

# Izolált veseperfúziós rendszerek modellezése a transzplantációs ischaemiás toleranciában

PhD értekezés tézise

**Telek Vivien**

**Témavezető:** Dr. Takács Ildikó

**Programvezető:** Dr. Jancsó Gábor

**Doktori iskola vezetője:** Dr. Bogár Lajos

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Sebészeti Oktató és Kutató Intézet



Pécs, 2021



# 1. Bevezetés

A vesetranszplantációt tartják a legjobb kezelési módnak azon betegek esetén, akik végstádiumú vesebetegségben szenvednek. Az ischaemia-reperfúziós károsodás (IRI) egy elkerülhetetlen folyamat a donor transzplantáció során és befolyásolja mind a rövid-, mind pedig a hosszútávú graft funkciót. Vesetranszplantációt követően a fő következmény a DGF (késleltetett graft funkció – delayed graft function), akut és krónikus graftkilökődés és krónikus graft diszfunkció. Az IRI mechanizmusok jobb megérthetősége segítséget jelent a további fejlesztéseket illetően az átültetett szervek túlélése tekintetében. Hozzávetőlegesen a DGF 30%-a vesetranszplantációt követő IRI miatt alakul ki. A kaszpázok, az apoptózis klasszikus effektor enzimeit, képesek gyulladást indukálni IRI-t követően, mely az egyik legfontosabb nem-specifikus szabályozó faktora nem csupán a DGF-nek, de a későbbi allograft diszfunkciónak is. IRI folyamán felszabadult mediátorok felelősek a helyi és a távolabbi szervekben bekövetkező mikrocirkulációs változásokért, citokinek felszabadulásáért (TNF-alfa, IL-1 és IL-6), melyek súlyos sejtválaszt indukálnak és akár a sejtek nekrozisát vagy apoptózisát okozhatják.

A transzplantált vesék károsodott szerveknek tekinthetők és gyógyszerek használhatóak egyedül, vagy kombinálva arra, hogy az ischaemia és reperfúzió okozta károsodásokat mérsékeljük. Erre alkalmasak a perfúziós oldatok és módszerek is.

## 1.1. Endoplazmás retikulum stressz

Az eukarióta sejtek főbb jellemzője, hogy autoregulációval rendelkeznek. Az endoplazmás retikulum (ER), Golgi apparátus, mitokondrium, peroxisómák és a sejtmag mind saját funkcióval bír. Ez az alapja a helyes sejtes működésnek és ezen folyamatok szigorúan szabályozottak annak érdekében, hogy fenntartsák a sejt homeosztázisát. Az ER egy sejtalkotó, mely szekréciós és membrán fehérjeszintéziséért és foldingért felelős. A megfelelően foldingolt fehérjék a Golgi apparátusba transzportálódnak. A nem megfelelő foldingon átesett fehérjék pedig az ER-asszociált degradáció (ERAD) által lebontásra kerülnek. Számos élettani stressz okozhatja a megbomlott homeosztázist és egyensúlyi állapotot, mely az ER stresszt (ERS) eredményezi. Az UPR (unfolded protein response) a gyűjtőneve a szignál transzdukciós útvonalaknak, melyek az ERS érzékelésében és a megfelelő válaszreakcióban szerepelnek. Ezen útvonal közül a leginkább konzervált az IRE1, mely az XBP1 fehérjét érinti. Ezen fehérje

befolyásolja az ER protein folding mechanizmusát és kapacitását, továbbá a helytelenül foldingolt ER fehérjék degradációjáért felel, mellyel védőfunkciót tölt be a sejtben.

Az IRE1 szignalizáció képes serkenteni a sejthalált ERS-t követően kaszpázok aktiválásán keresztül. A TRAF2 adapter molekula kapcsolatba lép a prokaspáz-12-vel, és az ERS megzavarja ezt az interakciót, és feltehetőleg az IRE1 kináz domén a TRAF2-höz kapcsolódva a prokaspáz-12 aktív enzimmé való konverzióját okozza. A kaszpáz-12 szerepe a sejthalál elősegítésében vitatott, ugyanis Nakagawa és munkatársai tanulmánya szerint, melyben rágcsáló *Caspase-12<sup>-/-</sup>* sejtek nagymértékben rezisztensek voltak ERS indukálta sejthalálra és egy másik csoport nem szignifikáns rezisztenciát mutatott ERS-re, amikor *Caspase-12<sup>-/-</sup>* sejteket állítottak elő.

## **1.2. Pioglitazone**

A peroxiszóma proliferátor aktiváló receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) a molekuláris receptorok családjába tartozik, melyek a nagyszámú gének expressziójának kontrolljárt felelősek és szenzorként működnek hormonok, vitaminok, endogén metabolitok és xenobiotikus vegyületek tekintetében. A thiazolidinedione (TZD) csoport a legszéleskörűbben tanulmányozott PPAR $\gamma$  ligandok. A PPAR $\gamma$  aktiváció inzulin szenzitizációt okoz, mellyel ellentétes hatást vált ki a TNF -alfával kifejtett, adipocitákat érintő befolyással és fokozza a glükóz metabolizmust. A PPAR $\gamma$  agonistát, a Pioglitazont (Pio) antidiabetikus gyógyszerként használják a 2-es típusú cukorbetegség kezelésében, mint hatékony inzulinérzékenyítőt. A legújabb tanulmányok azt mutatják, hogy a Pio védi a veséket, a szívizomot és az agyat az IRI-vel szemben. A Pio és más PPAR $\gamma$  agonisták potenciális szerepét nefroprotektív szerekként a vesekárosodás nem diabéteszes modelljeiben (például IRI és gyógyszerek vagy kémiai szerek által kiváltott vesetoxicitás) bizonyítják. A Pio renoprotektív tulajdonságai az endothelium-függő értágulat megkönnyítésével mutatkoznak meg az NO-termelés rendellenességeinek módosításával, az antioxidáns profil fejlesztésével, valamint a gyulladáshoz vezető mediátorok expressziójának kontrolljával és apoptotikus faktorokkal.

## 2. Célkitűzés

Ötletünk szerint három módszerrel tudjuk modellezni a transzplantáció folyamatát. Az első részben a Pio-t egy koncentrációban teszteljük - amelyet az irodalom többnyire ajánl - és az ischaemia-reperfúzió különböző stádiumaiban alkalmazzuk IRI modellben. A második részben a Pio-ra koncentrálnak több dózisban és a lehetséges toxikus hatásra, és a leghatékonyabb dózis kiválasztása a célunk. A harmadik részben a fent említett két módszerből keveréket készítünk, amelynek célja a gyógyszer különböző koncentrációkban történő tesztelése perfúzió-reperfúziós modellben, amely a legközelebb áll a klinikai alkalmazáshoz.

1. Célunk a PPAR- $\gamma$  agonista Pioglitazone hatásának vizsgálata ischaemia-reperfúziós károsodásban. A paraméterek a szuperoxid-dizmutáz aktivitás, a TNF-alfa, az IL-1 $\beta$ , az IL-6 és a kataláz aktivitás. Szeretnénk bebizonyítani, hogy a Pio csökkentheti az IRI-t a gyulladással citokinek szintjének mérséklésével, és segít fenntartani az egyensúlyt az ROS és az antioxidánsok között. Először a szövettani változásokat szeretnénk megvizsgálni hematoxylin-eozin festéssel. Első kísérleti módszerünkönél döntő kérdés, hogy van-e különbség a kezelés időzítésében. A cél annak bemutatása, hogy a Pio pozitív hatással van a sérült vesére.
2. Feltételezzük, hogy a Pio különböző hatással van a vesékre és a májra. A cél ennek az eltérésnek a megállapítása az *in situ* teljes test perfúzióval kapcsolatban. A módszer további célja az endoplazmás retikulum stressz mértékének vizsgálata máj és vese esetén. Arra számítunk, hogy a Pio csökkenti az ER stresszt. Ennek mérésére szeretnénk Western blot elemzést végezni.
3. Összehasonlítanánk az *in situ* perfúziót az *in situ* perfúzió-reperfúziós modellel. Ennek a különbségnek a bemutatására ugyanazokat az eszközöket és kísérleti körülményeket alkalmazzuk, és meg szeretnénk mérni a kataláz és SOD aktivitást és a gyulladással citokinek szintjét, továbbá a szövettani paramétereket a vesék látható változásainak értékelésére. Célunk, hogy megválaszoljuk a kérdést, hogy az *in situ* perfúzió, vagy az *in situ* perfúzió-reperfúzió ad jobb eredményt vesék esetén.

