immunizálás hatásának a közvetítésében. (197).

3.4. A diabetes kardiovaszkuláris szövődményei

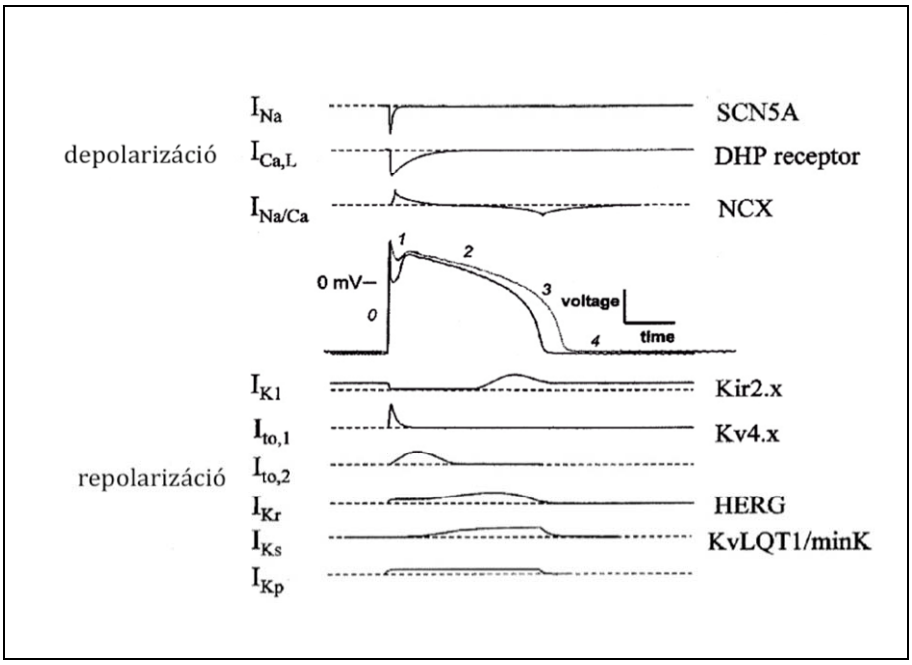
Átfogó klinikai epidemiológiai vizsgálatok adatai szerint cukorbetegekben jelentősen nagyobb a szív-érrendszeri megbetegedések és halálozások száma az átlag népességhez képest. A koszorúerek atherosclerosisa fiatalabb életkorban és agresszívebb formában jelenik meg a cukorbetegekben. Ugyanakkor pusztán ez a jelenség nem tehető felelőssé az emelkedett szív-érrendszeri rizikóért diabetesben, hiszen ez megjelenik azon cukorbetegekben is, akikben coronaria sclerosis nem igazolható. A cukorbetegségben megnövekedett kardiális eredetű halálozás okaként számításba kell tehát venni a

szívizomzatot, annak érrendszerét és beidegzését érintő elváltozásokat, melyeknek komplexitása hozza létre a diabeteses kardiomiopátiaként meghatározott kórélettani jelenséget (198). Az 1-es típusú diabeteses betegek esetén a repolarizációs fázis megnyúlásának, mechanizmusa, az arrhythmiára való fokozott hajlam összetevői és a hirtelen halál oka(i) a mai napig vizsgálatok tárgyát képezik.

1TDM-ban a legjelentősebb elektromos változást és problémát a QT intervallum megnyúlása jelenti (199, 200, 201). Ezen belül rámutattak arra, hogy a QT-diszperzió nagysága 1TDM-ban meghaladja a 2TDM-ban mért értéket. Feltételezhető, hogy ez a QT intervallum megnyúlás a nem diabeteses eredetű QT megnyúláshoz hasonlóan nagyfokú mortalitással jár (202, 203, 204). Egypetéjű ikreken végzett kísérletek szintén azt igazolták, hogy a QT megnyúlás is diabetesnek köszönhető és nem genetikai okai vannak (205).

A szívizomsejtek, más ingerlékeny szövetekhez hasonlóan, a megfelelő ingerekre sajátos potenciálváltozással válaszolnak, amelyet akciós potenciálnak (AP) nevezünk. Az akciós potenciál alakja a szívizom különböző területén eltéréseket mutat. Más az alakja a kamra pitvar sejteken és más az atrioventikuláris és szinuszcsomóban. Különbség van továbbá a kamrai izom endokardiális, miokardiális és epikardiális rétegeinek AP alakja között is (206).

A 4. ábrán jól látható, hogy a szívizom akciós potenciálja több fázisra különíthető el. Az ún. 0 fázis a gyors depolarizáció amely során a negatív membránpotenciál átmenetileg pozitívvá válik. Ezután a szívizomsejt-típusok többségében egy gyors repolarizációs fázis következik (l. fázis), amelyet csak a munkaizomra jellemző hosszú plató (2. fázis) követ. A platófázist követi egy gyorsabb repolarizáció (3. fázis), amely során a membránpotenciál visszatér az eredeti negatív értékhez, a nyugalmi membrán potenciálhoz (207, 208). A kamrai akciós potenciál egyes fázisaiért felelős ioncsatornák a 4. ábrán vannak feltüntetve. Ezen fázisok és ioncsatornák közül a diabetes szempontjából a 3 fázis (repolarizáció) és az ezt létrehozó K^+ csatornák a fontosak, mert ezeknek a denzitás csökkenését illetve működés zavarát feltételezik a diabetes okozta akciós potenciál zavarok hátterében.



4. ábra. A kamrai akciós potenciál egyes fázisaiért felelős ioncsatornák. A 0. fázisában, a gyors nátriumáramnak (I_{Na}) valamint az L-típusú kalciumáramnak (I_{CaL}) van jelentős szerepe. Az 1. fázisú gyors repolarizációért a nátriumáram inaktivációja, valamint a tranziens káliumáram/tranziens outward rectifier (I_{to}) a felelős. A 2. fázis fenntartásánál fontos megemlíteni a nátrium-kalcium ($I_{Na/Ca}$) csereáramot. A gyors és lassú késői egyenirányító/delayed rectifier káliumáram (I_{Ks}, I_{Kr}) és a befelé egyenirányító/inward rectifier káliumáram (I_{K1}) a repolarizáció 3. fázisában segíti elő a gyors repolarizációt, illetve a repolarizáció befejezését (207).

A diabetes indukálta repolarizációs abnormalitások okának kiderítésére irányuló legkorábbi kísérleteket nagy részét patkányokon végezték (216, 217, 218, 219). A pitvar és kamrai AP jellemzőit valamint az AP időtartamának változását diabeteses illetve kontroll patkányokban vizsgálták és hasonlították össze (220). A STZ indukálta diabeteses patkányokban mind a depolarizáció mind a repolarizáció gátolva volt, az akciós potenciál időtartama (APD) szignifikáns megnyúlt és a depolarizáció maximális sebessége (V_{max}) is szignifikánsan csökkent.

A depolarizáció maximális sebessége (V_{max}) a gyors nátriumáramtól függ. Az ebben bekövetkező változások, jelen esetben csökkenés arra utal, hogy a STZ indukálta diabetes nagy valószínűséggel károsította a gyors Na^+ csatornák működését illetve csökkenthette a számukat, esetleg változást eredményezhetett a fenotipusban is. Ennek a Na^+ csatorna zavarnak a pontos mechanizmusa a nehéz vizsgálhatóság miatt a mai napig

nem ismert teljességében. Munkám során én is elsősorban a repolarizációs változások vizsgálatára és ennek okára koncentráltam.

A repolarizációt érintő változásokkal kapcsolatban végzett elemi ionáram vizsgálatok arra utalnak, hogy a tranziens outward K^+ (I_{to}) áram amplitúdójának a csökkenése, illetve a Kv4.3 illetve Kv4.2 csatorna fehérjék csökkent expressziója vezethet az APD megnyúlásához a diabeteses patkányokban (209, 210, 211, 212, 213, 214, 215). A patkányok kamrájában a repolarizáció során egész más mechanizmusok érintettek, mint pl. a kutyában, nyúlban, emberben, ugyanis a patkányban hiányzik plató fázis és rövidebb a repolarizációs fázis. Ezért a patkányokból származó kísérleti eredmények csak részben segítenek megérteni a diabetesben kialakuló repolarizációs zavarokat.

A KK/Ta diabetes egérmodellben (221) szignifikánsan lecsökkent V_{max} és megnyúlt APD detektálható, továbbá a transient outward áramot gátló 4-aminopiridin nem képe további repolarizáció megnyúlást okozni, ami szintén arra utal, hogy a diabeteses repolarizáció megnyúlás hátterében az egerekben is az I_{to} áramok károsodott aktivitása állhat (222).

Az alloxán egy toxikus glükóz analóg, amely az inzulin termelő β-sejtek szelektív pusztításával képes diabetest indukálni. Az alloxán indukálta diabeteses nyúlban azt mutatták ki, hogy a QT intervallum megnyúlás hátterében a lassú delyed rectifier K^+ csatornák denzitásának (I_{Ks}) csökkenése áll, míg a többi ionáramok, nevezetesen az inward rectifier K^+ áramok (I_{K1}), a gyors delayed rectifier K^+ áramok (I_{Kr}), a tranziens outward áram (I_{to}) és az L-tipusú kalcium áramok (I_{CaL}) egyáltalán nem érintettek a folyamatban (223). Ebben a speciesben a patkány eredményektől eltérően az I_{to} áramok zavara nem játszik szerepet a diabeteses kardiovaszkuláris szövődmények kialakulásában. Alloxán indukálta diabeteses kutyaszív vizsgálatakor, ugyanakkor azt találták, hogy a QT megnyúlást a transient outward K^+ csatornák (I_{to}) mellett a lassú delayed rectifier K^+ csatornák (I_{Ks}) és áramok szignifikáns csökkenése is okozta. (224).

Összefoglalva tehát a diabetes okozta megnyúlt repolarizáció hátterében nagy valószínűséggel a transient outward K^+ csatornák és a lassú delayed rectifier K^+ csatornák és áramok szignifikáns csökkenése áll.

4. CÉLKITŰZÉSEK

In vitro humán kísérleteim során a T-sejtek szerepét feltételező hipotézisnek megfelelően 1TDM-os betegekben p277 és LAK peptiddel történő stimulálás után az immunregulációs zavar jellegét vizsgáltam ELISPOT technikával.

In vivo állatkísérleteim első lépéseként a HDC-KO és WT (BALB/c) egerekben illetve a Wistar patkányokban a többszöri kis dózisú STZ indukálta autoimmun diabetes-modell kísérletes paramétereit állítottam be. In vivo kísérletsorozatom következő lépésében mindkét diabeteses állatmodellben megvizsgáltam a hsp-vel (hsp65, p277) történő immunizálás esetleges protektív hatását a STZ indukálta autoimmun diabetessel szemben. Meghatároztam továbbá az immunizálás hatására bekövetkezett antitest eltéréseket is a diabeteses egér és patkánymodell esetén.

Mivel a HDC-KO egerek szív AP paramétereit mindezidáig nem vizsgálták, elektrofiziológiai vizsgálataim első lépésében meghatároztam hagyományos mikroelektród technikával a HDC-KO egerek elektrofiziológiai paramétereit, majd ezt követően analizáltam a diabeteses WT és HDC-KO egerek paramétereit is.

Célkitűzéseim ezek alapján pontokba szedve:

Humán in vitro vizsgálatok

- Hsp60 peptidekkel (p277, LAK), történő stimulálást követően a Th1/Th2 arány és az esetleges Th1 irányába történő immunválasz eltolódásának vizsgálata a stimulált T-sejtek citokin termelése alapján.

In vivo immunizációs vizsgálatok diabeteses egér (WT/HDC-KO) és patkány modelleken.

- STZ indukálta autoimmun diabeteses modell beállítása és vizsgálata WT és HDC-KO egerekben.
- STZ indukálta autoimmun diabeteses modell beállítása és vizsgálata Wistar patkányokban.
- P277 és hsp65 immunizálás hatásának vizsgálata diabeteses WT és HDC-KO egerekben.
- Hsp65 immunizálás hatásának vizsgálata diabeteses patkányokban.

Elektrofiziológiai vizsgálatok

- HDC-KO és WT egerek szív elektrofiziológiai paramétereinek összehasonlítása.
- STZ indukálta diabetes kardiovaszkuláris hatásának vizsgálata WT és HDC-KO egerekben.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Anyagok

5.1.1. Peptid szintézis

A humán hsp60 régió különböző szekvenciáit tartalmazó szintetikus peptideket szilárdfázisú technikával állították elő tercier-butoxi-karbonil/benzil (Boc/Bzl) védőcsoportok alkalmazása mellett, 4-metil-benzhidril-amin (MBHA) gyanta használatával. A kapcsolást DIC/HOBt (N, N'-diizopropil-karbodiimid/1-hidroxi-benztriazol) kapcsolóreagensek segítségével hajtották végre. Két peptidet szintetizáltak: a Hsp60 (^{394}LAKLSDGVAVLKVGG^{408}) peptidet és a Hsp60 (^{437}VLGGGVALLRVIPALDSLTPANED^{460}) peptidet. A peptidek szintézisét MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport végezte (173). A szintetizált Hsp60AA437-460 peptid szekvencia megfelelt az Raz és munkatársai által a (191) humán vakcinációs próbálkozásoknál alkalmazott szekvenciának.

5.1.2. Reagensek és kit-ek

Az ELISPOT kit-et, az ELISA lemezeket valamint a rekombináns humán hsp60-at és *M. bovis* hsp65-öt az U-CyTech Biosciences-től (Hollandia), a Greiner Bio-one-tól (Németország) és a Lionex GmbH-tól (Németország) szereztük be. Az anti-hsp60 poliklonális nyúl antitestet a StressGen Biotechnologies-től vásároltuk (USA). A többi vegyszer a Sigma-Aldrich Co-tól származott.

5.2. Vizsgálati alanyok

5.2.1. Betegek és egészséges kontrollok

A vizsgálatunkban 11, 1-es típusú frissen diagnosztizált diabeteses beteg vett részt megfelelő tájékoztatás és a németországi Etikai Bizottság által elfogadott Hozzájárulási Nyilatkozat aláírását követően. Csak azokat a betegeket választottuk be a vizsgálatba, akiknél az inzulin terápia kezdete és vizsgálatunkhoz szükséges vérvétel között nem telt el hosszabb idő, mint 2 hét (4 - 11 nap). Kontrollként 10 egészséges önkéntes vett részt a vizsgálatban. Mivel a kontroll és beteg csoport a nemek tekintetében inhomogén további kísérleteket tervezünk ennek kiegyenlítése érdekében.

A beteg és kontroll csoport általános jellemzői a 1. táblázatban láthatók.

1. táblázat. A beteg és kontroll csoport általános jellemzői

	n	Kor (medián, tartomány)	BMI (medián, tartomány)	Férfi/ Nő, n	Inzulin terápia időtartama (medián, tartomány)
Diabeteses	11	35 év, (19-65 év)	23.60 kg/m^2 (20.23-28.03)	10/ 1	5 (4-11 nap)
Kontroll	9	36 év, (24-65 év)	21.80 kg/m^2 (18.29-30.11)	2/ 7	0

5.2.2. Állatok

Az egér kísérleteimet vad típusú (WT) hím BALB/c és hím hisztidin dekarboxiláz knockout (BALB/c háttérrel) egereken (HDC-KO) végeztem (25-29g, kor: 6 hét).

A hisztaminhiányos, HDC-génkiütött (HDC-KO) egértörzset kanadai és japán kutatók a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetével közösen hozták létre (225). A homozigóta mutációt hordozó állatokban még HDC transzkriptumot sem lehetett detektálni, ami arra utal, hogy nem pusztán funkcióképtelen fehérje lett az eredmény, a transzkripció is gátolt.

A BALB/c HDC-KO törzset vad típusú BALB/c és HDC KO CD-1 egereket keresztezve hozták létre (225). A genotípus meghatározása farokdarabból nyert genomiális DNS PCR analízisével történt. A teljes hisztaminmentesség biztosítása érdekében a KO állatok hisztaminmentes diétán voltak (Altromin Gmbh táp). Az állatokat szabályozott hőmérsékleten (22°C) és 12 órás fény/sötétség ciklusú megvilágításban tartottuk 10-es csoportokban. Élelem és víz folyamatosan elérhető volt a számukra. Az állattartási körülmények és a kísérletek megfeleltek az etikai

követelményeknek az EC Directive 86/609/EEC szerint. A kísérleteket a Semmelweis Egyetem etikai bizottsága is ellenőrizte.

A patkány kísérleteinket hím, Wistar (180-200g) patkányokon végeztük. A patkányokat egyedi ketrecekben tartottuk szabályozott hőmérsékleten (22°C) és 12 órás fény/sötétség ciklusú megvilágításban, ahol az élelem és a víz folyamatosan elérhető volt számukra. Az állattartási körülmények és a kísérletek itt is megfeleltek az etikai követelményeknek az EC Directive 86/609/EEC szerint. A kísérleteket a Semmelweis Egyetem etikai bizottsága is ellenőrizte.

5.3. Módszerek

5.3.1. Kísérleti protokollok, in vivo vizsgálatok

5.3.1.1. Diabetes indukció

A diabetest többszöri (3x) kis dózisú (40 mg/kg) STZ intraperitonealis adagolásával indukáltuk. A STZ-t 0.1mol/l citrát pufferben oldottuk fel és három egymást követő napon alkalmaztuk. A kontroll állatok azonos mennyiségű oldószert kaptak. A hagyományos, többszöri kis dózisú STZ (5x30mg/kg) kezelés esetén magas volt az állatpusztulás ezért a megszokott protokolltól eltérő általunk alkalmazott STZ dózist külön próbakísérletben határoztuk meg.

5.3.1.2. Vércukor mérés

A vércukor értéket először közvetlenül a STZ kezelés előtt ("0 hét") mértük, majd megismételtük a STZ kezelés után minden második héten. Vérmintát a retroorbitális vénás plexusból nyertük. A vércukor értékeket humán teszt-kittel mértük, amit előzőleg standardizáltunk és összehasonlítottuk a kolorimetrikus kitek eredményeivel melyek enzimatikus úton színreakció és spektrofotométer segítségével mérik a vércukor értékeket. A mérések során a vércukor-szint változásokat 6 hétig követtük. A diabetes kritériuma a 11mmol/l-nél nagyobb vércukor érték volt.

5.3.1.3. Vizsgálati csoportok

A kísérleti egereket (mind a WT mind a HDC-KO egereket) 4 különböző, 10-es állatszámú csoportba osztottuk (2. táblázat). Két csoport (kontroll) csak oldószert kapott (WT-1 és KO-1), kettő csak STZ kezelésben részesült (WT-2 és KO-2) és két-két csoportot p277-el (1x100 μg) i.p. (WT-3 és KO-3) vagy hsp65-el (1x100 μg) i.p. (WT-4 és KO-4) immunizáltunk. A hősokk fehérjét komplett Freund-adjuvánssal együtt adtuk hét nappal a STZ kezelés előtt.

A kísérleti patkányokat is 4 csoportba osztottuk (3. táblázat). A kontroll csoport (n=5) csak vivőanyagot kapott. A következő csoport az egerekhez hasonlóan csak STZ (3x) kezelésben részesült. A harmadik és negyedik csoport egyedeit a STZ kezelés mellet hsp65-el is immunizáltuk, mégpedig különböző módon. Az egyik csoport (n=6) egy alkalommal kapott hsp65-öt (1x100 μg) a STZ kezelés előtt hét nappal, míg a másik csoport (n=8) kétszer részesült hsp65 (100 -100 μg) kezelésben 7 nappal a STZ kezelés előtt majd 7 nappal utána is.

2. táblázat. A WT és HDC-KO egerek vizsgálati csoportjai

Vad típusú (WT) egér		**Knockout egér (HDC-KO)**	
Csoport	**Kezelés**	**Csoport**	**Kezelés**
WT-1 (n=10)	kontroll	KO-1 (n=10)	kontroll
WT-2 (n=10)	3XSTZ	KO-2 (n=10)	3XSTZ
WT-3 (n=10)	p277+3XSTZ	KO-3 (n=10)	p277+3XSTZ
WT-4 (n=10)	hsp65+3XSTZ	KO-4 (n=10)	hsp65+3XSTZ

3. táblázat. A Wistar patkányok kísérleti csoportjai

Wistar patkány

Csoport	Kezelés
R1 (n=5)	Kontroll
R2 (n=4)	3XSTZ
R2 (n=6)	-7 hsp65+3XSTZ
R3 (n=8)	-7,+7 hsp65+3XSTZ

5.3.2. In vitro vizsgálati protokollok, módszerek

5.3.2.1. T helper sejt meghatározás. Citokin vizsgálatok. (ELISPOT)

Az ELISPOT (**E**nzyme-**l**inked **i**mmunosorbent **spot**) módszer viszonylag új technikának számít az immunológiai vizsgálatok területén. Előnyei röviden összefoglalva az alábbiak:

- Elve hasonlít az Enzyme-linked immunosorbent assay-hez (ELISA, leírását lásd később).
- Eredetileg az ellenanyagot szekretáló B-sejtek számának meghatározására szolgált.
- Alkalmas különböző molekulák, pl. **citokinek**, kemokinek, kvantitatív és kvalitatív meghatározására.
- Alkalmas továbbá poliklonális aktivátorok vagy antigén indukálta aktivációt követően az aktivált effektor sejtek számának meghatározására.

