



**A VÉKONYBÉL ISCHAEMIÁS/REPERFÚZIÓS
KÁROSODÁSÁNAK ÉS VÉDELMI MECHANIZMUSAINAK
VIZSGÁLATA KÍSÉRLETES ÁLLATMODELLEKBEN**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Nedvig Klára

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Vezető: Prof. Dr. Kovács L. Gábor, akadémikus

**„Keringésszabályozási állapotok vizsgálata kísérletes modelleken és klinikai beteganyagban”
című program**

Programvezető: Dr. Jancsó Gábor, egyetemi docens (Pécsi Tudományegyetem, ÁOK)

Témavezető: Dr. Ferencz Andrea, egyetemi docens (Semmelweis Egyetem, ÁOK)

Prof. Dr. Lőrinczy Dénes, egyetemi tanár (Pécsi Tudományegyetem, ÁOK)

**Készült a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Sebészeti Oktató és Kutató Intézetében**

Pécs

2016

1. Bevezetés

Az International Intestinal Transplant Registry 2013-as adatai szerint jelenleg a világ 21 országának 77 centrumában évente kb. 1300 betegen végeznek izolált vagy multiviscerális vékonybél átültetést. Ebből Európában 25 helyen történik bélátültetés, hazánkban nem végeznek ilyen műtétet. A recipiensek és a graftok 1 és 3 éves túlélése 75-70 %, míg az 5 éves túlélés 60 % alatt van. A műtétek száma és a túlélési adatok messze elmaradnak a többi hasi szerv transzplantációs statisztikái mögött.

A vékonybél elégtelenség hátterében a szerv veleszületett teljes vagy részleges hiánya, vagy a szerv különböző mértékű reszekciója állhat. Ha a vékonybél traktus hosszának több mint 70 %-a hiányzik vagy jelentős részén tartós működészavar áll fenn, akkor un. rövidbél-szindróma jön létre. Ekkor felnőtteknél a működőképes vékonybél hossza 2 méternél rövidebb, ami a folyadék- és elektrolitháztartás és az alapvető tápanyagok felszívódási zavarát okozza, és végül súlyos alultápláltságot és dehidrációt eredményez. Konzervatív megoldásként a betegek teljes parenterális táplálása jön szóba, mely kezelés alatt álló felnőttek 2-5 %-nál, míg a gyerekek 10-15 %-nál alakul ki olyan életveszélyes szövödmény, ami kuratív megoldásként vékonybél átültetést tesz szükségessé. Számos gyerek- és felnőttkori alapbetegség (intestinális poliposis, Hirschsprung betegség, gastroschisis, nekrotizáló enterocolitis, ischaemia, trauma, volvulus, Crohn betegség, Gardner szindróma, irradiációs bélsérülés, stb) állhat a klinikai probléma hátterében.

A vékonybél transzplantációját alapvetően két tényező nehezíti: jelentős immunológiai szerepe, és fokozott érzékenysége az ischaemiás/reperfúziós (I/R) károsodásra. A kiemelten fontos immunszerv transzplantációjakor a bélfalban és a mesentériumban jelenlévő nagyszámú nyirokszövet is átültetésre kerül. Ez a fő oka a graft versus host disease-nek, vagyis a szervkilöködésnek, illetve az átvitt immunsejtek az immunuszupprimált beteg ellen fordulva host-versus-graft-disease-t okoznak.

A bélátültetést nehezítő másik tényező a szerv fokozott érzékenysége az I/R károsodásokra. Ennek nagyságát a hipoxia súlyossága és fennállásának időtartama határozza meg. A reperfúziós-paradoxon jelenségét először 1986-ban Park és Granger macskafélék I/R-s bélmodelljében írták le. E szerint a reperfúzió során kialakult szövetkárosodás mértéke jelentősebb, mint ami az ischaemia ideje alatt kialakul. Az I/R különböző sejtes interakciókat generálhat, melyek mikrovasculáris károsodáshoz, celluláris nekrozishoz és/vagy apoptózishoz vezetnek. A splanchnikus artériák elzáródása és az azt követő reperfúziója a polymorphonuclearis (PMN) leukociták aktivációjával és adhéziójával járó vasculáris permeabilitás növekedésén keresztül keringési elégtelenséget, illetve a proinflammatorikus faktorok, a nitrogén- és az oxigén eredetű szabadgyökök (Oxygen Free Radicals, OFRs) felszabadulását idézik elő. Ezek a membránok lipidperoxidációját, a fehérjék és a DNS károsodását, és végül sejthalált okoznak. Az I/R az izomszövet károsítása révén motilitási zavarokhoz vezet, melynek hátterében az OFRs és a sejtek kalciumháztartásának zavara áll. A vékonybélben bekövetkező I/R a mucosális barrier károsodása révén bakteriális transzlokációt, szisztémás gyulladást okoz, és az elektrolit és a sav-bázis háztartás eltolódását vonja maga után. A súlyos károsodás szepszist, sokszervi elégtelenséget (Multi Organ Failure) és a beteg halálát okozhatja.

Transzplantáció során a meleg ischaemiás károsodás csökkentése az átültetendő szerv hűtésével történik. Ennek első lépése a perfúzió, amikor hideg konzerváló oldattal a graft érrendszerén keresztül a vér kimosásra kerül, majd olvadó jég között tartott, 4 °C-os konzerváló oldatban különböző ideig tároljuk. Humán vékonybél izolált vagy multiviszcerális transzplantációja esetén ma a legelfogadottabb az University of Wisconsin (UW) oldat használata. Ez volt az első intracelluláris ozmolaritású oldat, melyet az 1980-as évek végén fejlesztettek ki. Az UW oldat ozmotikus koncentrációjának állandóságát olyan metabolikusan inert molekulák biztosítják, mint a laktobinát és a raffinóz; a hidroxietil-keményítő tartalma megelőzi az ödéma kialakulását és többek között antioxidánsokat (glutathion, allopurinol) és energiaforrásként adenzint tartalmaz. A sejtek metabolikus aktivitását és esetleges károsodását önmagában a hideg konzerváló oldat használata csökkenti ugyan, de maga a konzerválási folyamat elkerülhetetlenül együtt jár a szerv hideg ischaemiás károsodásával.

A szervek I/R-s kutatásai és ezen belül is a transzplantációval kapcsolatos vizsgálatok több évtizedes múltra tekintenek vissza. Az alapmechanizmusok ismeretében ma a vizsgálatok célkeresztjében a károsító és védelmi folyamatok molekuláris hátterének kutatása áll, melyekhez kutatócsoportunk különböző vékonybél transzplantációs állatkísérletes modellek vizsgálatával kívánt hozzájárulni.

2. Meleg és hideg ischaemia/reperfúziót követő vékonybélkárosodás vizsgálata

2.1. Célkitűzés

Kutatásunk első részében különböző időtartamú meleg I/R-t, és hideg konzerválást követő vékonybél autotranszplantációt hoztunk létre és a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen mértékű oxidatív stressz lép fel meleg és hideg ischaemia után a reperfundált bélszövetben?
2. A hideg konzerválás mennyiben csökkenti a sejtek oxidatív károsodását?
3. Hogyan változik a bél strukturális szerkezete az ischaemiás idők növelésével?
4. A károsodások kimutathatók -e DSC technikával? És ha igen, akkor van -e különbség az egyes bélfalrétegekben létrejövő változások esetén?

2.2. Anyag és módszer

2.2.1. Kísérleti csoportok és műtéti módszerek

Felnőtt, hím, Wistar patkányokat (testtömeg: 250-300 g; $\Sigma n = 35$) használtunk kísérleteinkhez. A műtét előtt 24 óráig csak cukros vizet fogyaszthattak. Az érzéstelenítés intramuscularisan (im.) adott ketamin-hidroklorid (0,01 mg/ttg) és diazepam (0,01 mg/ttg) injekcióval történt (Richter Gedeon, Budapest, Magyarország). A vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága engedélyében (BA02/2000–9/2008) megadott módon végeztük el.

A meleg ischaemiás csoportokban median laparotomiát követően felkerestük az a. mesenterica superior-t, melyet kiproparáltunk és atraumatikus klip felhelyezésével 1 órás (A1. csoport), 3 órás (A2. csoport) és 6 órás (A3. csoport) teljes ischaemiát hoztunk létre. A klipek eltávolítása után 3 órás reperfúziót kezdtünk.

A hideg ischaemiás csoportokban a laparotomia után a vékonybelet a Treitz-szalagtól az ileocecalis részig reszekáltuk. A bél lumenét fiziológiás sóoldattal mostuk át, antibiotikumot nem alkalmaztunk. A graftokat perfundáltuk és 4 °C-os UW oldatban (Via-span, Bristol-Myers Squibb GesmbH, Bécs, Ausztria) tároltuk 1 órán (B1. csoport), 3 órán (B2. csoport) és 6 órán (B3. csoport) keresztül. A konzerválás után mikrosebészeti technikával (8/0-s, szintetikus, monofil, nem felszívódó fonal felhasználásával), end-to-end éranasztomózisokkal egyesítettük az érvégeket orthotopicus módon (autotranszplantáció). Bélanasztomózist nem készítettünk. A reperfúziót minden csoportban 3 órán át tartottuk fenn. Valamennyi kísérleti csoportban a vékonybél jejunalis szakaszából biopsziát vettünk a laparotomia után (kontroll: K) és a reperfúziós periódusok végén. Az áloperált (sham operated: S) állatoknál a laparotomia után (kontroll mintavétel) és az ischaemiás csoportok biopsziáival analóg időben vettünk szövetmintákat.

2.2.2. Biokémiai vizsgálatok

Szövethomogenizátumból gyári kiték segítségével, spektrofotometriás módszerekkel határoztuk meg az oxidatív stresszt jelző paramétereket. A lipidperoxidáció indirekt markereként ismert malondialdehid (MDA) koncentrációját Lipid Peroxidation Assay Kit-tel (Calbiochem, Darmstadt, Németország) mértük. A mérés során a mintában lévő MDA a tiobarbitursavval (TBA) reakcióba lépve MDA-TBA komplexet képez. Szintjét kolorimetriás módszerrel (OD=532 nm), µmol/g nedves szövet értékben kaptuk meg

Az endogén antioxidáns scavenger redukált glutation (GSH) szintjét Glutathione Assay Kit (Calbiochem) felhasználásával mértük. A módszer lényege, hogy a GSH molekula egy kromofór thiollá alakul át, melynek abszorbanciáját 400 nm-es hullámhosszon mértük, és az eredményt µmol/g nedves szövet értékben adtuk meg.

Az endogén antioxidáns szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim aktivitását Superoxide Dismutase Assay Kit (Calbiochem) segítségével határoztuk meg. A kit egyik reagense alkalikus autooxidáción megy át, mely átalakulást a mintában lévő SOD fokozza. Az autooxidáció eredményeképpen képződött kromofór abszorpció maximuma 252 nm-en van. A SOD aktivitását IU/g nedves szövet értékben adtuk meg.

2.2.3. Morfológiai vizsgálatok

A szövettani vizsgálatokhoz a bélmintákat 10 %-os formalinban való fixálást és dehidrációt követően paraffinba ágyaztuk. A 4 µm vastag metszeteket haematoxin-eozin módszerrel festettük. A szerkezeti károsodások meghatározása egyrészt kvalitatív módon, a Park-féle hisztológiai klasszifikáció alapján történt fénymikroszkópos (Nicon Eclipse 80 Light Microscope, Kingston, Anglia; 100-szoros nagyítás) feldolgozás után. Másrészt kvantitatív módszerrel meghatároztuk a mucosa, a submucosa és az izomréteg vastagságát, valamint a kripták mélységét. A méréseket a minták 5-5 metszetén, metszetenként 5 különböző helyen végeztük 400-szoros nagyítás mellett Scion Image Software (Scion Corporation, USA) segítségével. Az eredményeket µm-ben adtuk meg.

