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

Doktori (Ph.D.) értekezés

Dr. Nedvig Klára

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Vezető: Dr. Kovács L. Gábor, akadémikus

„Keringéspatológiai állapotok vizsgálata kísérletes modelleken és klinikai beteganyagon" című program
Programvezető: Dr. Jancsó Gábor, egyetemi docens
Témavezető: Dr. Ferencz Andrea, egyetemi docens
Dr. Lőrinczy Dénes, egyetemi tanár

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

Pécs
2016

TARTALOM

	oldal
Rövidítések	**4**
1. Bevezetés	**5**
2. Meleg és hideg ischaemia/reperfúziót követő vékonybélkárosodás vizsgálata	**8**
2.1. Bevezetés	8
2.1.1. Vékonybél meleg I/R-ós károsodása	8
2.1.2. Vékonybél konzerválás	11
2.1.3. A szövetkárosodás meghatározásának módszerei	11
2.1.3.1. Biokémiai és szövettani vizsgálatok	11
2.1.3.2. DSC vizsgálat	12
2.2. Célkitűzés	15
2.3. Anyag és módszer	16
2.3.1. Kísérleti csoportok és műtéti módszerek	16
2.3.2. Biokémiai vizsgálatok	17
2.3.3. Morfológiai vizsgálatok	17
2.3.4. Statisztikai analízis	18
2.4. Eredmények	18
2.4.1. Biokémiai vizsgálatok eredménye	18
2.4.2. Szövettani vizsgálatok eredménye	20
2.4.3. DSC vizsgálatok eredménye	22
2.5. Megbeszélés	27
3. A vékonybél ischaemiás posztkondícionálása	**32**
3.1. Bevezetés	32
3.2. Célkitűzés	33
3.3. Anyag és módszer	34
3.3.1. Kísérleti csoportok és műtéti módszerek	34
3.3.2. Biokémiai vizsgálatok	35
3.3.3. Morfológiai vizsgálatok	35
3.3.4. Statisztikai analízis	35
3.4. Eredmények	35
3.4.1. Biokémiai vizsgálatok eredménye	35
3.4.2. Szövettani vizsgálatok eredménye	37
3.5. Megbeszélés	39

4. PACAP hatásának vizsgálata vékonybél autotranszplantációs modellekben 42
4.1. Bevezetés 42
4.2. Célkitűzés 43
4.3. Anyag és módszer 44
4.3.1. Kísérleti csoportok és műtéti módszerek 44
4.3.2. Biokémiai vizsgálatok 46
4.3.3. Morfológiai vizsgálatok 46
4.3.4. PACAP-38 és PACAP-27 mérése RIA módszerrel 46
4.3.5. A szöveti citokin aktivitás mérése 47
4.3.6. Statisztikai analízis 47
4.4. Eredmények 47
4.4.1. Biokémiai vizsgálatok eredményei 47
4.4.2. Morfológiai vizsgálatok eredménye 48
4.4.3. A bél PACAP-38 és PACAP-27 immunreaktivitási szintjének változása bélszövetben 50
4.4.4. Citokin expresszió változása bélszövetben 51
4.5. Megbeszélés 53
5. Új eredmények 57
6. Irodalomjegyzék 58
7. A szerző publikációi 67
Köszönetnyilvánítás 70

RÖVIDÍTÉSEK

AMP	adenozin-monofoszfát
cAMP	cyclic adenosine monophosphate, ciklikus adenozin-monofoszfát
ATP	adenozin-trifoszfát
ºC	Celziusz fok
C_p	hőkapacitás
ΔH	kalorimetriás entalpia
DSC	differential scanning calorimetry, differenciált pásztázó kalorimetria
EC	Euro Collins
GPX	glutation-peroxidáz
GR	glutation-reduktáz
GSH	redukált glutation
GVHD	graft versus host disease
H&E	haematoxilin-eozin
H2O2	hidrogén-peroxid
HVGD	host versus graft disease
IL-6	interleukin-6
I/R	ischaemia/reperfúzió
im.	intramuscularis
IPC	ischemic preconditioning, ischaemiás prekondícionálás
IPO	ischemic postconditioning, ischaemiás posztkondícionálás
IU	International Unit, nemzetközi egység
ºK	Kelvin fok
K	kontroll
KO	knock out
L-szelektin	L-selectin (CD62L/LECAM-1)
MALT	mucosal associated lymphatic tissue
MDA	malondialdehid
MOF	multi organ failure, sokszervi elégtelenség
µmol/g	mikromól/gramm
·OH	hidroxil gyök
$\cdot O_2$-	szuperoxid szabad gyök
OFRs	oxygen free radicals, oxigén eredetű szabadgyök
PACAP	pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide, hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
PMNs	polymorphonuclearis leukocyták
RANTES	Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted (CCL5)
RIA	radioimmunassay
S	Sham operated, áloperált
sICAM-1	soluble intercellular adhesion molecule-1 (CD54), szolubilis intercelluláris adhéziós molekula-1
SOD	szuperoxid-dizmutáz
TBA	tiobarbitursav
$T_{1/2}$	félértékszélesség
T_m	átmeneti hőmérséklet
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase-1, metalloproteináz-1 szöveti inhibitora
TNF-α,β	Tumor Nekrózis Faktor-alfa, béta
TPT	teljes parenterális táplálás
ttg	testtömeggramm
XD	xantin-dehidrogenáz
XO	xantin-oxidáz
UW	University of Wisconsin

1. Bevezetés

Az első sikeres kísérletes vékonybél transzplantációt 1959-ben kutyamodellen, majd 1967-ben betegeken Richard C. Lillehei és munkatársai végezték a minnesotai egyetemen [1, 2]. Az 1970-es évek elejéig összesen csak 8 átültetés történt, a leghosszabb túlélési idő 79 nap volt, és technikai komplikációk vagy immunszuppresszáns kezelés hiányában bekövetkező rejekció miatt valamennyi beteg meghalt. A ciklosporin 1972-es bevezetése után végzett bélátültetések (1988 Deltz, Németország; 1990 Goulet, Franciaország; 1990 Grant, Kanada) jelentették az első hosszabb távú sikeres beavatkozásokat, ahol a graftok leghosszabb túlélési ideje elérte a 4 évet.

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 [3, 4]. Ebből Európában 25 helyen történik bélátültetés, hazánkban nem végeznek ilyen műtétet. A recipiensek és a graftok 1 éves túlélése 75 % körüli, 3 éves túlélése 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 [3, 5-8].

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 (TPT) jön szóba, melynél az 1 éves túlélés 75-90 % körül van, ami lényegesen meghaladja a bélátültetés sikerességét [9]. Tartós TPT esetén azonban gyakori szövődmények a cholestasis, irreverzibilis májkárosodás (pl. fibrózis), kiválasztási zavarok, a vénás kanül trombózisa és környezetének gyulladása miatti rekurráló szeptikus állapot, pszichés zavarok és romló életminőség. A TPT kezelés alatt álló felnőttek 2-5 %-nál, míg a gyerekek 10-15 %-nál alakul ki olyan életveszélyes szövődmény, ami kuratív megoldásként vékonybél átültetést tesz szükségessé [8-10]. Számos gyerek- és felnőttkori alapbetegség állhat a klinikai probléma hátterében (1. táblázat).

1. táblázat. A vékonybél transzplantáció indikációját jelentő betegségek

Gyerekkor	Felnőttkor
Intestinális poliposis	Autoimmun enteritis
Hirschsprung betegség	Crohn betegség
Gastroschisis	Dezmoid tumor
Nekrotizáló enterocolitis	Gardner szindróma
Ischaemia	Ischaemia
Omfalokele	Irradiációs bélsérülés
Trauma	Trauma
Volvulus	Volvulus
Pseudoobstrukció	
Vékonybél atresia	

A vékonybél transzplantációját alapvetően két tényező nehezíti: egyrészt jelentős immunológiai szerepe, másrészt fokozott érzékenysége az ischaemia/reperfúziós (I/R) károsodásra. A bél kiemelten fontos perifériás immunszerv, mely transzplantációjakor a bélfalban található MALT (mucosal associated lymphatic tissue), a szoliter limphocyta tömörülések, a Peyer-plakkok és a dús nyirokér hálózat, valamint a mesentériumban jelenlévő nagyszámú nyirokcsomó is átültetésre kerül a recipiensbe. Ez a fő oka egyrészt a graft versus host disease-nek (GVHD), vagyis a szervkilökődésnek, illetve a jelentős mennyiségű átvitt immunsejt az immunszupprimált recipiens ellen fordulva host-versus-graft-disease-t (HVGD) okoz [11].

A transzplantációt nehezítő másik tényező a szerv fokozott érzékenysége az I/R károsodásokra. Ismert, hogy a vékonybél a perctérfogat mintegy 25 %-át kapja, melynek 90 %-a a 200 m^2 összfelületű mucosa és a submucosa területére kerül. Az I/R okozta bélkárosodás meghatározott sorrendben megy végbe. A kezdeti károsodás csupán funkcionális, de ha az I/R időtartama és/vagy kiterjedése fokozódik, akkor morfológiailag detektálható károsodás lép fel, mely a bélbolyhok csúcsának felületes károsodásától a transzmurális infarktusig terjedhet. Reperfúzió nélkül végzett kísérleti modellekben kimutatták, hogy önmagában az ischaemia is bélkárosodást okoz. Ennek nagyságát a hipoxia súlyossága és fennállásának időtartama határozza meg [12, 13]. A reperfúziós-paradoxon jelenségét először 1986-ban Park és Granger macskafélék I/R-s bélmodelljében írták le [14]. E szerint a reperfúzió során kialakult szövetkárosodás mértéke jóval jelentősebb, mint ami az ischaemia ideje alatt kialakul. Az I/R különböző interakciókat generálhat az endothel és más sejtes elemek között, melyek mikrovasculáris károsodáshoz, celluláris nekrózishoz és/vagy apoptózishoz vezetnek [15]. A splanchikus artériák elzáródása és az azt követő reperfúziója a polymorphonuclearis (PMN) leukocyták aktivációjával és adhéziójával járó vasculáris permeábilitás növekedésén keresztül

keringési elégtelenséget, illetve a proinflammatorikus faktorok, a nitrogén- és az oxigén eredetű szabadgyökök (Oxygen Free Radicals, OFRs) felszabadulását idézik elő. Ezek a szabadgyökök a membránok lipidperoxidációját, a fehérjék és a DNS károsodását és ezzel a sejtek dezorganizációját és végül sejthalált okoznak. Az I/R az izomszövet károsítása révén motilitási zavarokhoz vezet, melynek hátterében az OFRs fokozott termelődése és a sejtek kálciumháztartásának zavara áll [16]. A splanchnikus terület I/R okozta endothel károsodását főképp a bél mucosális és submucosális területére történő gyulladásos beszűrődés okozza. A vékonybélben bekövetkező I/R a mucosális barrier károsodása révén bakteriális transzlokációt, szisztémás gyulladásos folyamatok aktivációját, illetve az elektrolit és a sav-bázis háztartás eltolódását vonja maga után. A súlyos károsodás szepszist, sokszervi elégtelenséget (Multi Organ Failure, MOF) és a beteg halálát okozhatja [17-19].

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 ºC-os konzerváló oldatban különböző ideig tároljuk [20]. Tanulmányok sorozata igazolta, hogy szervenként eltérő összetételű konzerváló oldat alkalmazása biztosítja a legjobb prezervációt [21, 22]. 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 Folkert Belzer és James Southard fejlesztették ki hasnyálmirigy átültetésekhez [23]. A hasi szervek konzerválásában kapott jobb eredmények hatására ez egyre inkább kiszorította a korábban alkalmazott Euro Collins (EC) oldatot. Az UW oldat ozmotikus koncentrációjának állandóságát a glükóz helyett olyan metabolikusan inert molekulák biztosítják, mint a laktobinát és a raffinóz; a hidroxietil-keményítő tartalma megelőzi az ödéma kialakulását és többek között antioxidánsokat (glutation, allopurinol) és energiaforrásként adenozint tartalmaz [24]. 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 [25].

A szervek tágabb értelembe vett I/R-s kutatásai és ezen belül is a transzplantációval kapcsolatos vizsgálatok több évtizedes múltra tekintenek vissza [26-28]. Az alapmechanizmusok ismeretében ma a vizsgálatok célkeresztjében a károsító és védelmi folyamatok molekuláris hátterének kutatása áll [29-32], melyekhez kutatócsoportunk különböző vékonybél transzplantációs állatkísérletes modellek vizsgálatával kívánt hozzájárulni.

2. Meleg és hideg ischaemia/reperfúziót követő vékonybélkárosodás vizsgálata

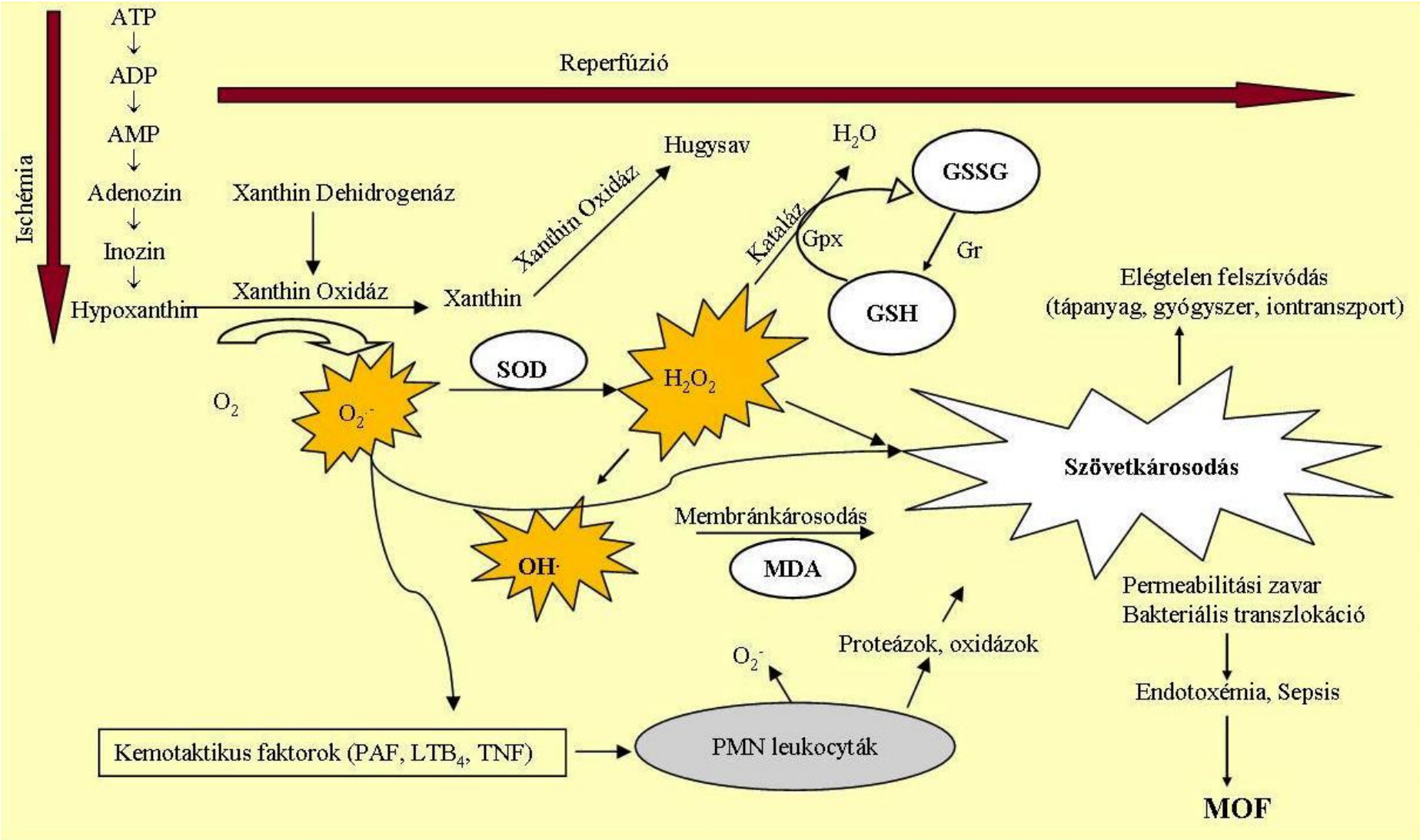
2.1. Bevezetés

2.1.1. Vékonybél meleg I/R-ós károsodása

A vékonybél meleg I/R-hoz kapcsolódó kutatások klinikai relevanciáját egyrészről az adja, hogy a vizsgálati eredmények rávilágítanak az akut mesenteriális ischaemiás kórkép pathomechanizmusára és molekuláris hátterére. Ismert, hogy klinikai szempontból a meleg ischaemia eredete lehet occlusív (pl. embolia, trombosis) és non-occlusív (pl. cardiogen shock, haemorrhagia, szepszis). Az a. mesenterica superior akut főtörzsi elzáródása kiterjedt intestinális nekrózist okoz, mely mai napig is gyakran katasztrófális kimenetelű betegség 70-90 % körüli mortalitással [33]. Másrésztről ezek a vizsgálatok összehasonlítási alapot adnak a konzerválás (hideg ischaemia) és azt követő transzplantációkor kapott eredmények összevetéséhez és kiértékeléséhez.