A perifériás mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll gradienssel történő centrifugálással nyertük perifériás heparinizált, egészséges kontroll személyek és 1-es típusú diabeteses betegek véréből. Foszfát pufferben (PBS) történő átmosás után a PBMC-ket 10% humán donor AB szérummal, Penicillinnel (100units/ml), Streptomycinnel (100µg/ml), L-Glutaminnal (2mM) kiegészített RPMI 1640 tápoldatban hígítottuk fel. A sejtkoncentrációt $1{,}8 \times 10^6$ sejt/ml-re állítottuk be. Ezután a sejteket stimuláltuk un. pozitív kontroll reagensekkel (10ng/ml phorbol myristát acetát (PMA) és Ionomycin kombinációja (PI) és 10µg/ml Tetanus toxoid (TT)) illetve a vizsgálni kívánt feltételezett cél-antigénekkel (15µg/ml GAD65 szerű hsp60 peptid LAK (Hsp60

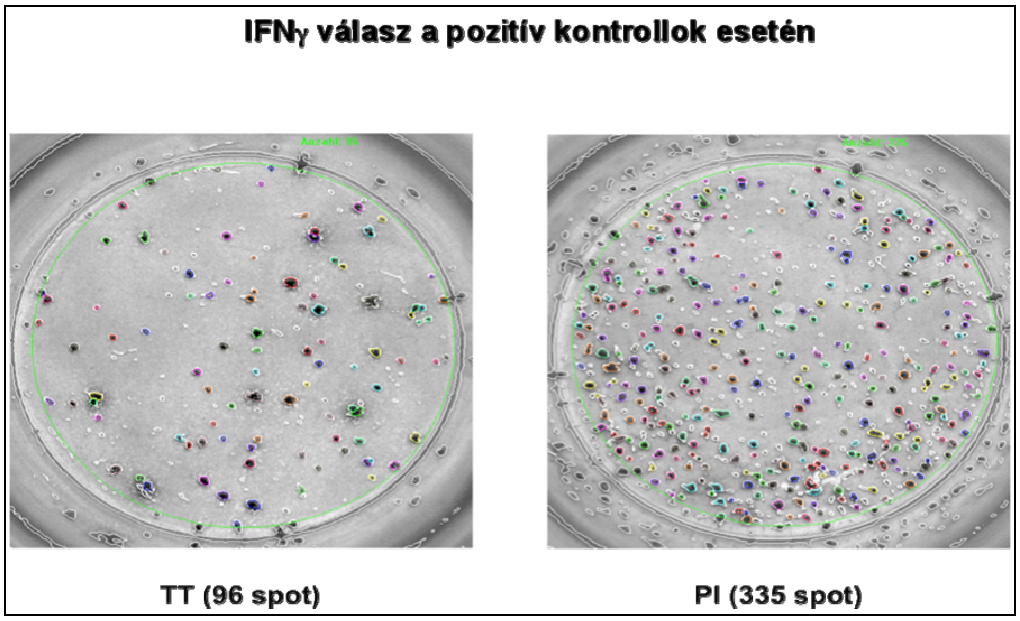
AA394-408), 10μg/ml p277 peptid (Hsp60 AA437-460)). A fedő anti-citokin antitesteket (IFN-γ és IL-13 ellen) 1:100 arányban steril fiziológiás sót tartalmazó foszfát pufferben hígítottuk, majd lefedtük a steril ELISA lemezeket, amelyeket ezután egy éjszakára hűtőbe tettük +2°C - + 8°C-ra. Az egy éjszakás inkubálás után mindegyik lemezt 5-ször átmostuk steril PBS és Tween-20 0.05% keverékével. A lemezeket, blokkolásuk után (PBS és 1% BSA keverékével) egy éjszakán keresztül inkubáltuk a hűtőben +2°C - + 8°C-on. Ezután 3 párhuzamos 100 μl sejt szuszpenziót tartalmazó aliquotot készítettünk majd a lemezeket 5 órára 37°C-os, 5%-os CO_2 atmoszférájú inkubátorba helyeztük

Az IFN-γ és IL-13 termelést akartuk detektálni, ezért az IFN-γ és IL-13 elleni biotinizált detektor ellenanyagokból és a PBS-BSA1%-ból 1:100-as hígításban oldatot készítettünk. A következő lépésben a sejt-szuszpenziót átmostuk PBS-sel majd az ELISA lemez minden egyes mélyedéshez (*„well”*) 10 μl hígított detektor ellenanyagot adtunk. A lemezeket 1 órán át inkubáltuk a 37°C -os nedves atmoszférán, majd átmosást követően minden mélyedéshez 50 μl GABA (gold labeled anti-biotin antitest) oldatot (1:50 PBS-BSA 1%-ban oldva) adtunk.

Egy órás 37-on történő inkubálás után 8-szor mostuk a lemezeket. Végső lépésként 30 μl/well aktiváló oldatot adtunk a lemezekhez. A reakció végén keletkező citokin foltok (továbbiakban *„spotok”*) számát Bioreader-3000 LC ELISPOT olvasóval határoztuk meg. Az 5. ábrán jól láthatók a mérés végén a mélyedések alján kapott spot-ok jellege.

A PMA egy olyan pozitív kontroll amely nem specifikus módon protein kináz C (PKC) aktiválásán keresztül fokozza a T-sejtek citokin termelését. Az Ionomycin Ca^{2+} ionofór jellege miatt fokozza a Ca^{2+} beáramlást a sejtbe, ami a PKC aktiválódásával szintén nem specifikusan stimulálja a T-sejtek citokin termelését. A két anyag kombinációja (PI) egy olyan pozitív kontrollt eredményez, amely alkalmas arra, hogy felmérjük a vizsgálni kívánt T-sejtek maximális, nem antigén specifikus stimulálhatóságát (226). A Tetanus toxoid (TT) egy olyan antigén, ami nagy mértékben és specifikusan stimulálja a T-sejt választ. A TT ezért egy olyan pozitív kontrollnak felel meg amivel felmérhetjük a T sejtek antigén specifikus stimulálhatóságát.

A kontroll és beteg csoportban az IFN-γ (Th1) és IL-13 (Th2) válaszokat úgy határoztuk meg, hogy az antigének okozta stimulált választ összehasonlítottuk a stimulálatlan háttérrel (BG). A különböző vizsgálati személyeknek megfelelő IFN-γ és IL-13 válaszok különálló pontokként szerepelnek az ábrákon. A p277 és LAK által stimulált IFN-γ és IL-13 spot-ok számának meghatározására a stimulált spot-ok átlagát elosztottuk a stimulálatlan spot-ok átlagával: (3 *well* spot-jainak átlaga antigén jelenlétében)/(3 *well* spot-jainak átlaga antigén jelenléte nélkül). Pozitívnak tekintettünk egy választ, ha a spot-ok száma meghaladta a háttér értékének 1.25-szörösét.



5. ábra. IFNγ válasz a pozitív kontrollokra (TT, PI). Pozitív kontrollal (Tetanus toxoid, phorbol myrisát acetát+Ionomycin) történő stimulálás hatására keletkező IFN-γ spotok.

5.3.2.2. Az antitest szint mérése (ELISA)

Az „ELISA" is mozaikszó, a vizsgálat angol elnevezésének kezdőbetűiből tevődik össze (**E**nzyme-**l**inked **i**mmuno**s**orbent **a**ssay, azaz enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat).

Az enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat (ELISA) olyan, szilárd fázison lejátszódó színreakció, ahol a reagensek műanyag felülethez vannak kötve, és a reakciót enzimmel kapcsolt antitest segítségével követjük nyomon. Főleg immunológiai

vizsgálatokban használják, hogy kimutassák valamilyen antitest vagy antigén jelenlétét a vizsgált mintában. A hsp65, hsp60 és p277 elleni antitestek szintjét az immunizációs egér és patkány kísérleteink végén határoztuk meg a II. Belgyógyászati Klinika Kutató laboratóriumában beállított ELISA módszerrel. Három antigént használtunk a lemezek fedéséhez: a *M. bovis* hsp65 fehérjét, a humán hsp60 fehérjét és ennek egy epitopját, a p277-et. A lemezeket 1µg/well mennyiségű 0,1 M-os bikarbonát pufferben oldott fehérjével fedtük egy éjszakán keresztül 4 ^{o}C-on. Mosás és blokkolás után (0,5%-os zselatin foszfát pufferben) a lemezeket 100µl hígított (1:500) tesztszérumot tartalmazó oldattal (0,5% zselatin és 0,05% Tween20 foszfát pufferben) inkubáltuk egy órán át szobahőmérsékleten. A lemezhez kötött antitesteket peroxidázzal kapcsolt gamma lánc specifikus anti-IgG antitestekkel jeleztük és o-phenylén diamidot, valamint hidrogén – peroxidot tartalmazó oldattal hívtuk elő. A kapott színreakciót Metrtech S960 ELISA Readerrel olvastuk le 490/620 nm-en. Minden tesztlemezen a vizsgált fehérjékkel keresztreakciót mutató anti-hsp60 poliklonális nyúl antitestet alkalmaztunk standardként. A tesztsavók esetében mért optikai denzitás (OD) értékeket ehhez a standard görbéhez viszonyítva egység/ml értékben fejeztük ki a savókban mért antitest szintet. A standard savó 1:1000-es hígításával kapott OD-értéknél jelöltük ki a 100 AU/ml egységet. Minden tesztsavóból párhuzamos meghatározás készült és ezek átlagát határoztuk meg.

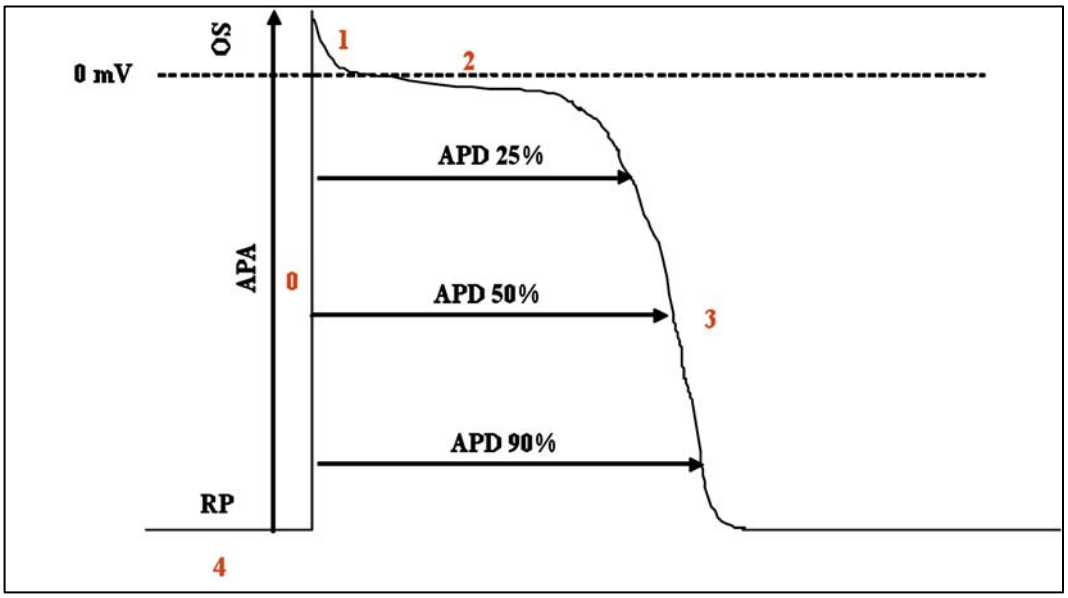
5.3.2.3. Akciós potenciál vizsgálata konvencionális mikroelektród technikával

A dekapitált egerek szívét jobb oldali thoracotomiát követően gyorsan eltávolítottuk és azonnal oxigenizált Tyrode-oldatba helyeztük (128mM NaCl, 4.7mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 0.4mM NaH_2PO_4, 1.2mM Na_2SO_4, 20.2mM $NaHCO_3$, 1.3 mM $CaCl_2$ és 11.0 mM glükóz). A karbogén gázzal (95% O_2+5% CO_2) átáramoltatott perfúziós oldat pH-ja 7,35-7,45 között volt. A jobb kamrai papilláris izmot kipreparáltuk, majd 37 °C -os, 95% O_2 és 5% CO_2 gáz eleggyel oxigenizált Tyrode-oldattal átáramoltatott szervfürdőben rögzítettük. A preparátumokat 2 ms időtartamú, kétszeres küszöbpotenciálú, 1-2Hz frekvenciájú négyszögimpulzusokkal, bipoláris platina elektródon keresztül ingereltük. Valamennyi készítményt legalább egy órán keresztül folyamatosan, az egyensúlyba kerülésig perfundáltuk a Tyrode-oldattal, melynek

hőmérsékletét állandó értéken (37°C) tartottuk. A transzmembrán akciós potenciálokat 5-20 Mohm ellenállású, 3 M/l KCl-dal feltöltött, konvencionális üvegkapilláris mikroelektródán keresztül nagy ellenállású erősítőbe vezettük, majd oszcilloszkóp segítségével monitoroztuk.

Az elektromos jelet analóg-digitális konverziót (INTRASYS computer analyzing system Experimetria) követően számítógépbe tápláltuk és értékeltük.

A 6. ábrán mutatom be a detektált paramétereket: **RP** (mV): nyugalmi potenciál, **APA** (mV): AP amplitúdója, **OS** (mV): AP túllövés, **APD2** (ms), **APD3** (ms), **APD5** (ms): AP időtartama 25%, 50%, 90%-os repolarizációnál $\mathbf{V}_{max}$ (V/s): depolarizáció maximális sebessége.



6. ábra. A konvencionális mikroelektród technikával detektált akciós potenciál paraméterek (lásd szöveg)

5.4. Statisztikai analízis

A humán vizsgálataim során a diabeteses és egészséges csoport összehasonlítására a nem parametrikus Mann-Whitney tesztet használtam.

Az állatkísérleteimben a különböző csoport összehasonlítására ANOVA tesztet használtam Bonferroni poszt teszttel. A patkányok túlélési görbéjének kiszámítása és összehasonlítása Mantel-Hansel teszttel történt.

Az elektrofiziológiai eredmények kiértékelésére szintén ANOVA tesztet használtam, Bonferroni post teszttel.

6. EREDMÉNYEK

6.1. Humán vizsgálatok

6.1.1. A háttér/alap citokin termelés és a pozitív kontrollok kiváltotta citokin termelés meghatározása

1TDM-os és nem diabeteses személyektől izolált PBMC sejtek – a vizsgálni kívánt antigénekkel és pozitív kontroll antigénekkel történő stimulálása után - citokin termelését mértük nagy szenzitivitású ELIPOT technikával. A Th1 típusú citokinek közül az IFN-γ-át, a Th2 típusú citokinek közül az IL-13-at választottuk mérésünk céljául. Az ELISPOT meghatározás során sejtek spontán/háttér aktivitása alacsony volt. A beteg és kontroll csoportból mindössze 4 személy esetén detektáltunk 4-nél több IFN-γ spot-ot (20%) és egyik személy esetén sem mértünk 4-nél több IL-13 spot-ot a stimuláló antigének jelenléte nélkül.

A kontroll és a beteg csoportban a háttér IFN-γ (2.33, 75% CI, 1.585-3.170) és IL-13 (1.585 (75% CI, 1.330-2.170) termelést jelző spot-ok mediánja alacsony volt. Ezzel szemben, a pozitív kontrollokkal történő stimulálás - phorbol myristate acetate + Ionomycin (PI) és Tetanus toxoid (TT) - nagymértékben megnövelte az IFN-γ (PI: 62.57, 75% CI, 13.31-108.8, TT: 3.5, 75% CI, 2.425-16.0) és IL-13 (PI: 52.92, 75% CI, 12.52-122.2, TT: 2.860, 75% CI, 1.700-12.92) spot-ok számát. Megállapítható tehát, hogy mindegyik anyag jól használható pozitív kontrollként.

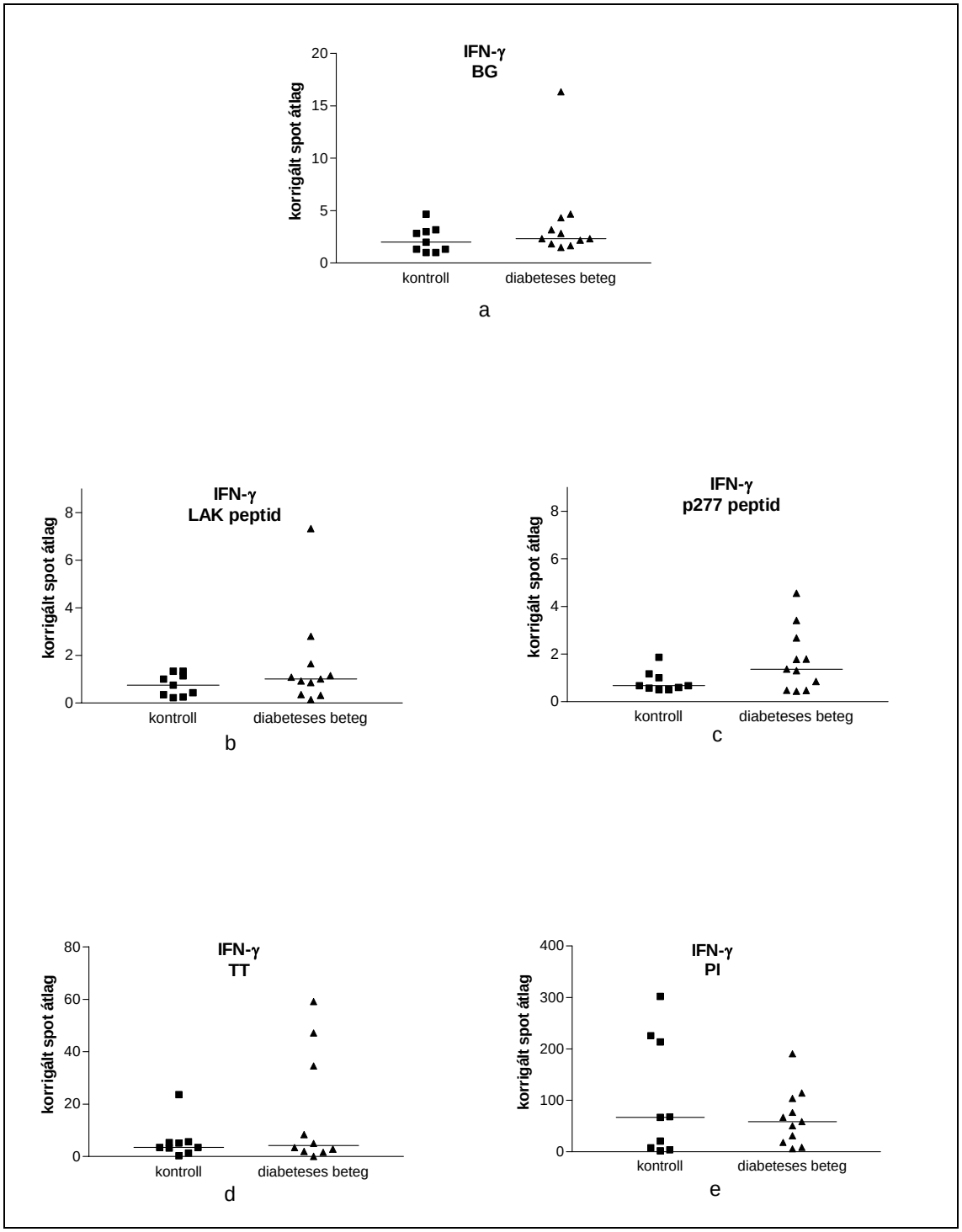
6.1.2. Stimuláció a hsp60 peptidekkel

6.1.2.1. Th1 (IFN-γ) válasz

11 diabeteses betegből 7 (63.63%) T-sejtjei adtak pozitív IFN-γ választ a p277-el történő stimulálás esetén (medián=1.36, 75% CI, 0.655-3.035). Az egészséges egyedek esetén ugyanakkor 9-ből csupán 3 esetben (33,33%) kaptunk pozitív IFN-γ választ (medián=0.067 75% CI, 0.530-1.01).

