

Projektszám: 98öu4	HUF: 1 040 000 EUR: 1050
Pályázó neve: Dr. Attila Kiss	Intézménye: Bécsi Orvostudományi Egyetem, Orvosbiológia Centrum
Projektpartner neve: Dr. György Nádasy	Intézménye: Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar
Pályázat címe: A TNC szerepe diabetes indukálta kardiomyopatiában	

A projekt jellege: (kérjük bejelölni)

- Workshop, konferencia
- Publikáció, tananyag
- **Kutatási együttműködés**
- Oktatási program

Beszámoló/Eredmények

A program a Bécsi Orvostudományi Egyetem Orvosbiológiai Kutatások Tanszéke (prof BK Podesser és dr A Kiss) valamint a budapesti Semmelweis Egyetem Élettan Tanszéke (prof L Hunyady and dr GL Nadasy) között hozott létre gyümölcsöző kapcsolatot. A program keretei között a Tenascin-C gén kiütésének hatásait tanulmányoztuk egérben a kardiovaszkuláris rendszerre, és specifikusan arra, hogy hogyan érinti ez a Streptozotocin diabetes által kiváltott vaszkuláris patológiai folyamatokat. Négy állatcsoport kialakítása történt: 1. Vad törzsbeli nem diabeteszes állatok 2. Vad törzsbeli diabeteszes állatok 3. Tenascin-C KO nem diabeteszes állatok 4. Tenascin-C KO diabeteszes állatok. Tizenkét állat volt mindegyik csoportban. A genetikailag módosított állatok kialakítására Bécsben került sor és ugyancsak Bécsben történt a diabetes indukciója valamint az ultrahangos kardiológiai vizsgálat. Az állatokat 2018 júliusában, októberében és novemberében, valamint 2019 márciusában szállítottuk Budapestre további vizsgálatokra. A Semmelweis Egyetem Élettan Intézetében az állatokat Nembutállal altattuk (50 mg/kg i.p.), az artériás középnyomást az a. carotis kanülözésével mértük, majd a teljes állatot heparinizált Krebs-Ringer oldattal mostuk át, hogy a vért a szívből és az erekből eltávolítsuk. Kimetszettük a szívet és az aortát és Krebs-Ringer oldatba helyeztük. Az abdominális aortából négy gyűrűt vágunk és miográfiás vizsgálatnak vetettük alá őket. A szívet hideg Krebs-Ringer oldatban tűkkel rögzítettük és a bal oldali koronária artéria ramus descendensének teljes hálózatát in situ kiperaráltuk (az óvatos mikropreparációval disztálisan a kb. 40 mikrométer átmérőjű ágakig haladva). Megkanüláltuk az orificiumot és a koronária artéria hálózatot meleg, oxigenizált nKR oldattal nyomás alatt perfundáltuk. A teljes hálózat videomikroszkópos képét rögzítettük, úgy kis- mind nagy nagyítással, geometriai elemzésre. Szövetteni metszetek készültek a szívből és az aorta thoracica-ból, amiket kollagénre, elasztinra és simaizom kontraktilis proteinre festettünk meg. A diabeteszes állatok testsúlya alacsonyabb volt, mint nem diabeteszes társaiké. A miográfiás vizsgálat kimutatta, hogy a diabeteszes állatok endoteliális dilációja jelentősen csökkent, és hogy a Tenascin C gén kiütése jelentősen mérsékelte ezt a jellegzetes diabeteszes patofiziológiai elváltozást. Új megfigyelésünk volt, hogy a diabeteszes koronária hálózat geometriai struktúrája jelentősen eltért a normális hálózatokétól: a tipikus bifurkációk helyett gyakran észleltünk trifurkációkat, sőt négyes oszlásokat. Ennek eredményeként a 60-100 µm átmérőjű szegmensek gyakorisága fokozódott a diabeteszes hálózatokban. A Tenascin-C gén kiütése (a fehérje jelentős szerepet játszik a kötőszöveti elemek térbeli szerveződésében és újraszerveződésében) ugyancsak befolyásolta a hálózati geometriát: tipikus volt a főág korai oszlása, amit vékonyabb ágak párhuzamos futását eredményezte. Ennek eredményeképpen a genetikailag módosított hálózatokban csökkent a 140-180 µm átmérőjű ágak száma. Ígéretes megfigyelésünk volt, hogy a Tenascin-C KO mintázat kevésbé hajlamosnak bizonyult a diabeteszes elágazási mintázat kialakítására. A nagyszámú aorta- és szív szövettani metszet kvantitatív analízise folyamatban van.