A sejtek metabolizmusában a katabolikus folyamatok jelentős része oxidoredukció. Normál körülmények között a sejtek aerob metabolizmusa során is termelődik kis mennyiségű, rövid életidejű oxigén szabadgyök, amelyeket az antioxidáns enzimek és scavengerek folyamatosan inaktiválnak (1. ábra). Ischaemia idején a sejtek aerob metabolizmusának zavara miatt az ATP molekula monomerjeire esik szét. A szöveti keringés helyreállásakor (reperfúzió) a sejtek oxigén ellátottsága hirtelen megnő és a felhalmozódott hypoxantint a xantin oxidáz (XO) xantinná bontja, miközben a szuperoxid gyökök termelődése robbanásszerűen megnő, kialakul az „oxidative burst”. Az OFRs ($\cdot OH$, $\cdot O_2$) vagy gyöktermészetű anyagok (H_2O_2) valamennyi sejtalkotót (membránok, struktúrális és enzimfehérjék, DNS, stb) károsítják. Ha az antioxidáns védő rendszer kimerülése vagy az OFRs túltermelődése miatt az endogén védelem elégtelenné válik, akkor súlyos károsodásokat okozó állapot, oxidatív stressz alakul ki. Ha a folyamat lassan következik be és/vagy rövid ideig áll fenn, akkor a sejtek képesek adaptív folyamatok révén kompenzálni az oxidatív stressz káros mechanizmusait. Ekkor a sejtfunkciók reverzibilis károsodása lép fel. Tartósan fennálló noxa hatására a károsodás irreverzibilissé válik, a sejtek apoptózis vagy nekrózis útján elhalnak [34, 35].

A vékonybél I/R-s érzékenységének fő oka, hogy az OFRs mindkét forrását extrém mennyiségben tartalmazza. 1981-ben mutatták ki az OFRs egyik forrásaként szolgáló xantin oxidázt. A xantin dehidrogenáz (XD) az ischaemiás szövetben XO-zá alakul.



1. ábra. A bélszövet oxidatív károsodása meleg ischaemia és reperfúzió hatására *(Forrás: Nedvig K. A vékonybél meleg ischaemiás/reperfúziós károsodásának komplex kimutatása és kivédésének lehetőségei. PTE ÁOK Dékáni pályamunka, 2008).*

Ez az átalakulás arányos az ischaemia időtartamával. Más szövetekhez viszonyítva a bél nyálkahártyájában a legjelentősebb a XD-XO átalakulás [36]. Másrészt a PMN leukocyták külső membránján található egy NADPH oxidáz enzim, ami a molekuláris oxigént szuperoxid anionná redukálja. A macska bélnyálkahártyában kimutatták, hogy 10 millió PMN leukocyta található 1 gramm szövetben. Az aktivált PMN leukocyták számos enzimet (proteáz, elasztáz, kollagenáz, stb) tárolnak granulumaikban, melyek aktivált állapotban felszabadulnak és az OFRs-kel együtt amplifikálják a szöveti destruktív hatást [37].

1993-ban Cheeseman írta le, hogy az oxidatív stressz során a sejtekben egy káros, kumulálódó folyamat, a lipidperoxidáció jön létre [38]. A lipidperoxidáció termékei részben markerei, részben gerjesztői az oxidatív károsodásnak. Az OFRs képesek elindítani a lipidperoxidációt, láncreakció révén lipidekből származó zsírsav szabadgyökök képződését eredményezve, melyeknek melléktermékei a konjugált diének, a lipid hidroperoxid gyök és a lipid hidroperoxid. A konjugált diének és a malondialdehid (MDA) mérése viszonylag egyszerű, ezért, mint a lipidperoxidáció indirekt markerét határozzák meg [39, 40]. Bélszövetben mért értékei kifejezetten jól korrelálnak a bél oxidatív károsodásával [41].

A károsodások mérséklésére számos endogén védőmechanizmus alakult ki [42, 43]. A nem enzimatikus antioxidánsok közé tartozó glutation egy tripeptid (L-γ-Glutation-L-Ciszteinil-Glicerin), mely a legfontosabb alacsony molekulasúlyú thiol vegyület az eukariótákban. Redukált formája a GSH, mely L-Glutamát, L-Ciszteinilből és glicinből a májban szintetizálódik [44]. Átjutva a sejtmembránokon fontos szerepet játszik a sejtek és szervek közötti thioltranszportban, a redox reakciókban, a jelátvitelben és az apoptózisban. A GSH-nak központi szerepe van a béltraktust elárasztó anyagok (pl. táplálék, gyógyszerek, mikroorganizmusok, stb) antioxidáns és detoxikáló folyamatainál is. Patkány bélsejtekkel végzett kísérletekben specifikus transzporterek jelenlétét mutatták ki, melyek a bél és a plazma GSH szintjéért, és így más szervek GSH-val való ellátásáért felelősek [42, 43, 45].

A szuperoxid dizmutáz (SOD) az egyik legfontosabb endogén antioxidáns enzim, mely azáltal nyújt védelmet a szabadgyökökkel szemben, hogy a szuperoxid aniont továbbalakítja hidrogén peroxiddá, melyet a kataláz vízzé redukál. Három formája van: az intracelluláris Cu-Zn SOD, az extracelluláris SOD és a mitokondriális Mn-SOD. Az teljes SOD mennyiségének kb. 85-90 %-át az intracelluláris SOD teszi ki [46].

A fenti folyamatok végül kiterjedt mikrocirkulációs zavarokkal, membrán-károsodással, a permeabilitás növekedésével és a transzportfolyamatok zavarával járó lokális bélszövet károsodást okoznak, mely utat enged a szisztémás bakteriális inváziónak, endotoxémiát, szeptikus állapotot és végül sokszervi elégtelenséget eredményezve [32, 47, 48].

2.1.2. Vékonybél konzerválás

A szervtranszplantáció egyik fő követelménye a szerv parenchymájának és vasculaturájának minél jobb megőrzöttsége, mely a szerv funkcióját biztosítani képes a keringés helyreállítását követően. Bármely szerv átültetésekor, így a vékonybél transzplantációjakor is elkerülhetetlen a szerv különböző időtartamú hideg és meleg ischémiája, majd ezt követő reperfúziója, mely bár az egyetlen alternatívája a szerv túlélésének, mégis számos problémát rejt magában. A konzerváló oldatokkal kapcsolatos kutatások az 1970-es években kezdődtek, az első oldat kifejlesztése Geoffrey Collins nevéhez fűződik [49]. Az oldat eredeti összetételt az Eurotransplant szervezet módosította és Euro Collins néven terjedt el. 1986-ban University of Wisconsin néven egy új oldat került forgalomba, mely hidroxietil-keményítőt, OFRs scavengereket (glutation, allopurinol) és energiaforrásként adenozint tartalmazott [50]. Ez a kezdeti, multicentrikus európai tanulmányok vizsgálatai után a máj, a vese és a pancreas standard konzerváló oldataként terjedt el a klinikai gyakorlatban [51]. A vékonybél prezerváció szempontjából nem ez az ideális oldat, de a konzerváló oldatok közül még ma is ez nyújtja a legjobb eredményeket [52]. A szervspecifikus konzerváló oldatok összetételének fejlesztése némileg lassult, de még ma is fontos kutatási irányt jelent főként a késői graft funkciók vizsgálata tekintetében [7, 53].

2.1.3. A szövetkárosodás meghatározásának módszerei

2.1.3.1. Biokémiai és szövettani vizsgálatok

Szövethomogenizátumból az oxidatív károsodást jelző szöveti MDA koncentrációja, illetve az endogén scavenger GSH szintje és az antioxidáns SOD enzim aktivitása meghatározható hagyományos módon [54-56] vagy gyári kittek segítségével végzett spektrofotometriás eljárásokkal.

A szöveti struktúrális károsodás meghatározásának alapvető módszere a hisztológiai metszetek fénymikroszkópos vizsgálata. Vékonybél esetén a kiértékeléshez legtöbbször használt klasszifikáció a Park-, a Sonnino- és a Chiu-féle osztályozás [57-60]. Ezek a stádiumbeosztásoknak a morfológiai károsodást az enyhétől a súlyos formáig osztályozzák, mely általában jól korrelál a klinikai kimenetellel. A kvalitatív módszernek számító Park-féle klasszifikáció a vékonybél villusaiban és kriptáiban bekövetkező mucosális károsodásokat sorolja különböző stádiumokba. Az osztályozás hematoxilin-eosin festett metszeteken, a villusokat és a kriptákat érintő ephiteliális nekrózis mértékétől függően 0-tól 5-ig történik (2. táblázat). A bél egyes rétegeit digitális technikával (pl. Scion Image Software) lemérve kvantitatív módon számszerűsíthetőek és statisztikailag kiértékelhetőek az eredmények.

2. táblázat. A Park-féle klasszifikáció stádiumbeosztása

Stádium	A villusok és kripták károsodásának mértéke
0	Normál bélszövet, károsodás nincs
1	A villusok kismértékű megemelkedése még ép kripták mellett
2	A villusok közepes mértékű leválása részleges kriptakárosodással
3	Jelentős epithel leválás, helyenként előforduló károsodott kriptákkal
4	Epithel leválás villus denudáció mellett
5	Denudált villusok, a lamina propria és a kripták decellularizációja a bélstruktúra jelentős szétesése mellett

2.1.3.2. DSC vizsgálat

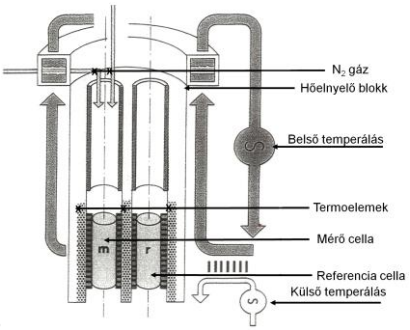
A minta fizikai és kémiai tulajdonságainak a hőmérséklet függvényében történő megváltozását mérő metodikákat termikus módszereknek nevezzük. A differenciál pásztázó kalorimetriát (Differential Scanning Calorimetry: DSC), mint termoanalitikai módszert az 1960-as években Watson és O'Neill főként ásványok és egyéb szervetlen anyagok fizikai tulajdonságainak meghatározására fejlesztette ki az USA-ban [61, 62]. Később ezt a szenzitív és validált analitikai módszert már nem csak a fizikai tudományokban, hanem számos biológiai makromolekula (szénhidrátok, fehérjék, nukleinsavak, stb) szerkezeti változásainak kimutatására használták [63, 64], és a 2000-es évektől a kísérleti állatmodellek vizsgálata mellett [65] a különböző klinikai kutatásokban is létjogosultságot nyert [66-69]. Összességében elmondható, hogy mára a DSC-t az orvostudományi kutatások széles köre alkalmazza a különböző biológiai struktúrákban végbemenő változások vizsgálatára.

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. Ismert, hogy az átalakulást hőjelenség kíséri. Detektálva az átalakulás, vagy ha több van, akkor az 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 [62, 63]. Az anyag fizikai és kémiai sajátosságainak megváltozását vagy az idő vagy a hőmérséklet függvényében megrajzolt görbék szemléltetik számunkra. Tekintettel arra, hogy a hőmérséklet változtatásával általában fázisátalakulások, kémiai reakciók is lejátszódnak a vizsgált anyagban, a mérési eredményekre a minta meglévő sajátosságain (pl. összetétel, morfológia) kívül a mérési körülmények (felfűtési sebesség, a minta nagysága), illetve a mintát körülvevő atmoszféra jellege is hat. Így a termikus analízis kétféle információt nyújt számunkra. Egyrészt a vizsgált anyag átalakulási hőmérsékletét határozhatjuk meg minőségi jelzőként, másrészt a mérés hatására átalakult anyag mennyiségével arányos jelet kapunk.

A DSC készülék két mintatartót tartalmaz, melyek közül az egyik a vizsgálandó mintát, míg a másik a referencia anyagot tartalmazza (2. ábra. A-B). Ez utóbbinak inertnek kell lennie, vagyis a méréskor 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 (ΔT=0) tarthassuk. A mérések 0-100 °C közötti hőmérsékleti tartományban történnek a beállított hőmérsékletemeléssel (pl. 0,3 ºK/perc).

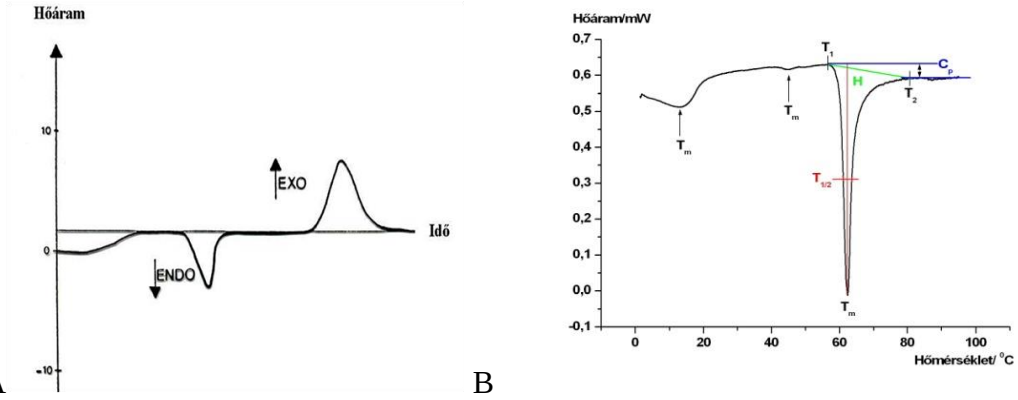
A

B 

2. ábra. SETARAM Micro DSC-II kaloriméter a PTE ÁOK Biofizikai Intézetében (A). A DSC készülék működésének sematikus rajza, ahol két különálló cella tartalmazza a mintát és a referencia anyagot (B).

A DSC-termogram kiértékelésekor arra kapunk választ, hogy a görbén a hőmérséklet növelésével hogyan változott a hőáram, vagyis időegység alatt az anyagon átáramló hőmennyiség. A biológiai mintával közölt hőt az egyenletesen felveszi és az anyag felmelegítésére, belső energiájának növelésére fordítódik, így nem alakul ki hőmérsékletkülönbség a minta és referencia között (1. plató fázis). A hőmérséklet további

növelésekor a hőáram csökkenni kezd, mert a hőmennyiség egy része már nem a belső energia növelésére, hanem a kémiai, biológiai kötések átrendeződésére, felszakítására fordítódik. Ezt jelzi a görbe leszálló szára, a denaturációs fázis, mely egy endoterm folyamatot tükröz (3. ábra A). Ekkor a minta hőmérséklete kisebb a referenciáénál, a szerkezet megbontásához többlet energiát kell betáplálnunk, hogy a hőmérsékletkülönbség a két anyag között továbbra is zérus maradjon (ΔT=0). Majd egyre több fehérje kezd denaturálódni, ami egyre több hőelnyeléssel jár, így tovább nő a mintába betáplálandó hőáram. 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. Ha minden fehérje denaturálódott, akkor már nem szükséges többlet energia a szerkezeti átalakulásra, így a minta és referencia közt nem lesz további hőmérsékletkülönbség (2. plató fázis). 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) (3. ábra B).



3. ábra. A kalorimetriás görbe az idő függvényében mért hőáram változását szemlélteti. Adott hőmérsékleten a folyamat endo- vagy exoterm módon zajlik (A). Porcszövet DSC görbéje (B), ahol a denaturációt jellemző termikus paramétereket szemléltetjük:

- *a denaturáció kezdete (T_1) és vége (T_2)*
- *denaturációhoz szükséges energia (ΔH=kalorimetriás entalpia)*
- *denaturáció maximális hőmérséklete (T_m= a minta 50%-a átalakul más konformációba)*
- *félértékszélesség ($T_{1/2}$: ha kicsi, akkor nagyon erős a kölcsönhatás/kooperativitás az adott termikus egységen belül, ha nagy, akkor igen laza. Tehát a denaturáció során létrejövő új állapot merevebb, vagy lazább szerkezetű lesz)*
- *a natív és denaturált állapot alapvonala közti különbség a két állapot hőkapacitás (C_p) különbségét adja.*

A vizsgálatok rámutattak arra, hogy a biológiai struktúrákban végbemenő termodinamikai változások (T_m, ΔH, C_p) összefüggésbe hozhatók a különböző szövetekben létrejövő kóros eltérésekkel (pl. ischaemia, degeneráció, trauma) és specifikus módon kimutathatók a különböző betegségeknél (onkológiai, krónikus gyulladásos kórképek) [67, 68].

2.2. Célkitűzés

Kutatásunk első részében 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 meleg és hideg ischaemia alkalmazása 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?

2.3. Anyag és módszer

2.3.1. Kísérleti csoportok és műtéti módszerek

Felnőtt, hím, Wistar patkányokat (testtömeg: 250-300 g; Σn = 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 kipreparáltunk és atraumatikus klipp felhelyezésével 1 órás (A1. csoport), 3 órás (A2. csoport) és 6 órás (A3. csoport) teljes ischémiát hoztunk létre (3. táblázat). A klipek eltávolítása után 3 órás reperfúziót kezdtünk.

A hideg ischaemiás csoportokban a laparotomia után a vékonybelet a Treitz-szalagtól az ileocoecalis 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.

3. táblázat. A meleg I/R-ós és hideg konzerválást követő autotraszplantációs kísérleti csoportoknál alkalmazott műtéti protokoll

Csoport	Beavatkozás
S	Anesztézia és median laparotomia
A1	1 óra meleg ischaemia + 3 óra reperfúzió
A2	3 óra meleg ischaemia + 3 óra reperfúzió
A3	6 óra meleg ischaemia + 3 óra reperfúzió
B1	1 óra hideg konzerválás + 3 óra reperfúzió
B2	3 óra hideg konzerválás + 3 óra reperfúzió
B3	6 óra hideg konzerválás + 3 óra reperfúzió

2.3.2. Biokémiai vizsgálatok

Szövethomogenizátumból gyári kittek segítségével, spektrofotometriás módszerekkel határoztuk meg az oxidatív stresszt jelző paramétereket. A lipidperoxidáció indirekt markereként ismert 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 scavanger GSH szintjét Glutathione Assay Kit (Calbiochem, Darmstadt, Németország) 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 SOD enzim aktivitását Superoxide Dismutase Assay Kit (Calbiochem, Darmstadt, Németország) segítségével határoztuk meg. A kit egyik reagense alkalikus autooxidáción megy át, mely átalakulást a mintában lévő SOD fokozza. Az autooxidáció eredményeképpen képződött kromofór abszorpciós maximuma 252 nm-en van. A SOD aktivitását IU/g nedves szövet értékben adtuk meg.