A LAK stimulusra adott válasz vizsgálata során, a 11 diabeteses betegből 6 (54.5%) mutatott pozitív Th1 típusú választ (medián=1.08, 75% CI, 0.605-2.675) míg a kontroll csoport esetén 9-ből 5 személy (55.5%) mutatott pozitív IFN-γ (medián=0.74, 75% CI,

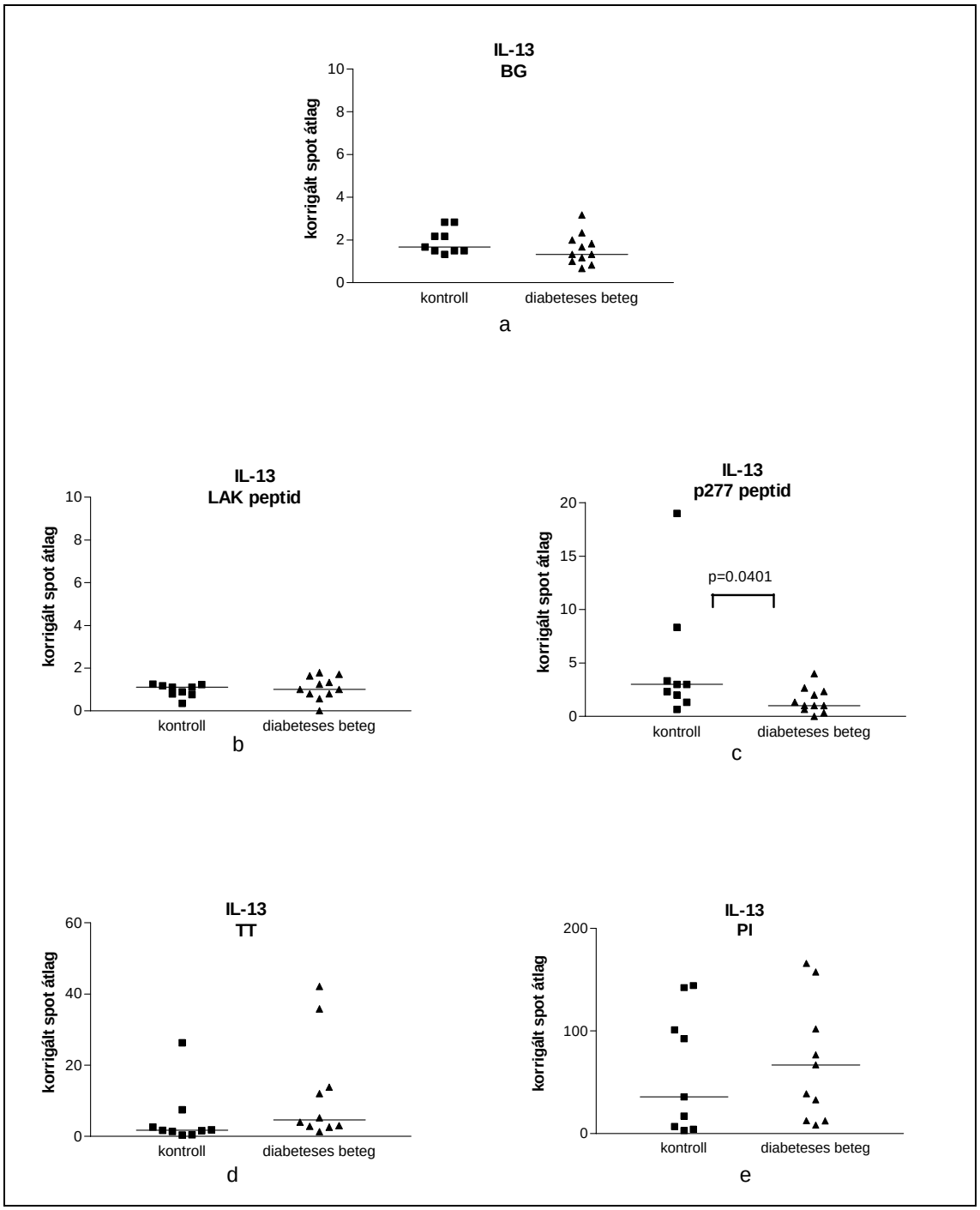
0.300-1.235) választ. Az IFN-γ válaszokat vizsgálva tehát nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll és beteg csoport között (7. ábra).



7. ábra. **A Th1 (IFN-γ) típusú citokin-válaszok összehasonlítása diabeteses betegekből illetve egészséges kontroll csoportból preparált nyiroksejteken**. A független pontok, az egyes személyek Th1 sejtjeinek IFN-γ termeléséből származó spot-ok átlagát jelképezik. A vízszintes vonalak, az egyes csoportok mediánját jelképezik. A statisztikai analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a csoportok között.

6.1.2.2. Th2 (IL-13) válasz

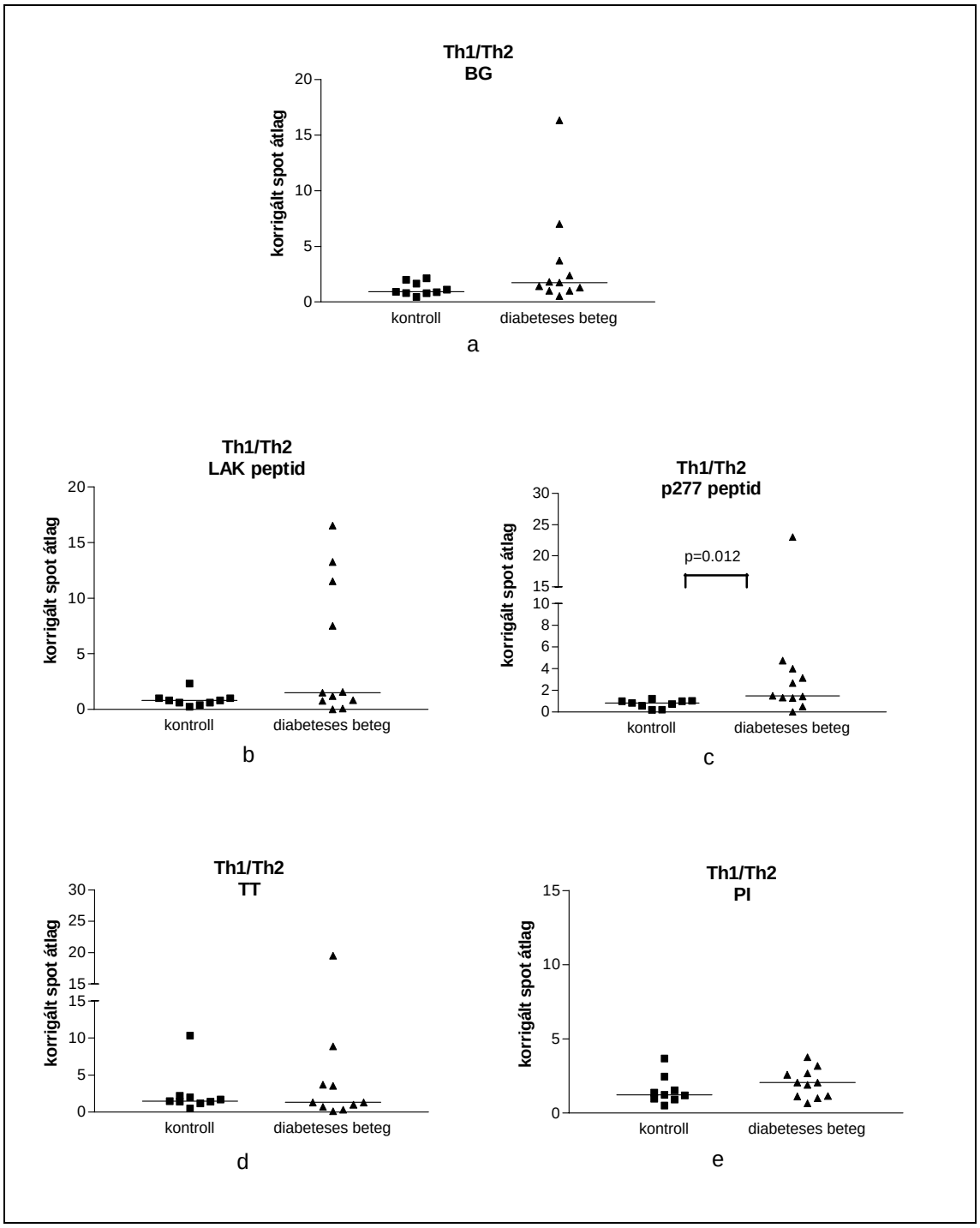
Az IL-13 válaszok esetén a pontok számát ugyanúgy határoztuk meg, mint az IFN-γ esetén. P277-el történő stimuláláskor 5 diabeteses (45.45%) beteg mutatott pozitív IL-13 választ (medián=0.86, 75% CI, 0.450-1.6000). A kontroll csoportból 7 esetben (77.7%) mutattunk ki pozitív proliferatív IL-13 választ (medián=1.110, 75% CI, 0.975-1.750). A spot számokat összehasonlítva a beteg csoport szignifikánsan (p=0.04) alacsonyabb IL-13 (Th2) választ (8. ábra/c) mutatott, mint a kontroll csoport, az eredeti (nem-korrigált) spot számokat összehasonlítva. LAK-al történő stimulálás esetén 11 diabeteses betegből 7 személy esetén (63.63%) mutatottunk ki pozitív IL-13 választ (medián=1.000, 75% CI, 0.8-1.675). A kontroll csoportban 9 személyből 5 adott pozitív (55.55%) IL-13 választ LAK stimulusra (medián=1.110, 75% CI, 0.785-1.205) (8. ábra).



8. ábra. A Th2 (IL-13) típusú citokin-válaszok összehasonlítása diabeteses betegekből illetve egészséges kontroll csoportból preparált nyiroksejteken. A pontok, az egyes személyek Th2 sejtjeinek IL-13 termeléséből származó spot-ok átlagát jelképezik. A vízszintes vonalak, az egyes csoportok mediánját jelentik. A statisztikai analízis szerint az 1TDM betegekben a p277-re adott Th2 válasz esetén szignifikánsan (p=0.0401) alacsonyabb IL-13 termelést mértünk a kontroll csoporthoz képest. A többi esetben nem volt szignifikáns eltérés.

6.1.2.3. Th1/Th2 arány

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk van-e eltolódás a diabeteses betegekben a Th1 vagy Th2 típusú immunválasz irányába, elosztottuk az IFN-γ spot-ok számát az IL-13 spot-ok számával és így meghatároztuk a Th1/Th2 arányt. P277-el történő stimulálás esetén szignifikáns (p=0.012) eltolódást találtuk (9 ábra/c) a Th1 típusú immunválasz irányába a diabeteses csoportban. A LAK peptiddel történő stimulálás esetén nem volt eltolódás egyik csoportban sem, egyik immunválasz irányába sem (9. ábra).



9. ábra. A Th1/Th2 eltolódás meghatározása és összehasonlítása diabeteses betegekben illetve az egészséges kontroll csoportban. A független pontok az egyes vizsgált személyek T-sejtjei által termelt citokinek IFN-γ/IL-13-arányát és ily módon a Th1/Th2 arányt jelképezik. A vízszintes vonalak, az egyes csoportok mediánját mutatják. Az 1TDM-os betegekben szignifikáns (p=0.012) eltolódást detektáltunk a Th1 típusú immunválasz irányába a p277 stimulus esetén.

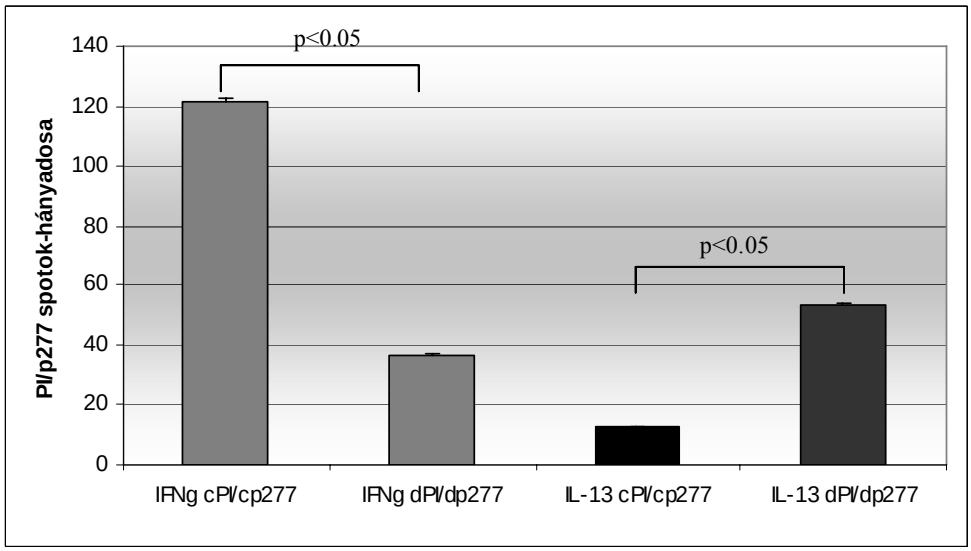
6.1.2.4. PI stimulushoz viszonyított p277- és LAK-válaszok összehasonlítása

A p277 és LAK okozta specifikus stimuláció mértékét összehasonlítottuk a pozitív kontroll PI okozta nem specifikus stimulussal/citokin termeléssel.

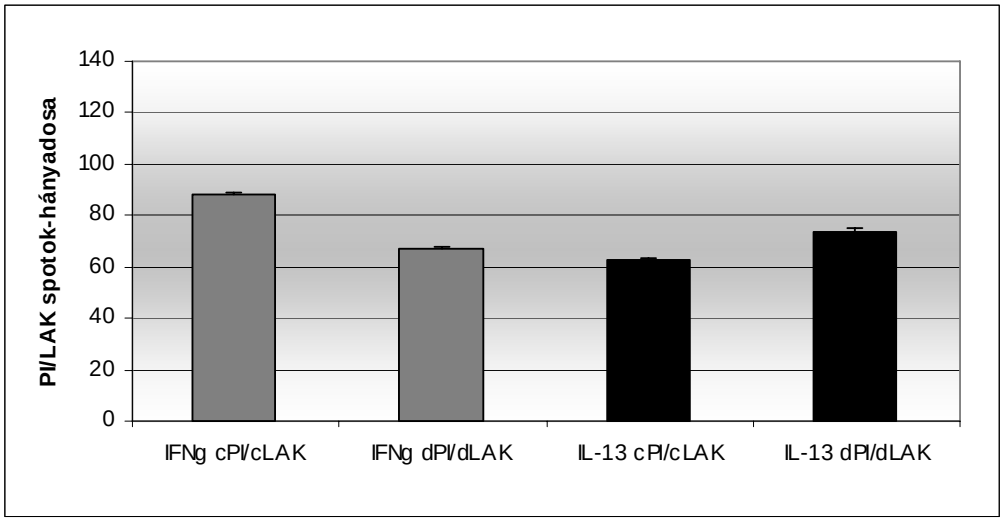
Az összehasonlítást úgy végeztük, hogy az adott csoportban a PI-stimulusra kapott értéket elosztottuk a specifikus stimulusokra adott egyedi értékekkel. Minél nagyobb ez a hányados, annál kisebb a specifikus stimulusra kapott válasz-arány.

Az 10/A ábrán jól látható, hogy az IFN-γ spot-ok arányát nézve - a kontroll és diabeteszes csoport összehasonlítása esetén - a PI/p277 aránya a kontroll csoportban szignifikánsan nagyobb volt, mint a diabeteses csoportban (tehát a p277 stimulusra adott válasz-arány a diabeteszes populációban magasabb). Ugyanakkor az IL-13 spot-ok arányát vizsgálva éppen ellentétes eredményt kaptunk. Ebben az esetben a PI/p277 arány a diabeteses csoportban volt szignifikánsan magasabb, ami arra utal, hogy a p277 a diabeteses betegekben kevésbé volt képes a Th2 típusú sejtek IL-13 citokin termelését stimulálni. Ugyanezt megvizsgáltuk a LAK peptid esetén is. A kontroll és diabeteszes csoportokat összehasonlítva (10/B) nem találtunk szignifikáns különbségeket a PI/LAK hányadosok esetén egyik citokin esetében sem.

10. ábra. A relatív Th1 és Th2 típusú citokin-válaszok összehasonlítása diabéteszes betegekből illetve egészséges kontroll csoportból preparált nyiroksejteken in vitro



A. A PI stimulussal illetve p277-tel kiváltott IFN-γ-válasz hányadosa valamint a PI stimulussal és p277-tel kiváltott IL-13 válasz hányadosa kontroll (c) és diabeteses (d) nyiroksejt-populáción. Az oszlopmagasság fordítottan arányos a p277-re adott immunválasz nagyságával, tehát a diabeteses betegekben a Th1 válasz szignifikánsan nagyobb, a Th2 pedig szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll csoportban.

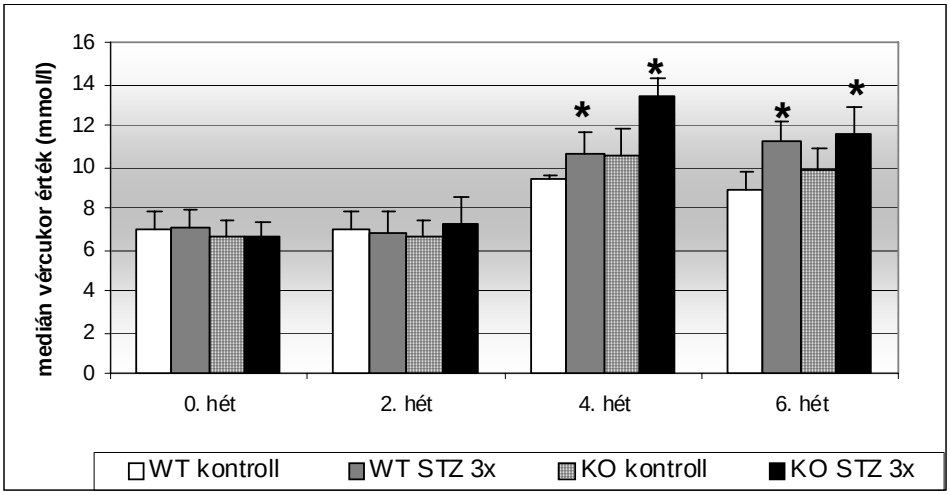


B. A PI stimulussal illetve LAK-peptiddel kiváltott IFN-γ-válasz hányadosa valamint a PI stimulussal és LAK-peptiddel kiváltott IL-13 válasz hányadosa kontroll (c) és diabeteses (d) nyiroksejt-populáción. LAK peptid esetén nem volt szignifikáns különbség a kontroll és diabeteses csoport között.

6.2. HDC-KO és WT egerek immunizációs vizsgálata

6.2.1. Vércukor-szint változás és STZ hatás

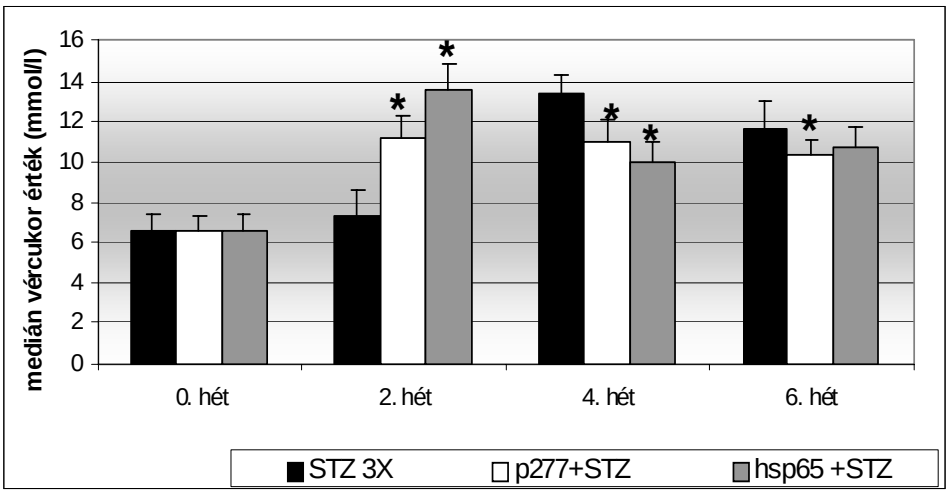
A többszöri kis dózisú STZ szignifikáns vércukor növekedést okozott mind a vad típusú, mind a HDC-KO egerekben a kezelés utáni 4.-ik ($p<0.001$) és 6.-ik ($p<0.05$) héten (11 ábra).