Előzetes eredményeink arra utalnak, hogy a diabetesz fokozta a kamraizomszövet fibrózisát, és míg a Tenascin-C gén kiütése nem befolyásolta a bal kamra mellső falában a kollagén denzitását, a genetikai eltérés jelenléte csökkentette a diabetesz által indukált kamra fibrózis mértékét. A nagy számú koronária hálózati, szövettani és miográfiás adat elemzése folyamatban van. Előzetes eredményeinket három tudományos konferencián ismertettük. A diabeteszes vaszkulopátia új pathológiai jellegzetességeit azonosítottuk, a Tenascin-C gének az érfalfunkció szervezésében betöltött szerepét tártuk föl. Megerősítettük, hogy jók a remények arra, hogy a Tenascin-C protein semlegesítésével pozitívan tudjuk majd befolyásolni a diabeteszes vaszkulopátiát. A kísérletek során nyert és már kézben lévő adatok feldolgozásával két vagy három nagyobb cikk lesz publikálható.

A program szoros kapcsolatot teremtett a bécsi és a budapesti laboratóriumok között. Prof Bruno K Podesser látogatást tett a budapesti tanszéken és előadást tartott azon korábbi vizsgálatainak eredményeiről, melyeket a Tenascin-C-nek a kardiovaszkuláris rendszerben való szerepéről szerzett. Dr Attila Kiss többször is ellátogatott a budapesti intézménybe, ellenőrizte az ott folyó munkát, tanácsokat adott és szervezte a bécsi tanszéken végzett vizsgálatokat. Lujza Szabó mindkét tanszéken részt vet a munkában, segített beállítani a miográfiás technikát a bécsi tanszéken, míg Karl Schneider látogatást tett a budapesti tanszéken és előadást tartott az ereken alkalmazható szövetépítő technikákról. Dr Nádasy György a budapesti munkát szervezte, számos esetben látogatott konzultációkra Bécsbe, ott egy előadást is tartott. Balogh Fruzsina, egészségügyi mérnök hallgató, aki MSc diplomamunkáját írja az Élettan Tanszéken részt vett úgy a miográfiás mérésekben, mind a szövettani metszetek képanalitikai feldolgozásban, valamint Alexander Fees, USA biológus, aki Fulbright ösztöndíjjal tartózkodik az Élettani Tanszéken, és aki a vérnyomásméréseknél, a koronária hálózati geometriai vizsgálatoknál és a szövettani kiértékelésekben nyújtott segítséget, mindketten lehetőséget kaptak több napos bécsi tartózkodásra, ahol megismerkedhettek a bécsi orvosegyetemen végzett tudományos munkával és az ott található modern berendezésekkel.

A program anyagi szükségleteit a két tanszékvezető (prof Bruno K Podesser és prof László Hunyady) nagylelkű támogatása biztosította. Az osztrák-magyar alapítvány által biztosított finanszírozás lehetővé tette, hogy a két tanszék meglévő erőforrásait egyesítsük, biztosítva a szükséges gyakori személyes kontaktusokat az effektív tervezéshez és kivitelezéshez. A program eredményeként számos új megfigyelést tettünk a diabeteszes kardiovaszkuláris patológia területén, valamint a Tenascin-C proteinek a kardiovaszkuláris szervek kötőszöveti állományának szervezésében betöltött szerepéről. Ezen eredményeinkre támaszkodva új programok benyújtását tervezzük a két intézmény között az Osztrák- Magyar Alapítvány segítségével megalapozott kooperációra építve. Ezúton is szeretnénk kifejezni köszönetünket és nagyrabecsülésünket az alapítványnak.

Publikációs jegyzék:

Publikáció: 1) Lack of tenascin c improves vascular endothelial function and network remodeling of coronary resistance arteries in diabetes. Arnold Z., Nagel F., Szabo P.L., Fee A. J., Josvai A., Balogh F., Szekeres M., Nádasy G. Y., Kiss A., Podesser B. K. (YIS symposium 2019, Vienna, Oral presentation).