2.3.3. Morfológiai vizsgálatok

A szövettani vizsgálatokhoz a bélmintákat 10 %-os formalinban való fixálást és dehidratiót követően paraffinba ágyaztuk. A 4 µm vastag metszeteket haematoxilin-eozin (H&E) 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. Ezeket a vizsgálatokat két, független, a kísérleti csoportokat nem ismerő hisztológus végezte a vakpróba kritériumainak megfelelően. 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.

2.3.4. DSC analízis

A DSC mérésekhez a teljes bélfalat és annak szétválasztott rétegeit (mucosa, simaizom) használtuk fel. A bélfal mucosalis rétege az izomzattól éles eszközzel végzett gyakorlott mozdulattal elválasztható a kontroll szövetnél. Az ischaemiás károsodás

következtében, a bél szerkezetének meggyengülése miatt ez a szétválasztás könnyen kivitelezhető. A bélszövet termikus denaturációját SETARAM Micro DSC-II kaloriméterrel határoztuk meg, mely 24 órás mérést jelent mintánként. 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 µl, 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 ±0,1 mg pontossággal táráztuk ki, így a minta- és a referenciaedények közötti esetleges hőkapacitáskülönbség korrigálására nem volt szükség. A kalorimetrikus entalpiát a hőabszorpciós görbe alatti területből 2-végpontos SETARAM csúcspontok integrációjával számítottunk ki. Az adatok grafikus feldolgozása ASCII konverzió után Origin program (ver. 6.0, Microcal Software Inc, Northampton, USA) segítségével történt.

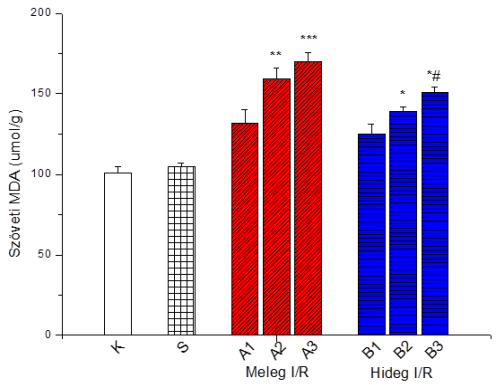
2.3.4. Statisztikai analízis

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.

2.4. Eredmények

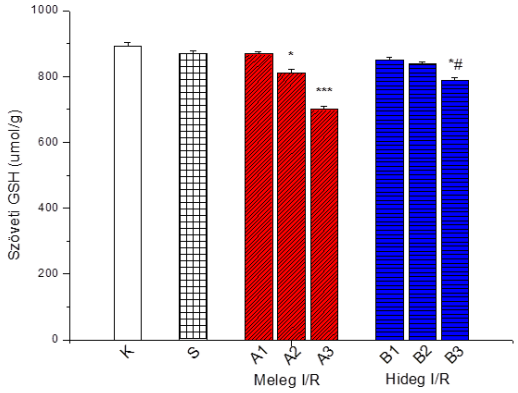
2.4.1. Biokémiai vizsgálatok eredményei

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 bélszövetben bekövetkező lipidkárosodás mértékét, mely a 6 órás csoportnál már szignifikáns eltérés volt (B3 vs. A3; $p<0,05$) (4. ábra).



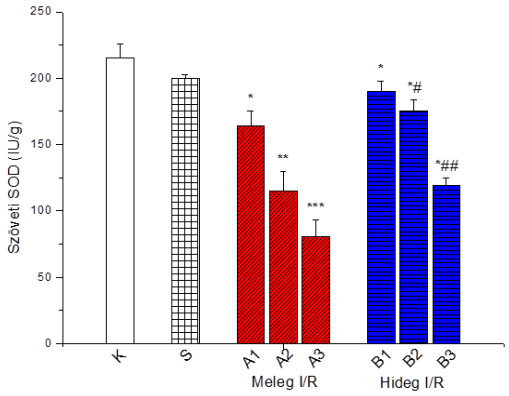
4. ábra. A szöveti MDA koncentrációjának változása meleg I/R és hideg konzerválást követő autotranszplantációs csoportokban. *A kísérleti csoportokat a 3. táblázat mutatja be. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; **p<0,01 vs. K; ***p<0,001 vs. K; #p<0,05 vs. A3)*

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) (5. ábra).



5. ábra. A szöveti GSH szintjének változása meleg és hideg ischémiát követő reperfúziós bélmintákban. *A vizsgált csoportokat a 3. táblázat mutatja be. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; ***p<0,001 vs. K; #p<0,05 vs. A3)*

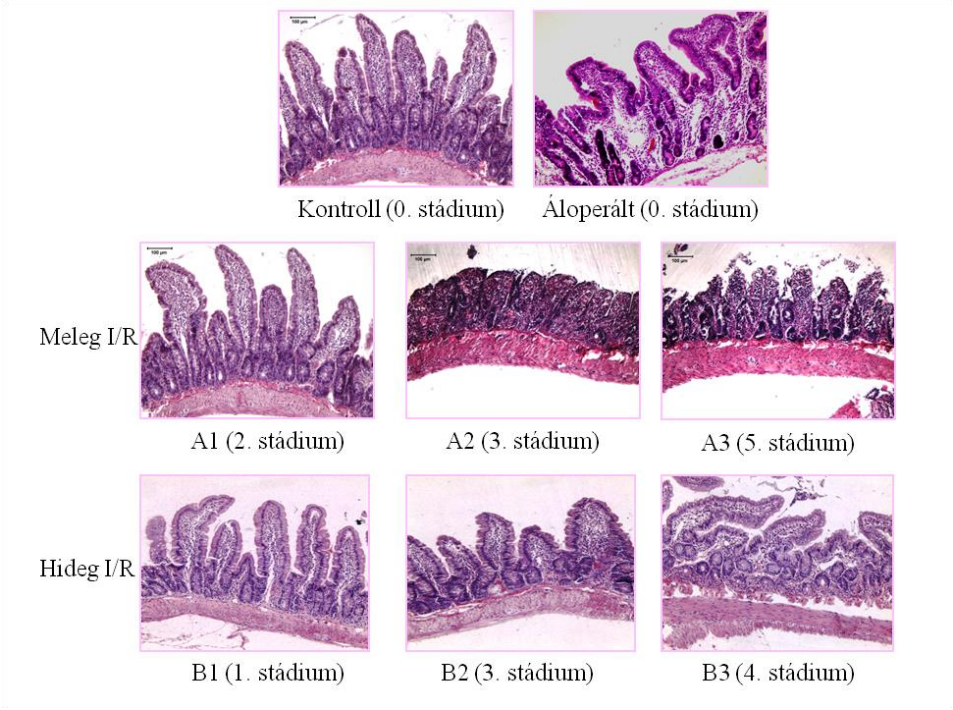
A bélminták SOD aktivitása a meleg ischaemiás idő növekedésével arányosan szignifikáns csökkenést mutatott (A1, A2 és A3 vs. K; p<0,05; p<0,01; p<0,001). Értéke hideg ischaemia hatására is szignifikánsan csökkent, bár az aktivitás számértékileg magasabb maradt (B1, B2 és B3 vs. K; p<0,05). A 3 és 6 órás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



6. ábra. A bélminták SOD aktivitásának változása az egyes vizsgálati csoportokban. *A csoportokban végzett beavatkozásokat a 3. táblázat foglalja össze. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; **p<0,01 vs. K; ***p<0,001 vs. K; #p<0,05 vs. A2; ##p<0,01 vs. A3)*

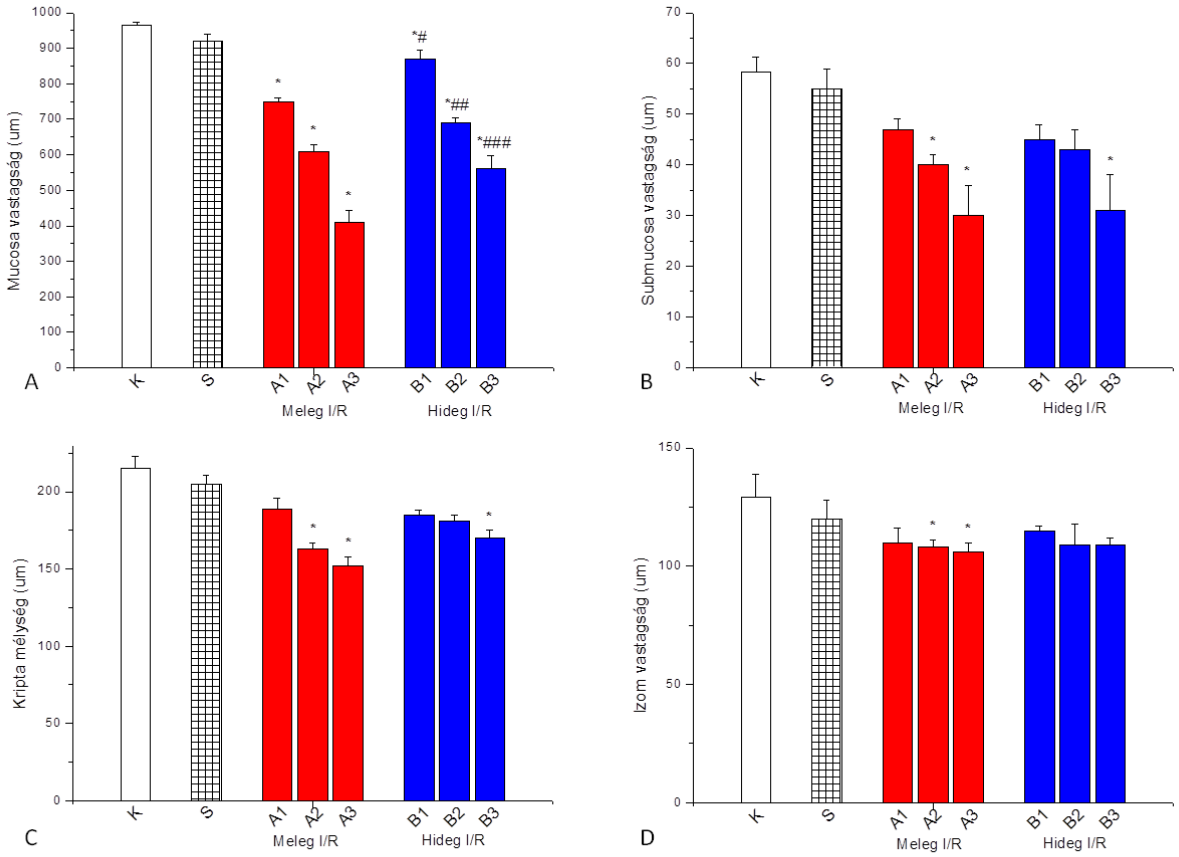
2.4.2. Szövettani vizsgálatok eredménye

A Park-féle klasszifikáció szerint a kontroll- és áloperált csoportokban normál szöveti struktúra volt megfigyelhető (7. ábra). Az 1 órás meleg ischémiát követő reperfúzió végén a villusok kismértékű leválását tapasztaltuk (2. stádiumú károsodás), míg 3 órás ischaemia már jelentős epithel-levállást 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 struktúrális károsodást okozott a bélszerkezetben, kivétel ez alól a 3 órás csoport, ahol a meleg ischaemiás csoporthoz hasonló károsodás volt (7. ábra).



7. ábra. Hisztológiai eredmények a Park-féle klasszifikáció alapján. *A Park-féle stádiumbeosztást a 2. táblázat, a vizsgálati csoportokat a 3. táblázat mutatja be. (Fénymikroszkópos vizsgálat H&E festett metszeteken, 100-szoros nagyítás)*

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 reperfúzió 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) (8. ábra). 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 legkevésbbé szembetűnőek.



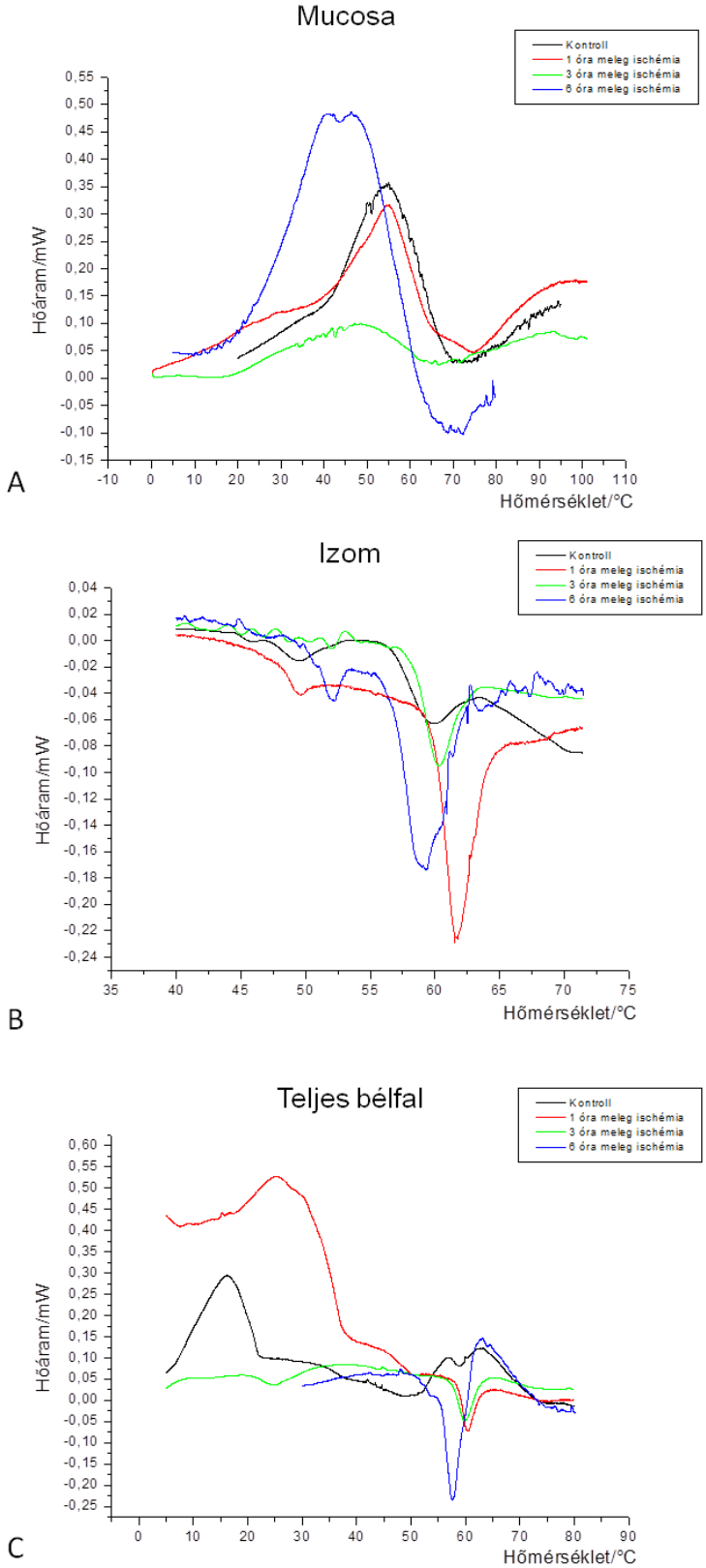
8. ábra. A vékonybél szöveti struktúrájának Scion Image kvantitatív mérési eredményei. *A: Mucosa vastagság, B: Submucosa vastagság, C: Kripta mélység, D: Izom vastagság. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; #p<0,05 vs. A1; ##p<0,05 vs. A2, ###p<0,05 vs. A3)*

2.4.3. 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 °C és a teljes kalorimetriás entalpiaváltozás (ΔH) -4,1±0,22 J/g volt. A meleg ischaemiás idő növekedésével csökkenő tendencia látható mind a T_m, mind a ΔH tekintetében (9. ábra A, 4. táblázat). Három óras meleg ischaemia hatására a T_m 48,7±0,2 °C-ra, míg az entalpia -1,7±0,2 J/g értékre csökkent. Kivétel ez alól a 6 órás meleg ischaemia mucosára gyakorolt hatása, ahol extrémen nagy entalpiaváltozás látható, meghaladva az 1 és 3 órás meleg ischémiánál és a kontroll mintáknál mért értékeket.

A bélfal simaizomrétegében a kontroll minták kettő denaturációs átmenetet mutattak: T_m=52,8 °C a miozinfej, míg az 58,1 °C-os és az 59,9 °C-os átmenetek a miozinvég és az aktin izomfehérjék értékei (9. ábra B). Együttes kalorimetriás entalpiájuk 0,59 J/g volt (4. táblázat). Egy órás meleg ischaemia hatására a fő denaturációs csúcs egy keskenyebb félszélességgel áttolódott a konvencionális aktin denaturációs tartományába (62 °C). Ez arra utal, hogy az aktomiozin-komplexben a miozinvég nem tud felolvadni, ami sokkal jelentősebb szerkezeti változást bizonyít alacsonyabb entalpiaváltozással (ΔH=1,4 J/g). Három órás meleg ischaemia az izomrétegben T_m emelkedést és a kalorimetriás entalpia csökkenését okozta. Az izomkomponensek DSC görbéinél jól látható, hogy 6 órás ischaemia hatására a T_m 52 °C és 59 °C volt, míg az entalpia extrém módon 3,1 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 °C). Ebben az esetben az aktin- és a miozinkomponensek sokkal jobban külön váltak a megnövekedett olvadási hőmérsékleten (50,5 °C; 60,2 °C). Továbbá maga a miozinszál sem különült el az aktin termikus denaturációjától. A 3 órás meleg ischaemia hatása kifejezett volt a mucosában (9. ábra C). Az izomfehérjék tekintetében a 3 órás meleg ischaemia egy fő átmeneti hőmérsékletet mutatott (T_m=59,8 °C) (4. táblázat). Míg a 6 órás meleg ischaemia a teljes bélfalban a legnagyobb kalorimetrikus entalpiát eredmenyezte az aktomiozin-komplex tekintetében.



9. ábra. A mucosa (A), az izomréteg (B) és a teljes bélfal (C) szerkezeti változásainak DSC görbéi 1, 3 és 6 órás meleg ischémiát követően.
A görbék felfelé történő kitérése exoterm, lefelé való elmozdulása endoterm folyamatokat jelez.