2.2.4. DSC analízis

A minta fizikai és kémiai tulajdonságainak a hőmérséklet függvényében történő megváltozását mérő metodikákat termikus módszereknek nevezzük. A differenciál pásztázó kalorimetriát (Differential Scanning Calorimetry: DSC), mint termoanalitikai módszert az 1960-as években Watson és O'Neill főként ásványok és egyéb szerves anyagok fizikai tulajdonságainak meghatározására fejlesztette ki az USA-ban. Később ezt a szenzitív és validált analitikai módszert számos biológiai makromolekula szerkezeti változásainak kimutatására használták, és a 2000-es évektől a kísérleti állatmodellek vizsgálata mellett a különböző klinikai kutatásokban is létjogosultságot nyert.

A módszer megértését szolgáló alapvető tényezők, szempontok a következők. Az egyes anyagok, így a biológiai minták is a hőmérséklettől függően különböző kémiai vegyület formájában, vagy különböző kristályszerkezetben vannak jelen a sejtekben vagy szövetekben. Élő szervezet esetén ez a hőmérsékleti tartomány viszonylag szűk, általában 36-37 °C körül van. A hőmérséklet változtatásával elérhetjük azt a pontot, ahol az adott anyag kémiai formája, kristályszerkezete vagy halmazállapota megváltozik. Ezen átalakulások az adott anyagra jellemzőek, illetve különböző noxa hatására a molekulában/mintában bekövetkező változások sajátos képet adnak. Az átalakulást hőjelenség kíséri. Detektálva az átalakulás, vagy átalakulások hőmérsékletét (T_{m1} , T_{m2} , T_{m3} , ... T_{mx}), illetve az eközben elnyelt vagy felszabaduló termikus energiát azonosíthatjuk az anyag kémiai szerkezetét, ha azt összehasonlítjuk ismert, tiszta kémiai anyagoknál már mért hőjelenségekkel.

A DSC készülék két mintatartót tartalmaz, melyek közül az egyik a vizsgálandó mintát, míg a másik a referencia anyagot tartalmazza. Ez utóbbinak inertnek kell lennie, vagyis a mérés során semmilyen szerkezeti változást nem szenvedhet el. A módszer azt az elektromos teljesítményt méri, ami ahhoz szükséges, hogy a mintát és a referencia anyagot felfűtés vagy lehűtés során azonos hőmérsékleten ($\Delta T=0$) tarthassuk.

A DSC-termogram kiértékelésekor arra kapunk választ, hogy a görbén a hőmérséklet növelésével hogyan változott a hőáram, vagyis időegység alatt az anyagon átáramló hőmennyiség. Egy adott hőmérsékletnél (maximális átalakulási/denaturációs hőmérséklet: T_m ; a görbe csúcsa) a teljes makromolekula mennyiségének 50 %-a denaturálódik. Ezek után több denaturálódott fehérje lesz és egyre kevesebb alakul át időegység alatt, így egyre kevesebb többlet energiát kell a mintába táplálni. Egy zárt rendszerben, állandó nyomáson a mért hőáram a minta és a referencia közti hőegyensúly megtartásához szükséges befektetett kompenzációs hőfluxus mérhető elektromos teljesítménnyé alakítva, vagyis az entalpiaváltozás (ΔH).

A DSC mérésekhez a teljes bélfalat és annak szétválasztott rétegeit (mucosa, simaizom) használtuk fel. A bélszövet termikus denaturációját SETARAM Micro DSC-II kaloriméterrel határoztuk meg. Minden mérést 0-100 °C közötti hőmérsékleti tartományban végeztünk el 0,3 °K/perc felfűtési sebességet alkalmazva. A kísérlet során átlagos Hastelloy-mintakamrákat alkalmaztunk, ahol a minták térfogata átlagosan 850 μ l, nedves tömege pedig 100-150 mg volt. A meleg ischaemiás csoportok mérésénél referencia oldatként fiziológiás sóoldatot (0,9 % NaCl), míg a hideg ischaemiás csoportoknál UW oldatot használtunk. A minta- és referenciacellák tömegét $\pm 0,1$ mg pontossággal táraztuk ki, így a minta- és a referenciaedények közötti esetleges hőkapacitáskülönbség korrigálására

nem volt szükség. A kalorimetrikus entalpiát a hőabszorpció görbe alatti területből 2-végpontos SETARAM csúcspontok integrációjával számítottunk ki. Az adatok grafikus feldolgozása ASCII konverzió után Origin programmal (ver. 6.0, Microcal Software Inc, Northampton, USA) történt.

2.2.5. Statisztikai analízis

Az eredmények értékelésekor átlagot és standard errort (SE) számoltunk. Az adatokat ANOVA varianciaanalízissel dolgoztuk fel. A szignifikancia mértéke $p < 0,05$ volt. Az adatok kiértékeléshez a MicroCal Origin (ver. 6.0) programot (Microcal Software, USA) alkalmaztuk.

2.3. Eredmények

2.3.1. Biokémiai vizsgálatok eredményei

A szövetminták MDA koncentrációja valamennyi meleg ischaemiás csoportban emelkedett a reperfúzió végére. Az emelkedés a 3 és 6 órás ischaemia után szignifikáns volt (A2 és A3 vs. K; $p < 0,01$; $p < 0,001$). A hideg ischaemia mérsékelte a szöveti lipidperoxidáció mértékét, de 3 és 6 óra után -a kontroll mintákhoz képest- itt is szignifikáns emelkedést találtunk (B2 és B3 vs. K; $p < 0,05$). A meleg ischaemiás csoportokkal összehasonlítva a konzerválás csökkentette a bélben bekövetkező lipidkárosodás mértékét, mely a 6 órás csoportnál már szignifikáns eltérés volt (B3 vs. A3; $p < 0,05$).

A bélszövet GSH szintje szignifikánsan csökkent a 3 és 6 órás meleg ischémiát követő reperfúzió végére (A2 és A3 vs. K; $p < 0,05$; $p < 0,001$). Azonos idejű hideg ischaemia mérsékelte a GSH koncentrációjának csökkenését. Míg a 6 órás mintákban a GSH szint szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest, addig ez szignifikánsan magasabb értékű volt a meleg ischaemiás értékhez képest (B3 vs. K; B3 vs. A3; $p < 0,05$).

A minták SOD aktivitása a meleg ischaemiás idő növekedésével arányosan szignifikáns csökkenést mutatott (A1, A2 és A3 vs. K; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). Értéke hideg ischaemia hatására is szignifikánsan csökkent, bár az aktivitás számértékileg magasabb maradt (B1, B2 és B3 vs. K; $p < 0,05$). A 3 és 6 órás hideg konzerválás hatására jobban megőrződött az enzim aktivitása, mint az azonos idejű meleg ischaemiás csoportokban (B2 vs. A2, B3 vs. A3; $p < 0,05$; $p < 0,01$).

2.3.2. Szöveti vizsgálatok eredménye

A Park-féle klasszifikáció szerint a kontroll- és áloperált csoportokban normál szöveti struktúra volt megfigyelhető. Az 1 órás meleg ischaemiát követő reperfúzió végén a villusok kismértékű leválását tapasztaltuk (2. stádiumú károsodás), míg 3 órás ischaemia már jelentős epithellevállást okozott (3. stádium). Hat órás ischaemia után, a legmagasabb, 5-ös fokozatú károsodás alakult ki denudált villusokkal, a lamina propria és a kripták decellularizációjával és végső soron a bélstruktúra teljes szétesésével. A hideg konzerválás kisebb mértékű strukturális károsodást okozott a bélszerkezetben, kivétel ez alól a 3 órás csoport, ahol a meleg ischaemiás csoporthoz hasonló károsodás volt.

A Scion Image kvantitatív analízis szerint a szöveti sérülés mértéke egyenes korrelációt mutatott a meleg ischaemia idejével. A 3 és 6 órás meleg ischaemia és azt követő reperfüzió szignifikánsan csökkentette a mucosa, a submucosa és az izomréteg vastagságát, valamint a kripták mélységét a kontroll és az áloperált szövethez képest (A2 és A3 vs. K és S; $p < 0,05$). A hidegen konzervált bélszövetben is mérhető volt csökkenés az említett rétegekben, de a meleg I/R-s csoportokhoz képest szignifikánsan nagyobb maradt a mucosa vastagsága a 3 és 6 órás csoportok esetén (B1 vs. A1; B2 vs. A2; B3 vs. A3; $p < 0,05$). A szöveti szerkezetben bekövetkező károsodásoknak az ischaemiás idővel való korrelációja főként a mucosa és submucosa rétegeknél volt jelentős, a kripták esetében már kevésbé volt látványos, míg a bélfal izomrétegében mért változások voltak a legkevésbé szembetűnőek.

2.3.3. DSC vizsgálatok eredménye

A DSC görbék alapján a bél nyálkahártyájának szerkezete jelentős változásokon ment át a különböző típusú és időtartamú ischaemiás periódusok végére. A kontroll bélminták DSC görbéje exoterm átalakulásra utal, ahol az átmeneti hőmérséklet (T_m) $53,6\text{ }^\circ\text{C}$ és a teljes kalorimetriás entalpiaváltozás (ΔH) $-4,1 \pm 0,22\text{ J/g}$ volt. A meleg ischaemiás idő növekedésével csökkenő tendencia látható mind a T_m , mind a ΔH tekintetében. Három órás meleg ischaemia hatására a T_m $48,7 \pm 0,2\text{ }^\circ\text{C}$ -ra, míg az entalpia $-1,7 \pm 0,2\text{ J/g}$ értékre csökkent. Kivétel ez alól a 6 órás meleg ischaemia mucosára gyakorolt hatása, ahol extrém nagy entalpiaváltozás látható, meghaladva az 1 és 3 órás meleg ischaemiánál és a kontroll mintáknál mért értékeket.

A bélfal simaizomrétegében a kontroll minták kettő denaturációs átmenetet mutattak: $T_m = 52,8\text{ }^\circ\text{C}$ a miozinfaj, míg az $58,1\text{ }^\circ\text{C}$ -os és az $59,9\text{ }^\circ\text{C}$ -os átmenetek a miozinvég és az aktin izomfehérjék értékei. Együttes kalorimetriás entalpiájuk $0,59\text{ J/g}$ volt. Egy órás meleg ischaemia hatására a fő denaturációs csúcs egy keskenyebb félszélességgel áttolódott a konvencionális aktin denaturációs tartományába ($62\text{ }^\circ\text{C}$). Ez arra utal, hogy az aktomiozin-komplexben a miozinvég nem tud felolvadni, ami sokkal jelentősebb szerkezeti változást bizonyít alacsonyabb entalpiaváltozással ($\Delta H = 1,4\text{ J/g}$). Három órás meleg ischaemia az izomrétegben T_m emelkedést és a kalorimetriás entalpia csökkenését okozta. Az izomkomponensek DSC görbénél jól látható, hogy 6 órás ischaemia hatására a T_m $52\text{ }^\circ\text{C}$ és $59\text{ }^\circ\text{C}$ volt, míg az entalpia extrém módon $3,1\text{ J/g}$ értékre emelkedett meg.

A teljes bélfal tekintetében az ischaemia nagyfokú variabilitást okozott. Egy órás meleg ischaemia hatására tisztán látható a mucosa átalakulás megjelenése ($T_m = 23\text{ }^\circ\text{C}$). Az aktin- és a miozinkomponensek sokkal jobban külön váltak a megnövekedett olvadási hőmérsékleten ($50,5\text{ }^\circ\text{C}$; $60,2\text{ }^\circ\text{C}$). Továbbá maga a miozinszál sem különült el az aktin termikus denaturációjától. A 3 órás meleg ischaemia hatása kifejezett volt a mucosában. Az izomfehérjék tekintetében a 3 órás meleg ischaemia egy fő átmeneti hőmérsékletet mutatott ($T_m = 59,8\text{ }^\circ\text{C}$). Míg a 6 órás meleg ischaemia a teljes bélfalban a legnagyobb kalorimetrikus entalpiát eredményezte az aktomiozin-komplex tekintetében.

