

Beszámoló
OTKA PD77474

„A vékonybél ischémiás toleranciájának vizsgálata kísérletes vékonybél transzplantáció során” című pályázat

1. A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide; PACAP) hatásainak vizsgálata vékonybél meleg ischémia/reperfúziós (I/R) és autotranszplantációs modellekben.

A vékonybél hideg tárolására ma a leggyakrabban alkalmazott eljárás a hideg UW oldattal történő perfúziós, majd statikus tárolás. Ez a módszer számos előnnyel jár máj és vese tárolásakor, de a vékonybél konzerválás problematikája ma sem tekinthető teljesen megoldottnak. Jelenleg is folynak kutatások a kereskedelmi forgalomban lévő oldatok összetételének módosítására az ischémiás tolerancia növelése céljából. A PACAP széles körben elterjedt neuropeptid, ún. „brain-gut” peptid. Hatását nem csak az idegrendszerben fejti ki, de a perifériás szervekben (belső elválasztású mirigyek, szív-érrendszer, respiratórikus és gasztrointesztinális traktus) is. Kutatásunk célja volt a PACAP hatásainak vizsgálata vékonybél meleg I/R-ös és autotranszplantációs modellekben.

Az első modellben meleg I/R-s és PACAP-38-kezelt csoportokat hoztunk létre Wistar patkányokon (n=40). I. csoport: áloperált; II. csoport: 1 óra ischémia; III. csoport: 2 óra ischémia; IV. csoport: 3 óra ischémia; V. csoport: áloperált+PACAP; VI. csoport: 1 óra ischémia+PACAP; VII. csoport: 2 óra ischémia+PACAP; VIII. csoport: 3 óra ischémia+PACAP. A PACAP-38-at a reperfúzió teljes ideje alatt (3 óra) adtuk 5 ug egyszeri bólus, majd 25 ug folyamatos iv. perfúzióval. HE festést követően fénymikroszkóppal vizsgáltuk a szöveti struktúrát. Az oxidatív stressz paraméterek közül meghatároztuk a malondialdehid (MDA) és redukált glutation (GSH) szinteket és a szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitását. Eredményeink szerint a II-IV. csoportban a mucosalis és muscularis réteg, valamint a crypták súlyos károsodását találtuk. Ez kisebb mértékű volt a PACAP-38-al kezelt csoportokban. A biokémiai vizsgálatok szerint a II-IV csoportokban emelkedett MDA koncentrációt mértünk a reperfúzió végére. Ezzel párhuzamosan a GSH koncentráció és SOD aktivitás szignifikáns csökkenését kaptuk. Ezzel szemben a reperfúzió során PACAP-38-al kezelt csoportokban (V-VIII. csoport) csökkent a lipidperoxidáció. A GSH koncentráció és SOD aktivitás jobban megőrződött a kontroll értékhez képest. Ezek alapján megállapítottuk, hogy a meleg I/R következtében súlyos oxidatív károsodás lép fel a bélszövetben. Ezt a károsodást csökkentette a reperfúzió alatt adott intravénás PACAP-38 kezelés.

A második modellben teljes orthotopikus vékonybél autotranszplantációt végeztünk Wistar patkányokon (n=30). A graftokat 1 (I. csoport), 2 (II. csoport) és 3 (III. csoport) órán át tároltuk 4°C-os University of Wisconsin (UW) oldatban. A további graftokat 30 ug PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban konzerváltuk 1 (IV. csoport), 2 (V. csoport) és 3 (VI. csoport) órán át. Valamennyi csoportban 3 órás reperfúziót végeztünk. Meghatároztuk az MDA és a GSH koncentrációját, valamint a SOD aktivitását. A szöveti károsodás mértékét kvalitatív (Park-féle klasszifikáció) és kvalitatív (Scion Image software) módszerekkel adtuk meg HE festett metszeteken. A szöveti MAP kináz (ERK1/2, JNK1/2, p38 MAPK) aktivációt immunhisztológiai módszerrel vizsgáltuk. Eredményeink szerint a III. csoportban mért szöveti MDA koncentráció szignifikánsan magasabb volt a VI. csoportban mért értékhez képest (p<0.05). A SOD aktivitása szignifikánsan magasabb volt az V. csoportban, mint a II csoportban (p<0.05), illetve ez a különbség megmaradt a 3 órás tárolás után is. Mind a kvalitatív, mind a kvantitatív analízis a mucosa, a muscularis réteg károsodását mutatta ki és ez fokozódott a konzerválási idővel (I-III. csoport). Ezzel szemben a PACAP-38-at tartalmazó oldatban tárolt graftoknál a mucosa, a crypták szerkezete jobban megőrződött, a reperfúzió végére szignifikáns különbségeket kaptunk (p<0,05). Eredményeink szerint a I-III csoportban

a foszforilált ERK1/2 aktivitása csökkent, míg a foszforilált JNK1/2 és a p38 MAP kináz aktivitása emelkedett a kontroll értékhez képest. Valamennyi PACAP-38 kezelt csoportban (IV-VI csoport) a foszforilált ERK1/2 aktivitása emelkedett, míg a foszforilált JNK1/2 és a p38 MAP kináz aktivitása csökkent a reperfüzió végére. Megállapítottuk, hogy a PACAP-38-at tartalmazó UW-ban tárolt graftok esetén szignifikánsan jobb biokémiai, szövettani és jelátviteli eredményeket kaptunk a vékonybél tárolására a klinikai gyakorlatban ma alkalmazott UW oldatban végzett konzerválással szemben.