## **3. Anyagok és módszerek**

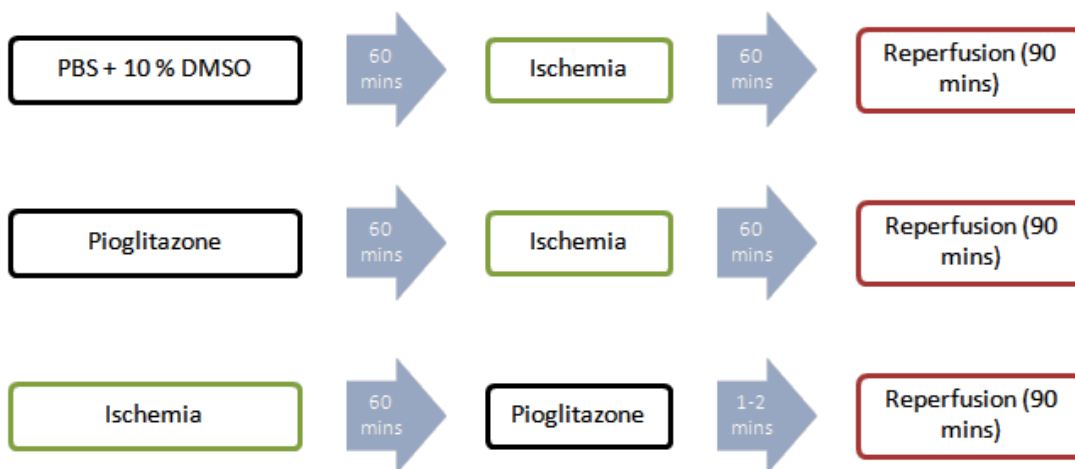
### **3.1. Ischaemia-reperfúziós károsodás modell**

#### **3.1.1. Állatmodell**

Harminc hasonló korú, 250-300 g közötti Wistar patkányt használtunk fel erre a vizsgálatra. A patkányokat standardizált ketrecekben, normál körülmények között (a hőmérséklet  $25 \pm 2$  ° C volt, légszűrt helyiségben), 12/12 órás világos és sötét ciklusban helyeztük el, és standard patkány táppal és vízzel etettük ad libitum. A vizsgálati protokollt az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács hagyta jóvá. (BA02/2000-38-2019.)

#### **3.1.2. Kísérleti protokoll**

Az állatokat három csoportra osztottuk (mindegyik csoportban 10 patkány). Az első csoport a kontrollcsoport volt, a műtétet és az ischaemiás állapotot kiváltottuk, de a gyógyszer oldószerét (PBS + 10% DMSO) adtuk intraperitoneálisan (i.p.) egy órával az ischaemiás periódus előtt. A második csoportot Pioglitazonnal (20 mg/kg) kezeltük egy órával az ischaemiás periódus előtt, (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Ebben a két csoportban 60 perces ischaemia után 90 percen át megkezdtük a reperfúziót. A harmadik csoportot először elaltattuk, majd ischaemiát váltottunk ki, és a reperfúzió kezdőpontja előtt 20 mg/kg Pioglitazont adtunk be i.p. ezt követően kiváltottuk a reperfúziót. A vizsgálat egységesítése érdekében az összes eljárást minden csoportban hasonló időpontokban hajtottuk végre. A beadást megelőzően a gyógyszert frissen PBS + 10% DMSO oldatba oldottuk. (1. ábra)



**1. ábra: Kísérleti csoportok: 1: kontroll, 2: IR prekondicionálás Pio-val, 3: IR poszkondicionálás Pio-val (IR - ischaemia-reperfúzió; Pio - Pioglitazone)**

### 3.1.3. Elvégzett beavatkozás ismertetése

A patkányokat preoperatív módon altattuk ketamine (2,7 ml/kg) és diazepam (2,7 ml/kg) keverék intraperitoneális (i.p.) alkalmazásával. Az arány 1:1 volt. A has bőrét állati szórtelenítő géppel szórtelenítettük. A műtét során az állatokat fűtött párnára helyeztük, és EKG-monitorozást is alkalmaztunk. A medián laparotómia után heparint adtunk be a mesenterialis vénába, majd a bal vese vérrellátását kis méretű bulldog érfogó segítségével elzártuk. Az érfogót a lefogás után 60 perccel eltávolítottuk, és a patkányt 90 percig figyeltük a reperfúziós periódus alatt. 90 perc elteltével az állatokat termináltuk, és vese- és vérmintákat gyűjtöttünk. A vérmintákat centrifugáltuk, a plazmát összegyűjtöttük és  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A vesemintákat azonnal  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk különálló edényekben.

## 3.2. *In situ* teljes test perfúziós modell

### 3.2.1. Állatmodell

Hatvan hasonló korú, 250-300 g közötti Wistar patkányt használtunk fel erre a vizsgálatra. A patkányokat standardizált ketrecekben, normál körülmények között (a hőmérséklet  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  volt, légszűrt helyiségben), 12/12 órás világos és sötét ciklusban helyeztük el, és standard patkány táppal és vízzel etettük ad libitum. A vizsgálati protokollt az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács hagyta jóvá. (BA02/2000-38-2019.)

### 3.2.2. Kísérleti protokoll

Az állatokat hat csoportra osztottuk, mindegyik csoportban tíz patkány volt. Az első csoport a kontroll (sham operált) volt. A második csoport a KH kontroll volt (KH - Krebs-Henseleit puffer), a harmadik csoport a KH + Pio 10 mg/kg, a negyedik a KH + Pio 20 mg/kg, az ötödik a KH + Pio 30 mg/kg, a hatodik csoport pedig a KH + Pio 40 mg/kg volt. A vizsgálat egységesítése érdekében az összes eljárást minden csoportban hasonló időpontokban hajtottuk végre. A beadást megelőzően a gyógyszert frissen PBS + 10% DMSO oldatba oldottuk. A perfúziós oldat hőmérsékletét az egész vizsgálat alatt 20 ° C-on tartottuk. (1. táblázat)