2) Lack of tenascin C improves vascular endothelial function and network remodeling of coronary resistance arteries in diabetes; Attila Kiss, Zsuzsanna Arnold, Felix Nagel, Petra Lujza Szabo, Alex J Fee, Attila Josvai, Fruzsina Balogh Maria Szekeres, György Nádasy, Bruno K Podesser (Austrian Society of Atherosclerosis, Annual Meeting, 2019, oral presentation)

3.) Hálózati geometria átépülése rágcsálók intramurális koronária rezisztencia artéria hálózatában: Kor, Nem, hipertónia, diabetesz, Tenaszcin C, táplálkozás és fizikai edzés hatásai FAMÉ 2019 jun. 5-8 Budapest

Projektnummer: 98öu4		HUF: 1 040 000 EUR : 1.050
Antragsteller: Dr. Attila Kiss	Institut: Medizinische Universität Wien Zentrum für Biomedizinische Forschung	
Projektpartner: Dr. György Nádasy	Institut: Semmelweis Egyetem Általános Orvostudományi Kar	
Titel: Die Rolle von TNC in Diabetes mellitus induzierten Kardiomyopathien		

Art der Förderung:

- Workshop, Konferenz
- Publikation, Lehrmaterial
- **Forschungsprojekt**
- Unterrichtsprojekt

Bericht

Durch die Unterstützung durch das Programm/Grant wurde eine Kooperation zwischen dem biomedizinischen Forschungs-Zentrum der Medizinischen Universität Wien (unter Leitung von Univ. Prof. Dr. BK Podesser und Dr. A. Kiss, PhD) und dem Physiologie-Departement der Semmelweis Universität Ungarn (unter Leitung von Prof. L. Hunyady and Dr. GL. Nádasy) ermöglicht. Im Rahmen dieses Programms wurden der Effekt von Tenascin-C Gen-Knock-out (TNC KO) in Mäusen in Hinsicht auf das kardiovaskuläre System untersucht. Genauer genommen wurde evaluiert, wie sich dieser Knock-out auf Herz- und Gefäßpathologien, ausgelöst durch Streptozotocin-Diabetes, auswirkt. Dazu wurden die Tiere in 4 Gruppen randomisiert zugeteilt: 1. Wild Type (WT) (A/J) Mäuse ohne Diabetes; 2. WT Mäuse mit Diabetes; 3. TNC KO Mäuse ohne Diabetes; 4. TNC KO mit Diabetes. Jede Gruppe bestand aus 12 Tieren. Die Tiere wurden in Wien gezüchtet und am Zentrum für biomedizinische Forschung wurde sowohl die Diabetes-Induktion sowie die kardiologischen Ultraschall-Untersuchungen durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere nach Budapest transportiert um dort im Juli, Oktober und November 2018 sowie im März 2019 weitere Untersuchungen folgen zu lassen. Am Physiologie-Departement der Semmelweis Universität wurden die Tiere mittels Nembutal (50mg/kg i.p.) anästhesiert und per Kanülierung einer Arteria carotis wurde der arterielle Mitteldruck gemessen. Anschließend wurden die Tiere mit heparinisierte Krebs-Ringer-Lösung durchgespült und somit Blut aus den Gefäßen und dem Herzen gewaschen. Herz und Aorta wurden entnommen und in nKR Lösung eingelegt. Vier Gefäßringe wurden von der abdominalen Aorta jeden Tieres herausgeschnitten und einem Wire Myograph- Test unterzogen. Die Herzen wurden in gekühlter Kochsalzlösung so fixiert, dass eine mikrochirurgische Präparation des gesamten intramuralen Gefäßnetzwerks des links anterioren, absteigenden Astes (LAD) der linken Koronararterie (LCA) vorsichtig durchgeführt werden konnte. Durch dieses Verfahren war es möglich die Äste bis zu einem Durchmesser von 40 µm nach distal zu verfolgen. Die Aorta wurde kanüliert und Koronararterien unter Druck mit warmer, oxygenierter nKR Lösung perfundiert. Mittels Videomikroskop wurden Bilder des Gefäßgeflechts unter leichter und hoher Vergrößerung gemacht. Dies erlaubte die Analyse der Geometrie. Histologische Schnitte wurden von den Herzen und der thorakalen Aorta angefertigt und mittels Färbungen für Kollagen, Elastin und glatten Muskelzellen- Kontraktionsprotein analysiert. Tiere mit Diabetes zeigten ein verringertes Körpergewicht als ihre Vergleichstiere. Der Myograph zeigte, dass die endotheliale Erweiterung von diabetischen Mäusen geringer war als jenes der Kontrollen und dass der Verlust an TNC. Eine neue Beobachtung war, dass die geometrische Struktur des Koronargeflechts in diabetischen Mäusen sich im Vergleich zu gesunden Tieren verändert: anstatt der typischen Bifurkationen, waren vermehrt Trifurkationen oder sogar Quadrifurkationen zu finden. Daraus resultierte eine Durchmesservarianz von 60-100 µm in Diabetikern. Das Ausschalten der TNC Gene (dieses Protein spielt eine wichtige Rolle in der (Re-) Organisation von verbindendem Gewebeelementen) beeinflusste ebenfalls die Geometrie des Gefäßgeflechts. Typisch ist die frühe Spaltung des Hauptastes mit zahlreichen, parallel-verlaufenden, kleinen

