

Akut szerv károsodás antioxidáns modulációja

Egyetemi Doktori (Ph.D.) Értekezés Tézis

Dr. Ghosh Subhamay

Programvezető:	Professzor Dr. Róth Erzsébet
Témavezető:	Professzor Dr. Gál János
Tutor:	Dr. Marczin Nándor
Doktori iskola vezetője:	Professzor Dr. Komoly Sámuel

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
ANAESTHESIOLÓGIAI ÉS INTENZÍV THERÁPIÁS INTÉZET

2010

BEVEZETÉS

Akut szervsérülés és oxidatív stressz

Az, hogy a súlyos betegségeknek mennyire összetett a biológiája nem csupán a kiváltó inzultus tükrözi, ami következtében a beteg az intenzív ellátásra szorul, hanem maga az életmentő akut beavatkozások következtében kialakuló szervelegtelenység is. Habár az oxidatív stressznek többféle biokémiai és pathofiziológiai következménye van, mégis az akut szerv sérülés kialakulásának vannak jellegzetes vonásai, mint például a lipidperoxidáció és a redoxi érzékeny sejten belüli jelátviteli folyamatok aktiválása. Az oxidatív stresszre adott genetikusan válasz túléléshez, sejt károsodás/ pusztulás, valamint apoptózishoz (programozott sejthalál) vezethet.

Súlyos sejt stresszre adott válasz során, a mitokondriális pórusok oxidációja révén az intrinszc apoptotikus útvonal aktiválódhat, amely következtében pro-apoptotikus fehérjék, mint a cytochrom-c felszabadulásuk révén a caspase rendszer aktivációján keresztül apoptózist okozhatnak. Mivel az akut szervrendszer elégtelenség ellátása az intenzív ellátás leggyakoribb *raison d'être* ezért egy relatíve fiatal tudományág kialakulásának az alapjait képezi. Maga a szerv rendszer védő mechanizmusa, önmaga károsodását okozhatja. A sikeres resuscitáció és intenzív osztályos ellátás ellenére gyakran megfigyelhető, hogy a kritikus állapotú betegeknel *de novo* károsodás az eredeti sérüléstől távoli helyen alakul ki. Bár nem teljesen ismert a mechanizmus mely során az akut életveszélyes inzultus miatt végzett resuscitációt követően, kialakult homeosztatisz működési zavar, illetve szervkárosodás létrejön, kevés vizsgálatot végeztünk arra vonatkozóan, hogy a súlyos megbetegedéseket állat modelleken tanulmányozzuk.

Iszkémia-reperfúziós károsodás szerepe.

Mindennapi életünk során az antioxidáns védekező mechanizmus szerepe az oxidatív károsodás kivédése. Iszkémia során olyan anyagok szaporodnak fel a reperfúziót követően (ROS formájában), amelyek kifejezett DNS, fehérje, szénhidrát, valamint lipid károsodást okoznak. Habár az emlősök rendelkeznek bőséges antioxidáns védekező mechanizmussal, nagy mennyiségű ROS képződés felülmúlhatja ezen mechanizmusokat, sejt működési zavart, elhalást okozva. A neutrophilek kiemelkedő szerepet játszanak az IR károsodás során, mivel proteolitikus enzimek és ROS képzés révén mukozális és mikrovaszkuláris károsodást okozhatnak. Annak ellenére, hogy *in vivo* modellen több kísérletes tanulmányt folytattak, állat kísérleteket csak kevés esetben végeztek.

Oxidatív stressz szerepe.

Az oxidatív stressz a pro-oxidáns/anti-oxidáns rendszer egyensúlyának felborulása az érintett sejtben. Ez arra utal, hogy a normál aerob metabolikus folyamatok során a sejtben olyan rendszer működik, amely folyamatosan képez és eltávolít oxidáns termékeket. Amikor addicionális oxidatív esemény fordul elő a pro-oxidáns rendszer túlsúlyozza az antioxidáns rendszert, ami a lipidek, proteinek, szénhidrátok, nukliensavak oxidatív sérülését eredményezi, következtetéses sejthalállal. Ezen folyamatokban szerepet játszó különböző gyökökre utaló bizonyítékok (kis gázmolekulák, nagy biomolekulák) keltették fel az érdeklődést a részlegesen redukált oxigén termékek hatására.