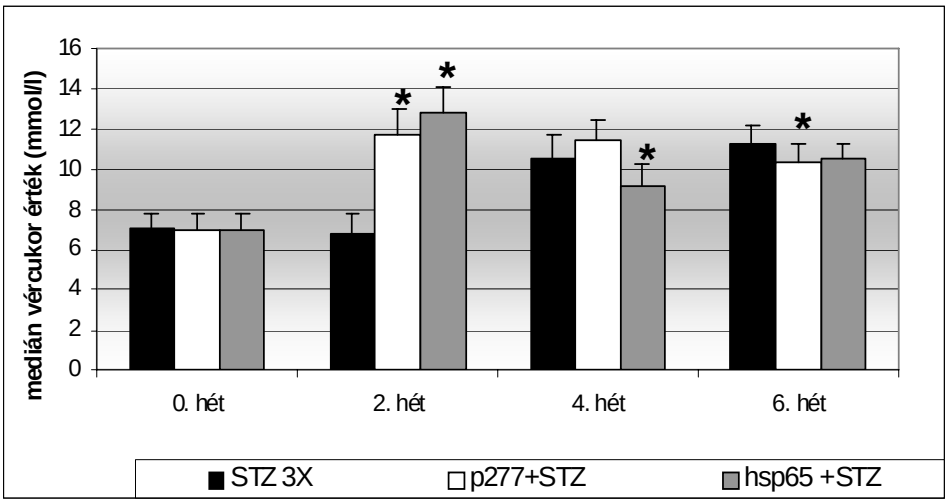
11. ábra. A STZ hatása a HDC-KO és WT egerek vércukor-szintjeire. Az egyes oszlopok a különböző csoportok vércukor értékeinek a mediánját valamint az SD-t jelképezik. A STZ szignifikáns vércukor növekedést okozott a 4.-ik és 6.-ik héten mind a két csoportban (* $p<0,05$).

6.2.2. Immunizálás p277-el és hsp65-el

A p277-el és a hsp65-el történő immunizálás mind a két csoportban befolyásolta a STZ okozta vércukor-szint növekedést. Először mind a két peptid szignifikáns, átmeneti vércukor-szint növekedést okozott a második héten. ($p<0.001$). Ezt követően a HDC-KO csoportban (12. ábra) a p277 kezelés szignifikáns csökkenést okozott a 4.-ik ($p<0.05$) és 6.-ik ($p<0.05$) héten, míg a hsp65 csak a negyedik héten okozott csökkenést ($p<0.05$). A WT csoportokban (13. ábra) a p277-nek a hatodik héten volt protektív hatása ($p<0.05$), míg a hsp65 csupán a negyedik héten okozott vércukor-szint csökkenést ($p<0.05$).



12. ábra. A hsp65 és p277 vakcináció hatása STZ indukálta diabeteses HDC-KO egerek vércukor-szintjeire. Az egyes oszlopok a különböző csoportok vércukor értékeinek a mediánját valamint az SD-t jelképezik. Mind a két peptid szignifikáns, átmeneti vércukor-szint növekedést okozott 2.-ik héten. A p277 szignifikáns csökkenést okozott a 4.-ik és 6.-ik héten, míg a hsp65 csak a 4.-ik héten (* $p<0,05$).



13. ábra. A hsp65 és p277 vakcináció hatása STZ indukálta diabeteses WT egerek vércukor-szintjeire. Az egyes oszlopok a különböző csoportok vércukor értékeinek a mediánját valamint az SD-t jelképezik. Mind a két peptid szignifikáns, átmeneti vércukor-szint növekedést okozott 2.-ik héten. A p277 szignifikáns csökkenést okozott a 6.-ik héten, míg a hsp65 csak a 4.-ik héten (* $p<0,05$).

6.2.3. Antitest szint vizsgálat

Az immunizálás és STZ kezelés következtében létrejövő hsp65, hsp60 és p277 ellenes antitest szinteket a kísérlet végén mértük, ELISA módszerrel.

6.2.3.1. Anti-p277 antitest szint

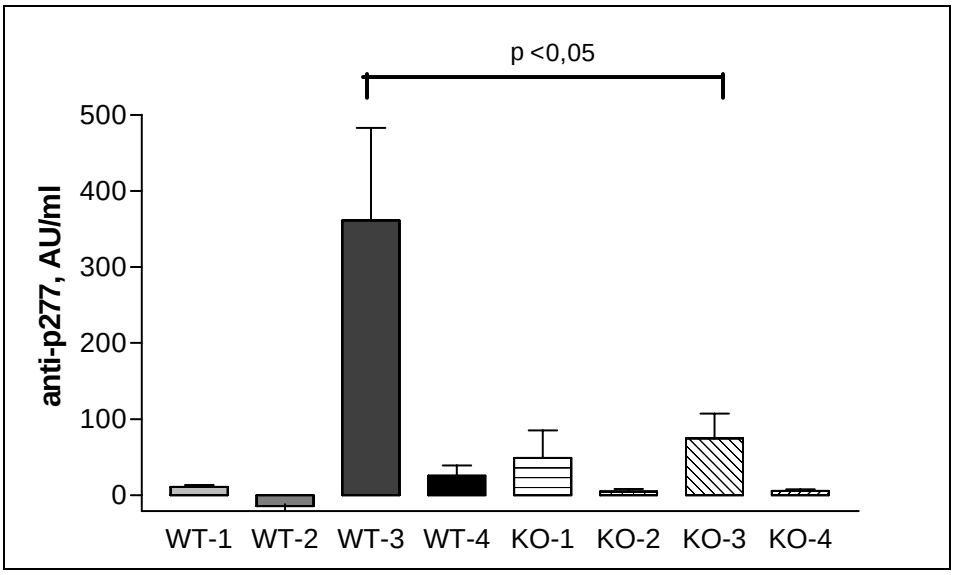
A WT és HDC-KO csoport vizsgálata során csak a p277-el kezelt WT egerekben (WT-3 csoport) találtunk szignifikáns p277-elleni antitest szint növekedést. A többi WT és HDC-KO csoport összehasonlítása során nem volt szignifikáns különbség (14. ábra).

6.2.3.2. Anti-hsp60 antitest szint

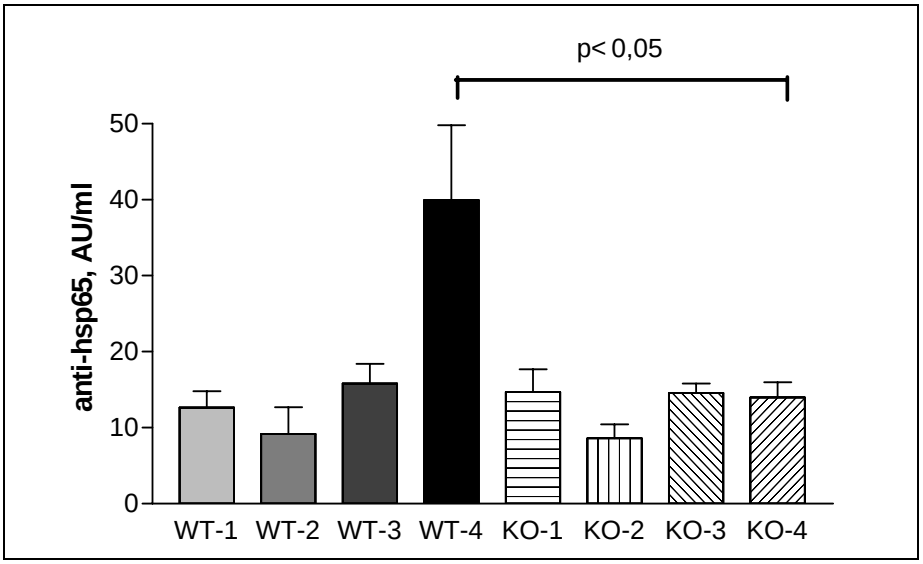
A hsp60 elleni antitest szintben egyik csoportban sem találtunk szignifikáns változást.

6.2.3.3. Anti-hsp65 antitest szint

A hsp65 elleni antitest szint vizsgálata esetén, a WT és HDC-KO csoportok összehasonlításában (az anti-p277 elleni antitest szinthez hasonlóan) csak a p277-el kezelt WT egerekben (WT-4 csoport) találtunk szignifikáns hsp65-elleni antitest szint növekedést. A többi WT és HDC-KO csoport összehasonlítása során itt sem volt szignifikáns különbség (15. ábra).



14. ábra. p277 elleni antitest szint alakulása az egyes kezelt egércsoportokban. Az egyes oszlopok, az ELISA-val mért antitest szintek -AU/ml- mediánját (±SD) jelképezik a különböző csoportokban. A statisztikai analízis szerint a p277-el immunizált WT (WT-3) csoportban szignifikánsan megnőtt az anti-p277 antitest szint, a szintén p277-el kezelt HDC-KO (KO-3) egerekhez képest.



15. ábra. Hsp65 elleni antitest szint alakulása az egyes kezelt egércsoportokban. Az egyes oszlopok, az ELISA-val mért antitest szintek -AU/ml- mediánját (±SD) jelképezik a különböző csoportokban. A statisztikai analízis szerint a hsp65-el immunizált WT (WT-4) csoportban szignifikánsan megnőtt az anti-hsp65 antitest szint, a szintén hsp65-el kezelt HDC-KO (KO-4) egerekhez képest.

6.3. STZ indukált diabeteses patkányok immunizációs vizsgálata

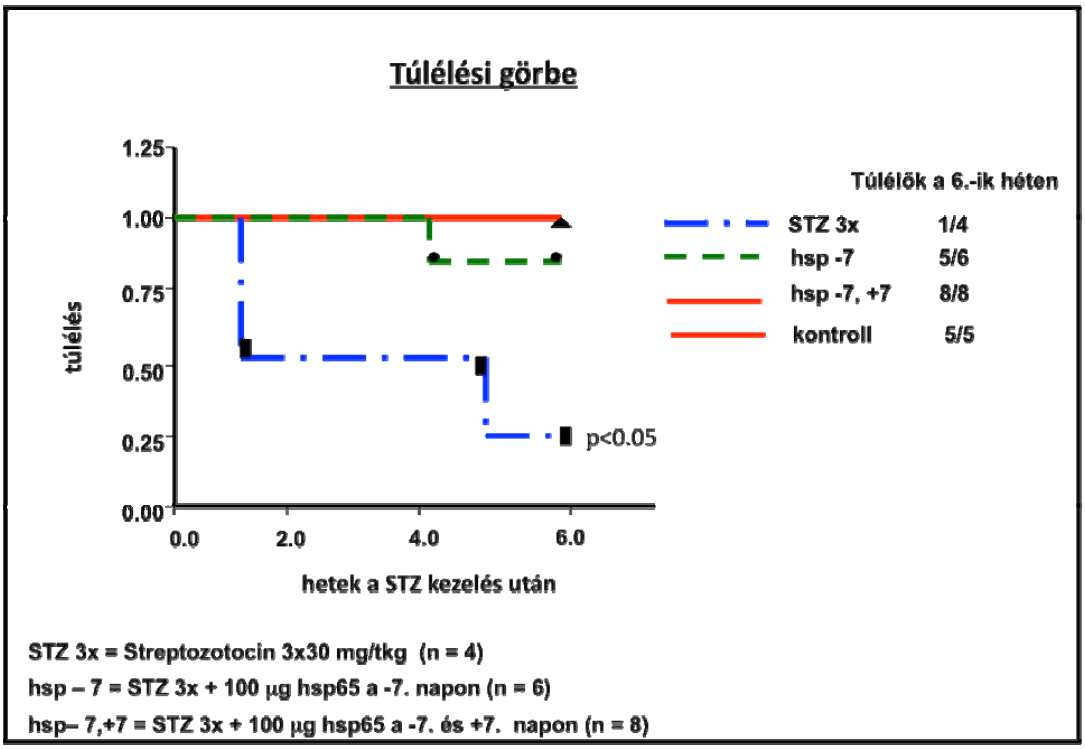
6.3.1. Vércukor és antitest szint változás STZ és immunizálás hatására patkányon

A patkány modellben a STZ hatására szintén megnőtt a vércukor-szint és a kialakult diabetes sokkal jelentősebb volt, mint az egérmodell esetén. Ugyanakkor az immunizálás hatására a korrekciós hatás elmaradt, azaz a hsp65 nem volt képes csökkenteni a vércukor szintet egyik adagolási séma esetében sem (4. táblázat).

4. táblázat. A vércukor értékek alakulása a különböző kísérleti patkánycsoportokban

	R1 median±S.E.M.	R2 median±S.E.M.	R3 median±S.E.M.	R4 median±S.E.M.
0 hét	6.50 ± 0.44	6.50 ± 0.32	7.1 ± 0.39	6,30 ± 0.37
2 hét	6.50 ± 0.44	20,5 ± 0.32	26.80 ± 0.43	27.50 ± 0.76
4 hét	7.25 ± 0.79	25.90 ± 0.53	26.19 ± 0.49	25.20 ± 0.73
6 hét	8.68 ± 0.29	27.30 ± 0.31	26.76 ± 0.46	26.20 ± 0.48

Az immunizálás egyedüli kimutatható protektív hatása az állatok túlélésére vonatkozott. A hsp65-el történő kettős kezelés szignifikánsan ($p<0.05$) megnyújtotta a vizsgált állatok élettartamát. A kétszer kezelt csoport túlélési aránya 100% volt, míg a csak STZ-al kezelt állatok esetén 25%-os volt a túlélés (16. ábra). A vércukor szinthez hasonlóan, a hsp65–eltörténő kezelés után, az antitest szintekben sem találtunk szignifikáns eltérést.



16. ábra. Az egyes kísérleti patkánycsoportok túlélési görbéje. A STZ kezelés előtt és után 7 nappal alkalmazott hsp65-el történő immunizálás szignifikánsan ($p<0.05$) megnyújtotta a diabeteses patkányok életidejét.

6.4. Elektrofiziológiai paraméterek vizsgálata

6.4.1. Elektrofiziológiai paraméterek összehasonlítása kontroll WT és HDC-KO egerekből származó szív-preparátumokon.

A kontroll HDC-KO és WT egerek elektrofiziológiai paramétereit összehasonlítva a HDC-KO csoportban a repolarizáció és a depolarizáció paraméterei egyaránt gátolva voltak. A HDC-KO egerek papilláris izmairól elvezetett akciós potenciál időtartama (APD) szignifikánsan ($p<0.05$) hosszabb volt a 90%-os repolarizáció esetén (APD90), továbbá csökkent a depolarizáció maximális sebessége is (V_{max}) a vad típusú egerekhez képest (17. ábra).

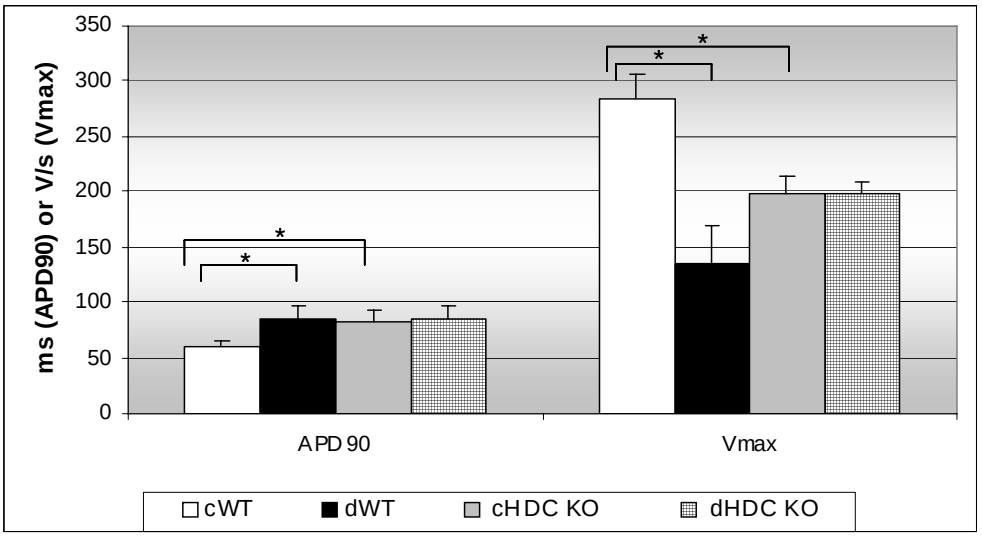
Az akciós potenciál egyéb paraméterei tekintetében nem találtunk további szignifikáns különbséget a két vizsgált csoport között.

6.4.2. A diabetes hatása a WT és HDC-KO egerek elektrofiziológiai paramétereire.

A STZ kezelés után a WT egerekben kialakult a diabetesre jellemző klasszikus repolarizációs és depolarizációs változás (17 ábra). Statisztikailag szignifikáns ($p < 0.05$) APD90 megnyúlást és V_{max} csökkenést detektáltunk a STZ indukálta diabetes hatására. Az akciós potenciál egyéb paraméterei tekintetében nem találtunk további szignifikáns különbséget a két vizsgált csoport között.

A diabeteses HDC-KO egerek akciós potenciáljának a paramétereit vizsgálva nem találtunk semmilyen változást a repolarizáció és a V_{max} tekintetében. A diabeteses HDC-KO egerek APD-je nem nyúlt meg és a V_{max} értékek esetén sem találtunk szignifikáns eltérést a kontrol HDC-KO egerekhez képest (17. ábra).

A diabeteses HDC-KO és WT egereket összehasonlítva nem találtunk szignifikáns eltérést a két csoport elektrofiziológiai paraméterei között.



17. ábra. Kontroll (c) és diabeteses (d) WT és HDC-KO egerek szív papilláris izmának elektrofiziológiai paraméterei. Az oszlopok az egyes csoportokban detektált APD90 és V_{max} értékek mediánját (±SD) jelképezik. STZ hatására a WT egerekben (dWT) az APD szignifikánsan megnyúlt, a V_{max} lecsökkent. A kontroll HDC-KO (cHDC-KO) egerekben a kontroll WT (cWT) egerekhez képest az APD szignifikánsan megnyúlt, a V_{max} pedig lecsökkent. A STZ nem okozott további változást a HDC-KO (dHDC-KO) egerekben a kontroll állatokhoz (cHDC-KO) képest (*$p<0,05$).

7. MEGBESZÉLÉS

Doktori munkám három témakörbe csoportosítható. Az első témakörben, a humán vizsgálatokban, a Th1 és Th2 típusú sejtek szerepét vizsgáltam, illetve ezen sejtek stimulálhatóságát és reakcióképességét a diabetes egyik feltételezett cél-antigénjével a p277-el és a hsp60 egy GAD szerű epitopjával szemben.

7.1. Th1 és Th2 típusú sejtválasz vizsgálatok frissen diagnosztizált 1-es típusú diabeteses betegekben.

A humán kísérleteinkben arra kerestük a válasz, hogy a humán diabetesre is jellemző-e a Th1 sejtes dominancia, illetve eltolódás. Az eddigi irodalmi adatokhoz képest az újdonság az volt, hogy kiterjedt a vizsgálatunk a feltételezett cél-antigénekre is. Azt vizsgáltuk, hogy vajon ezeket az autoreaktív Th1 sejteket milyen antigén aktiválta a diabeteses betegekben és reaktívak-e az általunk a diabetes patomechanizmusában fontosnak tartott cél-antigénre a hsp60-ra illetve epitopjaira.

A kísérleteinkben két hsp60 epitopot vizsgáltunk. Az egyik a már humán immunizálásra is használt hsp60 peptid a p277 (hsp60 AA437-460) volt. Az általunk kiválasztott másik hsp60 peptid az a LAK peptid (hsp60 AA394-408) volt, ami ellen megnövekedett antitest szintet mutattak ki 1TDM-os betegekben és viszonylag nagy homológiát mutat a GAD antigénnel. Ez a GAD antigén szintén feltételezett cél-antigénje a diabetest létrehozó autoimmun folyamatnak.

A p277 stimulálta INF-γ (Th1) és IL-13 (Th2) termelés háttérrel korrigált értékeit vizsgálva a Th2 típusú sejtválasz esetén szignifikáns csökkenést találtunk a diabeteses csoportban, ami jól korrelál az irodalmi adatokkal miszerint a diabeteses betegekben a Th2 típusú citokinek termelése kevésbé indukálható (227, 118, 228). A Th1 típusú immunválasz esetén azonban nem tudtunk szignifikáns növekedést kimutatni. LAK peptid esetén egyik sejtválaszban sem volt szignifikáns különbség a kontroll és diabeteses csoport között ezért a lehetséges cél-antigén szerepét ezzel a vizsgálattal nem tudtuk alátámasztani.

A p277-re és LAK peptidre adott specifikus immunválasz polarizáltságát először a Th1/Th2 immunválasz arányának kiszámításával határoztuk meg. A p277-el történő stimulálás esetén szignifikáns eltolódást észleltünk a Th1 típusú immunválasz irányába a diabeteses csoportban. A LAK peptid estén nem találtunk szignifikáns eltolódást egyik immunválasz irányába sem.

Az eredményeink értelmezésekor egy újszerű viszonyítási rendszer alkalmazásával feltárhatóvá váltak a diabeteses és kontroll csoportok Th1 és Th2 típusú immunválaszaiban jelentkező eltérő tendenciák.

Az egyes antigénekre adott immunválasz polarizáltságát úgy határoztuk meg, hogy a p277 és LAK okozta specifikus stimuláció mértékét összehasonlítottuk a pozitív kontroll PI okozta nem specifikus stimulussal/citokin termeléssel.

A PI stimulusra adott Th1 típusú immunválaszhoz (INF-γ termelés) viszonyított, p277-indukálta válasz magasabbnak bizonyult a diabeteses betegcsoportban, mint egészséges kontrollokon. Ezzel szemben a hasonlóképpen viszonyított Th2 típusú immunválasz (IL-13 termelés) a kontroll csoportban volt magasabb. A LAK-peptiddel szembeni relatív Th1/Th2 típusú immunválaszok nem különböztek szignifikánsan a két populációban.