Egy órás hideg ischaemia hatására a mucosában alacsonyabb hőmérsékleten is látható denaturáció ($T_m = 30,4 \pm 0,2\text{ }^\circ\text{C}$) magasabb tartományba mozdult el az eredeti átmeneti hőmérséklet

($T_m=59,3\pm 0,2$ °C) és a teljes kalorimetriás entalpiaváltozás $-5,94\pm 0,4$ J/g volt. Ezzel szemben a 3 órás hideg konzerválás 2,2 °C-kal emelte az első hőmérsékleti átmenetet, míg az entalpia $-2,67$ J/g-ra csökkent. A 6 órás hideg ischaemia az entalpiát tovább csökkentette.

A hideg ischaemia a vékonybél simaizomrétegében kisebb mértékű strukturális változást okozott ($T_m=53,5$ °C, 56 °C; $\Delta H=2,21$ J/g), mint az azonos idejű meleg ischaemiás mintákban ($\Delta H=1,4$ J/g). Az 1 órás hideg konzerválás is okozott strukturális változásokat, főként a miozin doménjében és az aktin-miozin interakcióban. Míg a 3 órás meleg ischaemia hatására az izomrétegben T_m emelkedés és kalorimetriás entalpia csökkenése volt megfigyelhető, addig a hideg konzerválás hatására csökkenés látható a denaturációs hőmérséklet és emelkedés az entalpia tekintetében ($T_m=53,6$ °C, 58,3 °C; $\Delta H=3,4$ J/g) (5. táblázat). Az izomkomponensek DSC görbéi a 6 órás konzerválás utáni mintákban meglepően hasonló termikus paramétereket mutattak, mint 6 órás meleg ischaemia után.

A teljes bélfal hideg ischaemiás vizsgálata során is jól látható a bélfal szerkezeti összetettségéből adódó jelentős variabilitás. Egy órás hideg ischaemia kettő termikus átmenetet ($T_m=53,5$ °C, 56 °C) eredményezett. A 3 órás konzerválás hatása a mucosában volt kifejezett. Az izomfehérjék tekintetében a 3 órás hideg konzerválás okozta a legnagyobb strukturális változásokat 3 termikus átmenettel ($T_m=53$ °C, 55 °C, 59,6 °C). Mindezek mellett a 6 órás konzerválás hatással volt a mucosa kalorimetriás megjelenésére és jelentős változást okozott az aktin/miozin megjelenésében is.

2.4. Megbeszélés

A vékonybél meleg és hideg I/R-ös károsodásával kapcsolatos kutatások több évtizedes múltra tekintenek vissza, melyek az első kísérletsorozatban kapott eredményeink számára jó összehasonlítási alapot adtak. Meleg I/R-ös vizsgálataink biokémiai eredményei szerint az ischaemiás idő növelésével arányos oxidatív károsodás lépett fel a reperfundált bélben. Már 1 órás meleg ischaemiakor fellépett az OFRs okozta oxidatív stressz lipidperoxidációval és az endogén scavenger és antioxidáns enzimek aktivációjával. A folyamat láncreakcióként terjed, 3 és 6 órás ischaemia újabb gyököket generálva okozott károsodást. Méréseink jelentőségét az adja, hogy meleg ischaemiát követően a sejtmembránok fizikai-kémiai tulajdonságainak megváltozása destabilizálja a receptor-ligand interakciókat és megváltoztathatja a sejt kontaktust az extracelluláris állománnyal. Ezek az eredmények igazolták a lipidperoxidáció szerepét a szövetek károsodása és a sejtek diszfunkciójának előidézésében.

Számos ischaemiás állatmodellben leírták mind a szisztémás, mind a lokális membránkárosodást jelző szöveti MDA koncentráció emelkedését. Az MDA koncentráció mind a bélnyálkahártyában, mind pedig a plazmában 3-4-szeresre növekedett a korai (5 perces) reperfüzió során és kb. a reperfüzió 3. órájára éri el a maximumát. Abban a tekintetben azonban nincs egységes álláspont az irodalomban, hogy mennyi az a meleg ischaemiás időtartam, ameddig a bélkárosodás reverzibilisnek tekinthető. Giele és munkatársai patkánymodellben kimutatták, hogy a vékonybél kritikus meleg ischaemiás ideje 40 perc. Ha a meleg ischaemia ennél hosszabb volt, akkor minden esetben haemorrhagiás enteropathia lépett fel. Slavikova ezt 45 perces, Beuk 60 perces, Park 90 perces, míg Schweizer 2 órás időintervallumban határozta meg a kritikus meleg ischaemiás periódust.

A sejtek alapvető celluláris védekezését jelentő endogén scavenger GSH koncentrációja vizsgálatunkban csak 3 és 6 órás ischaemia után csökkent szignifikánsan. Sola és munkatársai a szöveti GSH szint lefeleződését írta le 90 perces ischaemiát követő 30 perces reperfüziós mintákban. Az endogén antioxidáns SOD szöveti aktivitása mindhárom csoportban szignifikánsan csökkent. Ennek oka, hogy a reperfüzió alatt termelődő, kimosódó óriási számú OFRs-t az endogén SOD nem képes dizmutálni. Deshmukh is kimutatta, hogy vékonybél ischaemia során jelentősen csökken a SOD aktivitása. Ez több tényezőnek is köszönhető: egyrészt csökken az enzim aktivitása, másrészt csökken a SOD mennyisége, harmadrészt pedig csökken a SOD szintézise is.

Kísérleti eredményeink szerint az azonos idejű meleg ischaemiával összehasonlítva a UW oldatban végzett hideg konzerválás csökkentette a bélszövet oxidatív károsodásának mértékét. Szöveti lipidperoxidáció a hideg I/R-s csoportokban is mérhető volt, de a károsodás mértéke kisebbnek mutatkozott. A bél 3 órás konzerválás során kb. akkora lipidperoxidációs károsodást szenvedett el, mint 1 órás meleg ischaemia után. Sőt a 6 órás ischaemiát követő reperfüziós mintáknál a szövet MDA szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a meleg ischaemiás eredményekhez képest. Ehhez hasonló eredményekről számolt be De Oca kutatócsoportja, mi szerint lipidperoxidáció a hosszabb ideig konzervált bélben is emelkedik, de jelentős MDA koncentrációemelkedést nem találtak, ha a bél tárolási ideje 40 percnél rövidebb volt.

Az azonos idejű hideg ischaemia mérsékelte a GSH koncentrációjának csökkenését. Míg a 6 órás mintákban a GSH szint szignifikánsan csökkent a kontrollhoz képest, azonban szignifikánsan magasabb maradt a meleg ischaemiás értékhez képest. A bélminták SOD aktivitása hideg ischaemia hatására is szignifikánsan csökkent, bár az aktivitás számértéke magasabb maradt. A 3 és 6 órás hideg konzerválás hatására jobban megőrződött az enzim aktivitása, mint az azonos idejű meleg ischaemiás csoportokban. Hasonló eredményekről számolt be Zhang és munkatársai, akik 12 órás UW, EC és Ringer Laktát oldatban történő tárolás után a vékonybél graftokban bekövetkező károsodásokat hasonlították össze. Összességében elmondhatjuk, hogy a vékonybél kb. 3 órás hideg konzerválást képes tolerálni súlyosabb oxidatív károsodás nélkül.

A vékonybél meleg és hideg ischaemiás eredetű károsodása gyakran előforduló probléma a klinikai gyakorlatban. E kórképek rutin diagnosztikája standard, haematoxylin-eosin-festett szövettani módszer alapján történik, és kiértékelésüknél számos különböző hisztológiai stádiumbeosztást alkalmaznak. Vizsgálatainkban a szöveti szerkezetben bekövetkező változásokat Park-féle kvalitatív és Scion Image Software alkalmazásával kvantitatív módon határoztuk meg. Egy órás meleg ischaemiát követő reperfüzió végén ép kriptaszerkezet mellett a villusok kismértékű leválását tapasztaltuk, míg 3 órás ischaemia már jelentős epithel leválást és helyenként megjelelő kriptakárosodást okozott. Hat órás ischaemia után, a legmagasabb fokozatú károsodás alakult ki denudált villusokkal, a lamina propria és a kripták decellularizációjával és végső soron a bélstruktúra teljes szétesésével. A hideg konzerválás kisebb mértékű strukturális károsodást okozott, kivétel ez alól a 3 órás csoport voltak, ahol a meleg ischaemiás csoporthoz hasonló szintű károsodások látszottak a bélszerkezetben. A kvantitatív analízis szerint a szöveti sérülés mértéke egyenes korrelációt mutatott a

meleg ischaemia idejével. A 3 és 6 órás meleg ischaemia és azt követő reperfüzió szignifikánsan csökkentette a mucosa, a submucosa és az izomréteg vastagságát, valamint a kripták mélységét a kontroll és az áloperált szövethez képest. A hidegen konzervált bélszövetben is mérhető volt csökkenés az említett rétegekben, de a meleg I/R-s csoportokhoz képest szignifikánsan nagyobb maradt a mucosa vastagsága a 3 és 6 órás csoportok esetén. A szöveti szerkezetben bekövetkező károsodásoknak az ischaemiás idővel való korrelációja főként a mucosa és submucosa rétegeknél volt jelentős, a kripták esetében már kevésbé volt látványos, míg a bélfal izomrétegében mért változások voltak a legkevésbé szembetűnőek.

A különböző hisztológiai stádiumbeosztások többsége kvalitatív vagy szemikvantitatív metodika, mely nehézséget okoz az eredmények összehasonlítása, egybevetése során. A hisztológiai vizsgálatok hátrányai közé tartozik, hogy (1) nem minden esetben ad pontos értéket az egyes struktúrák károsodásáról, (2) időigényes, mert a teljes szövettani feldolgozás és kiértékelés napokig tart a posztoperatív szakban, (3) kvalitatív vizsgálat révén az értékelés nagyban függ a patológustól, (4) önmagukban nem adnak egzakt képet a folyamat progressziójáról, és (5) nincs konszenzus az irodalomban a rendszerek alkalmazása tekintetében sem.

Vizsgálatainkban kimutattunk korrelációt a hagyományos hisztológiai és a DSC eredmények között mind meleg ischaemiás, mind hidegen konzervált bélszövet esetében. Következtetéseink alapján a DSC adatok jól visszatükrözték a Park-féle klasszifikáció stádiumértékeit mucosa tekintetében, de a DSC analízis részletesebb információt adott az ischaemiás simaizomszövet károsodásának mértékéről. Jelen kísérletünkben DSC módszerrel hasonlítottuk össze az 1, 3 és 6 óra meleg, illetve hideg ischaemia hatására bekövetkező strukturális károsodásokat a vékonybél egyes rétegeiben (mucosa, simaizomszövet) és a teljes bélfalban. Eredményeink szerint a mucosa szerkezete az ischaemia formájától és annak időtartamától függően jelentősen károsodott. A kalorimetriás entalpia változása alapján a meleg ischaemiás periódusok végére időarányosan nőtt a károsodás mértéke. A hideg UW oldatban tárolt bél mucosa rétege megőrizte „normál fiziológiás szerkezetét” összehasonlítva mind a kontroll-, mind az azonos időtartamú meleg ischaemiás mintákkal. A változások legszembetűnőbbben a szeparált mintáknál láthatóak, de a teljes bélfal mérési görbéinél is fellelhetők. Kalorimetriás eredményeink korrelálnak számos kísérletes és klinikai megfigyeléssel: az ischaemia idejének emelkedésével egyre markánsabb morfológiai változások detektálhatók mind makroszkópos, mind mikroszkópos módon.

Fiziológiás körülmények között a mucosa sejtek megújulási ideje kb. 3-4 nap, majd apoptózis útján elhalnak, és helyükre a bazal membrán felől új mucosa termelődik. Az irodalomban számos meleg ischaemiás modellt írtak le, ahol a kvalitatív skálák alapján a meleg ischaemiás toleranciaidő 15 és 90 perc között változik. Nincs konszenzus a hideg konzerválás idejére vonatkozóan sem, a vékonybelet minél előbb, de 6-8 órán belül javasolják átültetni. Jelen kalorimetriás adatok jelzik, hogy súlyos mucosakárosodás 3 órás meleg ischaemia és 6 órás hideg konzerválás után következik be.