Szerv manifesztáció

A citokinek, valamint receptoraik által kiváltott jelátviteli folyamatok lehetnek védő vagy káros hatásúak a sérülés helyétől, illetve attól függően, hogy a gyulladás helyi vagy szisztémás jellegű. Ezen összetett események kevésbé ismert vonásai nagyon jellemzőek akut szervsérülésekben, mint szepszis, sokk és politrauma, valamint fontos szerepet játszanak a

patológiai válaszreakciók megértésében az adott inzultus által okozott diffúz szerv sérülés során.

Máj károsodás

A máj a benne lezajló magas energiafüggő folyamatoknak köszönhetően, magas metabolikus rátával rendelkezik, ennek nagy része azonban a méregtelenítő folyamatokra használódik fel. Ezen folyamatok az endogénean képződő szabadgyökök legjelentősebb forrása, más szervekhez viszonyítva itt a legnagyobb a ROS képződés. A legtöbb májsebészeti beavatkozás során találkozhatunk IR károsodással. A hepatocyták sérülésének nagysága egyrészt az iszkémia során fellépő primer károsodástól, másrészt pedig a reperfüzió következtében kialakuló sérüléstől függ. A súlyos IR károsodás nem csak májelégtelenséget okoz, de más szervekre is hatással van

Májkárosodás csökkenése N-acetilcisztein hatására

NAC megnöveli a hepatocyták glutation szintjét, aminek következtében csökken a hepatocelluláris károsodást okozó ROS képződése. A kifejezett antioxidáns kapacitás mellett, ciszteinné való hidrolízise során indirekt védelmet is nyújt a máj számára. NAC egyrészt szubsztrátként szolgál a redukált glutation számára, másrészt elősegíti a szintjének növekedését.

Tüdő károsodás

A külső környezettel közvetlen kapcsolatban álló tüdőt nem csak az exogén oxidánsok, de a gyulladásban résztvevő sejtek által termelt endogén ROS is károsítja. Számos tüdőbetegség [p.l. ARDS, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchopulmonary dysplasia (BPD)] ellátása során szükséges alkalmaznunk oxigén terápiát, ami tovább növelheti az oxidánsok okozta károsodást. Habár a mechanizmus még nem teljesen ismert, feltételezzük, hogy a mitokondriális epitheliál sejtek, neutrophilek és macrophagok NADPH oxidáza által képzett H_2O_2 , szuperoxid és hidroxil gyökök felelősek az oxigén károsító hatásáért.

Tüdő károsodás csökkenése szénmonoxid révén

CO hem fehérjékkal erős komplexet formál. Ezen kötődés következtében eltérő fiziológiai, adaptív, valamint toxikus hatást alakulhat ki. Mostanában vált ismerté, hogy emlős sejtekben aerob körülmények között, mind az exogén mind pedig a hem oxigenáz által termelt endogén CO szerepet játszik egy pro-oxidáns környezet kialakításában, amely elindítja a ROS képződéséhez vezető jelátviteli folyamatokat. A CO-ra adott válasz magában foglal alapvető fiziológiai szabályozó folyamatokat, mint például redoxi szenzitív transzkripciós faktor, illetve stressz aktivált kináz aktivációt, melyek hozzájárulnak a kompenzatorikus antioxidáns enzimszisztéma és egyéb oxidatív stresszre adott adaptációs folyamatok aktivációjához.

Szív károsodás

Az akut koronária elzáródást okozó sejtelhalás (nekrózis) nagyságát nem csak az elzáródott ér által ellátott terület nagysága, hanem az iszkémia súlyossága és ideje is befolyásolja. Jól ismert, hogy az iszkémiás sejtek túlélése különböző tényezőkön múlik. Az iszkémiás inzultuson átesett sejtek reperfüziós terápiájának sikere döntő mértékben a véráram helyre állásától függ, függetlenül attól, hogy milyen technikával (thrombolízis, invazív beavatkozás) végezték a reperfüziót. Habár az elmúlt 20 évben számos tanulmány egyértelműen igazolta, hogy revascularizáció az egyetlen lehetséges módszer az iszkémiás sejtek megmentésére, a sejtelhalás részben mégis magának a reperfüciónak köszönhető.

