

## **REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSOK CSÖKKENTÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI ENDOGÉN ADAPTÁCIÓS MECHANIZMUSOK INDUKCIÓJÁVAL. KÍSÉRLETES ÉS KLINIKAI VIZSGÁLATOK.**

A jelen pályázatban elvégzett munka a keringésből kirekesztett szövetek reperfúziós károsodásának vizsgálatával foglalkozik, részleteiben tanulmányozza a szöveti- sejtszintű folyamatok biológiáját, sejtszintű mechanizmusait. A kísérletes és klinikai munkák az alapkutatás mellett a kórfolyamatok sebészeti klinikai vonatkozásait, és a káros hatások csökkentésének lehetőségeit vizsgálja.

A kutatómunka részleteiben leírja a szövetek reperfúzió során lejátszódó oxidatív stressz és inflammatorikus válaszreakcióit.

Kiemelten foglalkozik a prekondicionálás és posztkondicionálás intracelluláris szignálfolyamataival, az NFkB, az urocortin, és a hemoxigenáz-1 szerepével a kialakuló citoprotekcióban.

A pályázatban elvégzett munkák eredményeiből 8 db impakt faktoriall rendelkező, nemzetközi folyóiratban megjelent közlemény született. A tudományos munkák és az eredményes publikáció 4 klinikus orvoskolléga (Dr Cserepes Barbara, Dr Sínay László, Dr Arató Endre, Dr Miklós Zsanett) PhD fokozatának megszerzését, és Dr Arató Endre, valamint a témavezető habilitációs fokozatának elérését tették lehetővé.

## **HEMOXIGENÁZ-1 EXPRESSZIÓJA ÉS CYTOPROTEKTÍV HATÁSA A MIOKARDIUM KÉSŐI PREKONDITIONÁLÁSÁBAN**

Kísérletes vizsgálatokban kimutatták a hemoxigenáz-1 (HO-1) hőszokkfehérje szívizomsejt védő szerepét oxidatív stresszben. Munkánkban vizsgálni kívántuk a késői prekondicionálás során a HO-1 expresszióját és az enzim védő hatását szívizomsejtek IR károsodásával szemben.

Újszülött patkány kardiomiocitákban iszkémiás és farmakológiai (adenozin, adrenalin, opioid) prekondicionálást (PC) végeztünk (I. csoport), majd 24 óra múlva tesztiszkémiát követően vizsgáltuk a sejtek károsodását: mértük a médium laktát dehidrogenáz (LDH) koncentrációját, meghatároztuk a sejtekben az apoptózis és nekrozis mértékét, valamint az élő/halott sejtek arányát. A második (II.) csoportban a tesztiszkémia előtt cink-protoporphyrin (ZnPPIX) adásával gátoltuk a HO-1 enzim aktivitását, míg a harmadik (III.) csoportban a PC-t követően HO-1 specifikus siRNS adásával blokkoltuk a HO-1 fehérje expresszióját. A kontroll csoportban (IV. csoport) PC nélkül csak tesztiszkémiát hoztunk létre. Valamennyi csoportban a kezelést követően 24 órával immunhisztokémiai festéssel detektáltuk a HO-1 expresszióját. Eredményeink azt mutatták, hogy a prekondicionálás az LDH szekrécióját a kontroll csoporthoz képest szignifikánsan csökkentette. A PC csoportokban az apoptózis és sejtnekrozis aránya szignifikánsan kisebb volt a kontroll csoporthoz képest. A HO-1 immunhisztokémia a PC csoportokban az enzim egyértelmű expresszióját mutatta, amelyet a PC-t követő siRNS kezelés meggátolt.

## **AZ UROCORTIN JELENTŐSÉGE A SZÍVIZOM PRE- ÉS POSZTKONDITIONÁLÁSÁBAN**

A legújabb kutatások szerint a szív- és érrendszerben termelődő urocortinnak, jelentős kardioprotektív hatása van.