Korábbi vizsgálataink alapján az izomréteg vastagsága enyhe csökkenést mutatott mind meleg, mind hideg ischaemia következtében, de szignifikáns eltérést nem találtunk. Számos vizsgálat

megerősítette, hogy az izomrétegben rutin hisztológiai módszerrel nem látható szignifikáns eltérés. Ezzel szemben az összehasonlító DSC adatok jelezték, hogy meleg ischaemia hatására az aktomiozin komplexben a miozinvég nem tud feloldódni, ami jelentős szerkezeti változást jelez alacsonyabb entalpiaváltozással. Az aktin és a miozin helye kevésbé tisztán látható, a hőkapacitásváltozás (az alapvonal eltolódása a natív és denaturált állapotok között), valamint az emelkedett olvadási hőmérséklet is jele a molekulákban a kötött víz nagyobb fellazulásának és ezáltal a fehérjerendszer kompaktabbá, merevebbé válásának. Ennek hátterében a meleg ischaemia alatt felszaporodó OFRs állnak, melyek károsítják a miozin katalitikus centrumát. E modifikáció függ az időtől, a koncentrációtól és az OFRs kémiai szerkezetétől. Másrészt az oxidatív stressz szétkapcsolja az ATP hidrolízist. Ezáltal az ischaemia strukturális és funkcionális változásokat eredményez az izomrétegben. Hideg ischaemia hatására a különböző izomkomponensek jól definiált módon elkülönülnek, jelezve, hogy az UW oldatban történő konzerválás csökkentette a strukturális károsodást. Legjelentősebb változás az aktomiozin-komplex interakciójában figyelhető meg. Jelenleg nincs az irodalomban hasonló DSC vizsgálat bél ischaemiás modellben. A simaizomszövetben mért pathofiziológiás vizsgálatok kimutatták, hogy a meleg ischaemia hatására csökken a ganglionsejtek száma a plexus myentericusban, amelyek nem képesek regenerálódni a posztoperatív periódusban. Ez a fő oka az intestinális motilitás posztoperatív és posztischaemiás változásának. E funkcionális zavarok hátterében ismert folyamatok állnak: a makromolekulákban bekövetkező oxidatív károsodás, a sejtek kalciumegyensúlyának zavara, illetve a gyulladásos kaszkádok aktivációja.

A teljes bélfal termikus viselkedése nagyfokú változatosságot mutatott, ami alapvetően a vékonybél réteges felépítéséből adódik. De a korábban említett szeparált mucosa- és simaizom mérések termikus karakterisztikája itt is jól megfigyelhető, ami igazolja, hogy a DSC analízis jól tükrözi a teljes bélszövetben bekövetkező szerkezeti eltéréseket. Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy kutatócsoportunk elsőként vizsgálta a meleg és hideg ischaemiás bélszövetben bekövetkező szerkezeti károsodásokat differenciál pásztázó kalorimetriás módszerrel. Ez a termoanalitikai technika lehetővé teszi a biológiai rendszerekben bekövetkező strukturális károsodások kvantitatív, objektív, komplex és egzakt meghatározását, és ezáltal lehetőséget nyújt mind a kísérletes, mind a klinikai sebészeti témájú kutatásokban való széles körű metodikai alkalmazására.

3. A vékonybél ischaemiás poszt kondicionálása

3.1. Bevezetés

Az I/R károsodásokkal szembeni cytoprotekció intenzív kutatásainak eredményeképpen 1986-ban Murry fogalmazta meg az ischaemiás prekondicionálás (IPC) koncepcióját. Ennek kiváltására az ischaemia előtt olyan rövid I/R-s periódusokat alkalmazunk, melyek nem okoznak szervkárosodást, de aktiválják az endogén védelmi rendszert, s így a szövet jobban ellenáll az ischaemiás behatásnak. 2003-ban Vinten-Johansen és munkacsoportja bevezette az ischaemiás poszt kondicionálás (IPO) teóriáját. Ennek során a reperfüzió elején több, néhány másodperces I/R-s ciklusokat alkalmazva, ún. frakcionált reperfüzióval engedik az ischaemiás területre a vért, mellyel csökken a reperfüziós károsodások mértéke. A véráramlás hirtelen, teljes visszaállítása ugyanis a sejtek kalciumtúltöltődését, oxidatív stresszt, gyors pH-neutralizációt okoz, melyek szerepet játszanak a mitokondriumok csatornáinak megnyitásában, ami ATP-deplációhoz és végül a sejt halálához vezet.

IPO hatására fenntarthatóbb a sejt kalcium-homeosztázisa, védelmet ad a súlyos intracelluláris oxidatív stresszel szemben, szerepe van a késleltetett pH-korrekcióban és a mitokondriumok védelmében, mely a sejt strukturális és funkcionális védelmét biztosítja. Az IPO első kutatási területe a kardiológia volt, bevezetését követően néhány tanulmány jelent meg a vékonybél I/R-ban mutatott védő hatására vonatkozólag. Az IPC felhasználhatósága – protektív hatása ellenére – korlátozott, mert a meglévő ischaemiánál már nincs mód az alkalmazására. Klinikai felhasználhatóság tekintetében az IPO áttörést jelenthet az I/R-s sérülések kivédésében és kezelésében.

3.2. Célkitűzés

Kutatásunk második részében ischaemiás poszt kondicionálás alkalmazása mellett különböző időtartamú meleg I/R, valamint hideg konzerválást követő vékonybél autotranszplantációt hoztunk létre és a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen mértékű oxidatív stressz lép fel IPO alkalmazásakor a meleg ischaemia és hideg konzerválást követő autotranszplantáció alkalmazása után a reperfundált bélszövetben?
2. Az IPO mennyiben csökkenti a sejtek oxidatív károsodását?
3. Hogyan változik a bél strukturális szerkezete modelljeinkben IPO alkalmazása után?

3.3. Anyag és módszer

3.3.1. Kísérleti csoportok és műtéti módszerek

Kísérleteinket felnőtt, hím házi sertéseken (tömegük: 25-30 kg, $\Sigma n = 16$) végeztük. A műtét előtt 24 óráig csak cukros vizet fogyaszthattak. Az állatokat im. adott azaperon (Stresnil, 0,4 mg/ttkg, Janssen Animal Health, Belgium) premedikáció és thiopenthal (0,1 mg/ttkg, Biochemie Gmb, Austria) anesztézia bevezetése után isofluran és N₂O gáz keverékével végzett narkózisban operáltuk. A vizsgálatokat a PTE MÁB engedélyének (BA02/2000-9/2008) megfelelően végeztük el.

A meleg I/R-s csoportokban median laparotomia után kipreparáltuk az a. mesenterica superiort, majd leszorításával ischaemiát hoztunk létre 1 (A1. csoport), 3 (A2. csoport) és 6 órán át (A3. csoport). A hideg I/R-s csoportokban a Treitz-szalagtól kb. 10 cm-re aboralisan a vékonybelet az ileum végéig reszekáltuk és lumenét antibiotikum nélküli fiziológiás sóoldattal mostuk át. A graftokat 4 °C-os UW oldattal perfundáltuk, és tároltuk 1 (B1. csoport), 3 (B2. csoport) és 6 órán át (B3. csoport). Konzerválást követően az éranastomózisokat 6/0-s szintetikus, monofil, nem felszívódó, tova futó varratokkal rekonstruáltuk és orthotopicus módon ültettük vissza a vékonybelet. Bélanasztomózist nem készítettünk. A reperfúziót valamennyi csoportban 3 órán át tartottuk fenn.

IPC-t az ischaemiás periódusok végén, közvetlenül a reperfúziós előtt végeztük a meleg (A4. csoport, A5. csoport, A6. csoport) és hideg ischaemiás (B4. csoport, B5. csoport, B6. csoport) csoportokban. Az IPO protokollt 3 ciklusban, ciklusonként 30 másodperc ischaemiával és 30 másodperc reperfúzióval végeztük. Valamennyi csoportnál mintát vettünk a jejunumból a laparotomia után (kontroll, K) és a reperfúziós periódusok végén. Az áloperált (S) állatoknál a laparotomia után (K) és az ischaemiás csoportok biopsziáival analóg időben vettünk bélszövetet.

3.3.2. Biokémiai vizsgálatok

A 2.2.2. pontban leírtak szerint végeztük a méréseket.

3.3.3. Morfológiai vizsgálatok

A bélmintákat a 2.2.3. pontban leírtak szerint készítettük elő és vizsgáltuk a változásokat.

3.3.4. Statisztikai analízis

Az eredmények értékelésekor a 2.2.5. pontban leírtak szerint végeztük a számításokat.

3.4. Eredmények

3.4.1. Biokémiai vizsgálatok eredményei

A szöveti MDA koncentrációja valamennyi csoportban emelkedett meleg ischaemia hatására. Az emelkedést a 3 és 6 órás ischaemiát követő reperfúziós mintáknál szignifikánsnak találtuk (A2 és A3 vs. K; $p < 0,05$). A poszt kondicionált szövetnél is emelkedett a lipidperoxidáció mértéke a kontroll mintákhoz képest, de értékét tekintve alacsonyabb maradt (A4 és A5 vs. K; $p < 0,05$). Ez az emelkedés a 6 órás csoportok között szignifikánsan alacsonyabb volt a nem poszt kondicionálthoz képest (A6 vs. A3; $p < 0,05$). A hidegen konzervált mintáknál is kimutatható volt a membránkárosodás (B2 és B3 vs. K; $p < 0,05$), de ez az egyes csoportoknál kisebb mértékű volt az azonos idejű meleg ischaemiához képest (B3 vs. A3; $p < 0,05$). A 6 óráig konzervált és poszt kondicionált bélnél szignifikánsan alacsonyabb volt az MDA koncentráció (B6 vs. B3; $p < 0,05$).

A szöveti GSH koncentrációja szignifikánsan csökkent a 3 és 6 órás meleg ischaemiát követő reperfúziós mintákban (A2 és A3 vs. K; $p < 0,05$). Ezzel szemben az IPO csoportokban mind a kontroll, mint a poszt kondicionálás nélküli csoportokhoz képest is szignifikánsan magasabb értéket mértünk

(A5 és A6 vs. K; A5 vs. A2; A6 vs. A3; $p < 0,05$). A hideg konzerválás csökkentette a szöveti GSH-szintet (B3 vs. K; $p < 0,05$), de ez a csökkenés szignifikánsan alacsonyabb volt a meleg csoporthoz képest (B3 vs. A3; $p < 0,05$). A konzerválást követő IPO protokoll fokozta a GSH-szintet, főként a 6 órás csoportban (B6 vs. K vs. B3 és vs. A6; $p < 0,05$).

A SOD aktivitása jelentősen csökkent valamennyi meleg ischaemiás csoportban (A1 és A2 és A3 vs. K; $p < 0,05$). IPO hatására a kontroll szinthez képest alacsonyabb volt az aktivitása, de szignifikánsan jobban megőrződött a nem poszt-kondicionálthoz képest (A5 és A6 vs. K; A5 vs. A2; A6 vs. A3; $p < 0,05$). Konzerválás hatására csökkent a SOD aktivitása, de a 3 és 6 órás mintáknál szignifikánsan magasabb volt, mint a meleg I/R-s csoportokban (B2 vs. A2; B3 vs. A3; $p < 0,05$). Az IPO tovább javította a SOD aktivitását a konzerválás után (B6 vs. K és B3 és A6; $p < 0,05$).