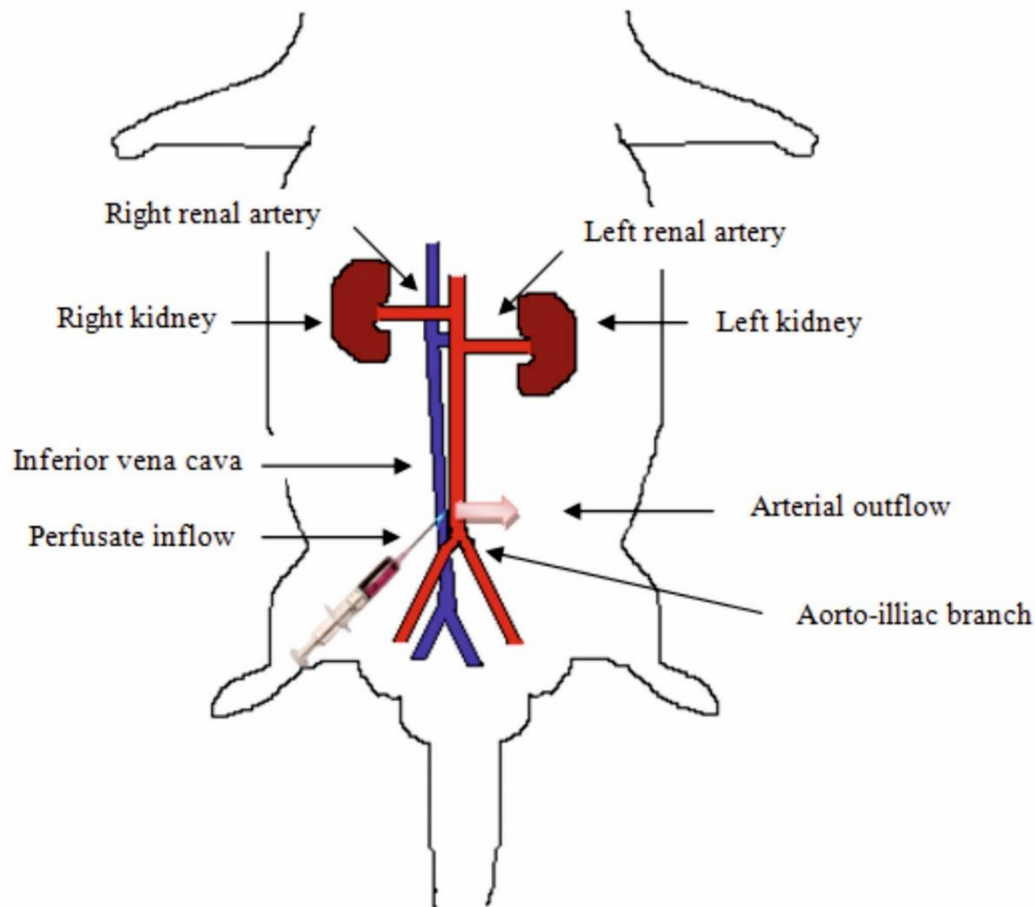
1. táblázat: A vizsgálati csoportok és a hozzájuk tartozó kezelések

Csoportok (n=10 minden csoportban)	Kezelések
1. csoport	kontroll (sham operált)
2. csoport	perfundált KH
3. csoport	perfundált KH + 10 mg/kg Pio
4. csoport	perfundált KH + 20 mg/kg Pio
5. csoport	perfundált KH + 30 mg/kg Pio
6. csoport	perfundált KH + 40 mg/kg Pio

### 3.2.3. Elvégzett beavatkozás ismertetése

A patkányokat preoperatív módon altattuk ketamine (2,7 ml/kg) és diazepam (2,7 ml/kg) keverék intraperitoneális (i.p.) alkalmazásával. Az arány 1:1 volt. A has bőrét állati szőrtelenítő géppel szőrtelenítettük. A műtét során az állatokat fűtött párnára helyeztük, és EKG-monitorozást is alkalmaztunk. A median laparotomia után az infrarenalis hasi aortát és a vena cava-t preparáltuk, majd heparint (400 NE / kg) adtunk a mesenterialis vénába. Néhány perc múlva a vena cava-t katétereztük (22-es méret), és megkezdjük az *in situ* teljes test perfúziót. Minden kísérleti csoportban 200 ml perfúziós oldatot használtunk. A perfúziós berendezést 150 ml/h-ra állítottuk be, és egy állat esetében a perfúzió minden kísérleti csoportban 80 percig tartott. A vena katéterezésével egyidejűleg az aortán kis bemetszést ejtettünk, és a perfúzió kiáramlását a hasüregből távolítottuk el szívással. (2. ábra) A kontroll csoportot kezelt csoportnak tekintettük perfúzió nélkül, amelyben a vérkeringés sértetlen volt. A kísérlet során az állatokat

kivéreztetéssel feláldoztuk. A perfúziós protokoll végén a veséket és a májat kivettük, és azonnal  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra helyeztük különálló edényekben.



2. ábra: Az *in situ* perfúziós állatmodell sematikus ábrázolása

### 3.3. *In situ* perfúzió-reperfúziós modell

#### 3.3.1. Állatmodell

Hatvan hasonló korú, 250-300 g közötti Wistar patkányt használtunk fel erre a vizsgálatra. A patkányokat standardizált ketrecekben, normál körülmények között (a hőmérséklet  $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  volt, légszűrt helyiségben), 12/12 órás világos és sötét ciklusban helyeztük el, és standard patkány táppal és vízzel etettük ad libitum. A vizsgálati protokollt az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács hagyta jóvá. (BA02/2000-38-2019.)



### 3.3.2. Kísérleti protokoll

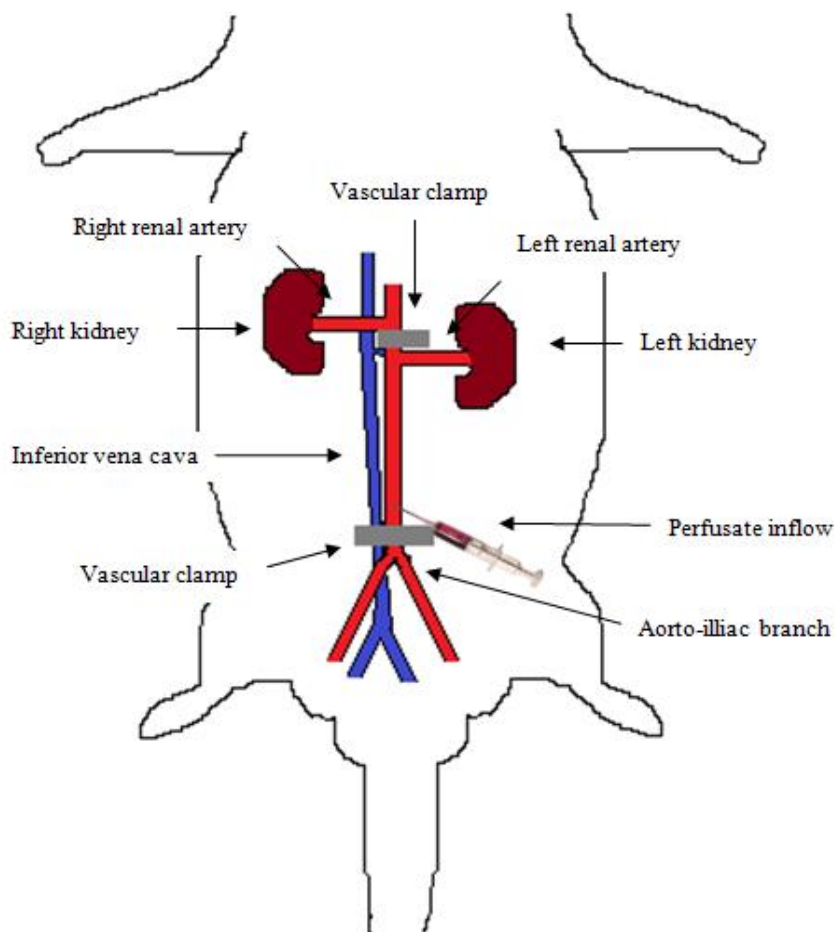
Az állatokat tíz csoportra osztottuk, mindegyik csoportban hat patkány volt. A vizsgálat egységesítése érdekében az összes eljárást minden csoportban hasonló időpontokban hajtottuk végre. A beadást megelőzően a gyógyszert frissen PBS + 10% DMSO oldatban oldottuk. A perfúziós oldat hőmérsékletét az egész vizsgálat alatt 20 ° C-on tartottuk. (2. táblázat)

2. táblázat: Kísérleti csoportok, minden csoportban 10 állattal

Kontroll csoportok	kezelt csoportok
KH kontroll	KH perfundált
KH + 10 mg/kg Pio_kontroll	KH + 10 mg/kg Pio perfundált
KH + 20 mg/kg Pio_kontroll	KH + 20 mg/kg Pio perfundált
KH + 30 mg/kg Pio_kontroll	KH + 30 mg/kg Pio perfundált
KH + 40 mg/kg Pio_kontroll	KH + 40 mg/kg Pio perfundált