Újszülött patkány kamrai szívizomzatából izolált sejteket prekondicionáltunk adenozinnal, iszkémiás stimulussal és urocortinnal (10 perces stimulust 10 perc reperfúzió követte), majd 3

óra teszt iszkémia és 2 óra reperfüziót követően vizsgáltuk a sejtkárosodás mértékét laktát-dehidrogenáz (LDH) kibocsátás, vitál festés (tripán kék), és apoptózis/nekrózis (Annexin V-Propodium-jodid festés) meghatározásának segítségével. A poszt kondicionálás vizsgálatához a sejteket különböző idejű (30 és 60 perc) iszkémiás inzultusnak és ezt követően rövid iszkémiás-reperfüziós stimulussal ill. urocortin kezelésnek tettük ki, majd az előző paraméterekkel meghatároztuk a kardioprotekció mértékét.

Eredményeink szerint a szívizomsejtek általi LDH kibocsátás mértéke, a tripán kékkel festődött halott sejtek száma és az apoptotizált, nekrotizált sejtek aránya szignifikánsan csökkent mindhárom prekondicionált csoportban a kontroll csoporthoz képest. A 30 és 60 perces iszkémiát követően az LDH enzim szintje, a halott sejtek mennyisége és az apoptotizált, nekrotizált sejtek aránya szintén csökkenést mutatott az iszkémiás, és az urocortinnal történő poszt kondicionálást követően.

## ISZKÉMIÁS PRE- ÉS POSZTKONDITIONÁLÁS PROTEKTÍV HATÁSAINAK VIZSGÁLATA HASI AORTA MŰTÉTET KÖVETŐ REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSOKBAN

Kísérletes és klinikai modelleken igazolt, hogy a hosszabb iszkémiát követő korai reperfüzióban intermittáló iszkémiás epizódokkal végzett poszt kondicionálás csökkenti a reperfüziós károsodás sejt szintű (oxidatív stressz, apoptózis, nekrosis) és szisztémás (leukocita aktiváció) hatásait a miokardiumban. Bár a harántcsíkolt izomnak nagyobb az iszkémia-toleranciája, hasi érműtétek során, hosszú aortakirekesztések esetében mindenképpen számolni kell reperfüziós károsodással, melynek csökkentése komoly klinikai előnyökkel jár.

Vizsgálataink célja volt, hogy állatkísérletes modellen és humán érsebészeti betegeken tanulmányozzuk a poszt kondicionálás hatékonyságát perifériás szöveteken, infrarenális hasi aorta elzárását követő iszkémiás-reperfüziós károsodások csökkentésében. Prospektív randomizált vizsgálatunkat altatott Whistar patkányokon végeztük (16). A reperfüzió korai szakában teljes leszorításokkal, és felengedéssel 4x15s-os poszt kondicionálás történt, melyet 1 órás iszkémia követett. Biokémiai vizsgálatainkhoz a véna cava inferiorból gyűjtött minták szolgáltak, melyeket az iszkémia előtt, és a reperfüziót követően 5, 10, 15, 30, 60, és 120 percet követően nyertünk. Meghatároztuk a serum peroxid szintet, a szérum TNF-alfa koncentrációját, mieloperoxidáz (MPO) aktivitást, és a leukociták indukált szabadgyök termelését. A jelátviteli útvonalak közül elsősorban az Akt-1 és az extracelluláris szignál regulált kináz (ERK 1/2) – mint védő útvonalak- aktivitását néztük a szövetmintákban Western blot analízis segítségével. Érsebészeti műtétek során aorto-bifemorális bypass műtét előtt alkalmazott prekondicionálás (4x5 perces intermittáló leszorításokkal), és az iszkémiát követően alkalmazott poszt kondicionálás hatásait vizsgáltuk a reperfüziós károsodásokra. Vizsgáltuk az antioxidáns enzimek változását, a lipidperoxidáció mértékét (malondialdehid meghatározással) a leukocita aktivációt (sejtfelszíni adhéziós molekula expresszióval, mieloperoxidase enzimaktivitás változással).

