

Szakmai beszámoló

**„Az akut izületi vérömleny patomechanizmusának vizsgálata”**

című kutatási program zárójelentéséhez

(OTKA-azonosító: F 46504)

Témavezető: Dr Borsiczky Balázs

A 2004-ben megkezdett projekt végrehajtása során *in vitro*, *in vivo* állatkísérletek, és klinikai vizsgálatok elvégzését tűztük ki célul annak érdekében, hogy újabb részleteit tárjuk fel az akutan kialakuló izületi vérömleny patomechanizmusának. Ugyan a végrehajtásban résztvevő kutatók távozása, illetve a pénzügyi környezet változásai miatt a kutatási munkatervet kis mértékben módosítanunk kellett a projekt időtartama alatt, mindez a kitűzött célok elérését nem akadályozta.

A vizsgálataink alapját adó hipotézis szerint - akár csak a krónikus izületi bevérvés esetén - az akut haemarthros során is a hirtelen megváltozó *intraarticularis* környezet a patogén folyamatok kulcsa. Azonban a kedvezőtlen hatások rövidebb ideig tartó fennállása (*Rodnan* vizsgálataiból tudjuk, hogy az izotóppal jelölt vvt-k kb. 50%-a két nap elteltével, kb. 75%-a pedig négy nap után elhagyja a térdizületet.) és az ismétlődő bevérvések hiánya alapján úgy gondoltuk, hogy több, de viszonylag agresszív és gyorsan aktiválódó mechanizmus a felelős az irodalmi adatokból ismert elváltozások kialakulásáért. Elfogadva, hogy az izületen belüli milió megváltozása alapvető jelentőségű, továbbá összehasonlítva az egészséges izületi folyadék és a vérplazma összetételét, megállapítható két szembeötlő különbség, amelyek a prompt hatással járó folyamatok alapjául szolgálhatnak. Ezek közül az egyik, hogy a plazma *kolloid ozmotikus nyomása* kétszeresen meghaladja a *synovialis* folyadékét, a másik nyilvánvaló különbség pedig a vér és a *synovium* eltérő *celluláris összetételéből* adódik.

**Az ozmotikus stressz hatása (*in vitro* vizsgálatok)**

Ismert, hogy az ozmotikus stressz hatására megváltozik a porcsejtek térfogata, amely hatással van a sejtek növekedésére protein és glükózaminoglikán szintézisére és aminosav

transzportája. A vér megjelenése az ízületi üregben együtt jár a kolloid ozmotikus nyomás gyors növekedésével, ami következményesen megváltoztathatja a mátrix hidratáltságát és a chondrocyták zsugorodásához vezethet. Bár a chondrocyták rendkívül hatékony ozmoregulációs képessége viszonylag tág határok között lehetővé teszi az adaptációt, az utóbbi évek kutatásainak eredményeképpen kiderült, hogy az ozmotikus stressz olyan G-protein és inozitol-trifoszfáthoz kapcsolt jelátviteli utakat aktivál, amelyek további  $Ca^{2+}$  mediálta másodlagos messenger szignálokat indítanak be. Ezek az ismeretek, valamint a bevezetőben említett változások együttesen jelölték ki a kutatás azon irányát amelyen járva in vitro kísérletek sorát elvégezve vizsgáltuk az ozmotikus stressz által okozott intracelluláris jelátviteli folyamatok változásait.

Munkacsoportunk által korábban kidolgozott chondrocyta izolációs módszer segítségével primer porcsejt-tenyészeteket hoztunk létre, majd ezeken vizsgáltuk az ozmotikus stressz, hatásait. Elsőként azt sikerült kimutatnunk, hogy az akut haemarthros kialakulása során létrejövő, több mint kétszeres, kolloid ozmotikus nyomásemelkedés hatására valóban bekövetkezik bizonyos szekunder intracelluláris jelátviteli mechanizmusok, különösen a p38MAP kináz út, aktiválódása. Tekintettel arra, hogy a p38MAP kináz aktiválódását más sejtek esetén, több közlemény szerzője is kapcsolatba hozza az apoptózis folyamatával, továbbá az apoptotikus sejtelhalást, korábbi akut haemarthrosos állatkísérletes modeljeinkben magunk is megfigyeltük, további vizsgálatainkat ebbe az irányba folytattuk.