Szív károsodás csökkenése glutation S-transzferáz révén

Glutationnak kiemelkedő szerepet van a sejtek védelmében. Az apoptotikus jelátviteli folyamatok és sejtproliferáció mellett GST fontos szerepet játszik a másodlagos oxidáns, valamint xenobiotikumok detoxifikációjában. Különböző kritikus állapotú betegekben, nagymértékben eltérő GSTt sikerült kimutatni. Ezen polimorfizmus jelentős mértékben hozzájárulhat a xenobiotikumokra adott válasz, az oxidatív stressz termékek eltávolítása, valamint a gyulladáshoz vezető folyamatokat is magukba foglaló daganatos és cardiovascularis betegségekre adott válaszban megnyilvánuló individuális különbségekhez .

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálatunk célja különböző *in vivo* és *in vitro* modelleken tanulmányozni az akut károsodások szervi manifesztációit.

Első kísérlet sorozat, *in vivo* állat máj modellben vizsgáltuk indocyanine green plasma disappearance rate (ICG-PDR) alapján az ismételt iszkémiás prekondicionálás és NAC hatását IR károsodás esetén, illetve az általuk esetlegesen kiváltott, kedvező hemodinamikai hatásokat. Az alap paraméterek mellett az iszkémiás károsodás igazolására invazív hemodinamikai monitorizálást végeztünk. A májkárosodás mértékét a plazma ICG-PDR, valamint a szérum AST és ALT szint alapján határoztuk meg.

Feltételeztük, hogy iszkémiás prekondicionálás és NAC adása nagymértékben csökkentheti az iszkémiás károsodás mértékét, valamint a májfunkciós értékek és a hemodinamikai paraméterek javulását eredményezheti.

Második kísérlet sorozat, belélegzett CO hatását vizsgáltuk három különböző *in vivo* egér modellben akut tüdőkárosodás esetén. Az intenzív ellátást modellezve altatott egereket CO jelenlétében illetve hiányában lélegeztettük intravénás/intratracheális LPS vagy intravénás oleic sav adásával előidézett az akut tüdőkárosodást megelőzően. Ezt követően további lélegeztetést végezve a hemodinamikai és légzési paramétereket monitorizáltuk. A tüdőkárosodás igazolására a mosófolyadékban lévő neutrophileket, teljes fehérje és citokin mennyiséget határoztuk meg. Vaszkuláris tüdőkárosodást igazolt az emelkedett plazma tumor nekrosis faktor (TNF) szint és a fokozott neutrophil aktiváció (felszíni Mac-1 upreguláció és L-selektin csökkenés), pulmonáris vaszkulaturában való felhalmozódással. Tüdő funkciót a légzési mechanika változása, vérgáz paraméterek és mosófolyadék neutrophil halmozás alapján határoztuk meg

Feltételeztük, hogy CO lélegeztetés csökkentheti a citokin választ, javíthatja a hemodinamikai és légzési paramétereket, és előnyös hatással van az akut tüdő károsodás progressziójára.

Harmadik kísérlet sorozat, *in vitro* modellt alkalmazva tanulmányoztuk a GST szerepét szívizomsejtek oxidatív stressz által kiváltott apoptózisában. A szív sejtek mitokondriális életképességét MTT assay, annexin V és propidium iodide flowcytometriás vizsgálatával határoztuk meg. Extracellularis signal-regulated protein kináz (ERK 1/2), c-Jun N-terminal kináz (JNK) és p38 MAPK foszforilációját szintén tanulmányoztuk. A GST biológiai szerepét vizsgáltuk a szívizomsejtekben oxidatív stressz kiváltása során.

GST biológiai szerepének vizsgálata maga GST etakrinsav adásával történő gátlása révén iszkémia és/vagy reperfüzióknak megfelelő körülmények között.

Feltételeztük, hogy GST aktivitás javíthatja a szívizomsejtek túlélését, az oxidatív stressz által okozott IR károsodás csökkentése révén.