Ezzel a viszonyítási módszerrel tehát, már nem csak a diabetesre jellemző Th2 típusú immunválasz csökkenését tudtuk kimutatni, hanem a Th1 típusú immunválasz szignifikáns növekedését is.

Az 1TDM autoimmun patomechanizmusával kapcsolatban két kérdés megválaszolásához is közelebb kerültünk. A lehetséges cél-antigénnel illetve a lehetséges immunregulációs zavar jellegével kapcsolatban is válaszokat kaptunk.

Mivel a p277 fokozott Th1 választ indukált a diabeteses betegekben cél-antigénje lehet az diabeteses autoimmun folyamatnak. A LAK peptid esetén ezt nem tudtuk igazolni.

Az immunreguláció zavarával kapcsolatban az eredményeink, miszerint az 1TDM-os betegekben csökkent Th2 és fokozott Th1 típusú immunválaszt detektáltunk tovább erősítették azt a feltételezést, hogy az 1TDM olyan autoimmun betegség, amit az immunreguláció zavara okoz.

7.2.1. A STZ-diabetes modell eltérő technikai sajátságai a különböző kísérleti állatcsoportokban

A második témakörben az első célunk a többszöri kis dózisú STZ indukálta autoimmun diabeteses állatmodellek beállítása volt.

Az egyszeri nagy dózisú STZ direkt citotoxikus hatása miatt diabetest indukál. Többszöri kis dózisban (5x30mg/tkg) azonban a toxin jellegéből fakadóan hsp expressziót indukál a β-sejtek felszínén. Ezzel a hsp expresszióval magyarázható, hogy ez a többszöri kis dózisú STZ autoimmun diabetest okoz. Kísérleteink során az 1TDM, mint autoimmun betegség patomechanizmusát vizsgáltuk, ezért olyan állatmodellekre volt szükségünk, amelyekben az autoimmun diabetes alakul ki.

Mindkét állatmodellünk esetén először a hagyományos többszöri kis dózisú STZ-t (5x30mg/tkg) alkalmaztuk. A kezelés estén magas volt az állatpusztulás ezért a megszokott protokolltól eltérő általunk alkalmazott STZ dózist külön próbakísérletben határoztuk meg.

A patkánykísérletben a 3x30m/tkg STZ volt az a dózis, ami nem okozott nagymértékű állatpusztulást és a szignifikáns vércukor-szint növekedést is kiváltotta.

Ugyanezt a STZ dózist alkalmaztuk aztán a WT és HDC-KO egerek esetében is és arra kerestük a választ, hogy milyen a vad típusú BALB/c és HDC-KO egerek érzékenysége a STZ iránt a széleskörűen vizsgált C57BL/6KsJ állatokhoz képest. A HDC-KO és a WT egerekben csak a 4.-ig hétre alakult ki a szignifikáns vércukor-szint növekedés, holott ez a C57BL/6KsJ állatokban már a második hétre kifejlődött. Ezek szerint megállapítható, hogy az általunk vizsgált WT és HDC-KO egerek bár feltehetően kevésbé érzékenyek a STZ iránt, mint a C57BL/6KsJ egerek, de többszöri kis dózisú STZ adagolásával bennük is kiváltható az autoimmun diabetes.

A STZ-al szembeni csökkent érzékenység, a HDC-KO egerek estében feltételezésünk szerint annak tulajdonítható, hogy kontroll (STZ-al nem kezelt) HDC-KO egerekben is megemelkedett a vércukor-szint a kísérleti periódus alatt. Ennek az lehet a magyarázata, hogy egy korábbi vizsgálat magasabb GAD ellenes antitestet mutattak ki ezekben az

egerekben. A megemelkedett GAD ellenes IgG antitest szint miatt ezek az egerek fokozottan hajlamosak lehetnek az autoimmun diabetes kialakulására (229).

Annak ellenére, hogy a vizsgált egértörzs csökkent érzékenységet mutatott a STZ-al szemben és ezáltal enyhébb formában alakult ki a diabetes, a pankreász szövettani vizsgálata során kimutatató volt a szigetsejtek mononukleáris sejtes infiltrációja illetve a pankreász szigetek közötti méretbeli különbség. A csökkent érzékenység hátterében a hisztidin dekarboxiláz enzim gén és a következményes hisztamin hiánya is állhat, de ez csak további kísérletekkel dönthető el.

7.2.2. A hősokk fehérjével történő immunizálás hatása a STZ indukálta autoimmun diabetesre WT és HDC-KO egerekben illetve patkányokban

Az in vivo immunizációs állatkísérleteinkben az HDC-KO és WT kontroll illetve diabeteses egerekben vizsgáltuk a diabetes új terápiás lehetőségét, a hsp-vel történő immunizálást. Ilyen típusú eljárást HDC-KO egereken még nem alkalmaztak. Mivel kevés a patkánykísérletes irodalmi adat is, így patkányokra is kiterjesztett párhuzamos vizsgálatainkkal nagymértékben hozzájárultunk a korábbi adatok kibővítéséhez.

Az immunizációs kísérleteinket STZ indukálta autoimmun diabeteses egér és patkány modelleken végeztük.

A kísérletben szereplő HDC-KO egerekre az jellemző, hogy hiányzik a szöveteikből az endogén hisztamin. Ez volt az egyik ok amiért, ez az állatmodell felkeltette az érdeklődésünket az immunizációs vizsgálataink során. A hisztaminnak ugyanis számos ponton fontos szerepe van az immunválasz szabályozásában. Befolyásolja az antitest termelést az immunizáció után (230, 231, 232) és szerepe van a Th1/Th2 egyensúly kialakításában is. Gátolja a Th1 sejtek proliferációját, amely sejtek kontrollálják a citotoxikus választ, valamit serkenti a Th2 sejtek proliferációját (233). Mivel gátolja az IL-12 és serkenti a monociták IL-10 termelését a hisztamin olyan körülményeket biztosít, ami Th2 típusú sejtek és citokinek képződésének kedvez (234, 235, 236, 237) 238, 239, 240).

Másik ok, amiért ezeket az állatokat választottuk az volt, hogy korábbi kísérletek GAD ellenes természetes antitesteket mutattak ki a HDC-KO egerekben, ami egy másik fontos lehetséges autoantigén az autoimmun diabetesben (229). Ez arra enged következtetni, hogy ezek az állatok fokozottan érzékenyek lehetnek az autoimmun diabetes kialakulására.

Két különböző 60kDa-os hsp-t használtunk a vakcináció során: a *Mycobacteriális* hsp65-öt és a hsp60 egy epitopját, a humán kísérleteink során már alkalmazott p277-et.

Első lépésként megvizsgáltuk a hsp65 és p277 hatását a kontroll HDC-KO és WT egerekben. Mind a két csoportban szignifikánsan megemelkedett a vércukor-szint a 2.-ik hétre, ami aztán mind a két hsp esetében lecsökkent a 6.-ik hétre. Ugyanez az átmeneti vércukor-szint növekedés kialakult a diabeteses állatok immunizációs vizsgálata során is.

A p277 és hsp65 kezelés hatására bekövetkező átmeneti vércukor növekedés további bizonyíték arra, hogy a hsp-nek fontos szerepe van a diabetes patomechanizmusában, mint cél-antigén és megegyezik a korábbi immunizációs irodalmi adatokkal, ahol szintén kialakult az átmeneti vércukor-szint növekedés (175, 174, 177).

Ezt követően vizsgáltuk az immunizálás hatását a STZ-al diabetesessé tett HDC-KO és WT egerekre. A p277-el és hsp65-el kezelt HDC-KO egerekben egyaránt lecsökkent a vércukor-szint a diabeteses állatokhoz képest, bár a hsp65 vércukorszint csökkentő hatása a hatodik héten már nem volt szignifikáns. Hasonló hatásokat észleltünk a WT egerek esetében is. Mind a két hsp szignifikáns vércukor-szint csökkenést okozott a diabeteses állatokhoz képest.

A két peptid hatékonyságát összehasonlítva azt találtuk, hogy p277 ugyan nem szignifikánsan, de tendencia szinten a hsp65-nél nagyobb mértében csökkentette a diabetes WT és HDC-KO állatok vércukor értékeit.

A HDC-KO kísérleteink során megvizsgáltuk a hsp65-el és p277-el történő immunizálás és STZ kezelés hatását a hsp60-, hsp65- és p277- elleni antitest szintekre.

A p277 elleni antitest szint csak a p277-el immunizált WT egerekben emelkedett meg szignifikánsan. A HDC-KO egerekben nem tudtunk szignifikáns eltérést kimutatni az

immunizálás hatására. Ugyan ezt az eredményt kaptuk a hsp65 elleni antitest szint vizsgálata során. Ebben az esetben is csak a hsp65-el immunizált WT állatokban tudtunk szignifikáns antitest szintnövekedést kimutatni. A többi vizsgálati csoportban nem volt szignifikáns antitest szint növekedés. A hsp60 elleni antitest szintet vizsgálva egyik esetben sem találtunk szignifikáns eltérés. Az immunizálás során észlelt hatékonyságbeli különbség az antitest szintekben is jelentkezett. Az immunválasz (antitest-szint növelő hatás) tekintetében a p277-el történő immunizálás hatékonyabbnak bizonyult, mert nagyobb mértékű antitest növekedést okozott a WT egerekben, mint a hsp65.

Az immunizációs irodalmi adatok szerint (175, 178) az immunizálás következtében az alkalmazott antigénnel szemben magasabb lesz az antitest titer, amit összefüggésbe hoznak az vakcináció hatékonyságával.

Annak ellenére, hogy a WT egerekben az immunizáció hatására bekövetkező vércukor érték csökkenés összefüggésbe hozható a vakcináció hatására bekövetkezett antitest-szint növekedéssel, a HDC-KO egerekben kapott ellentmondásos eredményeink miatt, nem állapíthatunk meg egyértelmű összefüggést a terápiás hatás és a vakcináció hatására bekövetkezett antitest szint változás között.

Az elmaradt antitest szint növekedés a HDC-KO egerek esetén többféleképpen is magyarázható.

Lehetséges, hogy a HDC-KO egerekben a hisztamin hiány miatt károsodott a Th2 típusú immunválasz. Ebben az esetben a Th2 sejtek csökkent működése miatt a humorális immunválasz szabályozásának zavara okozhatja az antitest válasz hiányát.

Annak is megvan a valószínűsége, hogy az immunizálás olyan stimulust jelent az immunrendszer számára, amely az antitest szinttől függetlenül, a Th1/Th2 eltolódás kiváltása mellett, egyéb Treg sejtek aktiválásával hozza létre a terápiás vércukor-szint változást a STZ-al kezelt WT és HDC-KO egerekben.

Ennek a bizonyítása további, spekulatív alapon indított immunizációs vizsgálatokkal lehetséges. Ezekben a kísérletekben az egyéb feltételezett cél-antigénekkel történő immunizálás hatását kellene vizsgálni.

Patkánykísérleteink, melyeket az egérkísérletek előtt mintegy „preliminary” vizsgálatként végeztük, nincsenek kellőképpen összhangban az egérkísérleteink eredményeivel. Ebben az időpontban p277 még nem állt a rendelkezésünkre ezért az immunizálást csak hsp65-el végeztük. Bár a patkánymodellben a STZ az egérmodellhez képest szignifikánsan nagyobb vércukor szintnövekedést okozott, sem a vércukor, sem az antitest szintekben nem találtunk eltérést a diabeteses és a hsp65-el immunizált diabeteses állatok között. Az egyedüli protektív hatás, ami a hsp65-el történő kezelés hatására kialakult az a túlélés megnyúlása volt. A hsp65-el kétszer -STZ kezelés előtt és után 7nappal - kezelt állatok élettartama szignifikánsan megnyúlt és 100% volt a túlélés az immunizálatlan diabeteses állatok 25%-hoz képest.

A doktori munkám második részének egyik új megállapítása tehát az, hogy a HDC-KO egerekben a többszöri kis dózisú STZ képes diabetest indukálni, ami megfelelő cél-antigénnel, azaz p277-el illetve hsp65-el történő immunizálással kedvező irányban befolyásolható.

7.3. WT és HDC-KO egerek jobb kamrai papilláris izmának elektrofiziológiai paraméterei kontroll és diabeteses állatok esetén.

A dolgozatom harmadik része az elektrofiziológiai vizsgálatokra épült. Ebben a kísérletsorozatban a diabetes kardiovaszkuláris szövődményeit vizsgáltuk a WT és HDC-KO egerekben.

Elektrofiziológiai kísérleteinkben egy viszonylag ritkán vizsgált állattörzs paramétereit vizsgáltuk. Az irodalomban egyáltalán nincs adat a HDC-KO egerek elektrofiziológiai paramétereiről és nem vizsgálták még a hisztamin hiánynak az elektrofiziológiai paraméterekre gyakorolt hatását sem. Az előző kísérleteinkhez hasonlóan itt is a STZ indukálta diabetes modellt alkalmaztuk tehát, az állatokban detektált paraméter változások feltehetően a diabetes hatására alakultak ki.

A létező vizsgálatokra támaszkodva tudjuk, hogy az egerek szív elektrofiziológiai paramétereik tekintetében különböznek az egyéb nagyobb testű emlősöktől. Sokkal nagyobb a szívfrekvenciájuk és rövidebb az akció potenciáljuk időtartama.

Az egerek AP-ja abban különbözik a legtöbb emlős (kutya, tengerimalac, sertés) akciós potenciáljától, hogy hiányzik a korai plató fázis (241). A hiány a gyors outward K^+ áramokkal magyarázható (242). Az egér bal kamrai kardiomiociták esetén a teljes outward K^+ áramok több mint 50%-ért a gyors transiens outward áram felelős, ami nagyon rövid APD30 és APD50 értékekhez vezet (243). Az újszülött egerek mind gyorsan inaktiválódó I_{to}, mind nagyon lassan vagy nem-inaktiválódó outward K^+ áramokkal egyaránt rendelkeznek (244) és úgy tűnik, hogy a többi rágcsálóhoz hasonlóan (patkány, hörcsög) a repolarizáció korai fázisáért egérben is leginkább az I_{to} áramok a felelősek (245, 246).

Kísérleteink legnagyobb újdonsága a HDC-KO egerek szív-elektrofiziológiai tulajdonságainak, akciós potenciál paramétereinek meghatározása volt.

A HDC-KO és WT egerek akciós potenciáljainak összehasonlításakor azt találtuk, hogy a kontroll HDC-KO egerek akciós potenciáljának mind a depolarizációs, mind a repolarizációs fázisa gátolt a WT egerekhez képest. A különbség a repolarizáció esetén kifejezettebb volt. Az APD megnyúlása és a V_{max} csökkenése olyan változások, amelyek megegyeznek a diabetesre is jellemző más állatokban kapott akciós potenciál változásokkal (247, 248). Ez az eredmény megerősíti azt a korábbi feltételezésünket, hogy a HDC-KO egerek fokozottan hajlamosak az autoimmun diabetesre.

A STZ vagy alloxán indukálta diabetesben, főleg patkány modellekben, megnyúlik az akciós potenciál időtartama az I_{to} áramok gátlása miatt, illetve csökken a V_{max} is. Az I_{to} csatornák alulműködése vagy csökkent denzitása okozhatja az akciós potenciál időtartamának megnövekedését, különösen a repolarizáció kezdeti szakaszában. Hasonló eredményeket kaptunk mi is a diabeteses WT egerekben. STZ kezelés hatására megnyúlt az akciós potenciál időtartama és lecsökkent a depolarizáció maximális sebessége. Ugyanakkor amíg a diabeteses patkányok akciós potenciál időtartama mind a három repolarizációs szakaszban megnyúlik (APD25, APD50, APD90) (220), addig a HDC-KO egerekben csak a repolarizáció utolsó szakaszában (APD90) észleltünk időtartam magnyúlást.

A repolarizáció végső szakaszának megnyúlása összefüggheet a delayed outward rectifier K^+ csatornák esetleges gátlásával, de a kérdés tisztázásához további elemi ionáram vizsgálatok szükségesek.

Az APD változások mellett, az általunk kimutatott V_{max} csökkenés megegyezik az irodalomban publikált adatokkal és arra utal, hogy a K^+ csatornákon kívül a Na^+ csatornák is változása is bekövetkezhet. Az utóbbi feltevés bizonyításához további elemi ionáram vizsgálatok szükségesek, amely vizsgálatokról azonban az irodalomban alig van adat.

Mivel korábbi kísérleteimben már megállapítottam, hogy a HDC-KO egerek fokozottabban hajlamosak az autoimmun diabetesre, és a STZ hatásával szemben kevésbé érzékenyek, várható volt, hogy a STZ-al kezelt HDC-KO egerek akciós potenciál vizsgálata esetén nem detektáltunk szignifikáns eltérést sem a repolarizáció sem a V_{max} tekintetében a kontroll HDC-KO egerekhez képest.

Röviden összesítve az eredményeinket megállapíthatjuk, hogy a HDC-KO egerekben a szív elektrofiziológiai akciós potenciál paraméter változások - az akciós potenciál időtartamának a megnyúlása, a depolarizáció maximális sebességének a csökkenése - olyan eltérések, amelyek a diabeteses szívre jellemzőek és ebben az esetben STZ indukció nélkül is kialakultak. A kontroll állatokban ezek a paraméterek már eleve a diabeteses paraméterekhez álltak közelebb, ezek után nem volt meglepő, hogy a STZ már nem volt képes további repolarizáció gátlást és V_{max} csökkenést okozni.

A HDC-KO egerekre jellemző eltérő elektrofiziológiai paraméterekre többféle magyarázat is adható.

Magyarázható a jelenség a hisztamin hiányával, illetve a hisztamin hiány esetleges K^+ csatorna módosító hatásával. A másik lehetséges magyarázat szerint, az elektrofiziológiai eltérések annak tudhatók be, hogy ezek az egerek fokozottan hajlamosak az autoimmun diabetesre, ami az irodalomból jól ismert módon létrehozza repolarizációs és V_{max} változásokat. Ennek bizonyítására azonban további direkt ion áram vizsgálatokra van szükség.

Annak ellenére, hogy az elektrofiziológiai eredményeinkre még nem tudunk teljes körű és biztos magyarázatot adni, ezek az eredmények mindenképpen nagy jelentőséggel bírnak, mert mindezidáig ezt az állattörzset elektrofiziológiai módszerekkel még nem vizsgálták. Ha feltételezzük, hogy az elektrofiziológiai változások hátterében nem a hisztamin hiány, hanem a diabetes okozta K^+ csatorna működési zavara áll akkor az elektrofiziológiai adataink is alátámasztják a feltételezésünket, hogy a HDC-KO egerek fokozottabban hajlamosak az autoimmun diabetesre.

Ez a megállapítás a humán eredményeink szempontjából is nagy jelentőséggel bír. Azokban az eredményekben ugyanis megállapítottuk, hogy az 1-es típusú diabeteses betegeknek alacsonyabb volt a Th2 típusú sejtaktivitása, és ez a regulációs zavar vezethet az autoimmun diabetes kialakulásához. A hisztaminról ugyanakkor tudjuk, hogy fontos a Th2 sejtek működéséhez. Ha tehát hiányzik a hisztamin, a Th2 típusú sejtválasz károsodik és ezért az egerekben is kialakul az autoimmun folyamat. További bizonyítékunk lehet tehát a Th2 sejtes reguláció jelentős szerepére az autoimmun folyamatok kialakulásában.

8. KÖVETKEZTETÉSEK

- A diabeteses betegekben a Th2 típusú limfociták IL-13 termeléssel jellemzett aktivitása szignifikánsan lecsökkent.
- A betegek p277-re adott immunválasza szignifikánsan eltolódott a Th2 sejtes immunválasz irányából a Th1 típusú immunválasz irányába.
- A p277 és hsp65 kezelés hatására átmeneti vércukorszint növekedés következet be a HDC-KO és WT egerekben, ami tovább erősíti a hsp-k esetleges fontos szerepét diabetes patomechanizmusában.
- A hsp65-el és a p277-el történő immunizálás egyaránt lecsökkentette a vércukor szintet a STZ-al diabetesessé tett HDC-KO és WT egerekben.
- A p277 és hsp65 elleni antitest szint csak a WT egerekben emelkedett meg szignifikánsan. A HDC-KO egerekben nem tudtunk szignifikáns eltérést kimutatni az immunizálás hatására.
- Nem állapítható meg egyértelmű összefüggést a terápiás hatás és a vakcináció hatására bekövetkezett antitestszint változás között. Az immunizálás tehát nem feltétlenül az antitestszint változáson keresztül, hanem más mechanizmussal (egyéb Treg sejtek aktiválása) hozza létre a terápiás vércukorszint
- A patkány kísérleteink esetében a STZ szignifikánsabb vércukor szintnövekedést okozott, de a hsp65-el történő kezelés nem csökkentette a vércukor szintet. Az egyedüli protektív hatás az volt, hogy a kezelt állatok élettartama szignifikánsan megnőtt a kezeletlen állatokhoz képest.
- A nem-diabeteses HDC-KO egerekben, a diabeteses WT egerekhez hasonlóan, szignifikánsan megnyúlt az akciós potenciál időtartama és csökkent a depolarizáció maximális sebessége. A diabetes hatására a KO egerekben nem volt további APD és V_{max} változás.