### 3.3.3. Elvégzett beavatkozás ismertetése

A patkányokat preoperatív módon altattuk ketamine (2,7 ml/kg) és diazepam (2,7 ml/kg) keverék intraperitoneális (i.p.) alkalmazásával. Az arány 1:1 volt. A has bőrét állati szőrtelenítő géppel szőrtelenítettük. A műtét során az állatokat fűtött párnára helyeztük, és EKG-monitorozást is alkalmaztunk. A median laparotomia után a hasi és suprarenalis aortát és a vena cava-t preparáltuk, és heparint adtunk a mesenterialis vénába. Ezután a szuprarenalis aortát egy mikrosebészeti érfogóval lefogtuk, mellyel elzártuk a vér útját, és a hasi aortát katétereztük (22-es méret). A perfúziós gépet csatlakoztattuk a katéterhez, és az áramlást mindegyik csoportban 110 ml/h sebességgel tartottuk fenn. A perfuzátum térfogata 55 ml volt. 30 perc múlva az perfúzió befejeződött, a katétert eltávolítottuk, és keletkezett kivezető nyílást lezártuk. (3. ábra) A reperfüziós szakasz 60 percig tartott. Ezt követően az állatokat kivérettetéssel termináltuk. A vér- és vesemintákat azonnal -80 ° C-ra helyeztük különálló edényekben.



3. ábra: Az *in situ* perfúzió-reperfúziós állatmodell sematikus ábrázolása

### 3.4. Analitikai módszerek

#### 3.4.1. Biokémiai analízis

Az eredmények igazolása érdekében mértük a vesemintákból az IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , SOD és kataláz szintjét és aktivitását. A vese- és májmintákból *in situ* perfúziós modell alapján mértük a SOD és a kataláz aktivitást (a gyulladáscitokineket nem elemeztük a reperfüzió hiánya miatt). Az IL-1 $\beta$ , az IL-6 és a TNF- $\alpha$  a gyulladáscitokinek fő mutatói, és a vér- és szövetmintákban mutatott szintjüket Rat IL-1 béta ELISA Kit, Rat IL-6 Elisa Kit, Rat TNF alfa ELISA Kit segítségével mértük (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) a gyártó protokolljának megfelelően. Az oxidatív stressz szintjének méréséhez a gyártó protokollját követve a szuperoxid-diszmutáz-aktivitás vizsgálati reagenseket és a kataláz-aktivitás-vizsgálati kitet (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) használtuk.

### **3.4.2. Hisztopatológiai analízis**

#### Hematoxylin-eozin jelölés protokollja

A szöveteket 10% neutrális formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, 3 mikrométer vastag szeletekre vágtuk rotációs mikrotommal (Microm HM 325, Thermo Scientific Ltd.), és bevonatos üvegmikroszkóp tárgylemezekre helyeztük. Deparaffinizálás és rehidratálás után a mintákat hematoxilinnal festettük, csapvízzel kékítettük, a szöveteket eozinnal festettük, alkoholban dehidratáltuk, xilolban tisztítottuk és állandó rögzítő közeggel szereltük fel.

### **3.4.3. Western blot protokoll**

A vese- és májszövet mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd kézzel mozsárban porítottuk és jéghideg lízispufferben oldottuk (amely 50 mM Tris-t (pH 7,4), 150 mM NaCl-ot, 1 mM EGTA-t, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>-et, 100 mM NaF, 5-et tartalmazott.  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, 10% glicerin és 1% Triton X-100 plusz 10  $\mu$ g/ml proteázinhibitor aprotinin). A lizátumokat 40 000x g-vel 4 °C-on 30 percig centrifugáltuk, majd a felülúszók fehérjekoncentrációját meghatároztuk a Protein Assay Dye Reagent Concentration (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornia, USA) segítségével (abszorpciómérés 595 nm-en) 30  $\mu$ g denaturált teljes fehérjét tartalmazó mintákat készítettünk és 10% poliakrilamid gélekbe mértük. A méret alapján elválasztott fehérjéket fél órán át elektroblottoltuk a PVDF membránokra a Trans-Blot Turbo félszáraz rendszerrel (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornia, USA), majd blokkoltuk 3% BSA-ban oldva 0,2% Tween 20-at tartalmazó Tris-pufferolt sóoldatban. A membránok vizsgálata az elsődleges antitestekkel (kaspáz-12 és XBP1 [Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA]) 1:1000 arányban hígítva a blokkoló oldatban, majd 4 °C-on egy éjszakán át. Az antitestek membránhoz való kötődését egy torna-peroxidázhoz konjugált szekunder anti-nyúl IgG-vel (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) hígítottuk, 1:10 000 arányban. A fokozott kemilumineszcens jelet egy G:box gél dokumentációs rendszer (Syngene, India) segítségével jelenítettük meg. Ezután az összes membránt leválasztottuk az antitestekről, és a fentiek szerint a GAPDH elleni elsődleges antitest (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA) alkalmazásával 1: 3000 hígítási sebességgel ismételten kimutattuk az esetleges terhelési különbségeket. A blotok elemzéséhez ImageJ szoftvert használtak, a statisztikai értékeléshez Bonferroni korrekcióval egyirányú varianciaanalízist (ANOVA) használtak.

#### **3.4.4. Statisztikai analízis**

A statisztikai értékeléshez egyirányú varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, majd megfelelő post hoc tesztek (Dunnett's, Sidak) végeztünk többszörös összehasonlítás céljából. Az összes Western-blotot egymástól függetlenül, három ismétlésben készült. A statisztikai értékelés tekintetében egyirányú ANOVA-t alkalmaztunk, amelyet Bonferroni post-hoc elemzése követett. Minden adatot átlag  $\pm$  SD értéként jelenítettünk meg. A különbséget akkor tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, amikor a p-érték kevesebb, mint 0,05, és csillaggal osztályoztuk az alábbiak szerint: p <0,05 (\*); p <0,001 (\*\*); p <0,0001 (\*\*\*). A statisztikai elemzést a GraphPad Prism for Windows szoftverrel (5.03 verzió) számoltuk.

### **4. Eredmények és diszkusszió**

#### **4.1. Ischaemia-reperfúziós károsodás modell**

##### **4.1.1. Eredmények**

Először, arra a kérdésre válaszolva, hogy a Pio melyik beállítással csökkenti jobban az oxidatív stresszt, SOD és kataláz aktivitást, vizsgálatokat végeztünk. Az kontrollcsoport szignifikáns különbséget mutat az ischaemiás csoportokhoz képest. A két kezelt csoport között azonban nem észlelhetők döntő eltérések.

Az IL1-béta, IL6 és TNF-alfa expresszióját ELISA-val detektáltuk. A kontrollminták statisztikailag szignifikáns különbséget mutattak a kezelt csoportokhoz képest, és a kezelés leghatékonyabb időpontja az IL1-béta esetén a Pio kezelés a reperfúziós periódus megkezdése előtt (pre-Pio reperfúziós ischaemia). Az ischaemiás periódus kiváltása előtti Pio-kezelés azonban hatékonyan csökkentette az IL6 és TNF-alfa expressziót a kontroll ischaemiás csoporthoz képest. A két kezelt csoport, a pre-Pio 1h ischaemiás és a pre-Pio reperfúziós ischaemia között azonban nem volt szignifikáns különbség.

A hisztopatológiai elemzés nem mutatott apoptotikus vagy onkotikus jeleket a kontroll csoportokban. Az alapvető szövetszerkezetet megtartott maradt. A kontroll ischaemiás csoportban azonban a duzzadt tubulusok és Bowman-tokok, valamint az eozinofília mutatták a veseszövet károsodását. A kezelt csoportok közötti különbség a megduzzadt endotheliális tubulusok meglétében látható. A Pio 1h előtti ischaemiás csoportban a duzzanat látható, de nem ugyanolyan mértékben, mint az előző csoportban, a Pio 1h előtti ischaemiában. A pre-Pio

reperfúziós ischaemia korrelál a kontroll szövetszerkezetével. A hisztopatológiai eredmények korrelálnak az ELISA és a Western blot eredményekkel.