Nebenästen. Dies wiederum führt zu einer Verringerung der 140-180 µm Segmente in KO Tieren. Es kann als vielversprechender Fakt angesehen werden, dass TNC KO Tiere nicht anfälliger waren, diabetische Muster zu entwickeln. Die quantitative, histologische Analyse der zahlreichen Aorten- und Herz-Proben wird derzeit durchgeführt. Erste Ergebnisse zeigen, dass Diabetes zu vermehrter kardialer Fibrose führt und dass TNC KO keinen Effekt auf die Dichte des Kollagens in der Vorderwand des linken Ventrikels hat. Allerdings limitierte TNC die Fibrose, welche durch Diabetes induziert wurde.

Die Evaluierung der zahlreichen Geflechtsgeometrien, histologischen Schnitte sowie des Myographen wird gerade durchgeführt. Erste Ergebnisse wurden bereits auf 2 wissenschaftlichen Konferenzen präsentiert. Neue, pathologische Eigenschaften von diabetischer Vaskulopathie konnten identifiziert werden und die Rolle von TNC in der Organisation der funktionellen Gefäßwand wurde aufgezeigt. Die Hoffnungen, dass die Neutralisation des TNC Proteins, den diabetischen Gefäßschaden positiv beeinflussen kann, haben sich bestätigt. Zwei bis drei wissenschaftliche Arbeiten / Papers können durch die neu gewonnenen Daten dieser Experimente erarbeitet werden.

Durch dieses Programm hat sich eine starke Bindung zwischen den Laboren aus Wien und Budapest gebildet. Prof. Podesser hat Budapest besucht und wurde zu einer Vorlesung zu seinen früheren Resultaten (z.B. über die Rolle von TNC im kardiovaskulären System) und derzeitiger Forschung eingeladen. Dr. Kiss besuchte Budapest einige Male und wurde zu aktuellen Schritten des Projekts befragt und gab Ratschläge. Er war für die Durchführung der Versuche in Wien verantwortlich. Petra Szabo war an dem Projekt in beiden Laboratorien beteiligt und half beim Durchführen der Myograph-Testungen in Wien. Karl Schneider wurde nach Budapest eingeladen und hielt einen Vortrag über seine Arbeit in Tissue engineering- Techniken in Blutgefäßen. Dr. György Nadasy organisierte die Studie in Budapest und besuchte einige Male das Labor in Wien für Update-Gespräche sowie Vorträge. Fruzsina Balogh, eine Medical Engineering- Studentin aus Budapest, die ihre Master-Arbeit in Zuge dieses Projekt schreibt, beteiligte sich an den Myograph- und den histologischen Bild-Analysen. Alexander Fees, ein Biologe aus den USA, der seinen Fulbright Stipendium- Term in Budapest an der Semmelweis-Klinik verbringt, half bei den Blutdruckmessungen, Koronargefäß- Präparationen und histologischen Evaluierungen. Beide letztgenannten hatten die Möglichkeit einige Tage in Wien zu arbeiten und die Forschung sowie das Equipment der MUW kennenzulernen.