2. Az ischémiás posztkondicionálás (IPO) hatásainak vizsgálata vékonybél meleg I/R-ös és autotranszplantációs modellben.

Az első modellben Wistar patkányokon (n=30) az a. mesenterica superior leszorításával meleg ischémiát hoztunk létre 1, 3 és 6 órás időtartammal, melyet minden esetben 3 órás reperfüzió követett. A reperfüzió elején 3 ciklusban (1 ciklus 30"ischémia+30"reperfüzió) IPO-t végeztünk. A bélszövetből mintát veszünk a laparotomia után (kontroll), az ischémia és a reperfüzió végén. HE festett metszeteken a károsodás mértékét kvalitatív és kvantitatív módszerekkel adtuk meg. Az oxidatív stressz paraméterek közül meghatároztuk az MDA és GSH szinteket és a SOD aktivitását. ELISA technikával mértük a mucosa sejtek magjában és citoplazmájában az NF-kB transzkripciós faktor aktivitását. Tunel módszerrel vizsgáltuk a szöveti DNS károsodás mértékét. Eredményeink szerint a meleg ischémia időtartamának növelésével fokozódott a szövetkárosodás mértéke mind a kvalitatív, mind a kvantitatív mérések során. 6 órás meleg ischémiás csoportban a mucosalis és muscularis réteg, valamint a crypták súlyos károsodását láttuk a reperfüzió végére. Az IPO szignifikánsan csökkentette a bélfal károsodásának mértékét. A morfológiai változásokat alátámasztották biokémiai eredményeink: IPO hatására szignifikánsan csökkent a reperfüzió végi lipidperoxidáció mértéke ($p < 0,05$), illetve az endogén védelmi rendszerek (GSH, SOD) kapacitása/aktivitása magasabb maradt, mint azoknál ahol nem alkalmaztunk IPO-t. A mucosa sejtekben mért NF-kB transzkripciós faktor nukleáris és citoplazmális aktivitása bifázisos jellegű (14000 ± 3500 és 16000 ± 2200 RLU) mutatott hasonlóan, mint a korábban általunk leközölt ischémiás prekondicionálás után (Microsurgery 2006; 26: 54-7). A DNS károsodás tekintetében nem találtunk eltérést a kísérlet egyes csoportjai között.

A második modellben vékonybél autotranszplantációt végeztünk sertéseken (n=12). A graftokat 1, 3 és 6 órán át tároltuk 4°C-os UW oldatban. Az éranasztomózisok elkészítése után 3 ciklusban IPO-t végeztünk a 3 órás reperfüzió előtt. A bélszövetből vett mintákból az első modellnél ismertetett méréseket végeztük el. Eredményeink szerint a bélszövetben kisebb mértékű volt a szöveti károsodás, melyet a mucosa és a cryptaszerkezet jobb megőrzöttsége jelzett. A hideg konzerválás jelentősen mérsékelte a szöveti oxidatív stresszt az IPO-t követő reperfüziós bélszövetben, melyet a csökkent MDA koncentráció, az emelkedett GSH szint és a SOD aktivitásának jobb megőrzöttsége mutatott a meleg I/R-s és IPO nélküli mintákhoz képest. Kimutattuk a mucosa sejtekben az NF-kB aktiválódását, bár RLU értékben ez kisebb volt, mint a meleg I/R csoportoknál. A bifázisos aktiváció itt is nyomon követhető volt mind a citoplazmában, mind a nukleusz frakcióban (11000 ± 1500 és 13000 ± 1100 RLU). Összességében elmondhatjuk, hogy az IPO mind a meleg I/R-s, mind az autotranszplantáción átesett bélszövetben csökkentette a szöveti strukturális károsodást, az oxidatív stressz mértékét feltehetően a védő jelátviteli folyamatok beindításával.

3. PACAP-38 és PACAP-27, valamint a citokinek szöveti expresszióját vizsgálata PACAP-38 tartalmú oldatban történő hideg tárolás és autotranszplantáció során.