ANYAG ÉS MÓDSZEREK

I. N-ACETILCISZTEIN ÉS ISZKÉMIÁS PREKONDICIONÁLÁS SZEREPE MÁJ ISZKÉMIA-REPERFÚZIÓS ÁLLAT MODELLBEN.

Általános anaeszthezia mellett három kutya csoportot vizsgáltunk (n=5 per csoport) az első csoport 60 min. iszkémia, második 150 mg kg⁻¹ NAC intravénás adását követő 60 min. iszkémia, harmadik csoport a 60 perces iszkémiát megelőzően három IPC periódusban (10 min. iszkémia amit 10 min. reperfúzió követ) részesült. Ezt követően 180 min reperfúzió fenntartása mellett hemodinamikai máj funkciós monitorizálást végeztünk. Feltételeztük, hogy az in vivo máj modellben végzet kísérletünkben, ismételt iszkémiás prekondicionálás, illetve N-acetylcysteine (NAC) adása meggátolhatja az indocyanine green plasma disappearance rate (ICG-PDR) által meghatározott iszkémiás-reperfúziós károsodást vagy kedvező hemodinamikai hatással rendelkezik a reperfúzió során. ICG-PDR, valamint a szérum aszpartát-transzferáz és alanin-transzferáz szint nem mutatott különbséget az egyes csoportok között. Habár a májkárosodást a hemodinamikai paraméterek, vérgáz értékek és a máj funkciós tesztek egyértelmű igazolták, az NAC és IPC nem volt hatással a májfunkció károsodására. Cardiac index és az intrathoracalis vér volumen index szignifikánsan magasabb értéket mutatott a kontroll csoporthoz képest. Ezen eredmények tükrében javasolt egy nagyobb prospektív tanulmány elvégzése, ami igazolhatja, hogy a máj iszkémiát megelőző prekondicionálásnak van-e ICG-PDR által kimutatott kedvező hatása a májsejtek túlélésére.

II. BELÉLEGZETT SZÉNMONOXID SZEREPE AKUT TÜDŐKÁROSODÁS ESETÉN EGÉR MODELLBEN.

Az altatott C57BL/6 egereket CO (500 parts per million) jelenlétben vagy hiányában oxigénnel lélegeztettük egy órával a lipopoliszacharid (LPS) vagy oleic sav (OA) adásával előidézett tüdősrülést megelőzően Ezt követően további 2 órán keresztül azonos gáz mennyiséggel folytattuk tovább a lélegeztetést, hemodinamikai és légzési paraméterek monitorizálása mellett. Habár acute lung injury (ALI) és acute respiratory distress syndrome (ARDS) az intenzív osztályon ellátott betegek között a leggyakoribb oka a mortalitás és morbiditás növekedésének, a folyamatos kutatások ellenére is csak kevés hatékony therápia áll rendelkezésünkre. Az elmúlt években szövetkárosodással járó állatkísérletekben sikerült igazolni, hogy a belélegzett szénmonoxid (CO) citoprotektív hatással rendelkezik Ezen eredmények tükrében vizsgáltuk a belélegzett CO hatását három in vivo egér modellben. Intratrachealisan adott LPS által előidézett alveoláris gyulladással (megnövekedett mosófolyadék neutrophil, totál protein, és cytokinek) járó tüdőkárosodást idéztünk elő. LPS intravénás adása elsősorban vaszkuláris tüdőkárosodást okozott, emelkedett plazma TNFszint, neutrophil aktiváció (felszíni Mac-1 upreguláció és L-selectin csökkenés) és halmozás mellett a pulmonáris vaszkulaturába. Intravénásan adott OA a légzési funkció károsodását okozta, amely megmutatkozott, a ventilációs mechanizmusok és vérgáz értékek romlásával, valamint a mosófolyadékban neutrophil halmozással. Kísérleteink során a belélegzett gázhoz adott CO szignifikáns változást nem okozott a vizsgált fiziológiai és immunológiai paraméterekben. Klinikailag ALI /ARDS sokkal lassabban fejlődik ki, mint az általunk alkalmazott állat modell esetén, így CO hosszabb ideig történő adása kedvezőbb hatást eredményezhet a túlélés, illetve felépülés tekintetében. Ezt a lehetőséget vizsgálatunk eredménye nem zárja ki és további vizsgálat szükségességét veti fel.