4. táblázat. A mucosa, az izom és a teljes bélfal thermoanalitikai eredményei 1, 3 és 6 órás meleg ischaemia után

	Mucosa		Simaizom réteg		Teljes bélfal	
Csoport	T_m (°C)	ΔH (J/g)	T_m (°C)	ΔH (J/g)	T_m (°C)	ΔH (J/g)
Kontroll	55,6±0,2	-4,1±0,22	50±0,2 59,9±0,2	0,4±0,2 0,58±0,2	17,5±0,2 50±0,2	0,46±0,2 0,45±0,2
1 órás meleg ischaemia	55,6±0,4	-3,41±0,3	49,5±0,5 61,5±0,5	1,4±0,2	23±0,4 50,5±0,4 60,2±0,4	1,1±0,02 0,28±0,02
3 órás meleg ischaemia	48,7±0,3	-1,7±0,2	61,7±0,4	0,8±0,02	59,8±0,3	0,28±0,02
6 órás meleg ischaemia	41,1±0,2 46,3±0,2	-5,2±0,3	52±0,5 59±0,5	3,1±0,02	58±0,3	0,58±0,03

Átmeneti hőmérséklet: T_m (°C); kalorimetriás entalpia: ΔH (J/g); átlag±SE

Egy órás hideg ischaemia hatására a mucosában alacsonyabb hőmérsékleten is látható denaturáció (T_m=30,4±0,2 °C) magasabb tartományba mozdult el az eredeti átmeneti hőmérséklet (T_m=59,3±0,2 °C) és a teljes kalorimetriás entalpiaváltozás −5,94±0,4 J/g volt (10. ábra A). Ezzel szemben a 3 óras 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 (5. táblázat).

A hideg ischaemia a vékonybél simaizomrétegében kisebb mértékű struktúrális változást okozott (T_m=53,5 °C, 56 °C; ΔH=2,21 J/g), mint az azonos idejű meleg ischaemiás mintákban (ΔH=1,4 J/g) (10. ábra B). Az 1 órás hideg konzerválás is okozott struktúralis 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; ΔH=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.

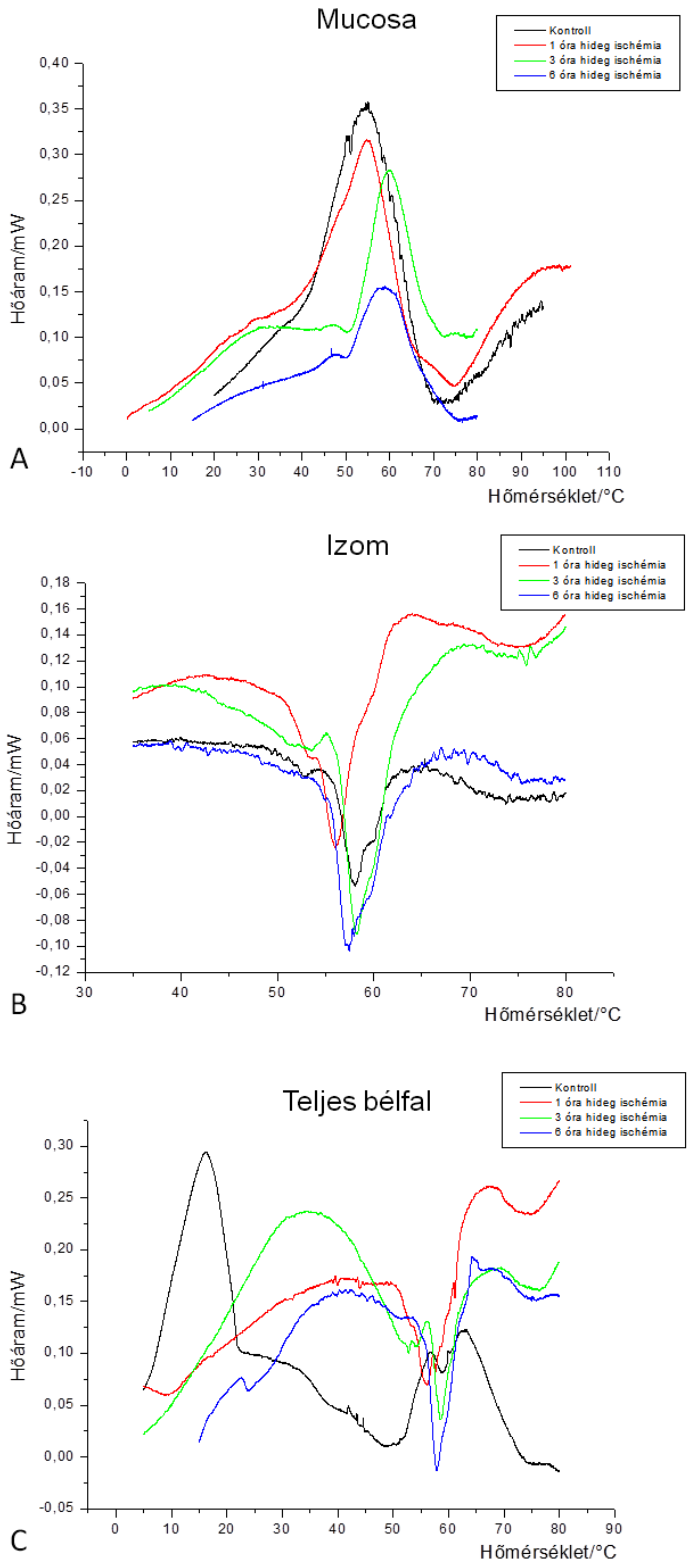
A teljes bélfal hideg ischaemiás vizsgálata során is jól látható a bélfal szerkezeti összetettségéből adódó jelentős variabilitás (10. ábra C). Egy órás hideg ischaemia kettő termikus átmenetet (T_m=53,5 °C, 56 °C) eredményezett. A 3 órás konzerválás hatása

kifejezett a mucosában, ami a görbén is markánsan megjelenik. Az izomfehérjék tekintetében a 3 órás hideg konzerválás okozta a legnagyobb struktúrális változásokat 3 termikus átmenettel (T_m=53 °C, 55 °C, 59,6 °C) (5. táblázat). Mindezek mellett a 6 órás konzerválás hatással volt a mucosa kalorimetriás megjelenésére és jelentős változást okozott az aktin/miozin megjelenésében is.

5. táblázat. A mucosa, az izom és a teljes bélfal DSC eredményei 1, 3 és 6 órás konzerválás után

	Mucosa		Simaizom réteg		Teljes bélfal	
Csoport	T_m (°C)	ΔH (J/g)	T_m (°C)	ΔH (J/g)	T_m (°C)	ΔH (J/g)
Kontroll	55,6±0,2	-4,1±0,22	50±0,2 59,9±0,2	0,4±0,2 0,58±0,2	17,5±0,2 50±0,2	0,46±0,2 0,45±0,2
1 órás hideg ischaemia	30,4±0,2 59,3±0,2	-5,94±0,4	53,5±0,2 56±0,2	2,21±0,2	56±0,2	0,38±0,02
3 órás hideg ischaemia	32,6±0,2 59,7±0,2	-2,67±0,2	53,6±0,2 58,3±0,2	3,4±0,1	53±0,2 55±0,2 59,6±0,2	0,764±0,1
6 órás hideg ischaemia	47,9±0,2 58,8±0,2	-1,96±0,2	53,6±0,2 57,9±0,2	3,8±0,1	41±0,2 57,9±0,2 58,6±0,2	0,4±0,02

Átmeneti hőmérséklet: T_m (°C); kalorimetriás entalpia: ΔH (J/g); átlag±SE



10. ábra. A mucosa (A), az izomréteg (B) és a teljes bélfal (C) szerkezeti változásainak DSC görbéi 1, 3 és 6 órás hideg konzerválást követő reperfúziós mintában. *A görbék felfelé történő kitérése exoterm, lefelé való elmozdulása endoterm folyamatokat jelez.*

2.5. Megbeszélés

A vékonybél meleg és hideg I/R-ós károsodásával kapcsolatos kutatások több évtizedes múltra tekintenek vissza, melyek az első kísérletsorozatban kapott eredményeink számára jó összehasonlítási alapot adtak. Meleg I/R-ós vizsgálataink biokémiai eredményei szerint az ischaemiás idő növelésével arányos oxidatív károsodás lépett fel a reperfundált bélszövetben. 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 sejtkárosodást. Méréseink jelentőségét az adja, hogy meleg ischémiát 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 (plazma és hemolizátum MDA szintjének), mind a lokális membránkárososdást jelző szöveti MDA koncentráció emelkedését. Az MDA koncentráció mind a bélnyálkahártyában, mind pedig a plazmában 3-4-szeresre növekedett a korai (5 perces) reperfúzió során és kb. a reperfúzió harmadik órájára éri el a maximumát [70, 71]. 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 [72]. Slavikova ezt 45 perces, Beuk 60 perces, Park 90 perces, míg Schweizer 2 órás időintervallumban határozta meg a kritikus meleg ischaemiás periódust [37, 58, 59, 73, 74].

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 ischémiát követő 30 perces reperfúziós mintákban [75]. Az ischaemiás idő növekedésével arányos GSH szint csökkenésről számolt be több korábbi kutatás is [76, 77]. Az endogén antioxidáns SOD szöveti aktivitása mindhárom csoportban szignifikánsan csökkent. Hasonló drámai csökkenésről számolt be több állatmodellen végzett vizsgálat is [43, 78]. Ennek oka, hogy a reperfúzió 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 [79].

Kísérleti eredményeink szerint az azonos idejű meleg ischémiával 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 az egyes csoportokban. A bél 3 órás konzerválás során kb. akkora lipidperoxidációs károsodást szenvedett el, mint 1 órás meleg ischaemia után. Sőt a 6 órás ischémiát követő reperfúziós 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 [80].

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 számértékileg 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 [81]. 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 [28, 82]. Vizsgálatainkban a szöveti szerkezetben bekövetkező változásokat Park-féle kvalitatív és Scion Image Software alkalmazásával kvantitatív módon határoztuk meg. Egy órás meleg ischémiát követő reperfúzió 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 struktúrális 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 reperfúzió 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 [83, 84]. 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-hetekig 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 [60].

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 struktúrális 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 mucosarétege megőrizte „normál fiziologiás szerkezetét” összehasonlítva mind a kontroll-, mind az azonos időtartamú meleg ischaemiás mintákkal. A változások legszembetűnőbben 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 [60, 85, 86].

Fiziológiás körülmények között a mucosasejtek megújulási ideje kb. 3-4 nap, majd apoptózis útján elhalnak, és helyükre a bazal membrán felől új mucosa termelődik [87]. Az irodalomban számos meleg ischaemiás modellt írtak le, ahol a kvalitatív skálák alapján a meleg ischaemiás toleranciaidő 15 és 90 perc között változik [60, 85, 86]. Nincs konszenzus a hideg konzerválás idejére vonatkozóan sem, a vékonybelet minél előbb, de 6-8 órán belül javasolják átültetni [82, 88, 89]. Jelen kalorimetriás adatok jelzik, hogy súlyos mucosakárosodás 3 órás meleg ischaemia és 6 óras hideg konzerválás után következik be.

Korábbi vizsgálataink alapján az izomréteg vastagsága enyhe csökkenést mutatott mind meleg, mind hideg ischemia következtében, de szignifikáns eltérést nem találtunk [83, 84]. Számos vizsgálat megerősítette, hogy az izomrétegben rutin hisztológiai módszerrel nem látható szignifikáns eltérés [16, 19, 82, 89]. 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 kevesbé 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 katalikus centrumát. E modifikáció függ az időtől, a koncentrációtól és az OFRs kémiai szerkezetétől. Másrészt az oxidatív stressz szétkapcsolja az ATP hidrolízist. Ezáltal az ischaemia struktúrális 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 struktúrális károsodást. Legjelentősebb változás az aktomiozin-komplex interakciójában figyelhető meg. Jelenleg nincs az irodalomban hasonló DSC vizsgálat bélischaemiás modellben. A simaizomszövetben mért patofiziológiás 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 [90-92]. E funkcionális zavarok hátterében ismert folyamatok állnak: a makromolekulákban bekövetkező oxidatív károsodás, a sejtek kálciumegyensúlyának zavara, illetve a gyulladásos kaszkádok aktivációja [93, 94].

A teljes bélfal termikus viselkedése nagyfokú változatosságot mutatott, ami alapvetően a vékonybél réteges felépítéséből adódik. De a korábban említett szeparált mucosa- és simaizommérések termikus karakterisztikéja 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 struktúrális 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 posztkondícionálása

3.1. Bevezetés

Az I/R károsodásokkal szembeni cytoprotekció intenzív kutatásainak eredményeképpen 1986-ban Murry fogalmazta meg az ischaemiás prekondícionálás (IPC) koncepcióját [95]. 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 [19, 96,]. 2003-ban Vinten-Johansen és munkacsoportja bevezetette az ischaemiás posztkondícionálás (IPO) teóriáját [97]. Ennek során a reperfúzió elején több, néhány másodperces I/R-s ciklusokat alkalmazva, un. frakcionált reperfúzióval engedik az ischaemiás területre a vért, mellyel csökken a reperfúziós károsodások mértéke. A véráramlás hirtelen, teljes visszaállítása ugyanis a sejtek kálciumtúltölődését, oxidatív stresszt, gyors pH-neutralizációt okoz, melyek szerepet játszanak a mitokondriumok csatornáinak megnyitásában, ami ATP-deplécióhoz és végül a sejt halálához vezet.

IPO hatására fenntarthatóbb a sejt kálcium-homeosztázisa, védelmet ad a súlyos intracelluláris oxidatív stresszel szemben, szerepe van a késleltetett pH-korrekcióban és a mitokondriumok védelmében, mely a sejt struktúrális 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 [98]. Az IPC felhasználhatósága – protektív hatása ellenére – korlátozott, mert a meglévő ischémiánál 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 posztkondícionálás 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, Σn = 16) végeztük. A műtét előtt 24 óráig csak cukros vizet fogyaszthattak. Az állatokat im. adott azaperon (Stresnil, 0,4 mg/ttkg, Jannsen Animal Health, Belgium) premedikáció és thiopenthal (0,1 mg/ttkg, Biochemie Gmb, Austria) anesztézia bevezetése után isofluran és N_2O 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 ischémiát 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, tovafutó 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 ischémiával 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 (6. táblázat).

6. táblázat. IPO-val vagy anélkül végzett meleg és hideg I/R-ós műtéti protokollok

Csoport	Beavatkozás
S	Anesztézia és median laparotomia
A1	1 óra meleg ischaemia + 3 óra reperfúzió
A2	3 óra meleg ischaemia + 3 óra reperfúzió
A3	6 óra meleg ischaemia + 3 óra reperfúzió
A4	1 óra meleg ischaemia + IPO + 3 óra reperfúzió
A5	3 óra meleg ischaemia + IPO + 3 óra reperfúzió
A6	6 óra meleg ischaemia + IPO + 3 óra reperfúzió
B1	1 óra hideg konzerválás + 3 óra reperfúzió
B2	3 óra hideg konzerválás + 3 óra reperfúzió
B3	6 óra hideg konzerválás + 3 óra reperfúzió
B4	1 óra hideg konzerválás + IPO + 3 óra reperfúzió
B5	3 óra hideg konzerválás + IPO + 3 óra reperfúzió
B6	6 óra hideg konzerválás + IPO + 3 óra reperfúzió

3.3.2. Biokémiai vizsgálatok

A 2.3.2. pontban leírtak szerint szövethomogenizátumból gyári kittek segítségével, spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg az MDA és GSH koncentrációját és a SOD aktivitását.

3.3.3. Morfológiai vizsgálatok

A bélmintákat a 2.3.3. pontban leírtak szerint készítettük elő a szövettani vizsgálatokhoz. A mucosa, a submucosa és az izomréteg vastagságát, valamint a kripták mélységét egyrészt kvalitatív módon, a Park-féle hisztológiai stádiumbeosztás alapján (2. táblázat), másrészt kvantitatív módon Scion Image Software segítségével határoztuk meg.

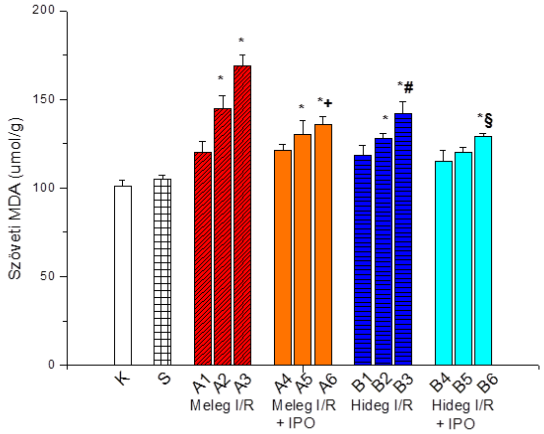
3.3.4. Statisztikai analízis

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.

3.4. Eredmények

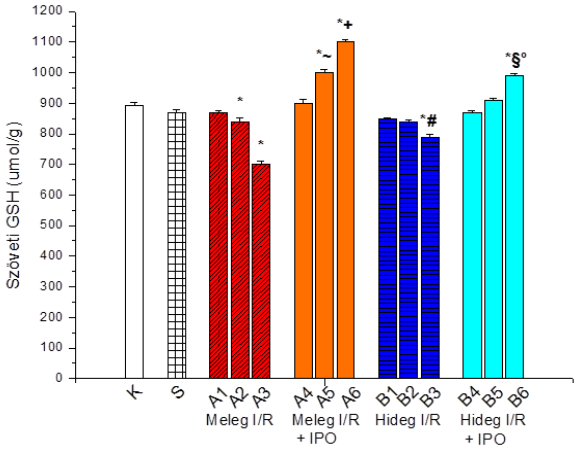
3.4.1. Biokémiai vizsgálatok eredményei

A szöveti MDA koncentrációja valamennyi csoportban emelkedett meleg ischaemia hatására. Az emelkedést a 3 és 6 órás ischémiát követő reperfúziós mintáknál szignifikánsnak találtuk (A2 és A3 vs. K; $p<0,05$). A posztkondícionált szövetnél is emelkedett a lipidperoxidáció mértéke a kontroll mintákhoz képest, de értékét tekintve alacsonyabb maradt (A4 es A5 vs. K; $p<0,05$). Ez az emelkedés a 6 órás csoportok között szignifikánsan alacsonyabb volt a nem posztkondícionálthoz 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 ischémiához képest (B3 vs. A3; $p<0,05$). A 6 óráig konzervált és posztkondícionált bélnél szignifikánsan alacsonyabb volt az MDA koncentráció (B6 vs. B3; $p<0,05$) (11. ábra).