A kaszpáz-12 expresszióját Western blot alkalmazásával mértük. A kontrollminták sávjai gyengébbek és a kezeletlen, de az ischaemiás (kontroll ischaemiás) csoport pixelsűrűsége szignifikánsan magasabb a kontroll és a Pio 1h előtti ischaemiás csoporthoz képest. A reperfúzió iniciáció előtti Pio-beadás (pre-Pio reperfúziós ischaemiás csoport) azonban csökkentheti a kaszpáz-12 expresszióját, statisztikailag nem szignifikáns mértékben.

A kezelt csoportok csökkentették az XBP1s expressziót a kontroll ischaemiás csoporthoz képest. A kontroll ischaemiás és a kezelt csoportok szignifikánsan különböztek a kontrolloktól. XBP1u esetén a kontrollcsoportok szignifikáns eltérést mutatnak a nem kezelt, de az ischaemiás (kontroll ischaemiás) és a kezelt csoportoktól. A leghatékonyabb időpont a Pio beadása volt egy órával az ischaemia megkezdése előtt, összehasonlítva a kontroll ischaemiás csoporttal az XBP1u expresszió csökkenésében. A sávok mintázata azonban a korábbi eredményekhez hasonlóan azt mutatja, hogy a kontroll ischaemiás és a pre-Pio reperfúziós ischaemiás csoportok közötti különbségeket statisztikai elemzéssel nem sikerült megállapítani.

#### **4.1.2. Megbeszélés**

Az IRI súlyos problémákat okozhat a mikrocirkulációban, és a beteg magasabb morbiditásához és hosszan tartó kórházi kezeléshez vezethet. Sejt diszfunkció, interstitialis ödéma, gyulladással citokin expresszió sejtpusztuláshoz vezethet. Az ischaemiás időszak hossza nagy jelentőséggel bír az okozott károk szempontjából. IRI modellünk esetében a 45 perces ischaemiás és 90 perces reperfúziós periódusokat alkalmaztuk, mivel a nemzetközi szakirodalomban ajánlott. A hosszabb ischaemiás periódus (60 percnél hosszabb ideig) visszafordíthatatlan sérülést és jelentős sejthalált okoz, amely káros hatással van a szerv működésére és veseelégtelenséghez vezethet.

Nemzetközi szakirodalom alapján a nemi és/vagy szexuális szteroidok szerepet játszhatnak az ischaemiás sérülésektől való felépülésben a nem vese szervekben, a posztischaemiás szervi diszfunkciókat pedig a nem és a nemi szteroidok befolyásolják. Müller és mtsai cikket publikált erről a kérdéssel, és a közölt tanulmányok következtetései szerint a jelen tézisben bemutatott összes kísérlet során hím Wistar patkányokat választottak. Arra a következtetésre jutottak, hogy a nőstény patkányok viszonylag védettek a posztischaemiás veseelégtelenséggel szemben, továbbá

hímeknél úgy tűnt, hogy az androgének ischaemiás vesekárosodásra gyakorolt hatását az endothelin által kiváltott érrendszeri változások közvetítik. Robert és mtsai megvizsgálták a nemek közötti különbséget és a nemi hormon termelését rágcsálók vese ischaemia reperfüziós sérülésében és javításában. Összességében elmondható, hogy az ischaemia után a vesefunkció helyreállítása és a szövetkárosodás nemtől függött, és a különbségek a nemi hormon termelésének modulációjával, valamint a szövetek átalakulásának és a proliferatív sejtfolyamatok módosításával társultak.

Az IRI módszer sokféle alkalmazást kínál. Hatalmas számú gyógyszert teszteltek, függetlenül attól, hogy antioxidáns, gyulladáscsökkentő vagy vese védő szerek-e vagy sem. Célunk az volt, hogy jellemezzük a Pio alkalmazásának hatását egyetlen dózisban, de eltérő időpontban. Ezért SOD és kataláz aktivitást, gyulladással kapcsolatos citokineket (IL1-béta, IL6, TNF-alfa) mértünk, hisztopatológiai változásokat és endoplazmás retikulum stressz markereket (kaspáz-12, XBP1s és XBP1u) elemeztünk. A további kísérletekhez először a következtetést vontuk le, és az ischaemiás periódus megkezdése előtt egy órával a Pio kezelést részesítettük előnyben, mivel ez a kísérleti csoport képviselte elvárásainkat és válaszul szolgált a hipotézisekre. A Pio 1h előtti ischaemiás csoport nemcsak az oxidatív stressz és gyulladással kapcsolatos citokinek, hanem az ERS markereket is csökkenti. Feltételezzük tehát, hogy a Pio protektív hatással bír az IRI-ben az oxidatív stressz, a gyulladás és az ERS, valamint az ebből következő sejthalál ellen.

Az IRI módszert az 1980-as évek óta alkalmazzák, és számos gyógyszert és szert alkalmaztak hatásuk és alkalmazhatóságuk meghatározására. Intézetünk számos publikációval rendelkezik és más kutatókkal közreműködött az IRI indukció, valamint a pre- és poszt-kondicionálás módszereinek kombinálásával.

A nemzetközi szakirodalom szerint a Pio gyulladáscsökkentő, antioxidáns és vesét védő hatásait bizonyították. Az ERS-ben az IRI patkány vesemodelljével kapcsolatos jótékony funkciót azonban még nem vizsgálták. Ezért, hogy összehasonlítsuk a két kezelt csoport hatását a fent említett markerekre, kísérleti tanulmányként fontosnak tartottuk azok hatásainak összevetését, amelyek eredményei további kísérletek alapjául szolgáltak, mint például az *in situ* perfúziós modell és az *in situ* perfúzió -reperfüziós modell.

Korábban, mint fent említettem, megvizsgálták és bebizonyították a Pio oxidatív stressz és gyulladás elleni védőhatását, azonban az ERS markereit még nem vizsgálták IRI környezetben Pio-val. Az NRK-52E sejteket azonban hipoxia/reoxigenizációs sérülésnek tették ki, és deklarálták a Pio citoprotektív hatását.

Összegzésként elmondható, hogy a hisztopatológiai eredmények korrelálnak az ELISA és a Western blot eredményekkel, mivel a Pio-nak nem volt toxikus hatása a beadott dózisban, és csökkentette a gyulladást azáltal, hogy mérsékelte a vizsgált citokinek expresszióját és az oxidatív stresszt. Az ERS markerek azt ábrázolták, hogy a Pio védő hatással van az organelum IRE1 útvonalra gyakorolt stresszére. További kísérletekre van azonban szükség a Pio leghatékonyabb mennyiségének meghatározásához az IRI és más modelljeink tekintetében.

## **4.2. *In situ* teljes test perfúziós modell**

### **4.2.1. Eredmények**

#### **4.2.1.1. Patkány vese eredmények**

SOD és kataláz aktivitás ELISA-kat végeztünk a beadott Pio leghatékonyabb adagjának meghatározására az *in situ* perfúziós patkány modell tekintetében. Dózisfüggő mintázatot figyeltünk meg. A 10 mg/kg Pio csoport kivételével szignifikáns különbség nemcsak a KH (perfúzió nélkül Pio) és a kezelt csoportok között volt (20, 30, 40 mg/kg Pio), hanem a 10 mg/kg Pio és a 30, 40 mg/kg Pio csoportok, továbbá a 10 és 20 mg/kg Pio csoportok szignifikánsan magasabb SOD és kataláz aktivitást mutattak, mint a 40 mg / kg Pio csoport.

A hematoxylin-eozinnal festett hisztopatológiai elemzések azt mutatták, hogy a kontrollcsoport fő szövetszerkezete megmaradt, és nem észleltük az apoptózis jeleit vagy a tubulusok vagy Bowman-kapszulák duzzadását. A Krebs-Henseleit-kezelt csoportban (KH) azonban a tubulusok és Bowman-tok duzzanata látható volt. Dózisfüggő módon megfigyeltük a gyógyszer pozitív hatását, mivel a KH + 40 mg/kg Pio csoportban a szövet szerkezete korrelált a kontroll mintájával.