Eredményeink azt mutatták, hogy a reperfüziót követően a poszt kondicionált csoportokban a plazma peroxidáz szintje a korai reperfüzióban (5-30 min) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll csoportban. A poszt kondicionálás csökkentette a szérum TNF-alfa szintet, MPO aktivitást és a fehérvérsejtek indukált szabadgyök termelését. A poszt kondicionálás szignifikánsan növelte mind az Akt-1, mind az ERK 1/2 aktivitóját. Humán vizsgálataink azt mutatták, hogy nem diabéteszes betegeknél mind a prekondicionálás, mind a poszt kondicionálás mérsékelten csökkentette a reperfüziós károsodásokat, azonban diabéteszes betegeknél szignifikáns javulást kimutatni nem tudtunk.

Hatékonyágát és klinikai alkalmazhatóságát tekintve a posztoperatív állapot kialakítását alkalmas lehetőségnek mutatkozik a sejt és szöveti szintű reperfüziós károsodások csökkentésére.

## AORTO-BIFEMORALIS REKONSTRUKCIÓT KÖVETŐ LEUKOCITA AKTIVÁCIÓ ÉS REDOX VÁLTOZÁSOK VIZSGÁLATA

Az aorto-bifemorális bypass rekonstrukciókat követő általános posztoperatív műtéti szövődeményeket jelentősen befolyásolja a műtéti stressz és a beteg tűrőképessége. A kialakuló oxidatív stressz fontos triggerje az iszkémia-reperfüziót követő gyulladásos válaszreakcióknak és a következményes lokális és szisztémás reperfüziós károsodásoknak. Vizsgálatunk célja volt az aorto-bifemorális rekonstrukciókat követő oxidatív változások és leukocita adhézis molekulák (CD11a és CD18) expressziójának monitorozása. 16 beteget vizsgáltunk, akiknél preoperatív kivizsgálást és előkészítést követően aorto-bifemorális rekonstrukciót végeztünk. Perifériás vérmintákat vettünk a műtét előtt, a műtétet követő 2., és 24. órában, valamint a postop 7. napon. Az oxidatív stressz paraméterek vizsgálata során meghatároztuk a plazma szuperoxid dizmutáz (SOD), redukált glutation (GSH), és totál thiol csoport (SH) koncentrációját. A leukocita aktiváció jellemzésére vizsgáltuk a plazma myeloperoxidáz szintet, a fehérvérsejtek indukált gyöktermelését, és a felszíni adhézis molekulák (CD11a és CD18) expressziójának változásait. Eredményeink az antioxidáns enzimek (SOD, GSH, SH) csökkenését, és a fehérvérsejtek aktivációjának (indukált gyöktermelés sebességének és mértékének) fokozódását mutatták a korai reperfüzió szakában. A CD11a és CD18 adhézis molekulák a reperfüzió korai fázisában szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) csökkentek, majd a 7. napon visszatértek a kiindulási értékre.

Eredményeink alapján az aorto-bifemorális rekonstrukciókat követő oxidatív stressz és szisztémás gyulladásos válaszreakciók mértéke a posztoperatív első 24 órában kritikus, ezt követően fokozatosan helyreáll az egyensúly, bár leukocita aktiváció detektálható még a 7. napon is.

## E-VITAMIN HATÁSA A REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSOKRA ALSÓVÉGTAGI REKONSTRUKTÍV ÉRMŰTÉTEK SORÁN

Munkánk során vizsgálni kívántuk, hogy milyen mértékben befolyásolja a perioperatív szakban folyamatosan alkalmazott E-vitamin az alsóvégtagi keringéshelyreállító műtétek következtében kialakuló oxidatív stressz és szöveti gyulladásos válaszreakciók kialakulását. Prospektív, randomizált vizsgálatunkba bevont 32 betegünkön angiográfiával igazolt AFS elzáródás szerepelt, mely miatt supragenuális rekonstrukciót végeztünk. Az E-vitaminnal kezelt betegeknek a műtétet megelőző naptól a posztoperatív 7. napig per os 1x200 mg E-vitamint adtunk. A második csoportba tartozó betegeknek nem adtunk E-vitamint. A perifériás vénás vérmintákat a műtét előtt közvetlenül, majd a reperfüzió első órája végén (a korai reperfüziós szak) vettük. A késői reperfüzió monitorozását a műtéti iszkémiát követő 24. órában, és a 7. napon vett vérmintákban végeztük.