9. ÖSSZEFOGLALÁS

Az 1-es típusú diabetes mellitus (1TDM) olyan autoimmun betegségnek tekinthető, amelyet a β-sejtek T-sejt mediálta destrukciója okoz. A T-sejteknek feltételezett cél-antigénjei között szerepel a humán hsp60 és epitopjai a p277 és LAK. Egyes elképzelések szerint a hsp-k elleni immunválasz a természetes autoimmunitás részének tekinthető és a természetes autoimmunitást szabályozó regulátoros sejtek működésének zavara illetve a Th1/Th2 sejtválasz eltolódása vezethet az autoimmun folyamathoz. Ha elfogadjuk ezt az elméletet, akkor az 1TDM terápiájának egyik útja a specifikus immunizálás lehet az autoimmun folyamat lehetséges cél-antigénjével, pl. a hsp-vel. A diabetesszel kapcsolatban nem szabad megfeledkezni a súlyos kardiovaszkuláris szövődményekről sem. 1TDM-ban a legjelentősebb elektrofiziológiai változást és problémát a QT intervallum megnyúlása jelenti. Streptozotocin (STZ) indukálta diabeteses patkány illetve egérmodellben az akciós potenciál időtartama (APD) szignifikánsan megnyúlt a depolarizáció maximális sebessége (Vmax) pedig szignifikánsan csökkent.

In vitro humán vizsgálataim célja a frissen diagnosztizált 1TDM-os betegek immunregulációs zavarának a feltárása volt. A feltételezett cél-antigénekkel történő stimuláció után vizsgáltam a Th1/Th2 sejtválasz eltolódását. In vivo állatkísérleteim során a hsp-vel történő immunizálás terápiás hatását vizsgáltam STZ-al diabetesessé tett HDC-KO és WT egereken illetve patkányokon. Elektrofiziológiai kísérleteim célja a kontroll és diabeteses HDC-KO egérszív akciós potenciáljának és diabetes hatására bekövetkezett változásának a vizsgálata volt.

A diabeteses betegekben a p277-re adott Th2 típusú immunválasz szignifikánsan alacsonyabb volt, a relatív Th1 típusú immunválasz pedig szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontroll csoportban. A LAK peptid esetén ez nem volt kimutatható. Megállapítható tehát, hogy a p277 cél-antigénje lehet az diabeteses autoimmun folyamatnak. Az immunválasz Th1 irányú eltolódása pedig tovább erősíti azt a teóriát, miszerint az autoimmun 1TDM-t az immunreguláció zavara okozza.

A WT és HDC-KO egerekkel végzett immunizációs kísérleteink eredményei alapján megállapítható, hogy a hsp-vel történő immunizálás képes mérsékelni a diabetes

kialakulását, tehát újszerű terápiát jelenthet az 1TDM kezelésében. A hsp65 ugyan a vércukor szinteket nem csökkentette, de szignifikánsan megnyújtotta a diabeteses patkányok életidejét.

Az elektorfiziológiai eredményeink alapján megállapítható, hogy az egészséges HDC-KO egerekben, a diabeteses WT egerekhez hasonlóan, szignifikánsan megnyúlt az APD és csökkent a Vmax. A diabetes (STZ) hatására a KO egerekben nem volt további APD és Vmax változás. A kontroll HDC-KO és WT egerek elektrofiziológiai paraméterei között jelentkező különbség oka az lehet, hogy a HDC-KO egerek eleve hajlamosak az autoimmun diabetesre.

10. SUMMARY

T1 diabetes mellitus is (T1DM) considered as an immune mediated disease where the β-cells are destroyed by T –cells. Among the possible targets in the autoimmune process are 60 kD heat shock proteins (hsp60) and hsp epitopes p277 and LAK peptide. The immune response to hsps is considered as a functional constituent of natural autoimmunity controlled by the regulatory T cells. The decreased activity of these regulatory T cells and a shift in the physiological Th1/Th2 immune balance-can lead T –cell mediated autoimmune destruction of β-cells. If we accept this theory, a possible way of the T1DM treatment may be the specific immunization with hsp, as one of the possible target antigens of the autoimmune process. Patients with T1DM exhibit a high incidence of diabetic cardiomyopathy. The most prominent electrical alteration is the prolongation of the repolarisation (QT interval). In STZ induced diabetic rat and mice models the APD has been found significantly prolonged and the Vmax significantly decreased.

The aim of my human experiments was to analyze the nature of immune regulation disorder. Therefore I determined the shift in Th1/Th2 immune response characterized in terms of cytokine production upon stimulation with presumed target antigens (p277, LAK). The aim of in vivo experiment was to examine the effects of immunisation with heat shock proteins on STZ induced diabetic WT/HDC-KO mice and rats. The novelty of my electrophysiological experiments was the characterization of changes of cardiac action potential in HDC-KO mice as compared to the heart parameters of WT animals. Furthermore the STZ diabetes-induced alterations in cardiovascular electrophysiological functions were also compared in WT and HDC-KO mice, respectively.

In type 1 diabetic patients the p277 induced Th1 response was significantly higher, meanwhile Th2 was lower as compared to healthy controls. Therefore, this peptide may be considered as a target-antigen of the autoimmune diabetic process. The significant shift toward Th1 immune response can be taken as a further support to the theory that T1DM is an autoimmune disease caused by the disorder of immune regulation. The results obtained in the experiments with WT/HDC-KO mice immunized with the purported target antigens hsp65 and p277 indicated that immunization can moderate the development of multiple low dose of STZ induced autoimmune diabetes. Therefore

vaccination may be regarded as a potential novel treatment mode in T1DM. In rat experiments treatment with hsp65 failed to prevent the development of the diabetes but prolonged the survival of animals. Based on the electrophysiological measurements it can be concluded that the action potential alterations (prolonged APD, decreased Vmax) detected in control HDC-KO mice are very similar to the changes found in STZ induced diabetic WT animals. It may also have a well-defined, still not yet clarified reason why STZ treatment failed to cause any further significant changes in the APD and Vmax in HDC-KO mice. The differences in the STZ treatment-related alterations of AP parameters (APD, Vmax) in HDC-KO and WT animals might be attributed to the increased susceptibility of HDC-KO mice to autoimmune diabetes.

11. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Frissen diagnosztizált 1TDM-os betegekből illetve egészséges kontrollokból nyert T limfocita-preparátumon specifikus antigén stimulusok in vitro alkalmazásával illetve referens stimulusokkal történő viszonyításával meggyőzően ki tudtam mutatni a Th1 (pro-inflammatorikus) és Th2 (anti-inflammatorikus) limfocita válasz egyensúlyának eltolódását a Th1 irányba a beteg populációban. Az immunválasz Th1 irányú eltolódásának a kimutatásával sikerült újabb bizonyítékot találnom az autoimmun 1TDM immunregulációs zavara teóriájára.
2. Ugyanazon lehetséges cél-antigén (hsp60) két különböző epitopjával (p277, LAK) szemben differenciált citokin-választ tudtam kimutatni. Mivel a p277 fokozott Th1- és csökkent Th2-választ indukált, eredményeim alapján cél-antigénje lehet az diabeteses autoimmun folyamatnak.
3. A kísérletesen jól alkalmazható, és az autoimmun mechanizmust jól modellező streptozotocin kezelési protokollt állítottam be az autoimmun diabetes indukciójára egy kísérletesen ritkábban alkalmazott természetes egértörzsön, valamint az újdonságnak számító HDC-KO egereken.
4. Az 1TDM újszerű terápiájának számító cél-antigénnel történő immunizáció hatását egy eddig ezen a téren még nem vizsgált HDC-KO egereken is vizsgáltam.
5. Immunizációs eredményeim alapján felvetődött, hogy nem feltétlenül az immunizációt követő antitest-szint növekedésessel van összefüggésben a vakcináció vércukor-szint csökkentő hatása. Lehetséges, hogy a vakcináció a diabetes patomechanizmusának hátterében álló T sejt regulációs zavart valamely más mechanizmus útján is rendezheti.
6. A WT és HDC-KO egereken végzett immunizációs kísérleteim eredményei alapján is megállapítható, hogy a hsp-vel történő immunizálás képes mérsékelni a diabetes kialakulását, tehát egy újszerű terápiát jelenthet az 1TDM kezelésében.
7. Doktori munkám újdonságának számít a HDC-KO egerek izolált szívpreparátumainak elektrofiziológiai vizsgálata és összehasonlítása a WT egerek paramétereivel.
8. Megállapítottam továbbá, hogy a HDC-KO egerek izolált szívpreparátumain mért kóros akciós potenciál-változások azonos irányúak, mint a vad egértörzsön STZ

indukálta diabetes esetén. A HDC-KO egerekben mért változások mértéke nem fokozható tovább a STZ kezeléssel.

12. IRODALOMJEGYZÉK

(1) Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É. (2007) Az immunológia alapjai, Semmelweis kiadó (Budapest), 3-11 old.

(2) Szegedi Gy. (2003) A patológiás autoimmunitásról mint az immunológia igazi kihívójáról. Magyar Tudomány, 4: 497-498.

(3) Husz S, Kiss M, Molnár K. (1996) Autoimmun betegségek. Háziorvos Továbbképző Szemle, 1: 373-374.

(4) Munk ME, Schoel B, Modrow S, Karr RW. Young RA, Kaufmann SHE. (1989) T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. J Immunol, 143: 2844-2849.

(5) Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoba A, Malanchére E, Coutinho A, Kazatchkine MD. (1998) Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. J Immunol Methods, 216: 117-137.

(6) Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. (1995) Natural antobodies. Curr Opinion in Immunology, 7: 812-818.

(7) Cohen IR, Young DB. (1991) Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. Immunol Today, 12: 105-110.

(8) Cohen IR. (1993) The meaning of the immunological homunculus. Isr J Med Sci, 29: 173-174.

(9) Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É. (2007) Az immunológia alapjai, Semmelweis kiadó (Budapest), 170-176 old.

(10) Duan B, Morel L. (2006) Role of B-1a cells in autoimmunity. Autoimmun Rev, 5: 403-408.

(11) Cohen IR. (2002) Peptide therapy for Type I diabetes: the immunological homunculus and the rationale for vaccination. Diabetologia, 45: 1468–1474.

(12) Cohen IR. (1991) The Immunological homunculus and autoimmune disease. Molecular autoimmunity, 437-453.

(13) Poletaev AB. (2002) The Immunological Homunculus (Immunculus) in Normal State and Pathology. Biochemistry, 67: 600-608.

(14) Gupta RS. (1995) Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. Mol. Microbiol, 15: 1-11.

(15) Jindal S, Dudani AK, Singh B, Harley CB, Gupta RS. (1989) Primary structure of a human mitochondrial protein homologous to the bacterial and plant chaperonines and to the 65-kilodalton mycobacterial antigen. Mol. Cell. Biol, 9: 2279-2289.

(16) Schlesinger, MJ. (1990) Heat shock proteins. The Journal of Biological Chemistry, 265: 12111–12114.

(17) Wand-Württenberger AB, Schoel J, Ivanyi S, Kaufmann HE. (1991) Surface expression by mononuclear phagocytes of an epitope shared with mycobacterial heat shock protein 60. Eur. J. Immunol, 21: 1089-1092.

(18) Soltys BJ, Gupta RS. (1997) Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. Cell Biol Int, 21: 315-320.

(19) Kocsis J, Füst Gy, Prohászka Z. (2003) A 70 kDa-os hősokkfehérje molekuláris biológiája és egyes immunológiai folyamatokban játszott szerepe. Magyar Immunol/Hun Immunol, 2: 5-15.

(20) Becker J, Craig EA. (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. Eur. J. Biochem, 219: 11-23.

(21) Ellis RJ, van der Vies SM. (1991) Molecular chaperones. Annu. Rev. Biochem, 60: 321-347.

(22) Ranford JC, Coates ARM, Henderson B. (2000) Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. Expert Reviews in Molecular Medicine, 8: 1-17.

(23) Hartl FU. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature, 381: 571-580.

(24) Feder ME, Hofmann GE. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu Rev Physiol, 61: 243-282.

(25) Bukau B, Horwich AL. (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell, 92: 351-366.

(26) Csermely P. (1997) Proteins, RNAs and chaperones in enzyme evolutiori: a folding perspective. Trends in Biochem. Sci, 22: 147-149.

(27) Csermely P. (2001) Stresszfehérjék. Tudomány-Egyetem sorozat, Budapest, Vince kiadó.

(28) Schnaider T, Somogyi J, Csermely P, Szamel M. (2000) The Hsp90-specific inhibitor, geldanamycin, selectively disrupts kinase-mediated signalling events of T lymphocyte activation. Cell Stress and Chaperones 5, 52-61.

(29) Csermely P, Schnaider T, Sőti Cs, Prohászka Z, Nardai G. (1998) The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function and clinical applications. A comprehensive review. Pharmacology and Therapeutics, 79: 129-168.

(30) Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S. (2000) Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. EMBO J, 19: 4310-4322.

(31) Nardai G, Sass B, Eber J, Orosz Gy, Csermely P. (2000) Reactive cysteines of the 90 kDa heat shock protein, Hsp90. Arch. Biochem. Biophys, 384: 59-67.

(32) Kaufmann SHE. (1990) Heat shock proteins and the immune response. Immunology Today, 1: 129-136.

(33) Srivastava P. (2002) Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. Nature Reviews Immunology, 2: 185-194.

(34) Ranford JC, Coates AR, Henderson B. (2000) Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones. Expert Rev Mol Med, 15: 1-17.

(35) Handley HH, Yu J, Yu DTY, Singh B, Gupta RS, Vaughan JH. (1996) Autoantibodies to human heat shock protein (hsp)60 may be induced by Escherichia coli groEL. Clin Exp Immunol, 103: 429–435.

(36) Gaur LK, Peeling RW, heang M, Kimani J, Bwayo J, Plummer F, Brunham RC. (1999) Association of Chlamydia trachomatis heat-shock protein 60 antibody and HLA Class II DQ Alleles. J of Infectious Diseases, 180: 234–237.

(37) Füst Gy, Prohászka Z, Cervenak L. (2003) A hõsokkfehérjék immunológiai tulajdonságai és szerepük az érelmeszesedés keletkezésében. Magyar Tudomány, 4: 430-439.

(38) Prechl Józse, Prohászka Z, Füst Gy. (2003) A hősokkfehérjék és a természetes immunitás sokrétű kapcsolata. Magyar Immunol/Hun Immunol, 2: 25-32.

(39) Prohászka Z, Singh M, Nagy K, Kiss E, Lakos G, Duba J, Füst G. (2002) Heat shock protein 70 is a potent activator of the human complement system. Cell Stress Chaperones, 7: 17-22.

(40) Prohászka Z, Duba J, Lakos G, Kiss E, Varga L, Jánoskuti L, Császár A, Karádi I, Nagy K, Singh M, Romics L, Füst G. (1999) Antibodies against human heat-shock protein (hsp) 60 and mycobacterial hsp65 differ in their antigen specificity and complement-activating ability. Int Immunol, 11: 1363-1370.

(41) Janetzki S, Blachere NE, Srivastava PK. (1998) Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and memory T cells by immunization with tumor-derived heat shock protein gp96. J Immunother, 21: 269-276.

(42) Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, Gastpar R, Issels RD. (2002) Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. International Journal of Hyperthermia, 18: 563-575.

(43) Verdegaal ME, Zegveld ST, van Furth R. (1996) Heat shock protein 65 induces CD62e, CD106, and CD54 on cultured human endothelial cells and increases their adhesiveness for monocytes and granulocytes. J. Immunol, 157: 369-376.

(44) Galdiero M, DeLEro GC, Marcatili A. (1997) Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins. Infect. Immun, 65: 699-707.

(45) Friedland JS, Shattock R, Remake DG, Griffin E. (1993). Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. Clin. Exp. Immunol, 91:58-65.

(46) Peetermans WE, Raats CJ, van Furth R, Langermans JA. (1995) Mycobacterial 65-kilodalton heat shock protein induces tumor necrosis factor a, interleukin 6, reactive nitrogen intermediates, and toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages. Infect. Immun, 63: 3454 -3458.

(47) Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. (1999) Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. J Clin Invest, 103: 571–577.

(48) Retzlaff C, Yamamoto Y, Hoffman PS, Friedman H, Klein TS. (1994) Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. Infect. Immun, 62: 5689-5693.

(49) Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. (1999) Human 60-kDa Heat-Shock Protein: A Danger Signal to the Innate Immune System. The Journal of Immunology, 162: 3212-3219.

(50) Kaufmann SHE. (1990) Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today, 11: 129-136.

(51) Res P, Thole J, de Vries R. (1991) Heat-shock proteins and autoimmunity in humans. Springer Semin. Immunopathol, 13: 81-98.

(52) Nomoto K, Yoshikai Y. (1991) Heat-shock proteins and immunopathology: regulatory role of heat-shock protein-specific T cells. Springer Semin. Immunopathol, 13: 63-80.

(53) Feige U, Cohen IR. (1991) The 65-kDa heat-shock protein in the pathogenesis, prevention and therapy of autoimmune arthritis and diabetes mellitus in rats and mice. Springer Semin. Immunopathol, 13: 99-113.

(54) De Graeff-Medder ER, Van der Zee R, Rijkers GT, Shuurman HJ, Kuis W, Bijslma JWJ, Zegers BJM, van Eden W. (1991) Recognition of human 60 kD heat shock protein by mononuclear cells from patients with juvenile chronic arthritis. Lancet, 337: 1368-1372.

(55) Danieli MG, Markovits D, Gabrielli A, Corvetta A, Giorgi PL, Van der Zee R, Van Embden DJ, Danieli G, Cohen IR. (1992) Juvenile rheumatoid arthritis patients manifest immune reactivity to the mycobacterial 65-kDa heat shock protein, to its 180-188 peptide, and to a partially homologous peptide of the proteoglycan link protein. Clin Immunol Immunpathol, 64: 121-128.

(56) Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, Stulning T, Luef G, Wick G. (1993) Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. Lancet, 341: 255-259.

(57) Panachapakesan J, Daglis M, Gatenby P. (1992) Antibodies to 65 kDa and 70 kDa heat shock proteins in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Immunol Cell Biol, 70. 295-300.

(58) Tun RYM, Smith MD, Lo SSS, Rook GAW, Lydyard P, Leslie RDG. (1994) Antibodies to heat shock protein 65 kD in type 1 diabetes mellitus. Diabetic Medicine, 11: 66-70.

(59) Kilidireas K, Latov N, Strauss DH, Gorig AD, Hashim GA, Gorman JM, Sadiq SA. (1992) Antibodies to the human 60 kDa heat-shock protein in patients with schizophrenia. Lancet, 340: 569-572.

(60) Georgopoulos C, McFarland H. (1993) Heat shock proteins in multiple sclerosis and other autoimmune diseases. Immun Today, 14:373-375.

(61) Horváth L, Czirják L, Fekete B, Jakab L, Prohászka Z, Cervenak L, Romics L, Singh M, Daha MR, Füst G. (2001) Levels of antibodies against C1q and 60 kD familiy of heat-shock proteins in the sera of patients with various autoimmune diseases. Immunology Letters, 75: 103-109.

(62) van Eden W, Hogervorst EJM, van der Zee R, van Embden JDA, Hensen EJ, Cohen IR. (2004) The mycobacterial 65 kD heat-shock protein and autoimmune arthritis. Rheumatology International, 9: 187-191.

(63) Wick G, Krömer G, Neu N, Fässler R, Ziemiecki A, Müller RG, Ginzel M, Béládi I, Kühr T, Hála K. (1987) The multi-factorial pathogenesis of autoimmune disease. Immunol. Lett, 16: 249-257.

(64) Kaufman SHE. (1994) Heat Shock Proteins and Autoimmunity: A Critical Appraisal. Int Arch Allergy Immunol,103: 317-322.

(65) Ausiello CM, Fedele G, Palazzo R, Spensieri F, Ciervo A, Cassone A. (2006) 60-kDa heat shock protein of Chlamydia pneumoniae promotes a T helper type 1 immune response through IL-12/IL-23 production in monocyte-derived dendritic cells. Microbes and Infection, 8: 714-720.

(66) Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Colombo MP, Stoppacciaro A, Vile RG. (1999) Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. J Immunol, 163: 1398-1408.

(67) Qingbo Xu (2002) Role of Heat Shock Proteins in Atherosclerosis Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol, 22: 1547-1559.

(68) Ross R. (1999) Atherosclerosis-An Inflammatory Disease N Engl J Med, 340: 115-126.