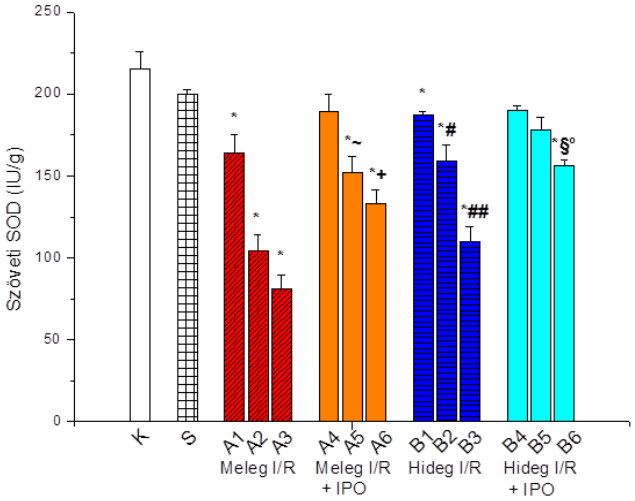
11. ábra. A szöveti MDA koncentrációjának változása IPO-val vagy anélkül végzett meleg I/R és hideg konzerválást követő autotranszplantációs csoportokban. *A kísérleti csoportokat a 6. táblázat mutatja be. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; +p<0,05 vs. A3; #p<0,05 vs. A3; §p<0,05 vs. B3)*

A szöveti GSH koncentrációja szignifikánsan csökkent a 3 és 6 órás meleg ischémiát követő reperfúziós mintákban (A2 és A3 vs. K; p<0,05). Ezzel szemben az IPO csoportokban mind a kontroll, mint a posztkondícionálás 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) (12. ábra).



12. ábra. Az ischaemiás posztkondícionálás hatása a szöveti GSH szintjének változására meleg és hideg ischémiát követő reperfúziós bélmintákban. *A vizsgált csoportokat a 6. táblázat mutatja be. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; ~p<0,05 vs. A2; +p<0,05 vs. A3; #p<0,05 vs. A3; §p<0,05 vs. B3; °p<0,05 vs. A6)*

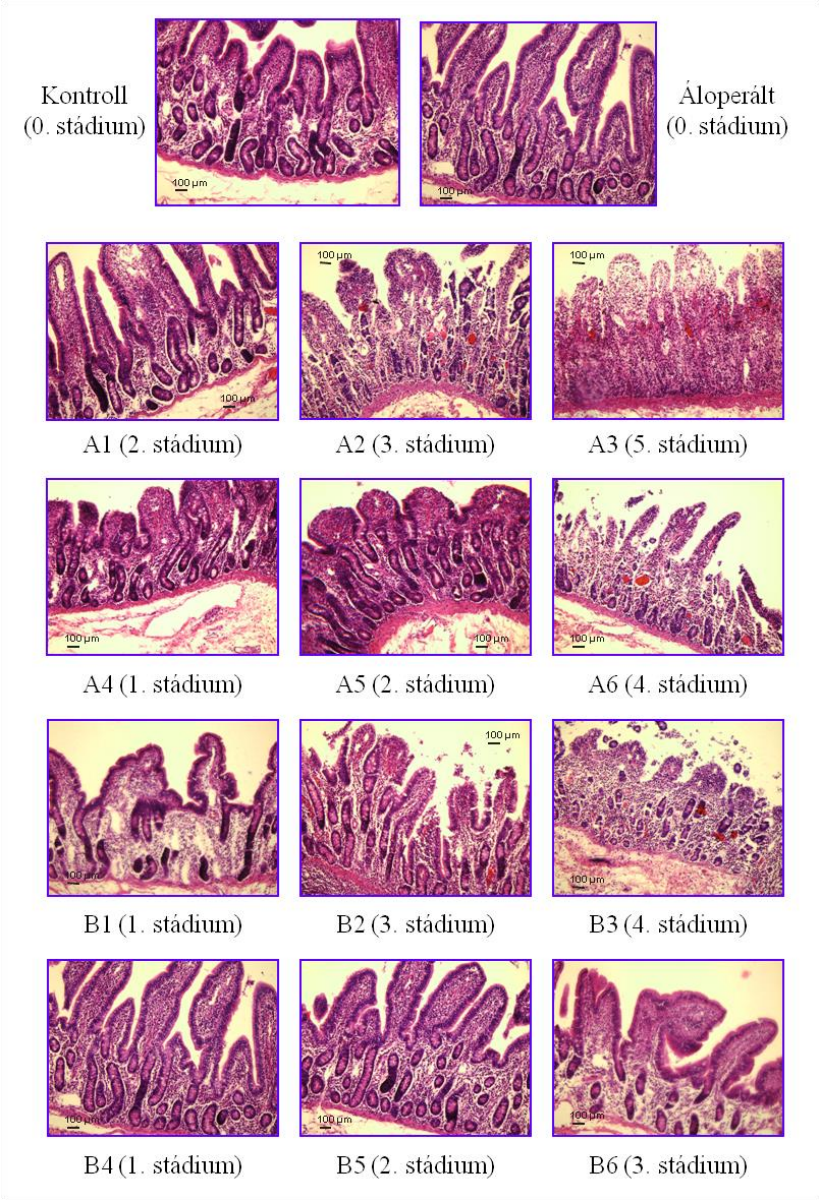
A SOD aktivitása jelentősen csökkent valamennyi meleg ischaemiás csoportban (A1 és A2 és A3 vs. K; p<0,05). Posztkondícionálás hatására a kontroll szinthez képest alacsonyabb volt az aktivitása, de szignifikánsan jobban megőrződött a nem posztkondícionálthoz képest (A5 és A6 vs. K; A5 vs. A2; A6 vs. A3; p<0,05). Konzerválás hatására csökkent a SOD aktivitása, de a 3 és 6 órás csoportokban 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 hideg konzerválást követő reperfúziós mintákban (B6 vs. K és B3 és A6; p<0,05) (13. ábra).



13. ábra. A szöveti SOD aktivitásának változása IPO hatására meleg ischémiát és hideg konzerválást követő reperfúziós bélmintákban. *A vizsgált csoportokat a 6. táblázat mutatja be. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; ~p<0,05 vs. A2; +p<0,05 vs. A3; #p<0,05 vs. A2; ##p<0,05 vs. A3; §p<0,05 vs. B3; °p<0,05 vs. A6)*

3.4.2. Szövettani vizsgálatok eredménye

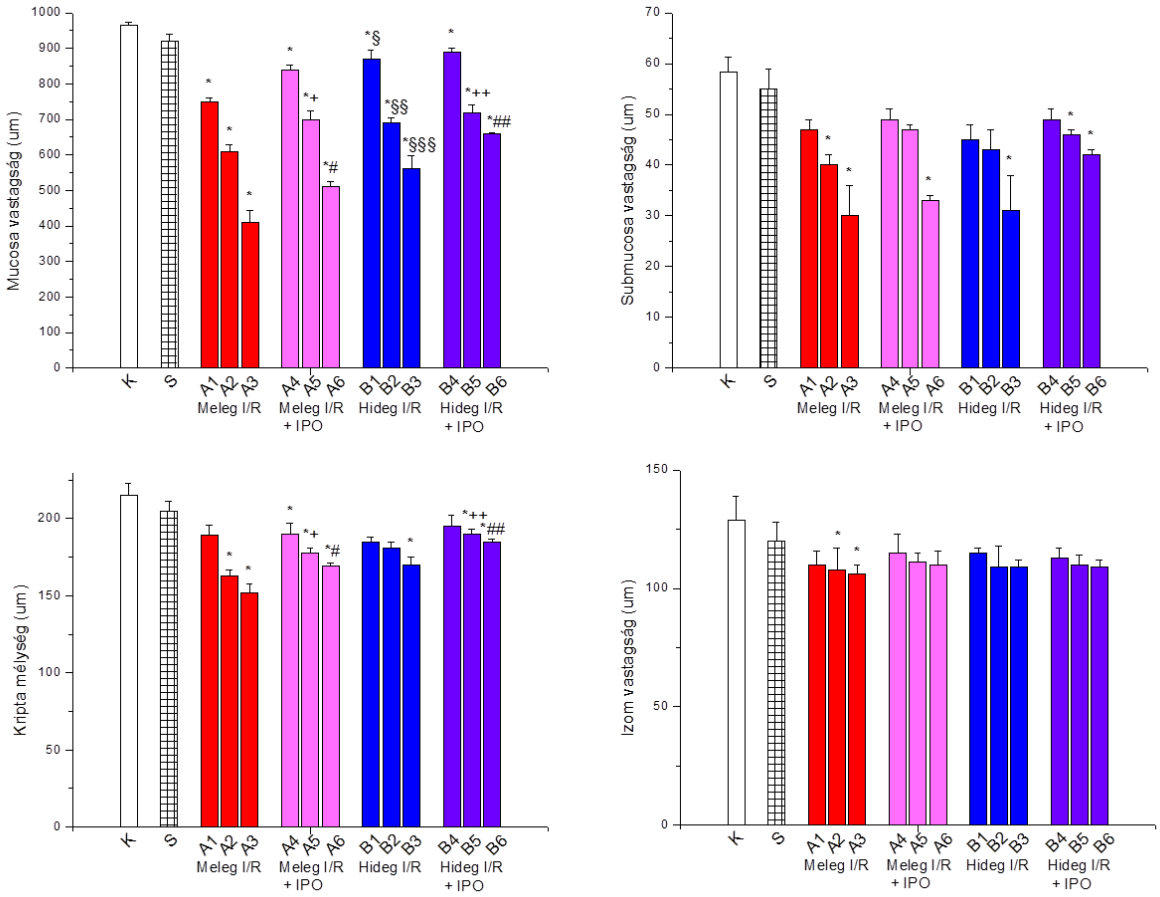
A Park-féle klasszifikáció szerint a kontroll- és áloperált csoportban normál szöveti struktúra látható (0. stádium) (14. ábra). Egy órás meleg ischémiát követő reperfúzió végén a villusok kismértékű leválását tapasztaltuk (2. stádium), míg 3 órás ischaemia már jelentős epithel-leválást okozott (3. stádium). 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.



14. ábra. Az ischaemiás posztkondícionálás hatása a szöveti szerkezetre a Park-féle klasszifikáció alapján. *A Park-féle stádiumbeosztást a 2. táblázat, a vizsgálati csoportokat a 6. táblázat mutatja be. (Fénymikroszkópos vizsgálat H&E festett metszeteken, 100-szoros nagyítás)*

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; $p<0,05$) (15. ábra). Az IPO csoportokban is látható csökkenés az említett rétegekben, de a nem posztkondícionált csoportokhoz képest szignifikánsan nagyobb volt a a mucosa vastagsága a reperfúziós végére (A5 vs. A2; A6 vs. A3; $p<0,05$). A hideg ischaemia mérsékelte a struktúrális károsodást a submucosa, az izomréteg és a kripták tekintetében. A mucosa itt is károsodott, de a meleg ischémiához 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.



15. ábra. Az IPO hatásának vizsgálata a vékonybél szöveti struktúrájára Scion Image kvantitatív módszerrel. *A: Mucosa vastagság, B: Submucosa vastagság, C: Kripta mélység, D: Izom vastagság. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; +p<0,05 vs. A2; #p<0,05 vs. A3; §p<0,05 vs. A1; §§p<0,05 vs. A2; §§§p<0,05 vs. A3; ++p<0,05 vs. B2; ##p<0,05 vs. B3)*

3.5. Megbeszélés

Intenzív kutatások ellenére a vékonybél I/R-s károsodásának kivédése napjainkban sem tekinthető rutin eljárásnak a klinikumban [99, 100]. Kísérleteinkben akut mesenteriális 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 [101]. 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 óras leszorításával, 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 [76]. Ezzel szemben Nakamura a szöveti GSH-koncentráció csökkenését írta le az ischaemia alatt, mely a reperfúzió során tovább csökkent [102]. Sola eredményei szerint a GSH tartalom lefeleződött 90 perces bélischaemia után [75]. 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 talánt Chen és kutatócsoportja, mely jelezte az endogén védelmi rendszer aktivációját [103]. Továbbá a meleg ischaemia az idő függvényében szignifikánsan csökkentette a szöveti SOD aktivitását. Az SOD aktivitásának drámai csökkenéséről számolt be Kacmaz és Karashima is [43, 78]. 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 gyulladásos folyamatok, többek között a PMN leukocyták aktiválódásának mérséklődésével [98]. 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 [104]. 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 gyulladásos válasz és a PMN leukocyták szöveti akkumulációja, valamint csökkent a tumor nekrózis 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 tényt, hogy a későn (reperfúzió utáni 3. percben) kivitelezett IPO hatástalan, ugyanis akkor a SOD aktivitása már nem őrződik meg, és nem csökkenti a szöveti lipidperoxidáció [98]. Emellett az IPO-t hatástalannak írták le 4 ciklusban alkalmazott, ciklusonként 30 másodperc ischémiából és 30 másodperc reperfúzióból álló protokollnál [105]. Az ellentmondó eredmények származhatnak az eltérő ischaemiás időkből és az eltérő IPO protokollokból egyaránt.

Hideg ischaemiás kísérletsorozatunkban 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 posztkondícionált 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 posztkondícionált csoportokban enyhébb fokú volt a károsodás mértéke, melyből kiemelendő a kripták jobb megőrzöttsége a reperfúzió végére. Eredményeink megfelelnek az irodalomban leírtaknak [106]. 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 vizsgálatai során kimutattuk, hogy az ischaemiás idő előrehaladtával arányosan nőtt a károsodás mértéke, de ez mérsékeltebb volt, mint a meleg ischaemia okozta károsodás. A meleg ischémiához 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 károsodás mértékét. 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 [107-109].

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 (hideg ischaemia) és a reperfúzió mind rövid, mind hosszú távon káros hatású, növeli az akut kilökődések számát, vagy krónikus allograft funkciózavart okoz [110]. 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 [52, 111]. Folyamatos kutatások folynak a forgalomban lévő oldatok módosítása (új összetevők, magasabb energia -és tápanyagtartalom), illetve új oldatok kifejlesztése terén [53, 107, 112, 113].

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 [114]. A szekretin/glukagon/vazoaktív intestinalis polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja [115]. A polipeptidnek két formája van, a 38 aminosavat tartalmazó PACAP-38 és a 27 aminosavból álló PACAP-27 [116]. Szerkezete 67 %-ban megegyezik VIP struktúrájával, 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 sejttestekben és az idegvégződésekben mutatható ki, főként a jejunum és az ileum területén [117]. Fokozott affinitással kötődnek a PAC1 és a VIP-el (vazoaktív intestinal peptid) közös VPAC1 és VPAC2 receptorokhoz [116, 117]. Mindhárom receptoruk megtalálható a mucosában, a myentericus neuronokban, neuroendokrin és érendothel sejteken, valamint a simaizomsejteken [118, 119].

A PACAP-38 anti-apoptotikus, anti-inflammatórikus és antioxidáns protektív hatása számos in vitro és in vivo kísérletben igazolódott [120-123]. Pontosan még nem tisztázott, hogy milyen mechanizmusokon keresztül hat, de az igen, hogy a bélszöveti I/R-s károsodás a béltraktusban citokin felszabadulást eredményez [124]. Számos gyulladásos modellben leírták, hogy a PACAP anti-inflammatórikus hatása részben a citokinek és kemokinek termelődésének gátlása révén érvényesül [123, 125-127].

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 PACAP-38 vad típusú egereknél milyen mértékű szöveti oxidatív károsodás lép fel és hogyan változott a bél szöveti szerkezete?
3. Vékonybél autotranszplantáció során PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő konzerválást követően milyen mértékű szöveti oxidatív károsodás lép fel?
4. PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő konzerválást követően hogyan változik a konzervált bélszövetben a PACAP-38 és a PACAP-27 immunreaktivitása?
5. Milyen mértékű lesz PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő prezerváció után 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; Σn=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; Σn=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, Budapest, Magyarország). A vizsgálatokat a PTE MÁB engedélye (BA02/2000-9/2008) szerint végeztük.

A kísérleti csoportokat a 7. táblázat foglalja össze. Az I. kísérletben meleg ischaemiás csoportokban median laparotomiát követően felkerestük az a. mesenterica superior-t, melyet kipreparáltunk és atraumatikus klipp felhelyezésével 1 órás (A1. csoport), 3 órás (A2. csoport) és 6 órás (A3. csoport) teljes ischémiát hoztunk létre. A klipek eltávolítása után 3 órás reperfúziót kezdtünk.

A II. kísérletben hideg ischaemiás csoportokat hoztunk létre. Laparotomia után a vékonybelet a Treitz-szalagtól az ileocoecalis 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. csoport, KO.B2. csoport) és 6 órán (PVB3. csoport, KO.B3. csoport) keresztül.

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). Bélanasztomózist nem készítettünk. A reperfúziót minden csoportban 3 órán át tartottuk fenn. Valamennyi csoportnál a szövetmintákat a laparotómia után (kontroll, K) és a reperfúzió végén vettük. Az „S" (Sham) csoportba a csak median laparotomián átesett, áloperált állatok kerültek. Ezekből az állatokból a laparotomia után (K) és az ischaemiás csoportok biopsziáival analóg időben vettünk szövetmintákat.