Az oxidatív stressz paraméterek közül a lipidperoxidáció mértékét jelző malondialdehid plazmaszintjét vizsgáltuk, illetve az antioxidáns státusz meghatározását végeztük (GSH, totál-SH csoport, SOD). A gyulladásos válaszreakciók mértékét a fehérvérsejtek aktivációját jellemző indukált gyöktermelés meghatározásával, a plazma myeloperoxidase (MPO) aktivitás vizsgálatával, illetve a leukocita adhézis molekulák (CD11a és CD18) expressziójának monitorozásával jellemeztük.

Vizsgálataink azt mutatták, hogy a perioperatív szakban – a műtétet megelőző naptól a posztoperatív 7. napig – alkalmazott 200 mg E-vitamin csökkentette az iszkémia-reperfüzió

következtében kialakuló oxidatív stressz mértékét (lipidperoxidáció, antioxidáns enzimek), valamint a prooxidáns-antioxidáns egyensúly felborulását. Igazoltuk, hogy az E-vitamin elektív műtétek során csökkentette a korai reperfüzióban a fehérvérsejt aktivációt (MPO aktivitás, szabadgyök produkció, adhéziós molekulák expressziója) és a következményes lokális gyulladással járó folyamatokat.

Eredményeink alapján az E-vitamin hatékony kiegészítő gyógyszeres terápiája lehet az érsebészeti beavatkozásokot követő mérsékelt reperfüziós károsodások csökkentésének.

## A POSZTKONDITIONÁLÁS HATÁSA AZ ISZKÉMIA/REPERFÚZIÓ OKOZTA SZÖVETANI ELVÁLTOZÁSOKRA HIPERKOLESZTERINÉMIA PATKÁNYOKBAN

A sebészeti gyakorlatban a transzplantációt, és a hasi érműtéteket kísérő iszkémia/ reperfüziós (IR) károsodás komoly problémát jelent, mivel nem csak az érintett szerv, hanem távoli szervek, gyakran az egész szervezet integritását is érinti. A prekondicionálás védő hatását az I/R károsodásokkal szemben Murry és munkatársai mintegy 20 éve írták le, azóta számos emlősfajon bizonyítást nyert az eljárás hatékonysága. Klinikai alkalmazása mégis limitált maradt. A poszt-kondicionálás (mely alatt a korai reperfüzió időszakában a keringés rövid ideig tartó (néhány 10 másodperc) periodikus leállítását és újraindítását értjük) ennél ígéretesebb eljárásnak tűnik, mivel alkalmazására az iszkémiás területek vérellátásának helyreállítása után kerül sor, így kivitelezése jól tervezhető. Mindezek ellenére mind a prekondicionálás, mind a poszt-kondicionálás alkalmazhatóságát limitálja egyes patológiás állapotok, illetve metabolikus betegségek jelenléte (glükóz intolerancia és a kettéstípusú cukorbetegség).

Vizsgálatunk célja a poszt-kondicionálás I/R okozta funkcionális és morfológiai elváltozásokra gyakorolt hatásának vizsgálata volt fiziológiai metabolikus státusú és hiperkoleszterinémia patkányok vesefunkciós laboratóriumi értékeinek, és vese metszeteinek fénymikroszkópos vizsgálata során.