3.4.2. Szövettani vizsgálatok eredménye

A Park-féle klasszifikáció szerint a kontroll- és áloperált csoportban normál szöveti struktúra látható (0. stádium). Egy órás meleg ischaemiát követő reperfúzió végén a villusok kismértékű leválását tapasztaltuk (2. stádium), míg 3 órás ischaemia már jelentős epithel-leválást okozott (3. stádium). Hat órás ischaemia után 5-ös stádiumú károsodás alakult ki denudált villusokkal, a lamina propria és a kripták decellularisatiójával és végső soron a bélstruktúra teljes szétesésével. Az IPO csoportokban a károsodás egy fokozattal enyhébb volt, mint az IPO nélküli csoportokban. Ezek közül is kiemelendő a kripták jobb megőrzöttsége a reperfúzió végére. A kvalitatív kiértékelés szerint a hideg konzerválás önmagában hatással volt szöveti struktúra megőrzésére, melyet az IPO tovább javított.

A kvantitatív analízis szerint a szöveti sérülés mértéke korrelált az ischaemia idejével. A 3 és 6 órás meleg ischaemia szignifikánsan csökkentette a mucosa, a submucosa és az izomréteg vastagságát, valamint a kripták mélységét a kontroll szövethez képest (A2 és A3 vs. K; $p < 0,05$). Az IPO csoportokban is látható csökkenés az említett rétegekben, de a nem poszt-kondicionált csoportokhoz képest szignifikánsan nagyobb volt a mucosa vastagsága a reperfúziós végére (A5 vs. A2; A6 vs. A3; $p < 0,05$). A hideg ischaemia mérsékelte a strukturális károsodást a submucosa, az izomréteg és a kripták tekintetében. A mucosa itt is károsodott, de a meleg ischaemiához képest kisebb mértékben (B1 vs. A1; B2 vs. A2; B3 vs. A3; $p < 0,05$). Az IPO tovább csökkentette a szöveti károsodást főként a 3 és 6 órás konzerválás után (B5 vs. B2; B6 vs. B3; $p < 0,05$). A bélfal simaizom rétegénél csökkenő tendencia látható, mely 3 és 6 órás meleg ischaemia után szignifikáns volt (A2 és A3 vs. K; $p < 0,05$), de a többi csoportban jelentős változás ennél a rétegnél nem volt mérhető.

3.5. Megbeszélés

Intenzív kutatások ellenére a vékonybél I/R-s károsodásának kivédése napjainkban sem tekinthető rutin eljárásnak a klinikumban. Kísérleteinkben akut mesenterialis I/R-t és hideg konzerválást követő autotranszplantációt modelleztünk különböző I/R-s időtartamok, valamint IPO felhasználásával. A klasszikus IPO-protokollt használtunk, mely 3 ciklusból áll, ciklusonként 30

másodperc ischaemia és 30 másodperc reperfúzió alkalmazásával. Az oxidatív stressz markerek közül a károsodást jelző lipidperoxidációt, az OFRs inaktiválásában szerepet játszó GSH szintjét és a SOD aktivitásának változását mértük.

Eredményeink szerint az IPO csökkentette a meleg I/R okozta lipidperoxidáció mértékét. Ez a csökkenés a 6 órás mintáknál szignifikáns volt. Az antioxidáns oldalon kimutattuk, hogy a GSH szintje csökken meleg ischaemia hatására. Hasonló eredményekről számolt be korábban Gibson, aki patkánybél I/R-t hozott létre az a. mesenterica superior 1 órás lezorításával, melyet 2 óra reperfúzió követett. Eredményei szerint az ischaemia ideje alatt csökkent a szöveti GSH-szint, de a reperfúzió alatt további csökkenést már nem tapasztalt. Ezzel szemben Nakamura a szöveti GSH-koncentráció csökkenését írta le az ischaemia alatt, mely a reperfúzió során tovább csökkent. Sola eredményei szerint a GSH tartalom lefeleződött 90 perces bélischaemia után. Ezzel szemben az IPO csoportokban szignifikánsan emelkedett GSH koncentrációt találtunk 3 és 6 órás meleg I/R-s és 6 órás konzerváláson átesett csoportokban. Eredményeinkhez hasonló GSH szint változást talált Chen és kutatócsoportja, mely jelezte az endogén védelmi rendszer aktivációját. Továbbá a meleg ischaemia az idő függvényében szignifikánsan csökkentette a szöveti SOD aktivitását. Az SOD aktivitásának drámai csökkenéséről számolt be Kacmaz és Karashima is. Az IPO csoportoknál is csökkent ugyan az aktivitás, de ezt értékét tekintve kisebbnek találtuk. Ezen eredményeket irodalmi adatok is megerősítik, amelyek leírják, hogy az IPO által létrehozott védelem összefügg az oxidatív stressz, a gyulladási folyamatok, többek között a PMN leukocyták aktiválódásának mérséklődésével. A hatást a szövetet ért intermittáló reoxigenizáció miatti csökkent OFRs-képződésben látták. Az IPO-t a reperfúzió indításától számított első 7 percig terjedő időintervallumban kell alkalmazni, amikor az OFRs képződés tetőzik. Az azonnali IPO pozitív hatását írja le egy másik patkányokon végzett tanulmány is, ahol klasszikus és késleltetett IPO-protokollt alkalmaztak. Ezáltal csökkent a szöveti MDA-szint, helyreállt a SOD aktivitása, csökkent a gyulladási válasz és a PMN leukocyták szöveti akkumulációja, valamint csökkent a tumor nekrosis faktor-alfa (TNF- α) és az interleukin-6 (IL-6) plazmaszintje. Bizonyították, hogy az IPC és az IPO egymással szinergista hatásúak, továbbá azt a fontos tény, hogy a későn (reperfúzió utáni 3. percben) kivitelezett IPO hatástalan, ugyanis akkor a SOD aktivitása már nem őrződik meg, és nem csökkenti a szöveti lipidperoxidációt. Emellett az IPO-t hatástalannak írták le 4 ciklusban alkalmazott, ciklusonként 30 másodperc ischaemiából és 30 másodperc reperfúzióból álló protokollnál. Az ellentmondó eredmények származhatnak az eltérő ischaemiás időkből és az eltérő IPO protokollokból egyaránt.

Hideg ischaemiás kísérlet sorozatunkban kimutattuk, hogy az UW oldatban történt hideg prezerváció csökkenti a szöveti oxidatív károsodásokat a meleg ischaemiás eredményekhez képest. Méréseink szerint a szöveti MDA a hideg konzerválás hatására emelkedett ugyan, de ez elmarad a meleg károsodás mértékétől. Az IPO tovább csökkentette a szöveti MDA-szinteket a nem poszt-kondicionált mintákhoz képest. Továbbá a hideg konzerválás kevésbé csökkentette a szöveti GSH-szintet és SOD-aktivitást, mint a meleg ischaemia. Az IPO mintáknál ezek az értékek jobban megközelítették a kontroll szintet.

Hagyományos hisztológiai vizsgálatok kvalitatív és kvantitatív analízisével kimutattuk, hogy a bélszövet meleg I/R hatására jelentősen károsodik és a károsodás mértéke az ischaemiás idővel fokozódik. A posztkondicionált csoportokban enyhébb fokú volt a károsodás mértéke, melyből kiemelendő a kripták jobb megőrzöttsége a reperfúzió végére. Eredményeink megfelelnek az irodalomban leírtaknak. A kvantitatív eredmények ezeket a változásokat támasztották alá a mucosa, a submucosa és a kripták esetén. Az izomrétegben jelentős változást nem láttunk. A konzervált graftok vizsgálata során kimutattuk, hogy az ischaemiás idő előrehaladtával arányosan nőtt a károsodás mértéke, de ez mérsékeltebb volt, mint a meleg ischaemia okozta károsodás. A meleg ischaemiához hasonlóan az IPO csoportokban a károsodás egy fokozattal enyhébb volt az IPO nélküliekhez képest. Az IPO védő hatásának pontos mechanizmusa még nem ismert modellünkben. Néhány közlemény azonban leírta már, hogy az IPO csökkenti a bélszövet egyes rétegeiben bekövetkező károsodásokat. Annak ellenére, hogy az IPO során aktiválódó jelátviteli utak rendkívül komplex összefüggést mutatnak, és számos részük ma még nem ismert, az széles körben elfogadott, hogy az IPO a sejtek természetes védekező mechanizmusainak passzív és aktív tényezőivel hozható összefüggésbe.

Tekintettel arra, hogy az IPO egy a klinikai gyakorlatban is hasznosítható eljárás lehet a jövőben, ezért minden jelenlegi és jövőbeli kutatás fontos a folyamatok részleteinek tisztázása és a felmerült számos kérdés megválaszolása érdekében.

4. PACAP hatásának vizsgálata vékonybél autotranszplantációs modellekben

4.1. Bevezetés

Kísérletes kutatások ellenére még ma sem ismert olyan specifikus terápia mellyel az I/R-s károsodás megelőzhető vagy teljes mértékben kezelhető lenne. A klinikai eredmények igazolják, hogy transzplantációkor a konzerválás és a reperfüzió mind rövid, mind hosszú távon káros hatású, növeli az akut kilökődések számát, vagy krónikus allograft funkciózavart okoz. A jelenleg standardként használt UW konzerváló oldatot főként hasnyálmirigy és máj tárolására fejlesztették ki. A többi szervvel kapott jó eredmények ellenére a bél graftok tárolására ez az oldat ma sem tekinthető „optimális” oldatnak. Folyamatos kutatások folynak a forgalomban lévő oldatok módosítása (új összetevők, magasabb energia -és tápanyagtartalom), illetve új oldatok kifejlesztése terén.

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide: PACAP) az evolúció során jól konzervált, széles hatásspektrumú neuropeptid, mely hat az endokrin mirigyekre, a kardiovaszkuláris és légző rendszerre, valamint az emésztő traktusra is. 1989-ben izolálták birka hypothalamusból a hypophysisben kiváltott adenilát-cikláz aktiváló hatása segítségével. A szekretin/glukagon/vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja. A polipeptidnek két formája van, a 38 aminosavat tartalmazó PACAP-38 és a 27 aminosavból álló PACAP-27. Szerkezete 67 %-ban megegyezik VIP-el, de adenilát-cikláz aktiváló hatása 1000-10000-szer nagyobb a VIP hatásánál. Ezek, mint „brain-gut” peptidek az emésztő rendszer teljes hosszában megtalálhatóak, immunreaktivitásuk a sejtestekben és az idegvégződéseken mutatható ki, főként a jejunum és az ileum területén. Fokozott affinitással kötődnek a PAC1 és a VIP-el közös VPAC1 és VPAC2 receptorokhoz. Mindhárom receptoruk megtalálható a mucosában, a myentericus neuronokban, neuroendokrin és érendothel sejteken, valamint a simaizomsejteken.

A PACAP-38 anti-apoptotikus, anti-inflammatórikus és antioxidáns protektív hatása számos in vitro és in vivo kísérletben igazolódott. Pontosán még nem tisztázott, hogy milyen mechanizmusokon keresztül hat, de az igen, hogy a bélszöveti I/R-s károsodás a béltraktusban citokin felszabadulást eredményez. Számos gyulladássos modellben leírták, hogy a PACAP anti-inflammatórikus hatása részben a citokinek és kemokinek termelődésének gátlása révén érvényesül.

4.2. Célkitűzés

Kutatásunk harmadik részében különböző időtartamú meleg I/R, valamint hideg konzerválást követő vékonybél autotranszplantációt végeztünk és a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Meleg ischaemia hatására hogyan változik az endogén PACAP-38 szint a bélszövetben?
2. PACAP-38 KO és vad típusú egereknél milyen mértékű oxidatív és szöveti károsodás lép fel?
3. Vékonybél autotranszplantáció során PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő konzerválást követően milyen mértékű oxidatív és szöveti károsodás lép fel, és hogyan változik a konzervált bélszövetben a PACAP-38 és a PACAP-27 immunreaktivitása?
4. Milyen mértékű lesz ebben a modellben a szöveti citokin expresszió?