III. GLUTÁTION S-TRANSZFERÁZ SZEREPE SZÍVIZOMSEJTEK OXYDATÍV STRESSZ OKOZTA APOPTÓZISA SORÁN.

A kísérletekhez 2-4 napos, kollagenáz által kinyert újszülött Wistar patkány kamrai szívizom sejt kultúrát használtunk, hat random kísérleti csoportba osztva; I csoport CSFM inkubált kontroll csoport kezelés nélkül; II csoport, EA 150 μM adása önmagában; III csoport, 1 mM H_2O_2 adásában részesült; IV csoport, IR; V csoport, 1 mM H_2O_2 és EA 150 μM kezelést kapott; VI csoport, IR és EA 150 μM . 5 órás kezelési időt követően kalorimetriás MTT assay segítségével határoztuk meg a szívizomsejtek életképességét az élősejtek abszolút számának megadása révén. Flocytometriás vizsgálatot alkalmazva határoztuk meg az apoptózis arányát kettős FITC-jelölt annexin V és propidium iodide festéssel. Mind az IR és H_2O_2 adása önmagában kifejezett csökkenést okozott az élő sejtszámban. Ezen csökkenés még kifejezettebb volt EA adása esetén. H_2O_2 kezelés alatt adott EA megnövelte az apoptotikus sejtek arányát, valamint reperfüzió során megnövelte a nekrotikus sejtek számát. Önmagában adott EA az élő sejtszámot csökkentette és megnövelte az apoptotikus sejtek arányát. Érdekes módon IR közben adott EA a nekrotikus sejtek mennyiségét megnövelte (annexin V negatív és PI pozitív) és az élő sejtszámot csökkentette. Szívizomsejteknek adott EA, valamint IR a JNK aktivitást jelentősen megnövelte. IR és H_2O_2 inkubáció a p38 MAP kináz aktivációt jelentősen megnövelte. EA révén gátolt GST aktivitás az Akt foszforiláció kifejezett csökkenését okozta H_2O_2 kezelés közben. ERK foszforiláció megnövekedett mindkét GST gátolt csoportban (EA inkubált) IR-nak kitett, illetve a H_2O_2 kezelt csoport esetén is. Kísérleti eredményeink alátámasztják feltételezésünket, miszerint stressz okozta károsodás során a szívizomsejtek túléléséhez GST aktivitás szükséges. Azonban további vizsgálatok szükségesek i) farmakológiai vizsgálatok ii) biokémiai folyamatok meghatározása iii) *in vivo* GST gátlás relevanciájának meghatározása érdekében.

EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

- 1) A klinikailag releváns máj iszkémia-reperfüzió állat modellünkben hemodinamikai, metabolikus ICG spectrophotometria mérések mellett kimutattuk, hogy a máj funkciót vagy hemodinamikai állapotot nem befolyásolta az NAC adása.
- 2) Munkacsoportunk által bevezetett egyedi IPC modell magasabb ICG-PDR, CI és ITBVI mutatott.
- 3) ALI/ARDS *in vivo* egér modellben a belélegzett CO hatását vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a CO magasabb COHb szint mellett sem okozott szignifikáns változást a légzési és hemodinamikai paraméterekben.
- 4) Az akut tüdőkárosodás vizsgálata során újonnan bevezetett egér modellünk alapját képezheti egy hosszabb CO expozíciónak a vizsgálatát szubakut, illetve krónikus modellekben.
- 5) A szív *in vitro* iszkémia-reperfüzió modellünkben a GST gátlás hatásának vizsgálata során, amikor a sejtek különböző stressz faktoroknak vannak kitéve, az EA az élő sejtek hányadát nagyobb mértékben csökkentette, mint a H_2O_2 vagy IR, valamint növelte az apoptotikus sejtek arányát H_2O_2 kezelés során.
- 6) A GST modellünk bizonyítja, hogy a szívizomsejtek túléléséhez stressz faktorok okozta károsodása során GST szükséges, továbbá más *in vivo* GST modell kísérleti alapját szolgálja.