Módszerek: Hím Wistar patkányokat (n=30) két csoportra osztottunk. Az egyik csoportot normál patkánytápon, a másikat 1,5 %-os koleszterin tartalmú diétán tartottunk. A diéta hatására a szérumban triglicerid és koleszterin szint szignifikánsan emelkedett, de obezitást nem tapasztaltunk. Stabil hiperkoleszterinémia kialakulása (8. hét) után kezdtük meg a kísérleteinket, ketamin : diazepam (i.p.) narkózis mellett. Laparotómiát követően mobilizáltuk a mezenterialis gyököt, majd mindkét vesét 45 percre a keringésből kirekesztettük. Csoportjainkat további két alcsoportra osztottuk: az egyik alcsoportnál kétórás reperfüziót, a másiknál ezt megelőzően 4×15 másodperc időtartamú poszt-kondicionálást alkalmaztunk. A kétórás reperfüziót követően vér, és szövetmintákat vettünk. Fotometriás módszerekkel meghatároztuk a szérumban kreatinin és karbamid szinteket. A vese-mintákat neutralizált 10%-os formalinba helyeztük, majd paraffinba ágyazás és metszés (5 microm) után hematoxilín-eozinnal, illetve PAS-sal festettük meg. A metszetek fénymikroszkópos elemzése után értékeltük a glomeruláris, tubuláris és intersticiális elváltozásokat. Eredmények: Az I/R-t valamennyi állat túlélte. A kétórás iszkémia után a szérumban kreatinin és karbamid szintekben nem mértünk szignifikáns különbséget. A nem iszkémizált vesék ép vesestruktúrát mutattak.

Az I/R elsősorban a tubuláris epithel sejtekben, és a kefeszegélyben okozott lokális gyulladást és morfológiai elváltozást. Emellett különböző mértékű vérszerű beszűrődéseket detektáltunk mindhárom vizsgált régióban. A poszt-kondicionálás jelentősen csökkentette az I/R okozta morfológiai elváltozásokat.

A metabolikus státust a szérumban glükóz, triglicerid, koleszterin és inzulin szintekkel, a vesefunkciót szérumban karbamid és kreatinin koncentrációk meghatározásával, az oxidatív

stressz és a gyulladás súlyosságát a szérumban TNF- $\alpha$  illetve oxLDL koncentrációjának meghatározásával jellemeztük, fotometriás és ELISA módszerekkel, valamint mértük a PMA-val teljes vérben indukált gyöktermelést luminometriás kinetikus módszerrel. Eredmények: Szignifikánsan magasabb koleszterin és triglicerid értékeket mértünk a koleszterinnel etetett állatok szérumban, de obezitást nem tapasztaltunk. A vese I/R-t követően a szérumban urea és kreatinin nem változott egyik csoportban sem. Jelentős és statisztikailag is szignifikáns emelkedést mutattunk ki a szérumban TNF- $\alpha$  szintekben ( $p < 0,01$ ), a PMA-val indukált szabadgyök termelésben ( $p < 0,05$ ), és a lipid peroxidációban (oxLDL;  $p < 0,05$ ). A posztkondicionált kontroll állatokban az IR okozta emelkedés szignifikánsan kisebb mértékű volt. A műtéti beavatkozás jelentős vércukor- és inzulinszint növekedéssel járt ( $p < 0,01$ ). A PK tovább fokozta az inzulin szintet, csökkentette a TNF- $\alpha$  koncentrációt és a szabadgyök termelést. Koleszterinnel etetett állatok I/R károsodása paradox módon, enyhébb volt, mint a kontroll csoporté.

Következtetések: a PK hatékonyan csökkentette a szisztémás oxidatív stresszt.

A pályázat keretében elvégzett munkák a PTE ÁOK Sebészeti Oktató és Kutató Intézetének és Érsebészeti Tanszékének közös eredményes kollaborációjában születtek. A két intézet szoros együttműködése teszi lehetővé, hogy a sebészeti alapkutatások, és a klinikai problémakörök találkozhatnak, és megoldáshoz vezessenek.