Das Material, welches benötigt wurde, wurde freundlicher Weise von den beiden Department-Leitern, Prof. Podesser und Prof. Hunyady, zur Verfügung gestellt. Die finanziellen Mittel, welche von der Austro-Ungarischen Stiftung bereitgestellt wurden, ermöglichten das Zusammenbringen von bereits existierenden Ressourcen der beiden Laboratorien. Durch die Unterstützung konnten ein nötiger, regelmäßiger persönlicher Kontakt und Besuchsrhythmus für eine effizientere Planung und Durchführung des Projekts sichergestellt werden. Die Resultate dieses Austauschprogramms sind mehrere neue Beobachtungen auf dem Feld der diabetischen, kardiovaskulären Pathologien sowie der Rolle von TNC im Organisieren von Bindegewebe in kardiovaskulären Organen. Auf diesen Ergebnissen basierend, planen wir neue Projekte einzureichen, welche im Zuge dieser entstandenen Kooperation mit Hilfe der österreichisch-ungarischen Stiftung erarbeitet werden sollen.

Publikationsliste:

Publikationsverzeichnis: 1) **Lack of tenascin c improves vascular endothelial function and network remodeling of coronary resistance arteries in diabetes.** Arnold Z., Nagel F., Szabo P.L., Fee A. J., Josvai A., Balogh F., Szekeres M., Nadasy G. Y., Kiss A., Podesser B. K. (YIS symposium 2019, Vienna, Oral presentation).

2) **Lack of tenascin C improves vascular endothelial function and network remodeling of coronary resistance arteries in diabetes;** Attila Kiss, Zsuzsanna Arnold, Felix Nagel, Petra Lujza Szabo, Alex J Fee, Attila Josvai, Fruzsina Balogh Maria Szekeres, György Nádasy, Bruno K Podesser (Austrian Society of Atherosclerosis, Annual Meeting, 2019, oral presentation)

Abschlußbericht

Weitere Fragen zu den Ergebnissen:

1. Nutzung und Verbreitung der Ergebnisse:

Welchen konkreten Nutzen konnten Sie und Ihr Kooperationspartner aus dem Projekt gewinnen. Bitte denken Sie insbesondere an Publikationen, Experimente, gemeinsame Seminare, Sommerschools und/oder an eine anderweitige Umsetzung in die Praxis.

Die Resultate dieses Austauschprogramms sind mehrere neue Beobachtungen auf dem Feld der diabetischen, kardiovaskulären Pathologien sowie der Rolle von TNC im Organisieren von Bindegewebe in kardiovaskulären Organen. Auf diesen Ergebnissen basierend, planen wir neue Projekte einzureichen, welche im Zuge dieser entstandenen Kooperation mit Hilfe der österreichisch-ungarischen Stiftung erarbeitet werden sollen.

2. Durchführung:

Welche konkrete Änderungen gegenüber der Planung ergaben sich hinsichtlich Inhalte und Mitarbeit/Anzahl der Teilnehmer während des Projektverlaufes?

Junge Forscher und Senior Forscher mobilitat sammeln in jeder Arbeitsgruppe.

3. Bewertung:

Bitte führen Sie besonders positive, aber auch negative Beobachtungen und Erfahrungen an. Ev. langfristige Auswirkungen Ihres Projektes?

Positive: immer wieder schnelle und professional arbeiten

4. Perspektiven:

Hat sich eine Fortführung der Kooperation ergeben?

- a. Welche geplante Fortführung gibt es?
- b. Welche konkrete Fortführung gibt es?

Derzeit wird die minimum Zwei Publikation zusammengefasst und verfasst.

5. Verbesserungsvorschläge:

Nenne Sie uns, Bitte, Verbesserungsvorschläge, wie Sie Ihre Arbeit oder wie wir unseren Service besser gestalten könnten?

Wir warent mit der Verwaltung vollkommen zufrieden.

Datum: **24.07.2019**



MEDIZINISCHE
UNIVERSITÄT WIEN

ZENTRUM

FÜR REGIONALE MEDIZINISCHE FORSCHUNG

Antragsteller (Unterschrift)

M. M. 2019

Projektpartner (Unterschrift)