7. táblázat. PACAP hatásának kimutatásához létrehozott meleg és hideg I/R-ós csoportok műtéti és mérési protokollja

Kísérlet	Modellállat	Csoport	Beavatkozás	Mérés a kísérleti csoportban
		S	Anesztézia és median laparotómia	
I.	patkány	A1	1 óra meleg ischaemia + 3 óra reperfúzió	
		A2	3 óra meleg ischaemia + 3 óra reperfúzió	RIA
		A3	6 óra meleg ischaemia + 3 óra reperfúzió	
II.	PACAP vad egér (PV)	PVB1	1 óra hideg UW konzerválás + 3 óra reperfúzió	
		PVB2	3 óra hideg UW konzerválás + 3 óra reperfúzió	Biokémia: MDA, GSH, SOD
		PVB3	6 óra hideg UW konzerválás + 3 óra reperfúzió	Szövettan:
	PACAP KO egér (KO)	KO.B1	1 óra hideg UW konzerválás + 3 óra reperfúzió	- Park-féle klasszifikáció
		KO.B2	3 óra hideg UW konzerválás + 3 óra reperfúzió	- Scion Image Software
		KO.B3	6 óra hideg UW konzerválás + 3 óra reperfúzió	
III.	patkány	B1	1 óra hideg UW konzerválás + 3 óra reperfúzió	
		B2	3 óra hideg UW konzerválás + 3 óra reperfúzió	RIA
		B3	6 óra hideg UW konzerválás + 3 óra reperfúzió	Szöveti citokin aktivitás:
		PB4	1 óra hideg UW+PACAP-38 konzerválás + 3 óra reperfúzió	- Citokin Array
		PB5	3 óra hideg UW+PACAP-38 konzerválás + 3 óra reperfúzió	- Luminex Multiplex Immunassay
		PB6	6 óra hideg UW+PACAP-38 konzerválás + 3 óra reperfúzió	

4.3.2. Biokémiai vizsgálatok

A 2.3.2. pontban leírtak szerint szövethomogenizátumból gyári kittek segítségével, spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg az MDA és GSH koncentrációját és a SOD aktivitását.

4.3.3. Morfológiai vizsgálatok

A bélmintákat a 2.3.3. pontban leírtak szerint készítettük elő a szövettani vizsgálatokhoz. A mucosa, a submucosa és az izomréteg vastagságát, valamint a kripták mélységét egyrészt kvalitatív módon, a Park-féle hisztológiai stádiumbeosztás alapján (2. táblázat), másrészt kvantitatív módon Scion Image Software segítségével határoztuk meg.

4.3.4. PACAP-38 és PACAP-27 mérése radioimmunassay (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, ahogy azt korábban leírtuk [128]. A PACAP-38 antiszérumát 88111-3-mal, a PACAP-27 antiszérumát 88123-mal rövidítettük. Jelölt anyagként 125-ös jód izotóppal jelölt juhból származó PACAP24-38-at és PACAP-27-et használtunk (csövenként 5000 cpm). A standardjaink juhból származó PACAP-38 és PACAP-27 voltak (0-1000 fmol/ml). A vizsgálatot 0,1 M NaCl-ot, 0,05 % nátrium-azidot és 0,25 % marha szérum albumint tartalmazó 7,4-es pH-jú 0,05 M-os 1 ml térfogatú foszfát-pufferben végeztük. A vizsgálati elegy 100 µl antiszérumot (a 88111-3 jelűből 1:10 000 hígítást és a 88123 jelűből 1:45000 hígítást), 100 µl jelölt anyagot és 100 µl standardot vagy ismeretlen mintát tartalmazó polipropilén csövekbe került. 48-72 órát követő 4 °C-on történő inkubáció után az (antiszérumból származó) antitesteket megkötő peptideket 100 µl szeparáló oldat segítségével elkülönítettük azoktól a peptidektől, amelyek nem kötöttek antitestet. A szeparáló oldat összetétele: 10 g aktív szén, 1 g dextrán és 0,2 g közönséges zsírmentes tejpor 100 ml desztillált vízben oldva. 4 °C-on 20 percig 3 000-es fordulaton való centrifugálást követően a cső tartalmának felülúszóját óvatosan elöntöttük (=dekantáltuk) és a csőben maradó csapadék 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 vizsgálatát a korábban leírtak szerint végeztük [126]. Röviden, a szöveti homogenizátum méréséhez patkány citokin kittet használtunk (Panel A Array kit, R&D Systems). A bélszövetet proteáz inhibítor 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 átlagot és standard errort számoltunk. Az adatokat ANOVA varianciaanalízissel dolgoztuk fel. A szignifikancia szintje $p<0,05$ volt. Az adatok kiértékeléshez a MicroCal Origin (6.0) programot (Microcal Software, USA) alkalmaztuk.

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 (8. táblázat). Legmagasabb értéket a PACAP-38 KO graftok 6 órás konzerválás utáni reperfúziós 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; $p<0,05$).

8. táblázat. Szöveti MDA, GSH és SOD értékének változása a II. kísérletben

	MDA	GSH	SOD
K	100±3,6	910±11,9	215±11
S	108±2,1	890±15	208±12
PACAP-38 vad típus			
PVB1	112±5,8	889±8,9	179±10
PVB2	117±6,9	849±10,7	150±5,1*
PVB3	120±1,7*	808±12,3*	125±8,1*
PACAP-38 KO			
KO.B1	120±3,5*	866±13,1*	140±11,4*
KO.B2	129±7,9*+	753±10,1*+	111±10,7*+
KO.B3	153±8,4*#	720±8,4*#	103±8,3*#

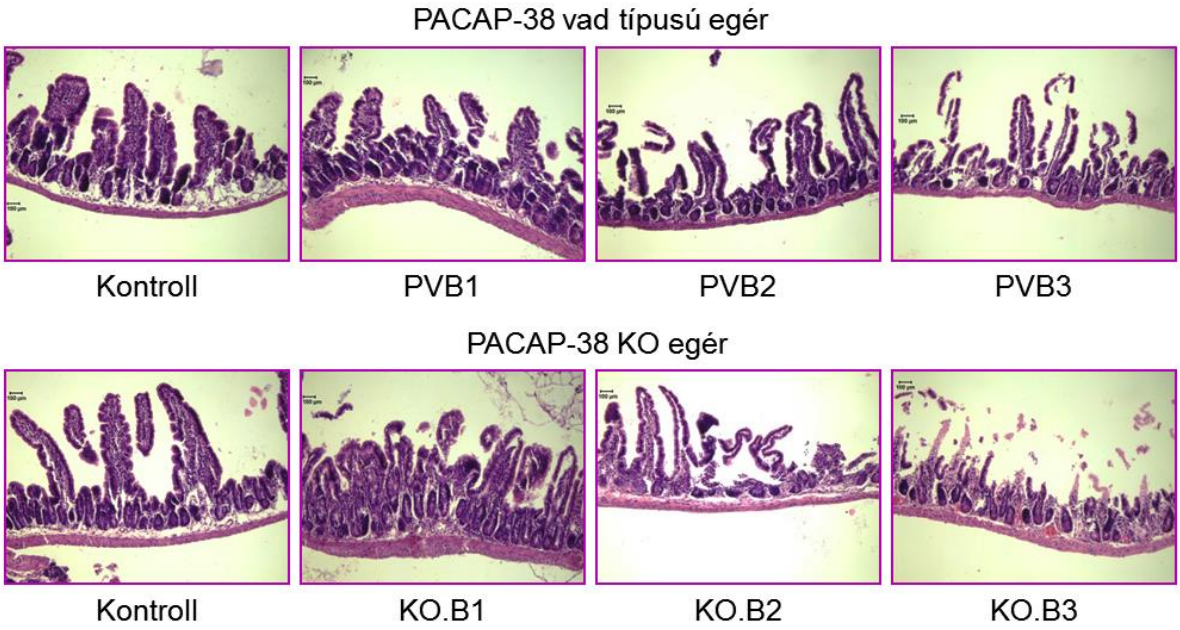
*Az eredmények μmol/g nedves szövet értékben vannak megadva. A vizsgálati csoportokat a 7. táblázat mutatja. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; +p<0,05 vs. PVB2; #p<0,05 vs. PVB3)*

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 (16. ábra). 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 fokozaú 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) (9. táblázat). 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 értékeinez képest (KO.B2., KO.B3. vs. PVB2 és PB.B3; p<0,05). Az izom vastagsága enyhe csökkenést mutatott, de ez nem volt szignifikáns egyik csoportnál sem.



16. ábra. UW oldatban történt konzerválás után a szöveti szerkezet változásainak vizsgálata Park-féle klasszifikációval. *A Park-féle stádiumbeosztást a 2. táblázat, a vizsgálati csoportokat a 7. táblázat mutatja be. (Fénymikroszkópos vizsgálat H&E festett metszeteken, 100-szoros nagyítás)*

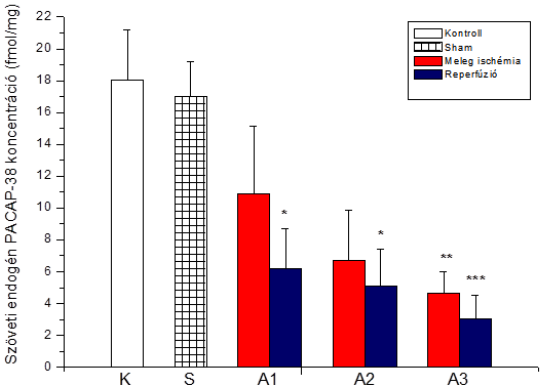
9. táblázat. A bélfal rétegeinek Scion Image Software-rel történt kvantitatív kiértékelése a II. kísérletben

	Mucosa vastagság	Submucosa vastagság	Kripta mélység	Izom vastagság
K	964±12	55±2.5	210±8	120±10
S	955±21	50±2,1	205±6	120±8
PACAP-38 vad típus				
PVB1	915±15	45±1,2	195±6	115±8
PVB2	810±25	42±2	182±9	110±9
PVB3	520±16*	35±1,6*	175±8*	108±8
PACAP-38 KO				
KO.B1	650±21*	40±2,1	170±7*	115±8
KO.B2	512±9*+	35±1*+	164±3*+	112±6
KO.B3	254±10*#	27±1*#	110±2*#	108±4

*Az eredmények μm értékben adtuk meg. A vizsgálati csoportokat a 7. táblázat mutatja be. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; +p<0,05 vs. PVB2; #p<0,05 vs. PVB3)*

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

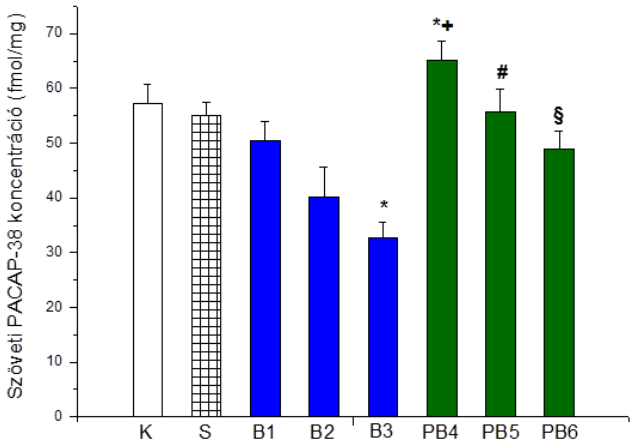
Az I. kísérletben a bélszövet endogén PACAP-38 immunreaktivitási szintjének változását mértük különböző időtartamú meleg ischaemia és azt követő reperfúzió során. Az endogén PACAP-38 immunreaktivitási szintje a reperfúziós mintáknál szignifikánsan csökkent minden csoportban (A1, A2 és A3 ischaemia vs. K; p<0,05). A 6 órás meleg ischaemiás csoportban már az ischaemia végi mintákban is szignifiánsan 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) (17. ábra).



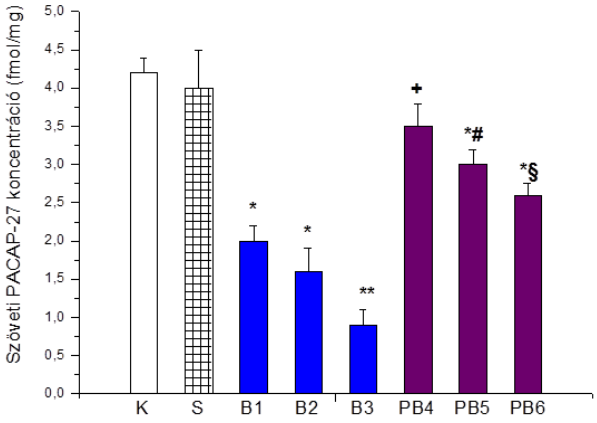
17. ábra. A bélszövet endogén PACAP-38 immunreaktivitásának változása meleg ischaemia és reperfúzió hatására. *A vizsgálati csoportokat a 7. táblázat mutatja be. Az eredményeket fmol/mg nedves szövet értékben adtuk meg. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; **p<0,01 vs. K;* ***p<0,001 *vs. K)*

A III. kísérletben a szöveti PACAP-38-szerű immunreaktivitás 57,32±3,5 fmol/mg volt a kontroll mintákban és 55,1±2,5 fmol/mg az áloperált csoportban (18. ábra). Ennek értéke 1 órás hideg konzerválást követően 50,4±3,5f mol/mg-ra (B1. csoport), 3 óra után 40,1±5,5 fmol/mg-ra csökkent (B2. csoport). Ez a változás a 6 órás konzerválás végére (B3. csoport: 32,6±3,0 fmol/mg; p<0,05) szignifikáns volt. PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő tárolást követően szignifikánsan magasabb szinteket mértünk a PB4 (65,2±3,4 fmol/mg), a PB5 (55,2±4,2 fmol/mg), és PB6 csoportban (48,9±3,2 fmol/mg).

A szöveti PACAP-27-szerű immunreaktivitás csökken a kontroll (4,2±0,2 fmol/mg) mintákhoz képest. Ezen csökkenés szignifikáns volt, mind az 1 órás (B1. csoport: 2±0,2 fmol/mg; p<0,05), mind a 3 órás (B2. csoport: 1,6±0,3 fmol/mg; p<0,05) és a 6 órás (B3. csoport: 0,9±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±0,3 fmol/mg; PB5. csoport: 3,0±0,2 fmol/mg; PB6. csoport: 2,6±0,15 fmol/mg; p<0,05) (19. ábra).



18. ábra. PACAP-38 immunreaktivitásának szintje autotranszplantált vékonybélben. *A vizsgálati csoportokat a 7. táblázat mutatja. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K; +p<0,05 vs. B1; #p<0,05 vs. B2; §p<0,05 vs. B3)*

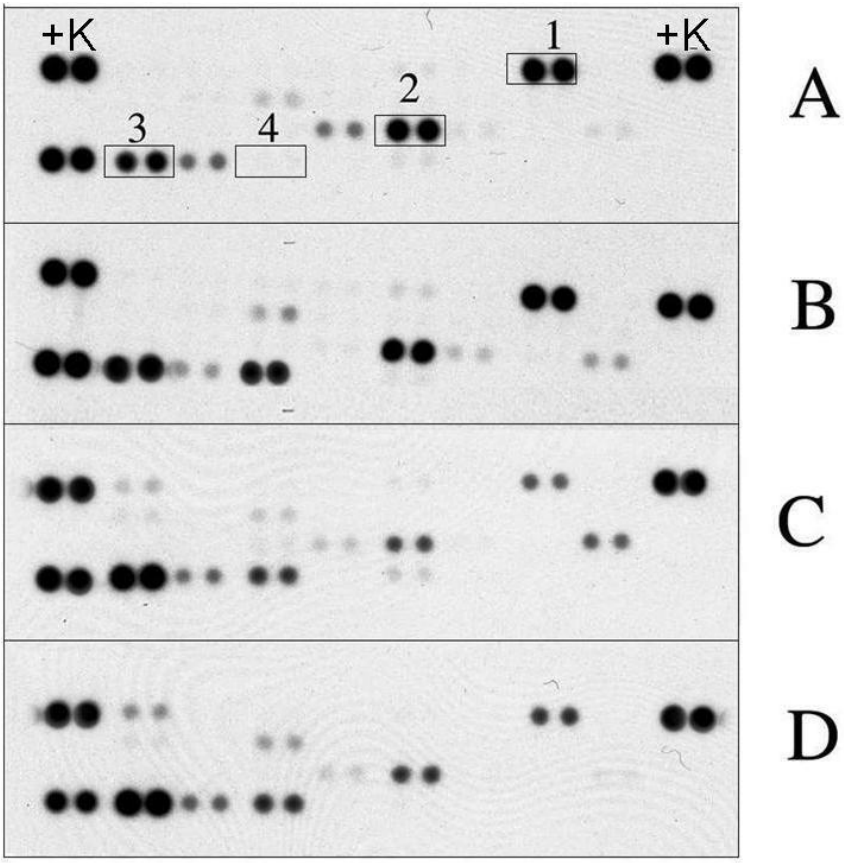


19. ábra. PACAP-27 immunreaktivitásának szintje autotranszplantált vékonybélben. *A vizsgálati csoportokat a 7. táblázat mutatja. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. K;* **p<0,01 vs. K; *+p<0,05 vs. B1; #p<0,05 vs. B2; §p<0,05 vs. B3)*