(69) Libby P, Ridker PM, Maseri A. (2002) Inflammation and atherosclerosis. Circulation, 105: 1135–1143.

(70) Hansson GK. (2001) Immune mechanisms in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 21: 1876–1890.

(71) Xu Q, Wick G. (1996) The role of heat shock proteins in protection and pathophysiology of the arterial wall. Mol Med Today, 2: 372–379.

(72) Benjamin IJ, McMillan DR. (1998) Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. Circ Res, 83: 117–132.

(73) Pockley AG. (2002) Heat shock proteins, inflammation, and cardiovascular disease. Circulation, 105: 1012–1017.

(74) Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechl S, Stulnig T, Luef G, Wick G (1993) Association of serum antibodies to heat-shock protein 65 with carotid atherosclerosis. Lancet, 341: 255-259.

(75) Hoppichler F, Koch T, Dzien A, Gschwandtner G, Lechleitner M. (2000) Prognostic Value of Antibody Titre to Heat-Shock Protein 65 on Cardiovascular Events. Cardiology 94: 220-223.

(76) Prohaszka Z, Duba J, Horvath L, Csaszar A, Karadi I, Szebeni A, Singh M, Fekete B, Romics L, Fust G. (2001) Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat shock proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects. Eur J Clin Invest, 31: 285-292.

(77) Zhu JH, Quyyumi AA, Rott D, Csako G, Wu HS, Halcox J, Epstein SE. (2001) Antibodies to Human Heat-Shock Protein 60 Are Associated with the Presence and Severity of Coronary Artery Disease: Evidence for an Autoimmune Component of Atherogenesis. Circulation, 103: 1071-1075.

(78) Hosszúfalusi N, Vatay A, Rajczy K, Prohászka Z, Pozsonyi E, Horváth L, Grosz A, Gerõ L, Madácsy L, Romics L, Karádi I, Füst G, Pánczél P. (2003) Similar genetic features and different islet cell autoantibody pattern of latent autoimmune diabetes in adults (LADA) compared with adult-onset type 1 diabetes with rapid progression. Diabetes Care, 26: 452-457.

(79) Bach JF. (1986) Insulin-Dependent Diabetes Mellitus as an Autoimmune Disease. N Engl J Med, 314: 1360-1368.

(80) Eisenbarth GS. (1986) Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. N Engl J Med, 314: 1360–1368.

(81) Gepts W. (1965) Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. Diabetes, 14: 619-633.

(82) Bottazzo GF, Dean BM, McNally JM, MacKay EH, Swift PG, Gamble DR. (1985) In situ characterization of autoimmune phenomena and expression of HLA molecules in the pancreas in diabetic insulitis. N Engl J Med, 313: 353-360.

(83) Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA, Keymeulen B, Pipeleers D, Drijfhout JW, Roep BO.(2005) Autoreactive CD8 T cells associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. Proc Natl Acad Sci, 102: 18425-1830.

(84) Sibley RK, Sutherland DE, Goetz F, Michael AF.(1985) Recurrent diabetes mellitus in the pancreas iso- and allograft. A light and electron microscopic and immunohistochemical analysis of four cases. Lab Invest, 53: 132-144.

(85) Lampeter EF, Homberg M, Quabeck K, Schaefer UW, Wernet P, Bertrams J, Grosse-Wilde H, Gries FA, Kolb H. (1993) Transfer of insulin-dependent diabetes between HLA-identical siblings by bone marrow transplantation. Lancet, 341: 1243-1244.

(86) Atkinson MA, Maclaren NK. (1994) The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med, 331: 1428-1436.

(87) Dahlquist G. (1998) The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective. Acta Paetriatr Suppl, 425: 5–10.

(88) Halmos T. (2000) A cukorbetegség tünetegyüttese. Természet Világa, I. különszám (internet)

(89) Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. (1981) Diabetes in identical twins. Diabetologia, 20: 87-93.

(90) Cudworth AG, Wolf E. The genetic susceptibility to Type I (insulin dependent) diabetes mellitus. (1983) Current problems in clinical biochemistry, 12: 45-64.

(91) Bottazzo GF and Bonifacio E. (1991) Immune factors in the pathogenesis of Insulin-dependent diabetes mellitus. Textbook of Diabetes (Pickup J and Williams G eds) pp 122-140, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

(92) Yoon JW, Austin M, Onodera T, Notkins AL. (1979) Virus induced diabetes mellitus. Isolation of a virus from the pancreas of a child with diabetic ketoacidosis. New Engl J Med, 300: 1173-1179.

(93) Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Hermann R, Soltesz G, Füchtenbusch M, Ziegler AG, Kondrashova A, Romanov A, Kaplan B, Laron Z, Koskela P, Vesikari T, Huhtala H, Knip M, Hyöty H. (2005) Relationship between the incidence of type 1 diabetes and maternal enterovirus antibodies: time trends and geographical variation. Diabetologia, 48: 1280-1287.

(94) Oberley LW. (1998) Free radicals and diabetes. Free Radic Biol Med, 5: 113-124.

(95) Miller BJ, Appel MC, O'Neil JJ, Wicker LS. (1988) Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice. J Immunol, 140: 52-58.

(96) Ejrnaes M, Videbaek N, Christen U, Cooke A, Michelsen BK, von Herrath M. (2005) Different diabetogenic potential of autoaggressive CD8+ clones associated with IFN-gamma-inducible protein 10 (CXC chemokine ligand 10) production but not cytokine expression, cytolytic activity, or homing characteristics. J Immunol, 174: 2746-2755.

(97) Moore A, Grimm J, Han B, Santamaria P. (2004) Tracking the recruitment of diabetogenic CD8+ T-cells to the pancreas in real time. Diabetes, 53: 1459-1466.

(98) Pinkse GG, Tysma OH, Bergen CA, Kester MG, Ossendorp F, van Veelen PA, Keymeulen B, Pipeleers D, Drijfhout JW, Roep BO. (2005) Autoreactive CD8 T cells

associated with beta cell destruction in type 1 diabetes. Proc Natl Acad Sci USA, 102: 18425-18430.

(99) Peterson JD & Haskins K. (1996) Transfer of diabetes in the NOD-scid mouse by CD4 T-cell clones. Differential requirement for CD8 T-cells. Diabetes, 45: 328-336.

(100) Wong FS, Visintin I, Wen L, Flavell RA, Janeway Jr CA. (1996) CD8 T cell clones can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells. J. Exp. Med, 183: 67-76.

(101) Haskins K. (2005) Pathogenic T-cell clones in autoimmune diabetes: more lessons from the NOD mouse. Adv Immunol, 87:123-162.

(102) Shizuru JA, Taylor-Edwards C, Banks BA, Gregory AK, Fathman CG. (1998) Immunotherapy of the nonobese diabetic mouse: treatment with an antibody to T-helper lymphocytes. Science, 240: 659-662.

(103) Abbas AK, Murphy KM, Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature, 383: 787-793.

(104) Mosmann TR, Coffman RL. (1989) Th1 and Th2 cells. Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu Rev Immunol, 7: 145–173

(105) Mosmann TR, Coffman RL. (1989) Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. Adv Immunol, 46: 111-147.

(106) Powrie F, Coffman RL. (1993) Inhibition of cell-mediated immunity by IL4 and IL-10. Res Immunol, 144: 639-643.

(107) Romagnani S. (1992) Human TH1 and TH2 subsets: regulation of differentiation and role in protection and immunopathology. Int Arch Allergy Immunol, 98: 279-285.

(108) Katz JD, Benoist C, Mathis D. (1995) T helper cells supset in insulin-dependent diabetes. Science, 268: 1185-1188.

(109) Healey D, Ozegbe P, Arden S, Chandler P, Hutton J, Cooke A. In vivo activity and in vitro specificity of CD4+ Th1 and Th2 cells derived from the spleens of diabetic NOD mice. J Clin Invest, 95: 2979-2985.

(110) Kidd P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. Altern Med Rev, 8: 223-246.

(111) Katz JD, Benoist C, Mathis D. (1995) T helper cell subsets in insulin-dependent diabetes. Science, 268: 1185–1188.

(112) Karlsson MG, Lawesson SS, Ludvigsson J. (2000) Th1-like dominance in high-risk first-degree relatives of type I diabetic patients. Diabetologia, 43: 742-749.

(113) Rachmiel M, Bloch O, Bistritzer T, Weintrob N, Ofan R, Koren-Morag N, Rapoport MJ. (2006) Th1/Th2 cytokine balance in patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma. Cytokine 34: 170-176.

(114) Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO (1995) Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. Immun Today, 16: 34-38.

(115) Kis J, Engelmann P, Heyam J, Orbán T. (2006) Az immunológiai prevenció lehetősége 1-es típusú diabetes mellitusban. LAM, 16: 771-773.

(116) Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. (1998) Cytokines and Their Roles in Pancreatic Islet β-Cell Destruction and Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Biochemical Pharmacology, 55: 1139-1149.

(117) Ozer G, Teker Z, Cetiner S, Yilmaz M, Topaloglu AK, Onenli-Mungan N, Yüksel B. (2003) Serum IL-1, IL-2, TNFalpha and INFgamma levels of patients with type 1 diabetes mellitus and their siblings. J Pediatr Endocrinol Metab, 16: 203-210.

(118) Berman MA, Sandborg CI, Wang Z, Imfeld KL, Zaldivar F, Dadufalza V, Buckingham BA. (1996) Decreased IL-4 production in new onset type I insulin-dependent diabetes mellitus. J Immunol, 157: 4690-4696.

(119) Healey D, Ozegbe P, Arden S, Chandler P, Hutton J, Cooke A. (1995) In vivo and in vitro specificity of CD4+ Th1 and Th2 cells derived from the spleens of diabetic NOD mice. J Clin Investig, 95: 2979–2985.

(120) Mueller R, Krahl T, Sarvetnick N. (1996) Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. J Exp Med, 184: 1093-1099.

(121) Faust A, Rothe H, Schade U, Lampeter E, Kolb H. (1996) Primary nonfunction of islet grafts in autoimmune diabetic nonobese diabetic mice is prevented by treatment with interleukin-4 and interleukin-10. Transplantation, 62: 648–652.

(122) Rappoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL. (1993) Interleukin 4 reverses T cell unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. J Exp Med, 178: 87–97.

(123) Cameron MJ, Arreaza GA, Zucker P, Chensue SW, Strieter RM, Chakrabarti S, Delovitch TL. (1997) IL-4 prevents insulitis and insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice by potentiation of regulatory T helper-2 cell function. J Immunol, 159: 4686-4692.

(124) Zaccone P, Phillips J, Conget I, Gomis R, Haskins K, Minty A, Bendtzen K, Cooke A, Nicoletti F. (1999) Interleukin-13 Prevents Autoimmune Diabetes in NOD Mice. Diabetes, 48: 1522-1528.

(125) Pennline KJ, Roque-Gaffney E, Monahan M. (1994) Recombinant human IL-10 prevents the onset of diabetes in the nonobese diabetic mouse. Clin Immunol Immunopathol, 71: 169–175.

(126) Schloot NC, Hanifi-Moghaddam P, Goebel C, Shatavi SV, Flohe S, Kolb H, Rothe H. (2002) Serum IFN-gamma and IL-10 levels are associated with disease progression in non-obese diabetic mice. Diabetes Metab Res Rev. 18: 64-70.

(127) Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. (1985) Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for

the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. J Exp Med, 161: 72-87.

(128) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol, 155: 1151-1164.

(129) Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. (2002) Origin of reg T cells with known specificity for antigen. Nat Immunol, 3: 756-763.

(130) Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. (2001) Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. Immunol Rev, 182: 58-67.

(131) Gergely J. (2007) Közeledünk az immunológiai tolerancia mechanizmusának megértése felé. Orvosi hetilap, 148: 7–11.

(132) Juedes AE, von Herrath MG. (2004) Regulatory T-cells in type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev, 20: 446-451.

(133) Horita M, Suzuki H, Onodera T, Ginsberg-Fellner F, Fauci AS, Notkins AL. (1982) Abnormalities of immunoregulatory T cell subsets in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. J Immunol, 129: 1426-1429.

(134) Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. (2002) Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. J Clin Invest, 109: 131-140.

(135) Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. (1980) Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. Jikken Dobutsu, 29: 1-13.

(136) Rees DA, Alcolado JC. (2005) Animal models of diabetes mellitus Diabetic medicine, 22: 359-370.

(137) Atkinson M, Leiter EH. (1999) The NOD mouse model of insulin dependent diabetes: As good as it gets? Nat Med, 5: 601–604.

(138) Anderson MS, Bluestone JA. (2005) The NOD Mouse: A Model of Immune Dysregulation. Annual review of immunology, 23: 447-485.

(139) Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, Piccirillo CA, Salomon BL, Bluestone JA. (2008) Central role of a defective interleukin-2 production in triggering islet autoimmune destruction. Immunity, 28: 687–697.

(140) Miyazaki A, Hanafusa T, Yamada K, Miyagawa J, Fujino-Kurihara H, Nakajima H, Nonaka K, Tarui S. (1985) Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study Clin. exp. Immunol, 60: 622-630.

(141) Brosky G, Logothetopoulos J. (1969) Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. Diabetes, 18: 606-611.

(142) Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep, 29: 91-98.

(143) Wang Z, Gleichmann H. (1998) GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low-doses of streptozotocin in mice. Diabetes, 47: 50–56.

(144) Zahner D, Malaisse WJ. (1990) Kinetic behaviour of liver glucokinase in diabetes. I. Alteration in streptozotocin-diabetic rats. Diabetes Res, 14: 101–108.

(145) Bolzan AD, Bianchi MS. (2002) Genotoxicity of streptozotocin. Mutat Res, 512: 121–134.

(146) Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. (1967) Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 126: 201-205.

(147) Orci L, Amherdt M, Malaisse-Lagae F, Ravazzola M, Malaisse WJ, Perrelet A, Renold AE. (1976) Islet cell membrane alteration by diabetogenic drugs. Lab Invest, 34: 451-454.

(148) Rossini AA, Like AA, Chick WL, Appel MC, Cahill GF Jr. (1977) Studies of streptozotocin-induced insulitis and diabetes. Proc. NatI. Acad. Sci, 74: 2485-2489.

(149) Kiesel U, Kolb H. (1982) Low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes is under the genetic control of the major histocompatibility complex in mice Diabetologia, 23: 69-71.

(150) Kiesel U, Greulich B, Moume CM, Kolb H. (1981) Induction of experimental autoimmune diabetes by low-dose streptozotocin treatment in genetically resistant mice. Immunol Lett, 3: 227-230.

(151) Leiter EH. (1982) Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and, insulitis in C57BL mice: Influence of inbred background,sex, and thymus (diabetes/inbred mice/nude mice). Proc. Natl Acad. Sci. USA, 79: 630-634.

(152) Wong FS. (2005) Insulin--a primary autoantigen in type 1 diabetes? Trends Mol Med, 11: 445-448.

(153) Kent SC, Chen Y, Bregoli L, Clemmings SM, Kenyon NS, Ricordi C, Hering BJ, Hafler DA. (2005) Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope, Nature, 435: 224-228.

(154) Kaufman DL, Erlander MG, Clare-Salzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. (1992) Autoimmunity to Two Forms of Glutamate Decarboxylase in Insulin-dependent Diabetes Mellitus. J Clin Invest, 1: 283-292.

(155) Kotani R, Nagata M, Moriyama H, Nakayama M, Yamada K, Chowdhury SA, Chakrabarty S, Jin Z, Yasuda H, Yokono K. (2002) Detection of GAD65-reactive T-Cells in type 1 diabetes by immunoglobulin-free ELISPOT assays. Diabetes Care, 25: 1390-1397.

(156) Richter W, Endl J, Eiermann TH, Brandt M, Kientsch-Engel R, Thivolet C, Jungfer H, Scherbaum WA. (1992) Human monoclonal islet cell antibodies from a patient with insulin-dependent diabetes mellitus reveal glutamate decarboxylase as the target antigen. Proc Natl Acad Sci U S A, 89: 8467-8471.

(157) Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS. (1996) Prediction of type 1 diabetes in first-degree relatives using a

combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/ IA-2 autoantibodies. Diabetes, 45: 926–933.

(158) Verge CF, Stenger D, Bonifacio E, Colman PG, Pilcher C, Bingley PJ, Eisenbarth GS. (1998) Combined use of autoantibodies (IA-2 autoantibody, GAD autoantibody, insulin autoantibody, cytoplasmic islet cell antibodies) in type 1 diabetes: Combinatorial Islet Autoantibody Workshop. Diabetes, 47: 1857–1866.

(159) Leslie RDG, Atkinson MA, Notkins AL. (1999) Autoantigens IA-2 and GAD in type 1 (insulin- dependent) diabetes. Diabetologia, 42: 3–14.

(160) Honeyman MC, Cram DS, Harrison LC. (1993) Glutamic acid decarboxylase 67-reactive T cells: a marker of insulin-dependent diabetes. J. Exp. Med, 177: 535-540.

(161) Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO. (1993) Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulitis in non-obese diabetic mice. Nature, 366: 72-75.

(162) Pleau JM, Fernandez-Saravia F, Esling A, Homo-Delarche F, Dardenne M. (1995) Prevention of autoimmune diabetes in nonobese diabetic female mice by treatment with recombinant glutamic acid decarboxylase (GAD 65). Clin Immunol Immunopathol, 76: 90-95.

(163) Elias D, Cohen IR. (1994) Peptide therapy for diabetes in NOD mice. Lancet, 343: 704-706.

(164) Lohmann T, Leslie RDG, Hawa M, Geysen M, Rodda S, Londei M. (1994) Immunodominant epitopes of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet, 343: 1607-1608.

(165) Sai P, Rivereau AS, Granier C, Haertl T, Martignat L. (1996) Immunization of non-obese diabetic (NOD) mice with glutamic acid decarboxylase-derived peptide 524-543 reduces cyclophosphamide-accelerated diabetes. Clin Exp Immunol, 105: 330-337.

(166) Harrison LC, Honeyman MC, DeAizpurua HJ, Schmidli RS, Colman PG, Tait BD, Cram DS. (1993) Inverse relation between humoral and cellular immunity to

glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin- dependent diabetes. Lancet, 341: 1365-1369.

(167) Tian J, Atkinson MA, Clare-Salzler M, Herschenfeld A, Forsthuber T, Lehmann PV, Kaufman DL. (1996) Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin- dependent diabetes. J Exp Med, 183: 1561-1567.

(168) Lohmann T, Scherbaum WA. (1996) T cell autoimmunity to glutamic acid decarboxylase in human insulin-dependent diabetes mellitus. Horm Metab Res 28: 357-360.

(169) Elias D, Marcus H, Reshef T, Ablamunits V, Cohen IR. (1995) Induction of diabetes in standard mice by immunization with the p277 peptide of a 60-kDa heat shock protein. Eur. J. Immunol, 10: 2851-2857.

(170) Birk OS, Elias D, Weiss AS, Rosen A, van-der Zee R, Walker MD, Cohen IR. (1996) NOD mouse diabetes: The ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. J Autoimmun, 9: 159–166.

(171) Birk OS, Douek DC, Elias D, Takacs K, Dewchand H, Gur SL, Walker MD, van der Zee R, Cohen IR, Altmann DM. (1996) The role of hsp60 in autoimmune diabetes: analysis in a transgenic model. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 1032–1037.

(172) Elias D, Prigozin H, Polak N, Rapoport M, Lohse AW, Cohen IR. (1994) Autoimmune diabetss induced by the B cell toxin STZ. Immunity to the 60-kDa heat shock protein and to insulin. Diabetes, 43: 992-998.

(173) Horvath L, Cervenak L, Oroszlan M, Prohaszka Z, Uray K, Hudecz F, Baranyi É, Madácsy L, Singh M, Romics, Füst G, Pánczél P. (2002) Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. Immunol Lett, 80: 155–162.

(174) Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR. (1990) Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1576-1580.

(175) Elias D, Marcus H, Reshef T, Ablamunits V, Cohen IR. (1995) Induction of diabetes in standard mice by immunization with the p277 peptide of a 60-kDa heat shock protein. Eur J Immunol, 25: 2851-2857.

(176) Elias D, Reshef T, Birk OS, van der Zee R, Walker MD, Cohen IR. (1991) Vaccination against autoimmune mouse diabetes with a T-cell epitope of the human 60-kDa heat shock protein (peptide vaccinatlon/T-cell vaccination). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 3088-3091.

(177) Elias D, Cohen IR. (1995) Treatment of autoimmune diabetes and insulitis in NOD mice with heat shock protein 60 peptide p277. Diabetes, 44: 1132-1138.

(178) Elias D, Cohen IR. (1996) The hsp60 peptide p277 arrests the autoimmune diabetes induced by the toxin streptozotocin. Diabetes, 45: 1168-1172.

(179) Elias D. (1994) Peptide therapy for diabetes in NOD mice. Lancet, 343: 704-706.

(180) Bougnères PF, Landais P, Boisson C, Carel JC, Frament N, Boitard C, Chaussain JL, Bach JF. (1990) Limited duration of remission of insulin dependency in children with recent overt type I diabetes treated with low-dose cyclosporin. Diabetes, 39: 1264–1272.

