

## Zárójelentés

### A vékonybél autotranszplantációt megelőző ischémiás prekondicionálás pathomechanizmusának vizsgálata kísérletes modellben

#### Bevezetés

Az International Intestinal Transplant Registry 2004-es adatai szerint a vékonybél transzplantáción átesett betegek 5 éves túlélése 68%. Az eredmények a többi vizszerális szerv transzplantációját tekintve rendkívül szerénynek mondhatóak. Klinikai alkalmazhatóságát két tényező nehezíti: az egyik a bél fokozott immunogenitása, a másik a bélszövet rendkívüli érzékenysége az ischémiás/reperfúziós (I/R) hatásokra. Az ischémia alatt termelődő oxigén eredetű szabadgyökök (Oxygen Free Radicals; OFRs) a reperfúzió alatt ugrásszerűen felszaporodnak. Így az endogén védelem insufficiensé válik, kialakul az oxidatív stressz állapota membránkárosodással, permeabilitási zavarokkal, bakteriális transzlokációval, a transzportfolyamatok és az enzimműködés károsodásával. A sejtek redox státuszának megváltozása a szignáltranszdukciós folyamatok kóros kisiklását eredményezi.

A szervtranszplantáció egyik fő követelménye a szerv parenchymájának és vaszkulaturájának minél jobb megőrzöttsége, mely a szerv funkcióját biztosítani képes a keringés helyreállítását követően is. Bármely szerv átültetésekor elkerülhetetlen a szerv különböző időtartamú meleg és hideg ischémiája, majd ezt követő reperfúziója. A I/R-s károsodás csökkentésének, a szöveti metabolizmus lassításának egyik módja a szervkonzerválás. Ennek sikerességét a konzerváló oldat és a hideg tárolás idejének optimális megválasztása befolyásolja. A bél számára optimális konzerváló oldat és a még károsodás nélkül tolerálható maximális hideg ischémiás idő nem került meghatározásra az irodalomban.

Az elmúlt 20 évben a szövetek ischémiás prekondicionálásának (IPC) kiváltása az endogén adaptáció új lehetőségeit fedte fel. Ennek kiváltására olyan rövid I/R-s periódusokat alkalmaznak, amelyek nem okoznak szövetkárosodást, de aktiválják az endogén védelmi rendszert, s így a szövet jobban ellenáll a későbbi, tartósabb ischémiás behatással szemben. A kutatások döntő többségét myocardiumon végezték. Az intracelluláris jelátviteli folyamat kaskádrendszerének aktiválódása korai és késői védelmet hoz létre. A korai védelemért a mitokondriális ATP-függő kálium csatornák kinyílása a felelős. A késői védelem kialakulásában az IPC-t követő új, védő fehérjék szintézise játszik szerepet. A vékonybél transzplantációt megelőző IPC hatásának kimutatására kevés irodalmi adat áll rendelkezésre.

A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide; PACAP) elsőként birka hypothalamusból izolálták. A kutatások később kimutatták, hogy a PACAP-nak nem csupán neuroprotektív hatása van. A 38 aminosavból álló PACAP-38 fiziológiásan termelődik a teljes gasztrointestinális traktusban és ismert a vékonybél szekrécióban és motilitásban kifejtett központi szerepe. A vékonybél I/R modellekben a PACAP-38 hatását eddig még nem vizsgálták.

## Saját kutatási eredmények

Kutatásaink középpontjában a vékonybél transzplantációval szorosan összefüggő, a bél anatómiai és élettani sajátosságaiból következő I/R-s túlérzékenységeinek tanulmányozása, ill. ennek mérséklésére irányuló vizsgálatok állnak. A kísérleteket állatmodellen végeztük (kutya, patkány) a PTE Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága engedélyével (BA02/2000-29/2001).

### *A vékonybél ischémiás prekondicionálásának korai hatása*

Korábbi eredményeink alapján felmerült a kérdés, hogy milyen módon lehetne növelni az I/R károsodásokkal szembeni védelmet. Állatmodellben az a. mesenterica superior occlusiójával különböző ciklusú IPC-t alkalmaztunk a bélgraft autotranszplantációja előtt. Kimutattuk, hogy az endogén adaptáció indukálása a hideg konzerválást követő oxidatív stressz kialakulását csökkenti, életképességét kedvezőbbé teheti egy következményes transzplantációra. A vizsgált paraméterek közül a malondialdehid (MDA) koncentrációja a kontroll értéket csak kis mértékben haladta meg, mely a károsodás mérséklődését jelezte. Az endogén scavenger redukált glutation (GSH) szintje szignifikánsan emelkedett valamennyi csoportban 2 és 3 órával az IPC után ( $p < 0.05$ ). A szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitása meghaladta a kontroll értéket a prekondicionálást követően. Ez az emelkedés szignifikáns volt az IPC-t követő 3. órára ( $p < 0.05$ ). Ezek az eredmények alátámasztották a vékonybél szövet prekondicionálásával kapcsolatos hipotézisünket. Mely szerint az IPC a vékonybélben is fokozza az oxidatív stresszel szembeni védelem kialakulását. Biokémiai méréseink jó alapot szolgáltatnak a prekondicionálás mechanizmusának molekuláris biológiai módszerekkel való meghatározásához.