4.3. Anyag és módszer

4.3.1. Kísérleti csoportok és műtéti módszerek

Az I-es és III-as kísérletekben felnőtt, hím, Wistar patkányokat (testtömeg: 250-300 g; $\Sigma n=56$, $n=8$ /csoport), a II. kísérletnél PACAP-38 vad típusú és célzott géntechnológiával előállított, fenntartott és visszakeresztezéssel ellenőrzött CD1 PACAP^{-/-} egereket (testtömeg: 25-30 g; $\Sigma n=40$, $n=20$ /csoport) használtunk. A műtét előtt 24 óráig csak vizet fogyaszthattak. Az érzéstelenítés im. adott ketamin-hidroklorid (0,01 mg/ttg) és diazepam (0,01 mg/ttg) injekcióval történt (Richter Gedeon). A vizsgálatokat a PTE MÁB engedélye (BA02/2000-9/2008) szerint végeztük.

Az I. kísérletben meleg ischaemiás csoportokban az a. mesenterica superior-t kiperaráltunk és atraumatikus klip felhelyezésével 1 órás (A1. csoport), 3 órás (A2. csoport) és 6 órás (A3. csoport) ischaemiát hoztunk létre. A klipek eltávolítása után 3 órás reperfüziót kezdtünk.

A II. kísérletben hideg ischaemiás csoportokat hoztunk létre. Laparotomia után a vékonybelet a Treitz-szalagtól az ileocecalis részig reszekáltuk. A bél lumenét antibiotikum nélküli fiziológiás sóoldattal mostuk át. A graftokat perfundáltuk és 4 °C-os UW oldatban tároltuk 1 órán (PVB1. csoport, KO.B1. csoport), 3 órán (PVB2. cs., KO.B2. cs.) és 6 órán (PVB3. cs., KO.B3. cs.) át.

A III. kísérletben is hideg ischaemiás csoportokat hoztunk létre. A graftok perfúziója után 100 ml 4°C-os UW oldatban tároltuk 1 órán (B1. csoport), 3 órán (B2. csoport) és 6 órán keresztül (B3. csoport). A további graftokat 100 µg PACAP-38-at tartalmazó 100 ml UW oldatban 1 órán (PB1. csoport), 3 órán (PB2. csoport) és 6 órán keresztül (PB3. csoport) konzerváltuk. A konzerválások után mikrosebészeti technikával (10/0-ás, szintetikus, monofil, nem felszívódó fonal felhasználásával), end-to-end éranasztomózisokkal egyesítettük az érvégeket orthotopicus módon (autotranszplantáció). Bélanasztomóziást nem készítettünk. A reperfüziót minden csoportban 3 órán át tartottuk fenn. Valamennyi csoportnál a szövetszövetmintákat a laparotomia után (kontroll, K) és a reperfüzió végén vettük. Az „S” (Sham) csoportba a csak median laparotomián átesett, áloperált állatok kerültek. Ezekből a laparotomia után (K) és az ischaemiás csoportok biopsziáival analóg időben vettünk szövetszövetmintákat.

4.3.2. Biokémiai vizsgálatok

A 2.2.2. pontban leírtak szerint végeztük a méréseket.

4.3.3. Morfológiai vizsgálatok

A bélmintákat a 2.2.3. pontban leírtak szerint készítettük elő és vizsgáltuk a változásokat.

4.3.4. PACAP-38 és PACAP-27 mérése radioimmúnassay (RIA) módszerrel

A bélszövetből származó mintákat (600 mg) jéghideg vízben homogenizáltuk, majd 12000-es fordulatszámon 30 percig 4 °C-os hőmérsékleten centrifugáltuk. Ez után a felülúszót a PACAP-38-szerű és PACAP-27-szerű immunreakciók vizsgálata céljából RIA analízisnek vetettük alá. A PACAP-38 antiszérumát 88111-3-mal, a PACAP-27 antiszérumát 88123-mal rövidítettük. Jelölt anyagként 125-ös jódot izotóppal jelölt juhól származó PACAP24-38-at és PACAP-27-et használtunk.

A standardjaink juhból származó PACAP-38 és PACAP-27 voltak (0-1000 fmol/ml). Mintánk radioaktivitását gamma-számlálóval mértük. Az ismeretlen minta PACAP-38 illetve PACAP-27 tartalmát kalibrációs görbe segítségével határoztuk meg. A PACAP-38-szerű és PACAP-27-szerű kötődés arányát femtomol/mg szövet értékben adtuk meg.

4.3.5. A szöveti citokin aktivitás mérése

Citokin Array

A bélszövet citokin tartalmának kemiluminescens vizsgálatához patkány citokin kittedt használtunk (Panel A Array kit, R&D Systems). A bélszövetet proteáz inhibitor tartalmú PBS pufferben homogenizáltuk, Triton X-100-at adtunk hozzá, majd -80 °C-on tároltuk a felhasználásig. A mintákhoz antitest-elegyet adtunk, majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Háromszori pufferes mosás után tormaperoxidáz-konjugált Streptavidint adtunk a mintákhoz és kemiluminescens mérés (Amersham Biosciences, Magyarország) után rtg filmre rögzítettük.

Luminex Multiplex Immunassay

A korábban leírtak alapján a bélszövetben három „host” marker (szolubilis intercelluláris adhéziós molekula-1: sICAM-1; L-szelektin; tissue inhibitor of metalloproteináz-1: TIMP-1) szintjét határoztuk meg Flurokine MAP Rat Base kit (R&D Systems) segítségével, a gyártó instrukciói alapján. Az eredményeket pg/g nedves szövet értékben adtuk meg.

4.3.6. Statisztikai analízis

Az eredmények értékelésekor a 2.2.5. pontban leírtak szerint végeztük a számításokat.

4.4. Eredmények

4.4.1. Biokémiai vizsgálatok eredményei

A UW oldatban tárolt graftok esetén a szöveti MDA szintje a kontroll és áloperált csoport értékeihez képest a konzerválási idővel arányosan nőtt a II. kísérletben. Legmagasabb értéket a PACAP-38 KO graftok 6 órás konzerválás utáni reperfüziós mintáinál mértünk. Ez szignifikánsan magasabb volt, mint a PACAP-38 vad típusú graftok ugyanilyen idejű tárolása után (KO.B3 vs. PVB3; $p < 0,05$). Szignifikáns volt az eltérés a 3 órás mintáknál is (KO.B2 vs. PVB2; $p < 0,05$). Az endogén scavenger GSH szöveti koncentrációja és a SOD aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a PACAP-38 KO állatok 3 és 6 órás konzerválás utáni mérésénél, mint az ugyanazon idejű vad típusú bélszövetben (KO.B2 vs. PVB2; KO.B3 vs. PVB3; $p < 0,05$).

4.4.2. Morfológiai vizsgálatok eredménye

A Park-szerinti klasszifikáció szerint a legnagyobb károsodást a PACAP-38 KO egerek 6 órás konzerválása után kaptunk (KO.B3. csoport, 4. stádium), míg a legkisebb károsodást a PACAP-38 vad típusú állatok 1 óráig prezervált graftjainál (PVB1. csoport, 1. stádium) figyeltünk meg. Egy órás konzerválás után a PACAP-38-at tartalmazó szövetben az ép kripták mellett a villusok kismértékű

megemelkedését láttuk. Ezzel szemben a PACAP-38 hiányos szövetnél a károsodás egyel magasabb fokozatú volt (KO.B1. csoport: 2. stádium): a villusok közepes mértékű leválása mellett részleges kriptakárosodás volt megfigyelhető. A három órás csoportoknál a PACAP-38 KO szövetben 3. stádiumú volt a károsodás, jelentős epithel leválást és helyenként károsodott kriptákat találtunk (KO.B2. csoport). A PACAP-38 vad típusú graftok 6 órás konzerválása után 3. stádiumú károsodás volt megfigyelhető (PVB3. csoport), míg a PACAP-38 KO graftok ugyanennyi idejű tárolása 4-es stádiumú károsodást okozott (KO.B3. csoport).

A kvantitatív szövettani vizsgálat szerint a mucosa és submucosa vastagsága és kripták mélysége szignifikánsan csökkent a PACAP-38 vad típusú állatok bélszövetének 6 órás konzerválása után (PVB3. Vs. K; $p < 0,05$). A PACAP-38 KO graftoknál a csökkenés már 1, 3 és 6 órás konzerválás után is szignifikáns volt a kontroll és az áloperált mintákhoz képest (KO.B1., KO.B2. és KO.B3. vs. K és S; $p < 0,05$). Ezeknél a rétegeknél szignifikánsan rosszabb eredményt kaptunk a PACAP KO mintáknál a PACAP-38 vad típusú egerek értékeihez képest (KO.B2., KO.B3. vs. PVB2 és PB.B3; $p < 0,05$). Az izom vastagsága enyhe csökkenést mutatott, de ez nem volt szignifikáns.

4.4.3. A bél PACAP-38 és PACAP-27 immunreaktivitási szintjének változása bélszövetben

Az I. kísérletben a bélszövet endogén PACAP-38 immunreaktivitási szintjének változását mértük különböző időtartamú meleg ischaemia és azt követő reperfúzió során. Az endogén PACAP-38 immunreaktivitási szintje a reperfúziós mintáknál szignifikánsan csökkent minden csoportban (A1, A2 és A3 ischaemia vs. K; $p < 0,05$). A 6 órás meleg ischaemiás csoportban már az ischaemia végi mintákban is szignifikánsan csökkent a PACAP-38 endogén szintje a kontroll és áloperált szöveti szinthez képest (A3 ischaemia vs. K; $p < 0,01$; A3 reperfúzió vs. K; $p < 0,001$).

A III. kísérletben a szöveti PACAP-38-szerű immunreaktivitás $57,32 \pm 3,5$ fmol/mg volt a kontroll mintákban és $55,1 \pm 2,5$ fmol/mg az áloperált csoportban. Ennek értéke 1 órás hideg konzerválást követően $50,4 \pm 3,5$ fmol/mg-ra (B1. csoport), 3 óra után $40,1 \pm 5,5$ fmol/mg-ra csökkent (B2. csoport). Ez a változás a 6 órás konzerválás végére (B3. csoport: $32,6 \pm 3,0$ fmol/mg; $p < 0,05$) szignifikáns volt. PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban való tárolás után szignifikánsan magasabb szinteket mértünk a PB4-PB6 ($65,2 \pm 3,4$; $55,2 \pm 4,2$; $48,9 \pm 3,2$ fmol/mg) csoportokban.

A szöveti PACAP-27-szerű immunreaktivitás csökken a kontroll ($4,2 \pm 0,2$ fmol/mg) mintákhoz képest. Ezen csökkenés szignifikáns volt, mind az 1 órás (B1. csoport: $2 \pm 0,2$ fmol/mg; $p < 0,05$), mind a 3 órás (B2. csoport: $1,6 \pm 0,3$ fmol/mg; $p < 0,05$) és a 6 órás (B3. csoport: $0,9 \pm 0,2$ fmol/mg; $p < 0,01$) mintáknál is. PACAP-38-at is tartalmazó UW oldatban történő tárolást követően értéke szignifikánsan magasabb volt a csak UW-ban tárolt mintákhoz képest (PB4. csoport: $3,5 \pm 0,3$ fmol/mg; PB5. csoport: $3,0 \pm 0,2$ fmol/mg; PB6. csoport: $2,6 \pm 0,15$ fmol/mg; $p < 0,05$).

4.4.4. Citokin expresszió változása bélszövetben

A kemiluminiscens vizsgálatok igazolták, hogy a citokinek közül az sICAM-1 és az L-Selectin normál aktivitású volt a kontroll bélszövetben. Expressziójuk nem változott 6 órás UW

oldatban történő konzerválás és az azt követő reperfüzió végére a B3. csoportban. Mind a 6 órás PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő konzerválás, mind az azt követő 3 órás reperfüzió jelentős citokin aktivitás csökkenést okozott a PB6 csoportban. A RANTES (CCL5) szintek minden csoportban megemelkedtek. A kontroll mintákban a TIMP-1 aktivitása nem volt mérhető. Jelentős aktivitást mértünk a 6 órás PACAP-38 nélküli UW oldatban való konzerválás után a B3. csoportban. A PACAP-38-t tartalmazó konzerválás csökkentette az aktivitások szintjét a PB4. csoportban.