(181) Jun HS, Yoon JW. (2005) Approaches for the cure of type 1 diabetes by cellular and gene therapy. Curr Gene Ther, 5: 249–262.

(182) Hutchings P, O'Reilly L, Parish NM, Waldmann H, Cooke A. (1992) The use of a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody to re-establish tolerance to beta cells in NOD mice. Eur J Immunol, 22: 1913-1918.

(183) Phillips JM, Harach SZ, Parish NM, Fehervari Z, Haskins K, Cooke A. (2000) Nondepleting anti-CD4 has an immediate action on diabetogenic effector cells, halting their destruction of pancreatic beta cells. J Immunol. 165: 1949-1955.

(184) Waldmann H, Cobbold S. (2001) Regulating the immune response to transplants. a role for CD4+ regulatory cells. Immunity, 14: 399-406.

(185) Cohen IR. (1997) The Th1/Th2 dichotomy, hsp60 autoimmunity, and type I diabetes. Clin Immunol Immunopathol, 84: 103-106.

(186) Elias D, Meilin A, Ablamunits V, Birk OS, Carmi P, Könen-Waisman S, Cohen IR. (1997) Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and downregulates autoimmunity to various beta-cell antigens. Diabetes, 46: 758-764.

(187) Rabinovitch A. (1994) Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation. Diabetes, 43: 613-621.

(188) Cohen IR. (1992) The cognitive principle challenges clonal selection. Immunol Today, 13: 441–444.

(189) Cohen IR. (1992) The cognitive paradigm and the immunological homunculus. Immunol Today, 13: 490–494.

(190) Ablamunits V, Elias D, Reshef T, Cohen IR. (1998) Islet T cells secreting IFN-gamma in NOD mouse diabetes: arrest by p277 peptide treatment. J Autoimmun, 11: 73–81.

(191) Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. (2001) Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. Lancet, 358:1749-1753.

(192) Raz I, Avron A, Tamir M, Metzger M, Symer L, Eldor R, Cohen IR, Elias D. (2007) Treatment of new-onset type 1 diabetes with peptide DiaPep277 is safe and associated with preserved beta-cell function: extension of a randomized, double-blind, phase II trial. DIAB Diabetes Metab Res Rev, 23: 292-298.

(193) Lazar L, Ofan R, Weintrob N, Avron A, Tamir M, Elias D, Phillip M, Josefsberg Z. (2007) Heat-shock protein peptide DiaPep277 treatment in children with newly diagnosed type 1 diabetes: a randomised, double-blind phase II study. Diabetes Metab Res Rev, 23: 286-291.

(194) Elias D, Avron A, Tamir M, Raz I. (2006) DiaPep277 preserves endogenous insulin production by immunomodulation in type 1 diabetes. Ann. N.Y. Acad. Sci, 1079: 340–344.

(195) Huurman VA, Decochez K, Mathieu C, Cohen IR, Roep BO. (2007) Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277 in C-peptide positive type 1 diabetes patients. Diabetes Metab Res Rev, 23: 269-275

(196) Huurman VA, van der Meide PE, Duinkerken G, Willemen S, Cohen IR, Elias D, Roep BO. (2008) Immunological efficacy of heat shock protein 60 peptide DiaPep277 therapy in clinical type I diabetes. Clin Exp Immunol,152: 488-497.

(197) Zanin-Zhorov A, Cahalon L, Tal G, Margalit R, Lider O, Cohen IR. (2006) Heat shock protein 60 enhances $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cell function via innate TLR2 signaling. J of Clin Invest, 116: 2022-2032.

(198) McNally PG, Lawrence IG, Panerai RB, Weston PJ, Thurston H. (1999) Sudden death in type 1 diabetes. Diabetes Obes Metab, 1: 151-158.

(199) Whitsel EA, Boyko EJ, Rautaharju PM, Raghunathan TE, Lin D, Pearce RM, Weinmann SA, Siscovick DS. (2005) Electrocardiographic QT interval prolongation and risk of primary cardiac arrest in diabetic patients. Diabetes Care, 28: 2045-2047.

(200) Suys BE, Huybrechts SJ, De Wolf D, Op De Beeck L, Matthys D, Van Overmeire B, Du Caju MV, Rooman RP. (2002) QTc interval prolongation and QTc dispersion in children and adolescents with type 1 diabetes. J Pediatr, 141: 59-63.

(201) Veglio M, Giunti S, Stevens LK, Fuller JH, Perin PC; EURODIAB IDDM Complications Study Group. (2002) Prevalence of Q-T interval dispersion in type 1 diabetes and its relation with cardiac ischemia: the EURODIAB IDDM Complications Study Group. Diabetes Care, 25: 702-707.

(202) de Bruyne MC, Hoes AW, Kors JA, Hofman A, van Bemmel JH, Grobbee DE. (1999) Prolonged QT interval predicts cardiac and all-cause mortality in the elderly. The Rotterdam Study. Eur Heart J, 20: 278-284.

(203) Veglio M, Sivieri R, Chinaglia A, Scaglione L, Cavallo-Perin P. (2002) QT interval prolongation and mortality in type 1 diabetic patients: a 5-year cohort prospective study. Neuropathy Study Group of the Italian Society of the Study of Diabetes, Piemonte Affiliate. Diabetes Care, 23: 1381-1383.

(204) Rossing P, Breum L, Major-Pedersen A, Sato A, Winding H, Pietersen A, Kastrup J, Parving HH. (2001) Prolonged QTc interval predicts mortality in patients with Type 1 diabetes mellitus. Diabet Med, 18: 199-205.

(205) Lo SS, Sutton MS, Leslie RD. (1993) Information on type 1 diabetes mellitus and QT interval from identical twins. Am J Cardiol, 72: 305-309.

(206) Lukas A. (1997) Electrophysiology of Myocardial Cells in the Epicardial, Midmyocardial, and Endocardial Layers of the Ventricle. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, 2: 61-72.

(207) Tomaselli GF, Marban E. (1999) Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure. Cardiavascular research, 42: 270-283.

(208) Varró András. Antiaritmiás szerek. In.: Gyires K, Fürst ZS, Farmakológia. Medicina, Budapest, 2007: 252-274.

(209) Nishiyama A, Ishii DN, Backx PH, Pulford BE, Birks BR, Tamkun MM. (2001) Altered K(+) channel gene expression in diabetic rat ventricle: isoform switching between Kv4.2 and Kv1.4. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 281: 1800-1807.

(210) Qin D, Huang B, Deng L, El-Adawi H, Ganguly K, Sowers JR, El-Sherif N. (2001) Downregulation of K(+) channel genes expression in type I diabetic cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun, 283: 549-553.

(211) Fein FS, Sonnenblick EH. (1994) Diabetic cardiomyopathy. Cardiovasc Drugs Ther, 8: 65-73.

(212) Magyar J, Rusznák Z, Szentesi P, Szûcs G, Kovács L. (1992) Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes. J Mol Cell Cardiol, 24: 841-853.

(213) Jourdon P, Feuvray D. (1993) Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. J Physiol, 470: 411-429.

(214) Shimoni Y, Firek L, Severson D, Giles W. (1994) Short-term diabetes alters K+ currents in rat ventricular myocytes. Circ Res, 74: 620-628.

(215) Fein FS, Kornstein LB, Strobeck JE, Capasso JM, Sonnenblick EH. (1980) Altered myocardial mechanics in diabetic rats. Circ Res, 1980 47: 922-933.

(216) Magyar J, Cseresnyés Z, Rusznák Z, Sipos I, Szücs G, Kovács L. (1995) Effects of insulin on potassium currents of rat ventricular myocytes in streptozotocin diabetes.

Gen Physiol Biophys, 14: 191-201.

(217) Shimoni Y, Firek L, Severson D, Giles W. (1994) Short-term diabetes alters K+ currents in rat ventricular myocytes. Circ Res, 74: 620-628.

(218) Xu Z, Patel KP, Rozanski GJ. (1996) Metabolic basis of decreased transient outward K+ current in ventricular myocytes from diabetic rats. Am J Physiol, 271: 2190-2196.

(219) Tsuchida K, Watajima H. (1997) Potassium currents in ventricular myocytes from genetically diabetic rats. Am J Physiol, 4: 695-700.

(220) Pacher P, Ungvári Z, Nánási PP, Kecskeméti V. (1999) Electrophysiological changes in rat ventricular and atrial myocardium at different stages of experimental diabetes. Acta Physiol Scand, 166: 7-13.

(221) Taketomi S, Fujita T, Yokono K. (1988) Insulin receptor and postbinding defects in KK mouse adipocytes and improvement by ciglitazone. Diabetes Res Clin Pract, 5: 125−134.

(222) Aomine M, Yamato T. (2000) Electrophysiological properties of ventricular muscle obtained from spontaneously diabetic mice. Exp Anim, 49: 23-33.

(223) Lengyel C, Virág L, Kovács PP, Kristóf A, Pacher P, Kocsis E, Koltay ZM, Nánási PP, Tóth M, Kecskeméti V, Papp JG, Varró A, Jost N.(2008) Role of slow

delayed rectifier K+-current in QT prolongation in the alloxan-induced diabetic rabbit heart. Acta Physiol (Oxf), 192: 359-368.

(224) Lengyel C, Virág L, Kovács PP, Kristóf A, Pacher P, Kocsis E, Koltay ZM, Nánási PP, Tóth M, Kecskeméti V, Papp JG, Varró A, Jost N. (2007) Role of slow delayed rectifier K+-current in QT prolongation in the alloxan-induced diabetic rabbit heart. Acta Physiol (Oxf), 192: 359-368.

(225) Ohtsu H, Tanaka S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G. (2001) Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. FEBS Lett, 502: 53–56.

(226) Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. (1989) Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. The J. of Immunology, 143: 1283-1289.

(227) Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. (2003) Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. Rev Endocr Metab Disord, 4: 291-299.

(228) Wilson D. (2007) Th1-driven autoimmune diseases. Immunology Lecture (internet)

(229) Quintana FJ, Buzas E, Prohászka Z, Bíró A, Kocsis J, Füst G, Falus A, Cohen IR. (2004) Knock-out of the histidine decarboxylase gene modifies the repertoire of natural autoantibodies. J Autoimmun, 22: 297-305.

(230) Jutel M, Watanabe T, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. (2002) Immune regulation by histamine. Curr Opin Immunol, 14: 735–740.

(231) Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J. (2001) Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. Nature, 413: 420–425.

(232) Schneider E, Rolli-Derkinderen M,Arock M, Dy M. (2002) Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. Trends Immunol, 23: 255–263.

(233) Packard KA, Khan MM. (2003) Effects of histamine on Th1/Th2 cytokine balance. Int Immunopharmacol, 7: 909–920.

(234) Sirois J, Ménard G, Moses AS, Bissonnette EY. (2000) Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H2 and H3 receptors: stimulation of IL-10 production. J Immunol, 164: 2964–2970.

(235) van der Pouw Kraan TC, Snijders A, Boeije LC, de Groot ER, Alewijnse AE, Leurs R. (1998) Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. J Clin Invest, 102: 1866–1873.

(236) Elenkov IJ, Webster E, Papanicolaou DA, Fleisher TA, Chrousos GP, Wilder RL. (1998) Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. J Immunol, 161: 2586–2593.

(237) Osna N, Elliott K, Khan MM. (2001) The effects of histamine on interferon gamma. production are dependent on the stimulatory signals. Int J Immunopharmacol, 1: 135–145.

(238) Poluektova LY, Khan MM. (1998) Protein kinase A inhibitor reverses histamine-mediated regulation of IL-5 secretion. Immunopharmacology, 39: 9–19.

(239) Osna N, Elliott K, Khan MM. (2001) Regulation of interleukin-10 secretion by histamine in TH2 cells and splenocytes. Int J Immunopharmacol, 1: 85–96.

(240) Elliott KA, Osna NA, Scofield MA, Kahn MM. (2001) Regulation of interleukin-13 production by histamine in cloned murine T helper type 2 cells. Int J Immunopharmacol, 1: 1923–1937.

(241) Knollmann BC, Schober T, Petersen AO, Sirenko SG, Franz MR. (2007) Action potential characterization in intact mouse heart: steady-state cycle length dependence and electrical restitution. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 292: 614-621

(242) Nerbonne JM. (2000) Molecular basis of functional voltage-gated K^+ channel diversity in the mammalian myocardium. J Physiol, 525: 285-298.

(243) Brunet S, Aimond F, Li H, Guo W, Eldstrom J, Fedida D, Yamada KA, Nerbonne JM. (2004) Heterogeneous expression of repolarizing, voltage-gated K^+ currents in adult mouse ventricles. J Physiol, 559: 103-120.

(244) Jeck CD, Boyden PA. (1992) Age-related appearance of outward currents may contribute to developmental differences in ventricular repolarization. Circ Res, 71: 1390-1403.

(245) Nuss HB, Marban E, (1994). Electrophysiological properties of neonatal mouse cardiac myocytes in primary culture. J Physiol, 479: 265-279.

(246) Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown AM. (1984) Early outward current in rat single ventricular cells. Circ Res, 54: 157-162.

(247) Shigematsu S, Maruyama T, Kiyosue T, Arita M. (1994) Rate-dependent prolongation of action potential duration in single ventricular myocytes obtained from hearts of rats with streptozotocin-induced chronic diabetes sustained for 30-32 weeks. Heart Vessels, 9: 300-306.

(248) Sauviat MP, Feuvray D. (1986) Electrophysiological analysis of the sensitivity to calcium in ventricular muscle from alloxan diabetic rats. Basic Res Cardiol, 81: 489-496.

13. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A doktori munka témájával összefüggő publikációk

Szebeni A, Schloot N, Kecskemeti V, Hosszufalusi N, Panczel P, Prohaszka Z, Fust G, Uray K, Hudecz F, Meierhoff G. (2005) Th1 and Th2 cell responses of type 1 diabetes patients and healthy controls to human heat-shock protein 60 peptides AA437-460 and AA394-408. Inflamm Res, 54: 415-419. IF: 1.210

Szebeni A, Zoltán Prohászka, Edit Buzás, András Falus, Valéria Kecskeméti. (2008) Effects of vaccination with heat shock proteins on streptozotocin induced diabetes in histidine decarboxylase knockout mice. Inflamm Res, 57: 1–5. IF: 1,485

Szebeni A, András Falus, Valéria Kecskeméti. (2009) Electrophysiological characteristics of heart ventricular papillary muscles from control and diabetic histidine decarboxylase knockout and wild-type mice. J Interv Card Electrophysiol, Sep 4. [Epub ahead of print] IF: 1,246

Prohaszka Z, Duba J, Horvath L, Csaszar A, Karadi I, **Szebeni A**, Singh M, Fekete B, Romics L, Fust G. (2001) Comparative study on antibodies to human and bacterial 60 kDa heat shock proteins in a large cohort of patients with coronary heart disease and healthy subjects. Eur J Clin Invest, 31: 285-292. IF: 2,255

Jánoskuti L, Horváth L, **Szebeni A**, Császár A, Karádi I, Fenyvesi T, Romics L, Füst Gy, Prohászka Z. (1999) A 60 KD-os hősokkfehérjék elleni antitestek szintjének változása akut coronaria-szindrómában szenvedő betegekben. Magy Belorv Arch, 52: 400-405.

A doktori munka témájához nem kapcsolódó publikációk

Rónai AZ, Király K, **Szebeni A**, Szemenyei E, Prohászka Z, Darula Z, Tóth G, Till I, Szalay B, Kató E, Barna I. (2009) Immunoreactive endomorphin 2 is generated

extracellularly in rat isolated L4,5 dorsal root ganglia by DPP-IV. Regul Pept, 157: 1-2. IF:2,276

Folyóiratban megjelent idézhető előadáskivonatok

Szebeni A, Schloot N, Prohaszka Z, Fust G, Kecskemeti V. (2003) Immune reactivity to heat shock proteins in Type 1 diabetes mellitus. Immunology, 110: 80. IF: 2,853

Szebeni A, Kecskeméti V. (2007) Electrophysiological characteristics of heart ventricular papillary muscles from histidine decarboxylase knockout and wild-type mice: effects of rosiglitazone. BMC Pharmacology, 20: A43.

Virágh É, Szebeni A, Kecskeméti V. (2007) Electrophysiological effects of heat shock proteins and dofetilide on cardiac preparations of streptozotocininduced diabetic rats BMC Pharmacology, 20: A40

Kongresszusi részvétel

Poszterek:

Szebeni A, Schloot N, Prohászka Z, Füst Gy, Kecskeméti V (2003) Immunreaktivitás a hősokk fehérjék ellen IDDM-ban. PhD Tudományos Napok.

Kecskemeti V, Szebeni A, Prohaszka Z, Tekes K, Fust G (2002) The role of heat shock proteins in the pathomechanism of diabetes mellitus. VI. Latin American congress of Immunology.

Szebeni A, Schloot N, Prohászka Z, Füst G, Kecskeméti V (2003) Immune reactivity to heat shock proteins in Type1 diabetes mellitus. Annual Congress of British Society for Immunology.

Szebeni A, Schloot N, Prohászka Z, Füst G, Kecskeméti V (2003) Immunreaktivitás a hősokk fehérjék ellen IDDM-ban. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése.

Szebeni A, Prohászka Z, Füst Gy, Tekes K, Kecskeméti V (2004) A 60 KD-os hő-shock fehérjék szerepe a diabetes patomechanizmusában. Magyar Klinikai Farmakológusok VI. Kongresszusa és MFT Immunfarmakológiai Szekció ülése.

Szebeni A, Prohászka Z, Füst Gy, Tekes K, Kecskeméti V (2005) A 60 KD-os hő-shock fehérjék szerepe a diabetes patomechanizmusában. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése.

Szebeni A, Schloot N, Prohászka Z, Füst Gy, Kecskeméti V, Meierhoff G (2005) Th1 and Th2 cell responses of type 1 diabetes patients and healthy controls to human Heat-shock protein 60 peptides AA437-460 and AA394-408. A Magyar Experimentális Farmakológia Tavaszi Szimpóziuma.

Szebeni A, Schloot N, Prohászka Z, Füst Gy, Kecskeméti V, Meierhoff G (2006) Th1 and Th2 cell responses of type 1 diabetes patients and healthy controls to human Heat-shock protein 60 peptides AA437-460 and AA394-408. 16th European Congress of Immunology.

Szebeni A, Prohászka Z, Buzás E, Falus A, Kecskeméti V (2006) Hő-sokk fehérjék szerepe a streptozotocin indukálta diabétesz patomechanizmusában patkányokban és hisztidin dekarboxiláz knock out egerekben. Magyar Experimentális Farmakológia II. Szimpóziuma.

Szebeni A, Prohászka Z, Buzás E, Falus A, Kecskeméti V (2006) Hő-sokk fehérjék szerepe a streptozotocin indukálta diabétesz patomechanizmusában patkányokban és hisztidin dekarboxiláz knock out egerekben. Magyar Experimentális Farmakológia III. Szimpóziuma.

Szebeni A, Kecskemeti V (2007) Electrophysiological characteristics of heart ventricular papillary muscles from histidine decarboxylase knockout and wild type mice: effects of rosiglitazone. Annual Meeting of European Society of Cardiology.

Szebeni A, Kecskemeti V (2007) Electrophysiological characteristics of heart ventricular papillary muscles from histidine decarboxylase knockout and wild type mice: effects of rosiglitazone. 13th Symposium of the Austrian Pharmacological Society (APHAR).

14. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kísérleteket a Semmelweis Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében és a Deutsche Diabetes Forschung Institute-ban (Düsseldorf) végeztem.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkám során segítséget nyújtottak számomra:

Dr. Kecskeméti Valéria Professzor Asszonynak, aki mint témavezetőm megismertette velem a kísérleti munka alapjait, a farmakológia tudományát és mindvégig segítségemre volt,

Dr. Fürst Zsuzsanna Professzor Asszonynak, a Farmakológiai Intézet korábbi igazgatójának, aki lehetővé tette, hogy doktori munkámat elkezdhessem az intézetben,

Dr. Gyires Klára Professzor Asszonynak a Farmakológiai Intézet igazgatójának, aki azóta is támogatja a munkámat,

Dr. Prohászka Zoltánnak és Dr. Nanette Schloot-nak, akiknek laborjaiban (SE, III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratórium; Düsseldorfi Egyetem, DDFI) kísérleteim egy részét elvégezhettem,

Dr. Rónai Andrásnak a doktori munkámmal kapcsolatos számos értékes szakmai és gyakorlati tanácsért,

Dr. Tímár Júliának a doktori munkámmal kapcsolatos értékes javaslataiért,

Benkes Jenőnének, Ibolyának és Szalai Antalnénak a kísérletek elvégzése során nyújtott segítségért,

Balogh Jenőnek, Gulyás Antalnak, és az intézet valamennyi dolgozójának,

és végül, de nem utolsósorban családomnak türelmükért és bátorításukért.

A munkát támogatta az ETT 578/2006 és az OTKA T 043207 VK.