A primeren izolált, sertés chondrocyták populációit 6 órán keresztül inkubáltunk normál és hyperozmotikus médiumban, majd a p38, ERK1/2, és Akt foszforilációját Western-blot eljárással vizsgáltuk. Az élő és az apoptotikus chondrocyták átlagát annexin-v flow citometriával határoztuk meg. Ismert, hogy a mátrixtól mefosztott chondrocyták rövid idő elteltével fibroblasztá dedifferenciálódnak. Annak érdekében, hogy a blasztos elváltozás mértékét megítélhessük, real time PCR segítségével ellenőriztük a sejtekben zajló aggrecan, valamint az I és II típusú kollagének expresszióját. E vizsgálataink kizárták a szignifikáns mértékű blasztos átalakulást. Az elvégzett Western-blot vizsgálatok később kimutatták, hogy nem csak a p38 MAPK, de az ERK1/2, és Akt1 foszforilációja is jelentősen fokozódik a chondrocyták hiperozmotikus médiummal való kezelése alatt, a kontrol sejtekhez képest.

E mellett, a flow cytometriás vizsgálatok az apoptotikus sejtek arányának szignifikáns emelkedését, míg az életképes porcsejtek számának jelentős csökkenését mutatták az ozmotikus stressznek kitett sejtpopulációkban. Eredményeink tehát igazolták, hogy a kétszeresére emelkedő ozmotikus nyomás számos proapoptotikus jelátviteli útvonalat aktivál,

amely tény magyarázatul szolgálhat a chondrocyták flow cytometriával kimutatott apoptotikus elváltozásaira.

Az ozmotikus stressz és a chondrocyták apoptotikus pusztulása közötti kapcsolat igazolása ösztönzött bennünket arra, hogy bevonjunk a vizsgálatainkba valami olyan ágenst, amely az említett mechanizmusokra feltehetően hatással lesz. A Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) neuroprotektív hatásai már jól ismertek, mind in vitro, mind különböző klinikai modellekben, in vivo. Napjainkban számos nem neuronális rendszerekben nyújtott, protektív hatása is kezd ismertté válni. Az ozmotikus stressz több intracelluláris másodlagos jelátviteli szereplőt is aktivál, azonban arra nézve, hogy ezek hogyan képesek befolyásolni a chondrocytákat csak néhány adat áll rendelkezésünkre. Ezért in vitro kísérletekben tovább vizsgáltuk az ozmotikus stressz aktiválta protein kináz útvonalak aktiválódását, különös tekintettel a MAPK család tagjait, a cAMP responsive element binding transcription factor (CREB), valamint a caspase 3 aktiválódását, és a PACAP erre adott lehetséges protektív válaszát. A fenti módon izolált chondrocytákat DMEM F12 médiumban tenyésztettük 2 napon keresztül, majd a harmadik napon a kontrol chondrocytákat normál (300 mOsm), a teszt csoportot pedig hiperozmotikus (600 mOsm) médiumban inkubáltunk 6 órán keresztül. A PACAP kezelt csoportokat mind izoozmotikus, mind hiperozmotikus médiumban inkubáltuk 20nM PACAP 1-38 hozzáadásával. A sejtek életképességét MTT assay segítségével, az élő és az apoptotikus chondrocyták átlagát annexin-v flow citometriával határoztuk meg. Szintén flow citometriás technikával határoztunk meg a MAPK család tagjainak foszforilációs szintjét - extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), p38 MAP kinase (p38), c-Jun N-terminal kinase (JNK1/2) és a CREB, valamint caspase 3 aktivációs szintjét. Megállapítottuk, hogy a p38 MAPK, ERK1/2, JNK1/2 foszforilációja, valamint caspase 3 aktivációs szintje emelkedett, míg a CREB foszforilációs szintje csökkent a chondrocyták hiperozmotikus médiummal való kezelése alatt a kontrol sejtekéhez képest. Emellett, az apoptotikus sejtek aránya megemelkedett, míg az életképes porcsejtek száma jelentősen lecsökkent az ozmotikus stressznek kitett sejtpopulációkban. A PACAP kezelt sejtcsoportban az életképes porcsejtek száma jelentősen megnőtt, míg az apoptotikus sejtek száma csökkent az osmotikus stressz kezelés mellett. Továbbá a PACAP képes volt csökkenteni, a JNK1/2, p38 MAPK, ERK1/2 és caspase 3 aktivációját, valamint emelni a CREB foszforilációs szintjét. A kapott eredmények ismét aláhúzták az ozmotikus stressz okozta degenerációs hatásmechanizmus jelenlétét, ugyanakkor igazolták a PACAP erre gyakorolt protektív hatását.