Az előbbi méréseket a Luminex Immunoassay-el kapott eredmények is megerősítették. Az sICAM és az L-Selectin expressziója hasonló a kontroll és az ischaemiás csoportokban, míg mindkét esetben szignifikáns csökkenés figyelhető meg a PACAP-38-al tárolt graftoknál. A TIMP-1 expressziója a kimutatási határon volt a kontroll mintákban, és jelentős emelkedés volt hideg ischaemia után. Az emelkedett TIMP-1 szinteket mérsékelte a PACAP-38-at tartalmazó konzerválás.

4.5. Megbeszélés

Jelen kutatásunkban egyrészt PACAP-38 KO és PACAP-38 vad típusú egerekben kísérletes vékonybél autotranszplantáció során meghatároztuk a szöveti oxidatív károsodás mértékét és a bélszövetben bekövetkező strukturális változásokat. Másrészt meleg I/R-s modellben mértük az endogén PACAP-38 immunreaktivitási szintjének változását. Harmadrészt a graftok konzerválásához UW és PACAP-38-at tartalmazó UW oldatot használva vizsgáltuk a bélszövet PACAP-38 és PACAP-27 immunreaktivitásának változását, valamint a konzerváláskor fellépő szöveti citokin expressziót.

PACAP-38 KO és vad típusú egerekben a konzerválás hatását a kialakult oxidatív károsodás alapján értékeltük. Eredményeink alapján a szöveti lipidperoxidáció a hideg konzerválás idejével arányos módon fokozódott, és szignifikánsan magasabb volt a PACAP-38-at nem termelő KO állatokban. A konzerválás során a szöveti endogén scavenger GSH szintje csökkent mind a vad típusú, mind a PACAP-38 KO modellekben. Koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt 3 és 6 óra után a KO graftokban. Az endogén antioxidáns enzim SOD aktivitása is hasonló csökkenést mutatott hideg ischaemia hatására, de aktivitása a vad típusú szövetben jobban megőrződött, mint a PACAP-38 nélküli graftokban. Hasonló kísérletekkel kapcsolatos adatok nem találhatóak az irodalomban, melyek jeleznék, hogy milyen mechanizmus útján fejt ki védő hatását a PACAP-38 hideg konzerválás és azt követő reperfüzió során. Számos vizsgálat megerősíti azonban azt a tényt, hogy a peptid antioxidáns, antiapoptotikus és anti-inflammatórikus tulajdonságának fontos szerepe van citoprotektív hatásában. A PACAP-38-nak van ugyan enyhe scavenger aktivitása, de inkább az valószínűsíthető, hogy indirekt módon, az antioxidáns enzimek aktivitásának/szintézisének stimulálása révén fejt ki oxidatív stressz elleni védő hatását. Ami az oxidatív stressz által kiváltott jelátviteli utakat illeti, a PACAP-38-ról kimutatták, hogy különböző sejtekben képes ellensúlyozni vagy megváltoztatni az oxidatív stresszt kiváltó ún. downstream jelátviteli útvonalakat.

Kimutattuk, hogy 6 órás konzerválás a PACAP-38 KO graftokban okozta a legnagyobb szöveti károsodást. Mind a kvalitatív, mind a kvantitatív vizsgálataink igazolták, hogy a PACAP-38 szöveti jelenléte mérsékelte a hideg konzerválás okozta szövetkárosodást. A mucosa és submucosa

vastagsága és a kripták mélysége is jobban megőrződött a PACAP-38-at tartalmazó szövetekben. A folyamat pontos molekuláris háttere ma még nem ismert. Jelen vizsgálatunkban kapott eredmények azonban összhangban vannak a PACAP-38 KO kísérleti állatokban kapott különböző vizsgálati eredményekkel. Többek között kimutatták, hogy PACAP-38 hiányában megváltozott az agyi fejlődés és kóros axonális dendriteket eredményezett. Érdekes, hogy ezek a változások nem vagy csak enyhe fokban jelentkeznek perifériás szövetekben (pl. vastagbélben). Ha a különböző szöveteket káros stimulus éri, akkor a PACAP-38 hiányos egerekben a károsodás sokkal súlyosabb mértékben jelenik meg. Ezt igazolták dextrán-indukálta colitis modellben, oxidatív stressznek kitett kisagyi szemcsesejtekben és vese sejt kultúrában, agyi ischaemia során, és axon regenerációs vizsgálatokban.

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a bélszövet endogén PACAP-38 immunreaktivitási szintje csökken meleg ischaemia és az azt követő reperfüzió során. Ezek az értékek 6 órás ischaemia után és valamennyi reperfüziós mintában szignifikáns volt. A PACAP-38 immunreaktivitási szintjének értékeit tekintve eredményeink korreláltak a gasztrointesztinális traktusban Hannibál által mért normál szintjeivel. A PACAP-38 immunreaktivitási szintjének csökkenését valószínűleg az okozza, hogy az ischaemiás sejtekben fokozódik felvétele és/vagy az, hogy ischaemia alatt csökken a szintézise. Hasonló megfigyeléseket írtak le más kutatók gyomorfekélyt modellező kísérletben, amikor a PACAP-38 immunreaktivitási szintjének akut csökkenését találták.

Az intenzív kutatásoknak köszönhetően az utóbbi években egyre több vékonybél transzplantáció történik a világon, azonban ma is számos probléma befolyásolja a graftok és a betegek túlélését a klinikai gyakorlatban. A konzerváló oldat alapvető szerepet játszik a hideg ischaemia és az azt követő reperfüzió során fellépő szövetkárosodás csökkentésében. A klinikai rutin jelenleg UW oldatot használnak a bélgraftok tárolására. Ez az oldat máj és vese konzerválása esetén számos előnnyel rendelkezik, ugyanakkor a vékonybél tárolásához nem optimális. Számos kutatás folyik a kereskedelembe kapható oldatok összetételének módosítása, illetve új oldatok kifejlesztése terén.

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a bélszövet PACAP-38-szerű és PACAP-27-szerű immunreaktivitása a konzerválási idő előre haladtával csökkent 1 és 3 órás hideg tárolást követően. Ez a csökkenés 6 órás hideg ischaemia után szignifikáns volt. Korábbi meleg I/R-s vékonybél modellben végzett kutatásaink hasonló eredményeket mutattak az endogén PACAP-38 szintjének változása tekintetében. A hideg ischaemiát követő PACAP-38 szint csökkenését okozhatja mind az ischaemiás sejtek fokozott PACAP-38 felvétele, mind a PACAP-38 szintézisének csökkenése, mind pedig a sejtkárosodás miatti fokozott PACAP lebomlás. Hasonló megfigyelést tettek kísérletes fekély modellben is, ahol a PACAP immunreaktivitásának akut csökkenését figyelték meg. A PACAP-38 és PACAP-27 szintek szignifikánsan magasabbak voltak azokban a graftokban, melyeket PACAP-38 tartalmú UW oldatban tároltunk. Érdekes módon a PACAP-38 szintje a kontroll értékek fölé emelkedett 1 órás konzerválást követően. Három és 6 órás PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő konzerválás hatására a bélsejt homogenizátumban szignifikánsan megnőtt a PACAP-38 és PACAP-27 szint. A reperfüziós időszak végén észlelt emelkedett értékek kialakulásáért felelős mechanizmust pontosan nem ismerjük. Ezt okozhatja az endothel sejtekben a hypoxia következtében

csökkent adenilát-cikláz aktivitás miatt kialakult alacsonyabb intracelluláris cAMP szint. Ez a feltételezés in vivo vékonybél prezervációs vizsgálatok során is megerősítést nyert. Az említett mechanizmusok közül a celluláris cAMP jelátvitel játszhatja a fő szerepet az ischaemiás bél integritásának megőrzésében. A legújabb tanulmányok megerősítették, hogy a PACAP-38 hatására a cAMP szint megemelkedik, mely megóvjja az I/R okozta károsodástól a bélszövetet. Továbbá kimutatták, hogy az alapvetően extrinsic denervációval járó vékonybél transzplantáció során a PACAP-38 szint a gyomorban csökken, de a bélben nem. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a bél PACAP-38 tartalmú idegrostjainak kettős -intrinsic és extrinsic- eredete van. A másik lehetséges magyarázat, hogy a konzerváló oldathoz adott, külsőleg bevitt PACAP hozzákötődve specifikus receptoraihoz fejti ki antioxidáns és protektív hatását a bélben.

A bélszövet károsodásáért elsősorban az I/R során keletkező gyulladáskeltő mediátorok, közöttük a citokinek is felelősek. Az indukált gyulladáshoz kaskád aktiválja a leukocitákat, az endothel sejteket, ami szöveti gyulladáshoz, többszervi elégtelenséghez és halálhoz vezethet. Vékonybél transzplantáció során a bél citokin termelő szervvé válik, fenyegetve a graft és a beteg túlélését.

Jelen vizsgálatunkban azt találtuk, hogy az sICAM-1 és az L-Selectin expressziója jelen volt a kontroll bélszövetben is és szabályos aktiválódást mutatott 6 órás hideg UW oldatban való konzerválás és azt követő reperfüzió során. Ezzel szemben 6 órás PACAP-38 tartalmú UW oldatban való tárolás jelentősen csökkentette a citokinek aktivációját. A sICAM-1 és az L-Selectin fokozott expressziója vese I/R-t követően is megfigyelhető volt, ugyanakkor ott a PACAP-kezelt csoportokban csökkenés volt kimutatható. A citokinek közé tartozó adhézios molekulák részt vesznek a leukocyták, a vérlemezkék, T sejtek és endothel sejtek közötti intercelluláris kommunikációban, beindítva ezzel a mikrovaszkuláris sérülést és reperfüziós károsodást. A RANTES (CCL5) citokin az interleukin-8 család tagja, egy nem konstitutívan termelődő protein, ami csupán gyulladás során expresszálódik. Szelektív attraktánsként működik, a memória T lymphocytákat és monocytákat vonzza. Modellünkben a CCL5 szint minden csoportban emelkedett volt, ugyanakkor a PACAP-kezelt csoportokban enyhe csökkenés volt megfigyelhető. Gyulladásos folyamatokban a mátrix metalloproteináz-9 (MMP-9) és endogén inhibitorának (TIMP-1) transzkripciója a pro-inflammatórikus mediátorok hatására indukálódik. Kísérletünkben a TIMP-1 erőteljes aktivációja volt kimutatható PACAP-38 nélküli UW oldatban való 6 órás tárolást követően. PACAP-38 tartalmú oldatban történő konzerválás csökkentette az aktivációt. A PACAP gyulladás gátló hatása részben a citokin és kemokin termelésre történő gátló hatása révén érvényesül.

5. Új eredmények

1. Különböző időtartamú meleg I/R-ós és UW oldatban történt konzerválás és autotranszplantáció során kimutattuk, hogy az ischaemiás idővel arányos mértékű oxidatív károsodás lép fel a vékonybél szövetben.
2. Méréseink szerint ez összhangban volt a bél szerkezeti károsodásával, melyet kvalitatív és kvantitatív módon detektáltunk.
3. Kutatócsoportunk elsőként vizsgálta a meleg és hideg ischaemia hatására a bélfal egyes rétegeiben bekövetkező szerkezeti károsodásokat differenciál pásztazó kalorimetriás módszerrel. Összességében elmondhatjuk, hogy a vékonybél kb. 3 órás hideg konzerválást képes tolerálni súlyosabb oxidatív stressz vagy strukturális károsodás nélkül.
4. Klasszikus IPO-protokoll [3x (30 másodperc ischaemia + 30 másodperc reperfüzió)] alkalmazása esetén a meleg I/R-ós és hideg tárolás utáni autotranszplantált vékonybélben csökkent a szöveti lipidperoxidáció, javult az endogén antioxidánsok hatása, és csökkent a bél szerkezeti károsodása.
5. Meleg I/R hatására idővel arányos módon csökken a bél szövetben az endogén PACAP-38 immunreaktivitási szintje.
6. Vékonybél meleg I/R-s és autotranszplantációs modellekben kimutattuk, hogy a PACAP vad típusú egerekben szignifikánsan kisebb mértékű szöveti oxidatív stressz és szerkezeti károsodás alakult ki a PACAP-38 KO állatok eredményéhez képest.
7. Vékonybél autotranszplantációs modellben a PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban konzervált bél szövetben fokozódott a PACAP-38 és a PACAP-27 immunreaktivitási szintje.
8. PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő prezerváció után a citokinek közül az sICAM, az L-Selectin és TIMP-1 expressziója szignifikánsan csökkent.