Felnőtt hím Wistar patkányokon (250-300 g, n = 35) reszekáltuk a teljes vékonybelet a Treitz-szalagtól aborálisan a colon descendens középső szakaszáig. A graftok az arteria mesenterica superiorba helyezett kanülön keresztül perfundáltuk 100 ml 4°C-os UW oldattal,

majd 1 órán (I. csoport), 3 órán (II. csoport) és 6 órán át (III. csoport) tároltuk. A további csoportokban a graftokat 100 ml UW oldatba tett 100 ug PACAP-38 oldatban tároltuk 1 órán (IV. csoport), 3 órán (V. csoport) és 6 órát át (VI. csoport). A konzerválás után az érvegeket end-to-end anasztomózisokkal, mikrosebészeti technikával egyesítettük. Minden csoportban 3 óra reperfüziót indítottunk. Vékonybél-biopsziát vettünk a laparotomia után (kontroll) és a reperfüzió végén. A radioimmunassay (RIA) mérést homogenizált bélszöveten végeztük a korábban megadott metodika szerint (J Mol Neurosci 2009; 37: 168-76). A szöveti citokin meghatározást patkány citokin array segítségével (Panel Array szett R & D Systems, Biomedica Hung., Budapest, Magyarország) mértük (J Mol Neurosci 2010; 42: 411-8).

Eredményeink szerint a bél szöveti PACAP-38-szerű immunreaktivitása $55,1 \pm 2,5$ fmol/mg volt az áloperált csoportban, és $57,32 \pm 3,5$ fmol/mg volt a kontroll mintákban. Egy óra elteltével a konzervált bél PACAP-38-szerű immunreaktivitása $50,4 \pm 3,5$ fmol/mg (I. csoport), míg 3 óra után $40,1 \pm 5,5$ fmol/mg értékre csökkent (II. csoport). Ezek a változások szignifikánsak voltak 6 óra után (III: $32,6 \pm 3,0$ fmol/mg, $p < 0,05$) a kontrollhoz és az áloperált csoporthoz képest is. A PACAP-38-szerű immunreaktivitás szignifikánsan magasabb volt a PACAP-38 tartalmú UW oldatban tárolt szövetekben (IV-VI). A IV. csoport szintje ($65,2 \pm 3,4$ fmol/mg), az V. csoport ($55,6 \pm 4,2$ fmol/mg) és a VI. csoport ($48,9 \pm 3,2$ fmol/mg) értékek jelentősen magasabbak voltak, mint a PACAP-38-at nem tartalmazó UW oldatban való tárolás esetén ($p < 0,05$). A szöveti PACAP-27 szintek változása hasonló szignifikáns tendenciát mutatott az említett csoportokban ($p < 0,05$). Citokinek közül az intercelluláris adhéziós molekula-1 (sICAM-1, CD54) és L-szelektin (CD62L/LECAM-1) szabályozott aktivációja volt kimutatható a kontroll bélmintákban. Az expresszió nem változott 6 óra hideg UW konzerválás és az azt követő reperfüziós időszakban a GIII csoportban. Ezzel szemben a 6 órás PACAP-38 tartalmú UW oldatban történő hideg tárolás és a 3 óra reperfüzió erőteljes az aktiválódó citokinek erőteljes csökkenését okozta GVI-ben. A RANTES (CCL5) szintek emelkedtek minden csoportban, de enyhe csökkenés volt megfigyelhető a PACAP-38-al kezelt csoportokban. A RANTES (CCL5) kemokin nem folyamatosan expresszálódik, hanem gyulladás folyamán szabadul fel. Kísérleti modellünkben a RANTES (CCL5) minden csoportban emelkedett és enyhe csökkenés volt megfigyelhető a PACAP-38-al kezelt csoportokban. Gyulladásakor a transzkripció mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) és endogén gátlója, a TIMP-1 pro-inflammatórikus mediátorok révén indukálódik. Kísérletünkben a PACAP-38 nélkül 6 órán át tárolt graftok esetén a TIMP-1 kifejezett aktivációt mutatott. Míg a PACAP-38 tartalmú konzerválás csökkentette ezt az aktivációt.

Összefoglalva, jelenlegi eredményeink alátámasztják a PACAP-38-at tartalmazó hideg UW oldatban való konzerválásnak az I/R-s károsodásokat és a gyulladásos folyamatokkal szembeni védő hatását autotranszplantált vékonybélben.

Eredményeinkről 11 folyóiratcikkben és 19 konferencián számoltunk be.

A kutatásból származó közlemények Impakt Faktora: 16,28.

A kutatócsoport egy egyéni PhD felkészülője tudományos téziseit idén fogja megvédeni.

A témavezető a kutatásaiért a következő díjakat nyerte el:

2009. „A vékonybél hideg konzerválásának hatására létrejövő károsodás összehasonlítása PACAP K.O. és vad típusú egereken” címmel tartott előadás a XI. Magyar Transzplantációs Társaság Kongresszusán „Ullmann Imre díj”-ban részesült (Galyatető).

2011. „The protective effect of ischemic postconditioning on the tissue ischemic injury following intestinal autotransplantation” című előadás a XII. International Small Bowel Transplant Symposium-on a „The Transplantation Society Travel Grant” díját kapta (Washington DC, USA).

2011. „A Szerzők Ünnepe” 2010. évi sikeres publikációs tevékenység elismerése (Pécsi Tudományegyetem díja).