## **A synovialis folyadék celluláris összetételének megváltozása (klinikai vizsgálatok)**

A normál synovialis folyadék celluláris összetételére jellemző a meglehetősen kevés ( $200-300\text{sejt/mm}^3$ ) leukocita, túlnyomó részben monocyta és lymphocyta jelenléte. Azonban az akut haemarthros során ugrásszerűen létrejövő intraarticularis leukocyta szám emelkedés ( $5 \times 10^6 - 10^7/\text{ml}$ ), döntően az ízületben abszolút idegen PMN-ek jelenlétéből adódik. E sejttípus egyik legjellemzőbb tulajdonsága, hogy különböző proinflammatorikus mediátorok (pl. thrombocyta aktiváló faktor, thromboxán, leukotriének, stb.) hatására nagy tömegű reaktív oxigén intermedier (ROI) és további gyulladáshoz vezető faktorok (pl. interleukinok) fokozott termelésébe kezd. A PMN-aktivátorok felszabadulhatnak egyrészt a sérült erek endotheljéből, vagy a sérülés helyén lokálisan összegyűlő thrombocytákból. Számos *in vitro* tanulmány igazolta, hogy a ROI és a belőlük keletkező egyéb agresszív vegyületek, mint pl. a hipoklóros sav, képesek a mátrix proteoglikánok és proteinek szintézisét gátolni a chondrocytáknak. Saját vizsgálataink során pedig kimutattuk, hogy aktivált PMN-ek jelentős oxidatív károsodást képesek létrehozni *in vitro* körülmények között izolált chondrocytákon. Korábbi klinikai vizsgálataink eredményeképpen kimutattuk, hogy bizonyos sejtfelszíni antigének expressziója megváltozik az ízületi vérömlenyben lévő leukocytákon a bevézés során, amely e sejtek aktiválódását sugallja.

A fenti gondolatmenetet folytatva, kutatási programunk végrehajtásának másik fő irányát, a klinikai vizsgálatok jelentették. Korábban igazoltuk, hogy az akut haemarthros során jelentős leukocita-aktiválódás jön létre, amely joggal tartható a patomechanizmus iniciátor faktorának. Az aktivált PMN-ek viszont, az általuk termelt ROI-k révén az oxidatív stressz állapotát hozhatják létre *in situ*, a sérült ízületben.

A patomechanizmus ezen összetevőjének vizsgálatát, a Pécsi Balesetsebészeti és Kézsebészeti Klinika ambulanciáján, akut térsérülés miatt megjelent betegek bevonásával végeztük el. A betegektől az anamnézis felvételét, fizikális és radiológiai vizsgálatot követően, a terápia részeként, steril körülmények között  $45 \pm 15$  ml haemarthrost pungáltunk a sérült ízületből. A punktatúmot és a klinikai vizsgálati protokoll részeként, a punctióval egy időben a cubitalis vénából levett vérminta egy részét speciális biokémiai feldolgozásnak vetettük alá. Az eltérő helyről származó, identikus minták vizsgálata során, az ízületi üregből nyert vvt-k esetében fokozott lipidperoxidációt és csökkent antioxidáns kapacitást sikerült kimutatni. Tekintettel arra, hogy egy adott intraarticularis környezetben a porc és a