A Pio ERS-csökkentő hatásának megállapításához kaszpáz-12 és XBP1 Western blotokat végeztünk. A Pio pozitív hatása dózisfüggő mintázatot mutatott. Western-blot-analízist végeztünk a kaszpáz-12-re és XBP1-re vonatkozó fehérje expresszió megvizsgálására, mind máj-, mind vesemintákból, és feltártuk a különböző Pio dózisok hatását. A kaszpáz-12 expressziója

alacsonyabb volt, mely függött a gyógyszer koncentrációjától a veseminták tekintetében. A Pio mind a négy beadott dózisban hatékony volt. A Western blot elemzés szignifikáns különbségeket mutatott ki a veseminták XBP1 expressziójában. A pixelsűrűség mintázata hasonlóknak tűnik az XBP1s és az XBP1u esetében, azonban az XBP1u gyengébb sávokkal rendelkezik, és ezeknek a fehérjéknek az expressziója is alacsonyabb. Mindazonáltal a Pio 40 mg/kg dózisa jelentősen hatékonyan csökkentette mind az XBP1, mind az XBP1u expresszióját.

#### **4.2.1.2. Patkány máj eredmények**

Patkány máj mintákat is elemeztünk, és megmértük a Pio SOD és kataláz aktivitásra gyakorolt hatását. Megfigyelhető a fent említett dózisfüggő tendencia. A kontrollcsoport szignifikánsan alacsonyabb SOD és kataláz aktivitást mutatott, mint az összes többi kísérleti csoportban. KH + 30 és 40 mg/kg Pio dózisok jelentősen csökkentették az oxidatív stressz markerek aktivitását a KH csoporthoz képest. KH + 10 mg/kg Pio csoport, hasonlóan a KH csoporthoz, szignifikánsan magasabb SOD és kataláz aktivitással rendelkezett, mint a KH + 40 mg/kg Pio csoport.

A különböző kezelt csoportokból származó patkány máj metszeteit hematoxylinnal és eoziinnal festettük. A kontroll csoport normál megjelenést adott. A nem kezelt ischaemiás csoportban (KH) hipertrofikus hepatocitákkal és a májsejtek duzzadásával tudtuk kimutatni a parenchima kifejezett nodularis fibrózist. A KH + 20 Pio és a KH + 30 Pio csoportokban az alapvető szöveti struktúra megtartott volt. A kezelt csoportok között nem észleltük az oncosis vagy apoptózis jeleit. Az összes mintát a májból nézve nagyon jól kimutatható a beadott gyógyszer protektív hatásának tendenciája.

A kaszpáz-12 májminták expressziója 10 és 20 mg/kg Pio koncentrációnál szignifikánsan alacsonyabb volt a KH csoporthoz képest.

A májmintákat illetően a sávok mintázata hasonlóknak tűnt, azonban a Pio szignifikánsan hatékony dózisa a 30 és 40 mg/kg volt, az XBP1 és XBP1u elemzése alapján.

#### **4.2.2. Megbeszélés**

Megfelelő gyógyszer alkalmazása az IRI által okozott károk csökkentésére döntő szerepet játszik a transzplantációban és a műtétek során. A vesetranszplantációt követően a DGF körülbelül 30%-a kapcsolódik az IRI-hez. Kísérletünk során a Pio gyógyszert választottuk, amelyet inzulinérzékenyítő szerként alkalmaznak a 2-es típusú cukorbetegség kezelésében, és a publikált



irodalom szerint gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatású, valamint véd a károsodás és apoptózis ellen. A kezdeti ERS válasz egy védekező mechanizmus a kibontakozott és rosszul összehajtott (foldingolt) fehérjék detektálására és az ER homeosztázisának fenntartására. Az ER hosszan tartó rendellenes működése aktiválja az adaptív jelátviteli utat, amelyet UPR-nek nevezünk. Az UPR hosszú távú aktiválása apoptotikusan programozott sejthalálhoz vezethet. Jelen vizsgálatunkban bemutattuk a Pio antioxidáns szerként történő alkalmazását, amely elnyomhatja az ERS markerek expresszióját. Az IRE1 aktiválása megváltoztatja a kommunikációt az ER és a mitokondriumok között, ami a mitokondrium diszfunkciójához, metabolikus egyensúlyhiányhoz és sejthalálhoz vezet.

A vese- és májminták SOD-jának és kataláz-aktivitásának eredményei alapján dóziszfüggése figyelhető meg. Ezért a Pio újszerű *in situ* perfúziós modellünkben megtartotta antioxidáns aktivitását, és megvédte a veséket és a májat a sejthaláltól.

A kontroll csoportban az XBP1 és a kaszpáz-12 fokozott expresszióját figyeltük meg, és dóziszfüggő módon a Pio csökkentette ezen ERS markerek szintjét. Ezek a megállapítások a Pio-t mint terápiás célpontot jelentik az ERS és végső soron a sejthalál védelmében. Az XBP1s/XBP1u aránya mutatja az IRE1 útvonalak aktivitását, azonban különböző géleket és membránokat használtunk az XBP1s és XBP1u kimutatására, ezért az arány kiszámítása nem megbízható.

Kísérleti modellünkben az *in situ* teljes test perfúziós rendszert alkalmaztuk a vesék és a máj perfundálására Krebs-Henseleit oldattal, amelyet különböző Pio dózissal módosítottunk. Az alkalmazott koncentrációk a 10, 20, 30 és 40 mg/kg Pio voltak. Az irodalom szerint ezek a koncentrációk megvédhetnek a sejtkárosodástól és az apoptózistól, és a magasabb dózissal hatékonyabb. Ez az *in situ* perfúziós modell alkalmas a vese- vagy májtranszplantáció utánozására, amikor a klinikusok a szervet szervkonzerváló oldattal perfundálják, amely segít megőrizni a szerv működőképességét és nem módosítja a sejt szerkezetét. Ez a folyamat elkerülhetetlenül szükséges a DGF és az ennek következtében ismételt transzplantáció csökkentéséhez. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a Pio alkalmas a sejtkárosodás csökkentésére, valamint a potenciális ERS és az apoptózis csökkentésére.

Az alkalmazott koncentrációkat a publikált irodalom alapján határoztuk meg. Singh és mtsai kísérletük során 20 és 40 mg/kg Pio-t adtak orálisan 1 órával az IRI indukció előtt az állatoknak.

Eredményeik szerint a 40 mg/kg dózis csökkentette a szérum vizeletsav, a vér karbamid-nitrogén, a szérum nitrogén és a mikroproteinuria koncentrációját. Ezenkívül a Pio nagyobb koncentrációban csökkenti a myeloperoxidase aktivitást a szövetek tekintetében. Kiemelik a Pio renoprotektív hatását diabéteszes és nem diabéteszes modellekben, vesekárosodás tekintetében.

A perfúziós idő és a perfuzátum térfogatának beállításához perfúziós rögzítési protokollt használtunk és módosítottuk, mivel a vena cava-t használtuk beáramlásként, a hasi aorta szakaszát pedig kiáramlásként. A protokoll szerint a patkány hasi aortáján áthaladva 100 ml/h áramlási sebességre van szükségünk, így kísérletünkben 100 ml/h sebességről indítottunk perfúziót, majd lassan növeltük az áramlási sebességet, amíg a vese és a máj nem vált opállossá vagy fehérré. A protokoll szerint 250-300 ml perfuzátum oldat optimális egy patkány számára.