4.4.4. Citokin expresszió változása bélszövetben

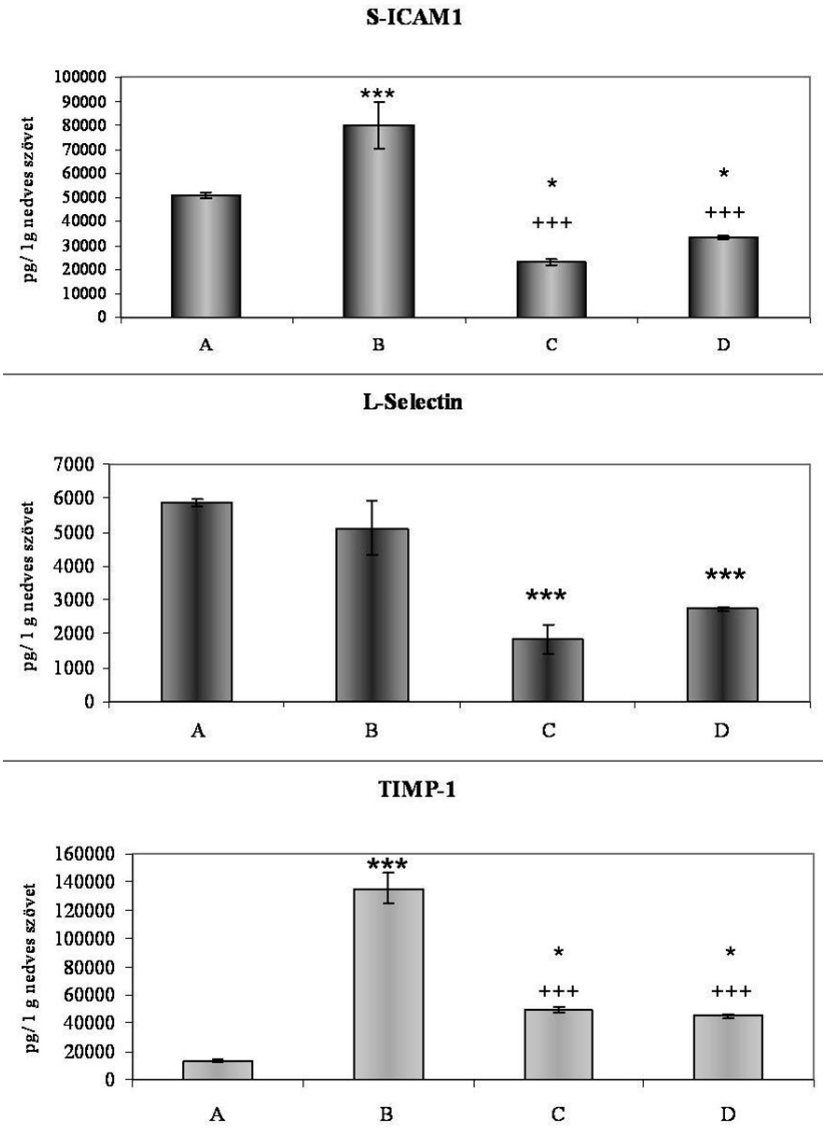
A kemiluminenscens vizsgálatok igazolták, hogy a citokinek közül az sICAM-1 (20. ábra, 1) és az L-Selectin (20. ábra, 2) normál aktivitása volt detektálható a kontroll bélszövetben. Expressziójuk nem változott 6 órás UW oldatban történő konzerválás és az azt követő reperfúziós periódus végére a B3. csoportban. Mind a 6 órás PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban történő konzerválás, mind az azt követő 3 órás reperfúzió jelentős citokin aktivitás csökkenést okozott a PB6 csoportban. A RANTES (CCL5) (20. ábra, 3) szintek minden csoportban megemelkedetek. A kontroll mintákban a TIMP-1 aktivitása (20. ábra, 4) nem volt mérhető. Jelentős aktivitást mértünk a 6 órás PACAP-38 nélküli UW

oldatban való konzerválást követően a B3. csoportban. A PACAP-38-t tartalmazó hideg konzerválás csökkentette ezen aktivitások szintjét a PB4. csoportban.



20. ábra. A bélszövet citokinexpressiójának vizsgálata kemilumineszcens módszerrel. *Különböző citokinek jelenléte látható a kontroll (A), 6 órás hideg UW oldatban történő konzerválás (B), 6 órás hideg konzerválás PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban (C) és az azt követő reperfúzió (D) során. Jelentős változás figyelhető meg az sICAM-1 (1), az L-szelektin (2) és a TIMP-1 (4) expressiójában. A RANTES szintek (3) minden csoportban emelkedettek voltak (+K: pozitív kontroll). A többi citokinnél (bal felső saroktól indulva: CINC-1, CINC-2alfa/béta, CINC-3, GM-CSF, IFN-gamma, IL-1alfa, IL-1béta, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IP-10, LIX, MIG, MIP-1alfa, TNF-alfa és VEGF) nem volt változás.*

Az előbbi méréseket a Luminex Immunoassay-el kapott eredmények is megerősítették (21. ábra). Az sICAM és az L-Selectin expressziója hasonló a kontroll (21. ábra A oszlop) és az ischaemiás csoportokban (21. ábra B oszlop), míg mindkét esetben szignifikáns csökkenés figyelhető meg a PACAP-38-al tárolt graftoknál (21. ábra C és D oszlopok). A TIMP-1 expressziója a kimutatási határon volt a kontroll mintákban (21. ábra A oszlop), és jelentős emelkedés volt hideg ischaemia után (21. ábra B oszlop). Az emelkedett TIMP-1 szinteket mérsékelte a PACAP-38-at tartalmazó konzerválás (21. ábra C és D oszlop).



21. ábra. A bélszövet citokin expressziójának vizsgálata immunassay módszerrel.
*Az sICAM-1, az L-Selectin és a TIMP-1 expressziójában bekövetkező változások láthatóak a kontroll (A), 6 órás hideg UW oldatban történő konzerválás (B), 6 órás hideg konzerválás PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban (C) és azt következő reperfúzió (D) alatt. (Átlag ± SE; *p<0,05 vs. A; ***p<0,01 vs. A; +++p<0,001 vs. B).*

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 struktúrális 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 immunreaktivitási szintjeinek változását, valamint a szervkonzerváláskor fellépő szöveti citokin expressziót.

PACAP-38 KO és vad típusú eregekben 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 fejti ki védő hatását a PACAP-38 hideg konzerválás és azt követő reperfúzió során. Számos vizsgálat megerősíti azonban azt a tényt, hogy a peptid antioxidáns, antiapoptotikus és anti-inflammatórikus tulajdonságának fontos szerepe van citoprotektív hatásában [116, 123]. A PACAP-38-nak van ugyan enyhe scavenger aktivitása, de inkább az valószínűsíthető, hogy indirekt módon, az antioxidáns enzimek aktivitásának/szintézisének stimulálása révén fejti ki oxidatív stress 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 un. downstream jelátviteli útvonalakat [122, 129, 130].

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 eredményzett [131, 132]. Érdekes, hogy ezek a változások nem vagy csak enyhe fokban jelentkeznek perifériás szövetekben (pl. vastagbélben) [133, 134]. 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 [133], oxidatív stressznek kitett kisagyi szemcsesejtekben és vese sejtkultúrában [126, 136], agyi ischaemia során [127], és axon regenerációs vizsgálatokban [137].

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a bélszövet endogén PACAP-38 immunreaktivitási szintje csökken meleg ischaemia és az azt követő reperfúzió során. Ezek az értékek 6 órás ischaemia után és valamennyi reperfúziós mintában szignifikáns volt. A PACAP-38 immunreaktivitási szintjének értékeit tekintve eredményeink korreláltak a gasztrointesztinális traktusban Hannibál által mért normál szintjeivel [117]. 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 [138].

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 reperfúzió 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 [52, 85]. Számos kutatás folyik a kereskedelemben kapható oldatok összetételének módosítása, illetve új oldatok kifejlesztése terén [112, 139].

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a bélszövet PACAP-38-szerű és PACAP-27-szerű immunreaktivitása a konzerválási idő előre haladtával csökkent 1 és 3 órás hideg tarolást 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 [120]. A hideg ischémiát 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 [138]. 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 reperfúziós 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 [139]. 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 [140]. A legújabb tanulmányok megerősítették, hogy a PACAP-38 hatására a cAMP szint megemelkedik, mely megóvja az I/R okozta károsodástól a bélszövetet [141]. 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 [116]. 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 gyulladásos kaszkád aktiválhatja a leukocitákat és az endothel sejteket, ami végül szöveti gyulladáshoz, többszervi elégtelenséghez és halálhoz vezethet. I/R-t követően vékonybél transzplantáció során a bél citokin termelő szervvé válik, fenyegetve ezáltal a graft és a beteg túlélését [142].

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 reperfúzió 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 [123, 126]. A citokinek közé tartozó adhéziós molekulák részt vesznek a leukocyták, a vérlemezkék, T sejtek és endothel sejtek közötti intercelluláris kommunikációban, beindítva ezzel a mikrovaszkuláris sérülést és reperfúziós károsodást [143]. 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 vonza. 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 gyulladásgátló hatása részben a citokin és kemokin termelésre történő gátló hatása révén érvényesül [121, 123, 125].

5. Új eredmények

1. Különböző időtartamú meleg I/R-ós és UW oldatban történt konzerválás és autotranszplantáció során kimutattuk, hogy az ischaemiás időkkel arányos mértékű oxidatív károsodás lép fel a vékonybélszövetben.

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 pásztázó kalorimetriás módszerrel. Összességében elmondhatjuk, hogy a vékonybél kb. 3 órás hideg konzerválást képes tolerálni súlyosabb oxidatív stressz vagy struktúrális károsodás nélkül.

4. Klasszikus IPO-protokoll [3x (30 másodperc ischaemia + 30 másodperc reperfúzió)] 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 bélszövetben 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 eredményihez képest.

7. Vékonybél autotranszplantációs modellben a PACAP-38-at tartalmazó UW oldatban konzervált bélszövetben 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 szignifikáns csökkent.

6. Irodalomjegyzék

1. Lillehei RC, Goott B, Miller FA. The physiological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. Ann Surg 1959;150:543-60.
2. Lillehei RC, Idezuki Y, Feemster JA. Transplantation of stomach, intestine, and pancreas: experimental and clinical observations. Surgery 1967;62:721-41.
3. www.intestinaltransplant.org
4. Sharkey LM, Russell NK, Rutter CS, Middleton SJ, Bradley JA, Jamieson NV, Butler AJ. Urgent multivisceral transplantation for widespread splanchnic ischemia. J Am Coll Surg 2016;222:760-5.
5. Abu-Elmagd KM, Kosmach-Park B, Costa G, Zenati M, Martin L, Koritsky DA, Emerling M, Murase N, Bond GJ, Soltys K, Sogawa H, Lunz J, Al Samman M, Shaefer N, Sindhi R, Mazariegos GV. Long-term survival, nutritional autonomy, and quality of life after intestinal and multivisceral transplantation. Ann Surg 2012;256:494-508.
6. Roskott AM, van Haaften WT, Leuvenink HG, Ploeg RJ, van Goor H, Blokzijl T, Ottens PJ, Dijkstra G, Nieuwenhuijs VB. Histopathologic and molecular evaluation of the Organ Procurement and Transplantation Network selection criteria for intestinal graft donation. J Surg Res 2014;189:143-51.
7. Kosieradzki M, Lisik W, Rowiński W, Małkowski P. Progress in abdominal organ transplantation. Med Sci Monit 2011;17:282-91.
8. Kalmár-Nagy K. Vékonybél-átültetés. Focus Medicinae 2007;2:26-30.
9. Perner F. Szervtranszplantáció az emésztőrendszerben. Gastroenterológiai sebészet. Szerk: Kiss J. Medicina könyvkiadó. Budapest, 2002:155-63.
10. Gotthardt DN, Gauss A, Zech U, Mehrabi A, Weiss KH, Sauer P, Stremmel W, Büchler MW, Schemmer P. Indications for intestinal transplantation: recognizing the scope and limits of total parenteral nutrition. Clin Transplant 2013;27:49-55.
11. Rao AS, Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Thomson A, Qian S, Murase N, Fung JJ. The two-way paradigm of transplantation immunology. Clin Immunol Immunopathol 1996;80:46-51.
12. Wolfárd A, Kaszaki J, Varga S, Lázár G, Boros M. Early microcirculatory changes after ischemic preconditioning and small bowel autotransplantation. Eur Surg Res 2007;39:284-90.
13. Chen SH, Tang YB, Chen HC. Survival of transferred ileum after ischemia time longer than 1 hour: a clinical result different from animal studies. J Am Coll Surg 2013;217:300-5.
14. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. Acta Physiol Scand Suppl 1986;548:47-64.
15. Liao YF, Zhu W, Li DP, Zhu X. Heme oxygenase-1 and gut ischemia/reperfusion injury: A short review. World J Gastroenterol 2013;19:3555-61.
16. Bielefeldt K, Whiteis CA, Sharma RV, Abboud FM, Conklin JL. Reactive oxygen species and calcium homeostasis in cultured human intestinal smooth muscle cells. Am J Physiol 1997;272:1439-50.

17. Piton G, Capellier G. Biomarkers of gut barrier failure in the ICU. Curr Opin Crit Care 2016;22:152-60.
18. Kozuch PL, Brandt LJ. Review article: diagnosis and management of mesenteric ischaemia with an emphasis on pharmacotherapy. Aliment Pharmacol Ther 2005;21:201-15.
19. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. Dig Dis Sci 2004;49:1359-77.
20. Colledan M, Zanfi C, Pinna AD. Technical aspects of intestinal transplantation. Curr Opin Organ Transplant 2013;18:291-7.
21. Machuca TN, Cypel M, Keshavjee S. Advances in lung preservation. Surg Clin North Am 2013;93:1373-94.
22. O'Callaghan JM, Morgan RD, Knight SR, Morris PJ. Systematic review and meta-analysis of hypothermic machine perfusion versus static cold storage of kidney allografts on transplant outcomes. Br J Surg 2013;100:991-1001.
23. Belzer FO. Evaluation of preservation of the intra-abdominal organs. Transplant Proc 1993;25:2527-30.
24. Reyes JD. Intestinal transplantation. Semin Pediatr Surg 2006;15:228-34.
25. Henry SD, Guarrera JV. Protective effects of hypothermic ex vivo perfusion on ischemia/reperfusion injury and transplant outcomes. Transplant Rev 2012;26:163-75.
26. Ferencz A, Szántó Z, Borsiczky B, Kiss K, Kalmár-Nagy K, Szeberényi J, Horváth ŐP, Rőth, E. The effects of preconditioning on the oxidative stress in small-bowel autotransplantation. Surgery 2002;132:877-84.
27. Bráth E, Németh N, Kiss F, Sajtos E, Hevér T, Mátyás L, Tóth L, Mikó I, Furka I. Changes of local and systemic hemorheological properties in intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat model. Microsurgery 2010;30:321-6.
28. Szabó A, Vollmar B, Boros M, Menger MD. Gender differences in ischemia-reperfusion-induced microcirculatory and epithelial dysfunctions in the small intestine. Life Sci 2006;78:3058-65.
29. Ferencz A, Rácz B, Gasz B, Benkő L, Jancsó G, Kürthy M, Rőth E. Intestinal ischemic preconditioning in rats and NF-kappaB activation. Microsurgery 2006;26:54-7.
30. Baumann J, Ghosh S, Szakmány T, Jancsó G, Ferencz A, Rőth E, Bogár L. Short-term effects of N-acetylcysteine and ischemic preconditioning in a canine model of hepatic ischemia-reperfusion injury. Eur Surg Res 2008;41:226-30.
31. Stangl R, Szijártó A, Ónody P, Tamás J, Tátrai M, Hegedűs V, Blázovics A, Lotz G, Kiss A, Módis K, Gerő D, Szabó C, Kupcsulik P, Harsányi L. Reduction of liver ischemia-reperfusion injury via glutamine pretreatment. J Surg Res 2011;166:95-103.
32. Rosero O, Kovács T, Ónody P, Harsányi L, Szijártó A. Bakteriális transzlokáció: rés a pajzson. Orv Hetil 2014;155:304-12.
33. Ender F, Varró V. A mesenteriális keringés. Gastroenterológiai sebészet. Szerk: Kiss J. Medicina könyvkiadó. Budapest, 2002:452-9.
34. Circu ML, Aw TY. Intestinal redox biology and oxidative stress. Semin Cell Dev Biol 2012;23:729-37.
35. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free

radical damage applications in experimental animals and in humans. Free Radic Biol Med 1999;26:202-26.
36. Wilkins EG, Rees RS, Smith D, Cashmer B, Punch J, Till GO, Smith DJ. Identification of xanthine oxidase activity following reperfusion in human tissue. Ann Plast Surg 1993;31:60-5.
37. Beuk RJ, Heineman E, Tangelder GJ, Kurvers HA, Bonke HJ, oude Egbrink MG. Effects of different durations of total warm ischemia of the gut on rat mesenteric microcirculation. J Surg Res 1997;73:14-23.
38. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. Mol Aspects Med 1993;14:191-7.
39. Holley AE, Walker MK, Cheeseman KH, Slater TF. Measurement of n-alkanals and hydroxyalkenals in biological samples. Free Radic Biol Med 1993;15:281-9.
40. Tekin IO, Sipahi EY, Comert M, Acikgoz S, Yurdakan G. Low-density lipoproteins oxidized after intestinal ischemia/reperfusion in rats. J Surg Res 2009;157:47-54.
41. Dumlu EG, Bozkurt B, Tokaç M, Kiyak G, Özkardeş AB, Ergin M, Yazgan A, Kılıç M. Oxidative stress and lipid peroxidation in the ischemic small intestine: pathological and biochemical evaluation in a rat model of superior mesenteric ischemia. Int Surg 2014;99:868-74.
42. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. Physiol Rev 2014;94:329-54.
43. Kacmaz M, Ozturk HS, Karaayvaz M, Guven C, Durak I. Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue in changed after ischemia-reperfusion. Effects of an allopurinol plus antioxidant combination. Can J Surg 1999;42:427-31.
44. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic Biol Med 1999;27:916-21.
45. Vincenzini MT, Favilli F, Stio M, Iantomasi T. Intestinal glutathione transport system: a possible detoxication role. Biochim Biophys Acta 1991;1073:571-9.
46. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. Gastroenterology 1981;81:22-9.
47. Byard RW. Acute mesenteric ischaemia and unexpected death. J Forensic Leg Med 2012;19:185-90.
48. Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. Physiological Reviews Published 2007;87:545-64.
49. Collins GM, Halasz NA. Forty-eight hour ice storage of kidneys: importance of cation content. Surgery 1976;79:432-5.
50. Wahlberg JA, Southard JH, Belzer FO. Development of a cold-storage solution for pancreas preservation. Cryobiology 1986;23:477-82.
51. Ploeg RJ, van Bockel JH, Langendijk PT, Groenewegen M, van der Woude FJ, Persijn GG, Thorogood J, Hermans J. Effect of preservation solution on results of cadaveric kidney transplantation. The European Multicentre Study Group. Lancet 1992;340:129-37.
52. Roskott AM, Nieuwenhuijs VB, Dijkstra G, Koudstaal LG, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Small bowel preservation for intestinal transplantation: a review. Transpl Int