vérömlenyben található erythrocyták hasonló módon vannak kitéve az oxidatív stressz károsító hatásainak úgy gondoljuk, hogy eredményeink közvetett módon alátámasztják a ROI-re vonatkozó feltételezéseinket. Az ízületi és szisztémás eredetű vvt-k mellett, a különböző eredetű PMN-eket is összehasonlítottuk, hogy a leukocyta aktiválódást követő ROI termelődést további bizonyítékokkal támasszuk alá. Western-blot analizissel igazoltuk, hogy az ízületi üregből származó PMN-ek esetében fokozott p38MAP kináz aktiválódást találtunk, amely több szerző szerint kapcsolatban áll a ROS termelés fokozódásával.

Tekintettel arra, hogy a PMN aktiválódás során nem csak ROI-k, hanem gyulladáshoz intermedierek is nagy mennyiségben termelődnek, a megkezdett klinikai vizsgálatok további folytatása során, arra kerestünk választ, hogy a PMN aktiváció során milyen mértékben változik meg az intraarticularis milió cytokin profilja. Ennek vizsgálatát ismét a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Balesetsebészeti és Kézsebészeti Klinikájának segítségével végeztük el. Flowcytometriás mérések során meghatároztuk az interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 és tumor necrosis factor alfa (TNF alfa) mennyiségét az egyes vér és punktatum mintákban, majd statisztikai analízist végeztünk. Méréseink a gyulladáshoz citokinek intraarticularis szintjének szignifikáns emelkedését igazolták. Ugyanakkor a gyulladáshoz folyamatok csökkentéséért felelős IL-10 mennyiségének csak diszkrét, statisztikailag nem szignifikáns emelkedését találtuk. Az általuk mért jelentősen megemelkedett intraarticularis citokin értékek egyrészt ismételt alátámasztják az akut haemarthros pathomechanismusában fontos, iniciátor szerepet játszó gyulladáshoz folyamatok jelentőségét.

Úgy gondoljuk, hogy a kutatási program in vitro és klinikai vonalán elért eredmények választ adtak arra, hogy az egyszeri bevérzés valóban eredményezheti az ízületi úgy ahogyan azt a korábbi kísérletek eredményei alapján feltételezzük. A szignál transzdukciós folyamatok elemzése újabb, korábban még nem közölt részleteit tárta fel a chondrocyták ozmotikus stresszre bekövetkező apoptotikus pusztulásának, amely más degeneratív ízületi betegségek kórfolyamatának megértéséhez is értékes információt nyújthat. Továbbá fény derült arra, hogy a patomechanizmus szempontjából fontosnak tartott károsító faktorok közül, melyek azok, amelyeknek jelentőségével számolnunk kell a haemarthrost követő porckárosodások kialakulásának szempontjából, ennél fogva melyek azok a destruktív hatások, amelyeknek csökkentése a terápia szempontjából fokozott jelentőségű. A PACAP-val elvégzett kísérletek felhívták a figyelmet egy olyan ágensre, amely a különböző noxiákra bekövetkező apoptotikus chondrocyta pusztulás kivédésében játszhat fontos szerepet.

A klinikai vizsgálatok segítségével indirekt bizonyítékokat szerezhettünk arra nézve, in situ van-e és milyen mértékű az ízületi porcot érintő oxidatív stressz. Ennél fogva az antioxidáns terápia alkalmazása ízületet érintő sérülések esetén hozzájárulhat-e a mielőbbi gyógyuláshoz. Az ízületi bevérzést követő cytokin túlterhelés pedig meggyőző bizonyítékot szolgáltatott arra nézve, hogy milyen jelentős gyulladásos folyamatok indulnak meg az ízületi üregben megjelenő vér hatására.