A thiazolidindionok (TZD) csoportja a legszélesebb körben tanulmányozott PPAR $\gamma$  ligandumok. A PPAR $\gamma$  aktiválása inzulin-szenzitizációt eredményez azáltal, hogy szembeszáll a TNF $\alpha$  hatásával az adipocytákban, és fokozza a glükóz metabolizmusát. A legújabb tanulmányok szerint a Pio védi a veséket, a szívizomot és az agyat az IRI-vel szemben. A Pio és más PPAR $\gamma$  agonisták potenciális szerepe: nefroprotektív, és a vesekárosodás nem diabéteszes modelljeiben (például IRI és gyógyszer vagy vegyszer által kiváltott vesetoxicitás) bizonyítják. A Pio renoprotektív tulajdonságai az endothelium-függő vazodilatáció megkönnyítésével mutatkoznak meg a NO-termelés rendellenességeinek módosítása révén, fejlesztve az antioxidáns profilt és szabályozva a gyulladással kapcsolatos mediátorok expresszióját és apoptotikus tényezőket. Ezenkívül a Pio inzulin-szenzitizáló hatását tekintve csökkentheti az IRI modellben az oxidatív stressz okozta gyulladást és következményeit. Hypoxiás körülmények között végzett kísérletek NRK-52 sejteken bebizonyították, hogy a Pio növelte a sejtek túlélési arányát és csökkentette a hipoxia/reperfúzió okozta károsodást. A TUNEL assay szerint megállapították, hogy a Pio csökkentheti az apoptotizált sejtek arányát a kezelt csoportokban a kezeletlen, hipoxia/reperfúziós kontroll csoporthoz képest. Ezenkívül a Pio rendelkezik endothel protektív funkcióval, amellyel a metotrexát (MTX) terápia mellett alkalmazható.

Korábban a Pio hatását IRI patkány modellekben tanulmányozták, *in situ* perfúziós módszerrel azonban nem találunk eredményt. Legjobb tudomásunk szerint ez az első olyan vizsgálat, amelyben a Pio hatásait alaposan megvizsgálták egy *in situ* perfúziós modell vonatkozásában az

ERS és a szövettani változásokra hivatkozva. Megállapítottuk, hogy a Pio a leghatékonyabb akut használatban és nagyobb koncentrációban.

### **4.3. *In situ* perfúzió-reperfúziós modell**

#### **4.3.1. Eredmények**

Egy új, *in situ* perfúzió-reperfúziós modellt dolgoztunk ki a Pio hatásának tesztelésére különböző dózisokban. A jelen PhD tézis többi kísérleti modelljéhez hasonlóan az oxidatív stressz markerek aktivitását és a gyulladással kapcsolatos citokinek expresszióját mértük és elemeztük, összehasonlítva a kontrollokat és a perfúziós csoportokat. KH + 40 Pio perf. csoport volt a leghatékonyabb, és a legalacsonyabb a SOD és a kataláz aktivitása.

A gyulladással kapcsolatos citokinek expresszióját ELISA-val mértük, és a csoportokat összehasonlítottuk egymással. A perfuzált, de nem kezelt és a kezelt csoportok statisztikai viszonya közötti különbségre összpontosítottunk. A legnagyobb koncentráció az IL1-béta, az IL6 és a TNF-alfa expresszióját csökkentette a legmarkánsabban.

A kontroll szövettani metszetekben semmilyen onkózis vagy apoptózis nem mutatható ki, az alap szöveti struktúra megmarad. A KH perf. csoportban megduzzadt Bowman-tokok és endotheliális tubulusok, valamint eozinofília figyelhető meg. A metszetek szerint a KH + 20 és 30 mg/kg Pio-val végzett perfúzió kevesebb szövettani rendellenességet ábrázol, szöveti szerkezetük korrelál a kontroll csoportokkal.

A kaszpáz-12 fehérje expresszióját Western-blottal mértük. Korábbi eredmények szerint a KH + 40 Pio perf csoport csökkentette a kaszpáz-12 expresszióját, azonban jelentős különbség figyelhető meg a KH perf és a KH 20, 30 és 40 Pio perf között.

Az XBP1s (56 kDa) fehérje expressziója a KH perf. csoport eredményei szerint azt láttuk, hogy a KH + 30 és 40 mg / kg Pio perf. csoportok jelentősen csökkentették az XBP1 expresszióját. Az XBP1u (29 kDa) fehérje expressziójának pixelsűrűsége szerint az összes kezelt csoport, a KH + 10 Pio perf. kivételével, csökkentheti az XBP1 fehérje expresszióját, és a KH + 40 Pio perf. adta a legnagyobb mértékű eltérést a KH perfhez képest.

### 4.3.2. Megbeszélés

Az IRI csökkenésének fontossága megkérdőjelezhetetlen, amelyet fontos tényezőnek tekinthető a magas morbiditás és mortalitás meghatározásában számos betegségben, mint például a szívinfarktus, ischaemiás stroke, AKI és trauma. Különösen a szervátültetésben, valamint a nagy műtétben az IRI súlyos szövődeményeket okoz és befolyásolja a klinikai kimenetelt. Mint fentebb említettem, az ischaemiás periódus lassítja az anyagcserét az ischaemiás szerven belüli kereslethez képest. A súlyos hipoxia miatt mikrovaszkuláris diszfunkció alakul ki. Ezenkívül a reperfüziós fázisban a normális körülmények helyreállítása helyett a további károsodások számos mechanizmus (veleszületett és adaptív immunválasz és sejthalál-program) aktiválódását idézik elő.

Az emberi transzplantációs protokoll modellezésében ezek a megállapítások fontosak, mivel a konzerváló oldat perfundálható, és reperfüziós periódus alatt fenntarthatja a sejtek és szövetek szerkezetét. Ezzel a módszerrel csökkenteni lehet a DGF előfordulását és növelni a túlélési arányt.

Több mint 5 évtizede sikeresen alkalmazták a szervmegőrzésben történő hűtést (a konzerváló oldat perfúziója a szervbe, és a szerv hipotermikus körülmények között történő tárolását), mely csökkentette a szervéltelenséget, mivel a módszer mérsékelte a szervek anyagcsereszükségletét és gyengítette az ischaemiás sérülést. Számos tartósító oldat áll rendelkezésre a klinikai gyakorlatban, és az hatékonyság egyre jobb. A University of Wisconsin (UW)/Viaspan és Histidin-triptofán-ketoglutarát (HTK)/Custodiol oldat a leggyakoribb tartósító oldatok, és a hasi szervek megőrzésében hasonló hatékonyságúak. A HTK azonban ellentmondásos eredményeket mutat a hasnyálmirigy sejtes ödémája tekintetében, számos tanulmány megállapította, hogy előnyösebb hatása a májtranszplantációban az epeúti szövődemények ellen, mint az UW oldaté. Vese esetén a HTK magasabb graftvesztéssel és megnövekedett DGF-rel társul. Az UW referenciamutatóként szolgál a multiorganikus helyreállítások során, de megvannak a maga versenytársai, különösen a HTK oldat.

A mitokondrium fontos szerepet játszik az oxidatív stresszben és az ERS a gyulladáshoz és az autofágia a 2-es típusú cukorbetegségben. Az ER egy alapvető funkcióval rendelkező organelum, mely funkciói közé tartozik a fehérjeszintézis és -feldolgozás. Az UPR megindítása után az ERS három fő jelátviteli útvonalon aktiválódik: IRE1, ATF6 és PER. Tudomásunk szerint

az ERS többféle vesebetegségben vesz részt, például vesefibrózisban, diabéteszes nephropathiában, AKI-ban, CKD-ben.

Ez az első vizsgálat, ahol a vese perfúzióját *in situ* végeztük szubnormotermiás (20 °C) KH oldattal, Pio-val módosítva, különböző dózisokban. Az *in situ* perfúzió-reperfúziós modell az IRI és az új *in situ* perfúziós patkánymodell kombinációja. Célunk az volt, hogy meghatározzuk a Pio optimális dózisát, amely megegyezik a dolgozat második fejezetében leírtakkal. A hipotézis az volt, hogy a reperfúziós szakasz hogyan módosítja a Pio hatását. Az eredmények szerint a gyógyszer legnagyobb dózisa (KH + 40 mg/kg Pio perf. csoport) az oxidatív stressz, a gyulladáshoz vezető citokinek és az ERS markerek hatékony csökkentő tényezője volt. A hisztopatológiai eredmények korrelálnak az ELISA és a Western blot eredményekkel, azonban a HE-vel festett vese metszeteken a 20 és 30 mg/kg Pio perf. csoportok kevesebb szövetkárosodást mutattak.