További megerősítését szolgálta a prekondicionálási kaszkád beindulásának az a tény, hogy az általunk alkalmazott IPC protokoll az NF-kB aktivációját váltotta ki. Vizsgáltuk az NF-kB transzkripció faktor aktiválódását ELISA módszerrel különböző időtartamú és ciklusszámú prekondicionálási protokoll révén. Kimutattuk, hogy az 1 perc ischémia és 1 perc reperfüzió képes kiváltani mind a citoplazmális (totál NF-kB), mind a nukleáris NF-kB aktivációt. Ez az indukció valamennyi prekondicionálási protokoll esetén bifázisos aktivációt mutatott. Rámutattunk arra is, hogy vékonybél prekondicionálás kiváltotta NF-kB aktiváció esetén, más szervekhez hasonlóan is érvényes a „minden vagy semmi törvény”. Ezzel megerősítettük bélszövetnél a Goto által szívizomnál leírt küszöbhipotézisét.

### *A vékonybél ischémiás prekondicionálásának késői hatása*

A kísérleti állatokon az első nap IPC-t alkalmaztunk 4 ciklusban (1 ciklus 5 perc ischémiából és 10 perc reperfüzióból állt). 24 óra múlva elvégeztük az autotranszplantációt. Eredményeink szerint az IPC késői hatása okozta a legkisebb szöveti oxidatív károsodást. Az IPC késői hatásainak vizsgálatok kimutattuk a szöveti hő shock protein 72 (HSP-72) indukcióját immunhisztokémiai módszerrel.

### *PACAP hatása a bélszövet meleg ischémia/reperfüziós károsodására*

I/R-s modellben a reperfüzió ideje alatt bólus, majd folyamatos intravénás PACAP-38 kezelést adtunk az állatoknak. A biokémiai vizsgálatok I/R csoportokban emelkedett MDA koncentrációt mértünk a reperfüzió végére. Ez az emelkedés szignifikáns volt a 3 óra ischémia után ( $p > 0,05$ ). Ezzel párhuzamosan a GSH koncentráció és SOD aktivitás szignifikáns csökkenését mértük. Ezzel szemben a reperfüzió során PACAP-38-al kezelt csoportokban csökkent a lipidperoxidáció a reperfüzió végére. A GSH koncentráció és SOD aktivitás jobban megőrződött a kontroll értékhez képest. Megállapítottuk, hogy I/R

következtében súlyos oxidatív károsodás lép fel a bélszövetben. Ezt a károsodást csökkentette a reperfúzió alatt adott intravénás PACAP-38 kezelés.

A kontroll és a PACAP-38-al kezelt áloperált csoportok között nem volt lényeges különbség a szöveti szerkezet tekintetében. Az 1 órás ischémia csak enyhe károsodást okozott a bélstruktúrában. 2 órás ischémia a mucosális réteg destrukcióját okozta, mely a reperfúzió végére tovább fokozódott. Ezzel szemben, ha a 2 órás ischémiát követő reperfúzió alatt PACAP-38 kezelés történt a vékonybél szöveti szerkezete kevésbé károsodott. 3 órás ischémia a struktúra durva károsodását okozta, a reperfúzió végére a mucosális réteg teljes mértékben destruálódott. Ezt a PACAP-38 adása szignifikánsan csökkentette, melyet mind a mucosális réteg (boholyszerkezet), mind a musculáris réteg szerkezeti megőrzöttsége jelzett ( $p < 0.05$ ).

Immunhisztológiai vizsgálatokkal és Western blot technikával kimutattuk, hogy a vékonybél I/R-ja a MAP kinázok közül a foszforilált ERK1/2 szintjét csökkenti, míg a JNK1/2 és a p38 MAP kináz aktivitását fokozza. A kontroll mintákhoz képest ez egy fokozott apoptózis indukciót jelent. Fenti modellben a PACAP-38 intravénás perfúziója védelmet jelentett a programozott sejthalál jelátviteli folyamatának beindulása tekintetében, melyet a MAP kinázok aktivitásának változása jól jelzett.

A PACAP-38-al végzett bevezető kísérletek után tervezzük a PACAP hatásának vizsgálatát vékonybél konzerválási és autotranszplantációs modellekben.