6. A szerző publikációi

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Nedvig K**, Ferencz A, Róth E, Lőrinczy D. DSC examination of intestinal tissue following warm ischemia and reperfusion injury. *J Therm Anal Calorim* 2009;95:775-9. IF: 1,587
2. Ferencz A, **Nedvig K**, Lőrinczy D. DSC examinations of intestinal tissue following cold preservation. *Thermochimica Acta* 2010;497:41-5. IF: 1,899
3. **Nedvig K**, Zapf I, Fekecs T. A vékonybél meleg és hideg ischaemiás károsodásának kimutatása differenciál pásztázó kalorimetriás vizsgálattal. *Magy Seb* 2011;64:207-12.
4. **Nedvig K**, Völgyi E, Wéber G, Róth E, Ferencz A. Az ischaemiás posztkondicionálás hatása az oxidatív stresszre és a szöveti struktúrára vékonybél meleg ischaemiás és autotranszplantációs modellekben. *Magy Seb* 2011;64:294-300.
5. **Nedvig K**, Wéber G, Németh J, Kovács K, Reglődi D, Kemény A, Ferencz A. Changes of PACAP immunoreactivities and cytokine levels after PACAP-38 containing intestinal preservation and autotransplantation. *J Mol Neurosci* 2012;48:788-94. IF: 2,891
6. **Nedvig K**, Szabó Gy, Csukás D, Sándor J, Németh J, Kovács K, Reglődi D, Kemény A, Wéber G, Ferencz A. A PACAP-38 citoprotektív és antiinflammatorikus hatásának vizsgálata vékonybél-autotranszplantációs modellben. *Magy Seb* 2013;66:250-5.

ΣIF: 6,377

Lektorált folyóiratban megjelent társszerzős közlemények:

1. Ferencz A, Rácz B, Tamás A, Reglődi D, Lubics A, Németh J, **Nedvig K**, Kalmár-Nagy K, Horváth ÓP, Wéber Gy, Róth E. Influence of PACAP on oxidative stress and tissue injury following small bowel autotransplantation. *J Mol Neurosci* 2009;37:168-76. IF: 2,72
2. Ferencz A, Rácz B, Tamás A, **Nedvig K**, Németh J, Kalmár-Nagy K, Horváth ÓP, Wéber G, Róth E, Reglődi D. Changes and effect of PACAP-38 on intestinal ischemia-reperfusion and autotransplantation. *Transplant Proc* 2009;41:57-9. IF: 0,994
3. Ferencz A, **Nedvig K**, Fekecs T, Rácz B, Wéber G, Hashimoto H, Baba A, Helyes Z, Reglődi D. Comparison of intestinal cold preservation injury on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in knockout and wild-type mice. *Transplant Proc* 2010;42:2290-2. IF: 0,993
4. Ferencz A, **Nedvig K**, Lőrinczy D.
Chapter: DSC examination of the intestinal tissue following ischemic injuries.
Book: Thermal analysis in medical application.
Ed: D. Lőrinczy, Akadémiai Kiadó, Budapest, 2011, pp. 255-69.
5. Ferencz A, **Nedvig K**, László E, Magyarlaci T, Lőrinczy D. DSC examination of kidney tissue following warm ischemia and reperfusion injury. *Thermochim Acta* 2011;525:161-6. IF: 1,805
6. Zapf I, Moezzi M, Fekecs T, **Nedvig K**, Lőrinczy D, Ferencz A. Influence of oxidative injury and monitoring of blood plasma by DSC on breast cancer patients. *J Therm Anal Calorim* 2016;123:2029-35. IF: 2,042
7. Moezzi M, Zapf I, Fekecs T, **Nedvig K**, Lőrinczy D, Ferencz A. Influence of oxidative injury and monitoring of blood plasma by DSC on patients with psoriasis. *J Therm Anal Calorim* 2016;123:2037-43. IF: 2,042

ΣIF: 10,596

Lektorált folyóiratokban megjelent elsőszerzős, idézhető absztraktok:

1. **Nedvig K**, Rác B, Reglődi D, Tamás A, Róth E, Wéber Gy, Ferencz A. A PACAP hatása az oxidatív stresszre bél meleg ischémia/reperfúziót követően. *Folia Hepatologica* 2007;11:29.
2. **Nedvig K**, Róth E, Lőrinczy D, Ferencz A. Morphological and Differential Scanning Calorimetry examination of the small bowel tissue following warm ischemia and reperfusion. *Br J Surg* 2008;95:88. IF: 4,304
3. **Nedvig K**, Rác B, Reglődi D, Róth E, Wéber Gy, Ferencz A. Effect of endogenous and exogenous PACAP on the oxidative stress and small bowel tissue lesion. *Br J Surg* 2008;95:89. IF: 4,304
4. **Nedvig K**, Róth E, Lőrinczy D, Ferencz A. Morfológiai és Differenciál Scanning Kalorimetria vizsgálatok vékonybél meleg ischémia/reperfúziót követően. *Magy Seb* 2008;61:178.
5. **Nedvig K**, Rác B, Tamás A, Reglődi D, Róth E, Wéber Gy, Ferencz A. PACAP hatása a szöveti oxidatív stresszre vékonybél autotranszplantációt követően. *Magy Seb* 2008;61:178.
6. **Nedvig K**, Takács I, Horváth Sz, Ferencz S, Jávör Sz, Fekecs T, Shanava K, Balatonyi B, Wéber Gy, Ferencz A. Az ischaemiás poszt kondicionálás oxidatív stresszre és szöveti károsodásra gyakorolt védő hatásának kimutatása vékonybél meleg ischaemia/reperfúzió során. *Magy Seb* 2010;63:267.
7. **Nedvig K**, Takács I, Horváth Sz, Ferencz S, Jávör Sz, Fekecs T, Shanava K, Balatonyi B, Wéber Gy, Ferencz A. Az ischaemiás poszt kondicionálás védő szerepe vékonybél-autotranszplantáció során. *Magy Seb* 2010;63:267.

Lektorált folyóiratokban megjelent társszerzős, idézhető absztraktok:

1. Ferencz A, Rác B, Gasz B, Benkő L, **Nedvig K**, Tamás A, Reglődi D, Róth E. A PACAP hatása a vékonybélben bekövetkező ischémiás/reperfúziós károsodásokra. *Magy Seb* 2006;59:227.
2. Ferencz A, Rác B, Gasz B, Benkő L, **Nedvig K**, Tamás A, Reglődi D, Róth E. A PACAP hatása a vékonybélben bekövetkező ischémiás/reperfúziós károsodásokra. *Magy Seb* 2007;60:163.
3. Ferencz A, **Nedvig K**, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry, as a new method to measure the structural injury in intestinal ischemia models. *Br J Surg* 2009;96:94. IF: 4,304
4. Ferencz A, **Nedvig K**, Lőrinczy D. DSC examinations following cold preservation of small bowel. *Eur Surg Res* 2009;43:137. IF: 1.327
5. Ferencz A, **Nedvig K**, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetry, as a new method to measure the structural injury during intestinal autotransplantation. *Transplant Int* 2009;22 S2:344. IF: 3.115
6. Ferencz A, **Nedvig K**, Völgyi E, Fekecs T, Reglődi D, Takács I, Wéber Gy. Comparison of intestinal cold preservation injury on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) knock-out and wild-type mice. *Br J Surg* 2010;94:114. IF: 4.304

Elsőszerzős előadások és poszterek

1. **Nedvig K**, Rác B, Reglődi D, Tamás A, Róth E, Wéber Gy, Ferencz A. A PACAP hatása az oxidatív stresszre bél meleg ischémia/reperfúziót követően. Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa, 2007. október 11-13, Pécs.
2. **Nedvig K**, Róth E, Lőrinczy D, Ferencz A. Morphological and Differential Scanning Calorimetry examination of the small bowel tissue following warm ischemia and reperfusion. 43rd Congress of European Society for Surgical Research (ESSR), 21-24 May, 2008, Warsaw, Poland.
3. **Nedvig K**, Reglődi D, Róth E, Wéber Gy, Ferencz A. Effect of endogenous and exogenous PACAP on the oxidative stress and small bowel tissue lesion. 43rd Congress of ESSR, 21-24 May, 2008, Warsaw, Poland.
4. **Nedvig K**, Róth E, Lőrinczy D, Ferencz A. Morfológiai és Differenciál Scanning Kalorimetria vizsgálatok vékonybél meleg ischémia/reperfúziót követően. Magyar Sebész Társaság 59. Kongresszusa, 2008. június 18-20, Debrecen.
5. **Nedvig K**, Rác B, Tamás A, Reglődi D, Róth E, Wéber Gy, Ferencz A. PACAP hatása a szöveti oxidatív stresszre vékonybél autotranszplantációt követően. Magyar Sebész Társaság 59. Kongresszusa, 2008. június 18-20, Debrecen.
6. **Nedvig K**, Róth E, Ferencz A, Lőrinczy D. DSC examination of intestinal tissue following warm ischemia and reperfusion. XV. International Conference on Biological Calorimetry, 24-30 May, 2008, Pécs.
7. **Nedvig K**, Ferencz A, Lőrinczy D. DSC examination of intestinal tissue following cold preservation. 18. Ulm-Freiberger Kalorimetria, 18-20 Marz, 2009, Freiburg, Germany.
8. **Nedvig K**, Takács I, Horváth Sz, Ferencz S, Fekecs Tamás, Balatonyi B, Wéber Gy, Róth E, Ferencz A. Az ischémiás poszt kondicionálás hatásának vizsgálata vékonybél autotranszplantáció során. Magyar Szabadgyök Kutató Társaság Kongresszusa 2010. 06. 25-26, Pécs.
9. **Nedvig K**, László E, Völgyi E, Lőrinczy D, Ferencz A. DSC examination of kidney tissue following warm ischemia and reperfusion injury. 4th Central European Congress of Surgery (CECS), April 28-30, 2011, Budapest.
10. **Nedvig K**, Völgyi E, Fekecs T, Wéber G, Reglődi D, Róth E, Ferencz A. Examination of small intestinal cold preservation injury on PACAP knock-out and wild-type mice. 4th CECS, April 28-30, 2011, Budapest.
11. **Nedvig K**, Völgyi E, Fekecs T, Wéber G, Róth E, Ferencz A. Influence of ischemic postconditioning on the tissue injury following intestinal autotransplantation. 4th CECS, April 28-30, 2011, Budapest.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ez úton szeretnék köszönetet mondani Dr. Ferencz Andrea docens asszonynak, témavezetőmnek fáradhatatlan segítségéért, mind a kísérletes munka irányításában, mind pedig a szakmai felkészítésben.

Köszönettel tartozom Lőrinczy Dénes Professzor Úrnak, a Pécsi Tudományegyetem Biofizikai Intézet egyetemi tanárának a DSC-mérések során nyújtott szakmai segítségéért és támogatásáért.

Szeretném megköszönni Reglődi Dóra Professzor asszonynak, a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai Intézet egyetemi tanárának, hogy a PACAP-al kapcsolatos kutatócsoport munkájában részt vehettem.

Továbbá köszönet illeti Prof. Dr. Róth Erzsébet egyetemi tanárt és Dr. Jancsó Gábor egyetemi docent, hogy kutató munkámat támogatták, és a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet valamennyi dolgozóját munkám megvalósulásában nyújtott segítségükért.