## 5. Következtetés

A Pio egy klinikailag alkalmazható és nem toxikus szer, amely növelheti a szövetek ischaemiás toleranciáját az endoplazmás retikulum stresszt és az ebből következő apoptózist csökkenti. Az eredmények alátámasztják azt a megállapítást, hogy a Pio ERS-csökkentő hatású magasabb dózisok esetén, mind vese, mind máj perfúzió esetén. Ezenkívül nem tudtunk kimutatni a Pio-val kapcsolatos nekrotikus hatást, amely utalhat arra, hogy ennek a PPAR $\gamma$  agonistának, a Pioglitazone-nak, egy akutan alkalmazott nagyobb dózisa segíthet az alapvető szervszerkezet fenntartásában mind a vese, mind a máj esetében. További kísérletekre van szükség az e módszertani készletre hivatkozó más PPAR $\gamma$  agonisták megvizsgálásához és az ischaemiában és a szervek *in situ* perfúzióval történő megőrzésében játszott potenciális szerepük bizonyításához. Előzetes vizsgálatunkban újszerű, *in situ* perfundált patkánymodellünkben a Pio védőhatásának megerősítését tűztük ki célul. Más ERS útvonalakat kell megvizsgálni ebben a kísérleti beállításban, hogy szélesebb körű ismereteket szerezzünk a Pio ERS csökkentő aktivitásáról. Megállapíthatjuk, hogy a legnagyobb dózisnak gyulladáscsökkentő, antioxidáns és ERS gátló hatása van, ráadásul a hisztopatológiai eredmények igazolják Pio hatékonyságát.

Harmadik célunk a vizsgálat második és harmadik kísérleti sorozatának összehasonlítása volt, a Pio beadott dózissai hasonlóak voltak, a perfúzió periódusai azonban nem. Ezért gondosan meg kell állapítanunk a két módszer közötti összefüggést.

Az enzim polimorfizmusa miatt az embereken történő alkalmazás eltér a Pio általunk alkalmazott protokolljaitól, dózissaitól és időtartamaitól. Ezért egy valós idejű patkány veseátültetés modellezését tervezzük, ahol egyesíthetjük kísérleteinket, és tesztelhetjük és javíthatjuk az időtartamokat, a Pio beadott dózissait és a műtéti eljárást.

## 6. Új eredmények

1. Első vizsgálatunkban megvizsgáltuk és bebizonyítottuk a Pio védőhatását gyulladásban, oxidatív stresszben és ERS-ben, amely az egy órával az ischaemiás periódus megkezdése előtt volt detektálható. A hagyományos IRI kísérleti beállításban az ERS markereket először elemeztük és megalapoztuk a többi kísérleti beállítást.
2. A második fejezet alapján különbség volt a vese- és a májminták között a Pio anyagcserét illetően, mivel a veseszövet esetében a nagyobb dózis volt a protektív, azonban a májminták esetén a középső dózisok (20 és 30 mg/kg Pio) rendelkeztek pozitívabb hatással. Ismereteink szerint és összehasonlítva a nemzetközi szakirodalommal, egy új, *in situ* perfúziós rendszert vizsgáltunk, amely felveti a Pio klinikai transzplantációs protokollban történő alkalmazásának lehetőségét.
3. A vizsgálat harmadik részében az eredmények korreláltak a másik két elvégzett protokollal, és a 40 mg/kg Pio dózis az IRI ellen védő hatást mutatott a KH-val perfundált csoporthoz képest. Ismereteink alapján ez az új kísérleti környezet alkalmas a preklinikai gyógyszervizsgálatra és az IRI elleni eszköztárunk bővítésére.
4. Összességében megállapíthatjuk, hogy a Pio nagyobb dózisokban alkalmazható, és kedvező hatással van a vese- és májmintákra IRI-ben, *in situ* perfúzióban és *in situ* perfúzió-reperfúziós modellekben.

## 7. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények és prezentációk

Kumulatív impakt faktor: 1,741

### Publikáció

**Telek V**, Erlitz L, Caleb I, Nagy T, Vecsernyés M, Balogh B, Sétáló G Jr, Hardi P, Jancsó G, Takács I. Effect of Pioglitazone on endoplasmic reticulum stress regarding in situ perfusion rat model. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2021. DOI: 10.3233/CH-211163. **IF 1.741 (Q2) /megjelenés alatt/**

### Prezentációk

**Telek V**, Erlitz L, Caleb I, Nagy T, Vecsernyés M, Balogh B, Sétáló G Jr, Hardi P, Jancsó G, Takács I. A novel treatment on endoplasmic reticulum stress regarding in situ perfused rat model. DOSZ Science and Innovation Conference 29-30<sup>th</sup> of January 2021

**Telek V**, Erlitz L, Caleb I, Nagy T, Vecsernyés M, Balogh B, Sétáló G Jr, Hardi P, Jancsó G, Takács I. Could Pioglitazone decrease endoplasmic reticulum stress regarding a novel in situ perfusion rat model? Magyar Haemorheologiai Társaság XXVII. Kongresszusa 23<sup>rd</sup> of April 2021.

### 7.1. Egyéb publikációk és prezentációk

Kumulatív impact faktor: 1,901

### Publikáció

Borocz K, Csizmadia Z, Markovics A, Meszaros V, Farkas K, **Telek V**, Varga V, Maloba GO, Bodo K, Najbauer J, Berki T, Nemeth P. Development of a robust and standardized immunoserological assay for detection of anti-measles IgG antibodies in human sera. *Journal of Immunological Methods*. 2019. DOI: 10.1016/j.jim.2018.07.009 **IF 1.901 (Q2)**

### Prezentációk



**Telek V**, Rapp J, Bognár A, Nagy G, Minier T, Czirják L, Berki T, Simon D. Analysis of PI3K pathway in B cells in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. XVI. János Szentágothai Multidisciplinary Conference and Student Competition. 14-15<sup>th</sup> of February 2019. Pécs

**Telek V**, Rapp J, Balogh P, Minier T, Czirják L, Berki T, Simon D. PI3K jelátviteli útvonal aktivációjának vizsgálata autoreaktív B-sejtekben. 49. Membrán-Transzport Konferencia, 14-17<sup>th</sup> May 2019. Sümeg,

**Telek V**, Rapp J, Bognár A, Nagy G, Minier T, Czirják L, Berki T, Simon D. Innate immune activation of B cells in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. Magyar Immunológiai Társaság 47. Vándorgyűlése 17-19<sup>th</sup> of October 2018 Bükkfűrdő

**Telek V**, Rapp J, Nagy G, Minier T, Czirják L, Berki T, Simon D. Alterations of PI3K pathway associated molecules in B cells in early diffuse cutaneous systemic sclerosis. 1<sup>st</sup> Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences. 27<sup>th</sup> of October 2018 Pécs

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik lehetőséget adtak a dolgozat elkészítésére.

Először is köszönettel tartozom Dr. Takács Ildikónak és Dr. Jancsó Gábornak kiváló útmutatásukért, folyamatos támogatásukért és pótolhatatlan segítségükért PhD tanulmányaim során.

Hálás vagyok a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet minden tagjának segítségéért, akik hozzájárultak munkámhoz.

Ezúton is szeretném megköszönni Vecseryés Mónika, Balogh Bálint és Ifj. Sétáló György segítségét a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Biológiai Intézet és Központi Elektronmikroszkópos Laboratóriumból.

Hálás vagyok minden barátomnak az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetből, hogy kutatói példaképet és végtelen támogatást nyújtottak számomra.

Végül szeretnék köszönetet mondani szüleimnek és családomnak türelmükért, szeretetükért és folyamatos támogatásukért.