2011;24:107-31.
53. Oltean M, Churchill TA. Organ-specific solutions and strategies for the intestinal preservation. Int Rev Immunol 2014;33:234-44.
54. Ohakawa HN, Okishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95:351-8.
55. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein-bound and non-protein sulphydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 1968;25:192-205.
56. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the antioxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 1972;27:3170-5.
57. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. Arch Surg 1970;101:478-83.
58. Park PO, Haglund U. Regeneration of small bowel mucosa after intestinal ischemia. Crit Care Med 1992;20:135-9.
59. Park PO, Haglung U, Bulkley GB, Falt K. The secuence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. Surgery 1990;107:574-80.
60. Quaedackers JSLT, Beuk RJ, Bennet L, Charlton A, oude Egbrink MGA, Gunn AJ, Heineman E. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel. Transplant Proc 2000;32:1307-10.
61. Watson ES, O'Neill MJ, Justin J, Brenner N. A Differential Scanning Calorimeter for quantitative differential thermal analysis. Anal Chem 1964;36:1233-8.
62. Bruylants G, Wouters J, Michaux C. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. Curr Med Chem 2005;12:2011-20.
63. Lőrinczy D, Belágyi J. Effects of nucleotide on skeletal muscle myosin unfolding in myofibrils by DSC. Biochem Biophys Res Commun 1995;217:592-8.
64. Dergez T, Lőrinczy D, Könczöl F, Farkas N, Belágyi J. Differential scanning calorimetry study of glycerinated rabbit psoas muscle fibres in intermediate state of ATP hydrolysis. BMC Structural Biology 2007;**7:**41-51.
65. Ferencz A, Nedvig K, László E, Magyarlaki T, Lőrinczy D. DSC examination of kidney tissue following warm ischemia and reperfusion injury. Thermochim Acta 2011;525:161-6.
66. Zapf I, Fekecs T, Moezzi M, Tizedes G, Pavlovics G, Kálmán E, Horváth PO, Ferencz A. Differential scanning calorimetry of blood plasma in breast cancer patients. Magy Onkol 2012;56:274-9.
67. Garbett NC, Miller JJ, Jenson AB, Chaires JB. Calorimetric analysis of the plasma proteome. Semin Nephrol 2007;27:621-6.
68. Garbett NC, Mekmaysy CS, DeLeeuw L, Chaires JB. Clinical application of plasma thermograms: utility, practical approaches and considerations. Methods 2015;76:41-50.
69. Wiegand N, Vámhidy L, Lőrinczy D. Differential scanning calorimetric examination of ruptured lower limb tendons in human. J Therm Anal Calorim 2010;101:487-492.
70. Otamiri TA, Tagesson C. Ginkgo biloba extract prevents mucosal damage associated with small-intestinal ischemia. Scand J Gastroenterol 1989;24:666-70.
71. deFoneska A, Kaunitz JD. Gastroduodenal mucosal defense. Curr Opin Gastroenterol

2010;26:604-10.
72. Giele HP, Heel KA, Storrie A, McCauley RD, Hall JC. Warm ischemia time in a model for small bowel transplantation. Microsurgery 1996;17:438-43.
73. Slavikova H, Lojek A, Hamar J, Duskova M, Kubala L, Vondracek J, Ciz M. Total antioxidant capacity of serum increased in early but not late period after intestinal ischemia in rats. Free Radic Biol Med 1998;25:9-18.
74. Schweizer E, Gassel AM, Deltz E, Schroeder P. A comparison of preservation solutions for small bowel transplantation in the rat. Transplantation 1994;57:1406-8.
75. Sola A, Hotter G, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. Modification of oxidative stress in response to intestinal preconditioning. Transplantation 2000;69:767-72.
76. Gibson DD, Brackett DJ, Squires RA, Balla AK, Lerner MR, McCay PB, Pennington LR. Evidence that the large loss of glutathione observed in ischemia/reperfusion of the small intestine is not due to oxidation to glutathione disulfide. Free Radic Biol Med 1993;14:427-33.
77. Nakamura M, Ozaki M, Fuchinoue S, Teraoka S, Ota K. Ascorbic acid prevents ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. Transpl Int 1997;10:89-95.
78. Karashima K, Uchida Y, Tohara K, Kashima K, Yokoyama S, Nakayama I. The kinetics of cooper-zinc superoxide dismutase in experimentally induced ischemia-reperfusion injury of the canine jejunum. Surg Today 1995;25:343-50.
79. Deshmukh DR, Mirochnitchenko O, Ghole VS, Doreen A, Shah PC, Reddell M, Brolin RE, Inouye M. Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. AJP-Cell Physiol 1997;273:1130-5.
80. De Oca J, Vallet J, Bettonica C, Garcia A, Montanes T, Castells A, Cuadrado S, Mercadal M, Fiol C. Influence of liquid preservation on lipid peroxidation and bacterial permeability after small bowel transplantation. Transplant Proc 1995;27:2382-3.
81. Zhang S, Kokudo Y, Nemoto EM, Todo S. Biochemical evidence of mucosal damage of intestinal grafts during cold preservation in University of Wisconsin, Euro-Collins, and Lactated Ringer's solutions. Transplant Proc 1994;26:1494-5.
82. Baláz P, Matia I, Jackanin S, Rybárová E, Kron I, Pomfy M, Fronek J, Ryska M. Preservation injury of jejunal grafts and its modulation by custodiol and University of Wisconsin perfusion solutions in Wistar rats. Eur Surg Res 2004;36:192-7.
83. Ferencz A, Kiss P, Wéber Gy, Helyes Zs, Shintani N, Baba A, Reglődi D. Comparison of intestinal warm ischemic injury in PACAP knock-out and wild-type mice. J Mol Neurosci 2010;42:435-42.
84. Ferencz A, Wéber Gy, Helyes Zs, Hashimoto H, Baba A, Reglődi D. Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury. J Mol Neurosci 2010;42:428-34.
85. Salehi P, Madsen K, Zhu J, Castillo E, Avila J, Lakey JR, Churchill TA. Ameliorating small bowel injury using a cavitary two-layer preservation method with perfluorocarbon and a nutrient-rich solution. Am J Transplant 2004;4:1421-8.
86. Mülbacher F, Langer F, Mittermayer C. Preservation solutions for transplantation. Transplant Proc 1999;31:2069-70.
87. Shah KA, Shurey S, Green CJ. Characterization of apoptosis in intestinal ischaemia-

reperfusion injury – a light and electron microscopic study. Int J Exp Pathol 1997;78:355-63.
88. Emre A, Bayram O, Salman B, Ercan S, Anadol Z, Akin O. Sodium nitroprusside as a nitric oxide donor in a rat intestinal ischemia-reperfusion model. Clinics 2008;63:91-6.
89. Haglund U, Bergqvist D. Intestinal ischemia – the basics. Langenbecks Arch Surg 1999;384:233-8.
90. Bielefeldt K, Conklin JL. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. Dig Dis Sci 1997;42:878-84.
91. Ballabeni V, Barocelli E, Bertoni S, Impicciatore M. Alterations of intestinal motor responsiveness in a model of mild mesenteric ischemia/reperfusion in rats. Life Sci 2002;71:2025-35.
92. Linhares GK, Martins JL, Fontanezzi F, Patricio FR, Montero EFS. Do lesions of the enteric nervous system occur following intestinal ischemia/reperfusion? Acta Cir Bras 2007;22:120-4.
93. Schaefer N, Tahara K, Schmidt J, Zobel S, Kalff JC, Hirner A, Türler A. Mechanism and impact of organ harvesting and ischemia-reperfusion injury within the graft muscularis in rat small bowel transplantation. Transplant Proc 2006;38:1821-2.
94. von Websky MW, Kalff JC, Schäfer N. Current knowledge on regulation and impairment of motility after intestinal transplantation. Curr Opin Organ Transplant 2015;20:303-7.
95. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal injury in ischemic myocardium. Circulation 1986;74:1124-36.
96. Ferencz A, Szántó Z, Borsiczky B, Kiss K, Kalmár-Nagy K, Telek G, Szeberényi J, Horváth ÖP, Rőth E. Vékonybél autotranszplantaciót megelőző ischaemiás prekondícionálás hatása az oxidatív stressz kialakulására. Magy Seb 2002;55:331-6.
97. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johasten J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003;285:579-88.
98. Liu KX, Li YS, Huang WQ, Chen SQ, Wang ZX, Liu JX, Xia Z. Immediate postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury. Intensive Care Med 2009;35:933-42.
99. Németh N, Furka I, Mikó I. Hemorheological changes in ischemia-reperfusion: an overview on our experimental surgical data. Clin Hemorheol Microcirc 2014;57:215-25.
100. Klárik Z, Tamás R, Tóth E, Kiss F, Kovács EL, Jäckel M, Furka I, Németh N. Intra and postoperative evaluations of microcirculation and micro-rheological parameters in a rat model of musculocutaneous flap ischemia-reperfusion. Acta Cir Bras 2015;30:551-60.
101. Zhao ZQ. Postconditioning in reperfusion injury: a status report. Cardiovasc Drugs Ther 2010;24:265-79.
102. Oki K, Maeda K, Nakamura K. Orthotopic small intestine transplantation in the rat: how long a small intestinal graft is necessary? Transpl Proc 1989;21:2909-12.
103. Cheng CH, Lin HC, Lai IR, Lai HS. Ischemic postconditioning attenuate reperfusion injury of small intestine: impact of mitochondrial permeability transition.

Transplantation 2013;95:559-65.
104. Dos Santos CH, Pontes JC, Gomes OM, Miiji LN, Bispo MA. Evaluation of ischemic postconditioning effect on mesenteric ischemia treatment: experimental study in rats. Rev Bras Cir Cardiovasc 2009;24:150-6.
105. Bretz B, Blaze C, Parry N, Kudej RK. Ischemic postconditioning does not attenuate ischemia-reperfusion injury of rabbit small intestine. Vet Surg 2010;39:216-23.
106. Boros M, Takaichi S, Hatanaka K. Ischemic time-dependent microvascular changes and reperfusion injury in the rat small intestine. J Surg Res 1995;59:311-20.
107. Zhao H, Kilgas S, Alam A, Eguchi S, Ma D. The role of extracellular adenosine triphosphate in ischemic organ injury. Crit Care Med 2016;44:1000-12.
108. Rosero O, Onody P, Stangl R, Hegedus V, Lotz G, Blázovics A, Kupcsulik P, Szijártó A. Investigation of postconditioning in intestinal ischemia-reperfusion experimental models. Magy Seb 2011;64:28-36.
109. Santos CH, Gomes OM, Pontes JC, Miiji LN, Bispo MA. The ischemic preconditioning and postconditioning effect on the intestinal mucosa of rats undergoing mesenteric ischemia/reperfusion procedure. Acta Cir Bras 2008;23:22-8.
110. Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. Transplant Rev 2009;23:1-10.
111. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. Transplantation 2007;83:1289-98.
112. Inuzuka K, Unno N, Yamamoto N, Sagara D, Suzuki M, Nishiyama M, Konno H. Effect of hyperbarically oxygenated-perfluorochemical with University of Wisconsin solution on preservation of rat small intestine using an original pressure-resistant portable apparatus. Surgery 2007;142:57-66.
113. Wei L, Hata K, Doorschodt BM, Büttner R, Minor T, Tolba RH. Experimental small bowel preservation using Polysol: A new alternative to University of Wisconsin solution, Celsior and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution? World J Gastroenterol 2007;13:3684-91.
114. Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. Biochem Biophys Res Commun 1989;164:567-74.
115. Arimura A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. Jpn J Physiol 1998;48:301-31.
116. Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Basille D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. Pharmacol Rev 2009;61:283-357.
117. Hannibal J, Ekblad E, Mulder H, Sundler F, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract of the rat: Distribution and effects of capsaicin or denervation. Cell Tissue Res 1998;291:65-79.
118. Schulz S, Rocken C, Mawrin C, Weise W, Hollt V, Schulz S. Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human

tissues with subtype-specific antibodies. Clin Cancer Res 2004;10:8235-42.
119. Pirone A, Baoan D, Piano I, Santina LD, Baglini A, Lenzi C. Pituitary adenylate cyclise-activating peptide (PACAP) immunoreactivity distribution in the small intestine of the adult New Hampshire chicken. Acta Histochem 2011;113:477-83.
120. Ferencz A, Kiss P, Wéber Gy, Helyes Zs, Shintani N, Baba A, Reglődi D. Comparison of intestinal warm ischemic injury in PACAP knockout and wild-type mice. J Mol Neurosci 2010;42:435-42.
121. Horváth G, Márk L, Brubel R, Szakály P, Rácz B, Kiss P, Tamás A, Helyes Zs, Lubics A, Hashimoto H, Baba A, Shintani N, Fürjes G, Németh J, Reglődi D. Mice deficient in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide display increased sensitivity to renal oxidative stress in vitro. Neurosci Lett 2010;469:70-4.
122. Rácz B, Gallyas F, Kiss P, Tóth G, Hegyi O, Gasz B, Borsiczky B, Ferencz A, Rőth E, Tamás A, Lengvári I, Lubics A, Reglődi D. The neuroprotective effects of PACAP in monosodium glutamate-induced retinal lesion involves inhibition of proapoptotic signaling pathways. Regul Pept 2006;137:20-6.
123. Reglődi D, Kiss P, Szabadfi K, Atlasz T, Gábriel R, Horváth G, Szakály P, Sándor B, Lubics A, László E, Farkas J, Matkovits A, Brubel R, Hashimoto H, Ferencz A, Vincze A, Helyes Zs, Welke L, Lakatos A, Tamás A. PACAP is an endogenous protective factor - insights from PACAP deficient mice. J Mol Neurosci 2012;48:482-92.
124. Grotz M, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal cytokine response after gut ischemia. Role of gut barrier failure. Ann Surg 1999;229:478-86.
125. Delgado M, Genea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclise activating polypeptide in vitro and in vivo. J Immunol 2001;167:966-75.
126. Horváth G, Rácz B, Reglődi D, Kovács K, Kiss P, Gallyas F, Bognár Z, Szabó A, Magyarlaki T, László E, Lubics A, Tamás A, Tóth G, Szakály P. Effects of PACAP on mitochondrial apoptotic pathways and cytokine expression in rats subjected to renal ischemia/reperfusion. J Mol Neurosci 2010;42:411-8.
127. Ohtaki H, Satoh A, Nakamachi T, Yofu S, Dohi K, Mori H, Ohara K, Miyamoto K, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Matsunaga M, Shioda S. Regulation of oxidative stress by pituitary adenylate cyclise-activating polypeptide (PACAP) mediated by PACAP receptor. J Mol Neurosci 2010;42:397-403.
128. Brubel R, Horváth G, Reglődi D, Lubics A, Tamás A, Kiss P, László E, Németh J, Márk L, Szakály P. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. Transplant Proc 2011;43:1297-9.
129. Reglődi D, Fábián Z, Tamás A, Lubics A, Szeberényi J, Alexy T, Tóth K, Márton Z, Borsiczky B, Rőth E, Szalontay L, Lengvári I. Effects of PACAP on in vitro and in vivo neuronal cell death, platelet aggregation, and production of reactive oxygen radicals. Regul Pept 2004;123:51-9.
130. Vaudry D, Pamantung TF, Basille M, Rousselle C, Fournier A, Vaudry H, Beauvillain JC, Gonzalez BJ. PACAP protects cerebellar granule neurons against oxidative stress-induced apoptosis. Eur J NeuroSci 2002;15:1451-60.
131. Allais A, Burel D, Isaac ER, Gray SL, Basille M, Ravni A, Sherwood NM, Vaudry H,

Gonzalez BJ. Altered cerebellar development in mice lacking pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. Eur J NeuroSci 2007;25:2604-18.
132. Yamada K, Matsuzaki S, Hattori T, Kuwahara R, Taniguchi M, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kumamoto N, Yamada K, Yoshikawa T, Katayama T, Tohyama M. Increased stathmin1 expression in the dentate gyrus of mice causes abnormal axonal arborisation. PloSOne 2010;5:e8596.
133. Azuma YT, Hagi K, Shintani N, Kuwamura M, Nakajima H, Hashimoto H, Baba A, Takeuchi T. PACAP provides colonic protection against dextran sodium sulfate induced colitis. J Cell Physiol 2008;216:111-9.
134. Nemetz N, Abad C, Lawson G, Nobuta H, Chhith S, Duong L, Tse G, Braun J, Waschek JA. Induction of colitis and rapid development of colorectal tumors in mice deficient in the neuropeptide PACAP. Int J Cancer 2008;122:1803-9.
136. Vaudry D, Hamelink C, Damadzic R, Eskay L, Gonzalez B, Eiden LE. Endogenous PACAP acts as a stress response peptide to protect cerebellar neurons from ethanol or oxidative insult. Peptides 2005;26:2518-24.
137. Armstrong BD, Abad C, Chhith S, Cheung-Lau G, Hajji OE, Nobuta H, Waschek JA. Impaired nerve regeneration and enhanced neuroinflammatory response in mice lacking pituitary adenylyl cyclase activating peptide. Neuroscience 2008;151:63-73.
138. Mei Q, Sundler F. Changes in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide innervation of rat oxyntic mucosa during ulcer healing. Neuropeptides 1998;32:527-35.
139. Yan SF, Ogawa S, Stern DM, Pinsky DJ. Hypoxiainduced modulation of endothelial cell properties: Regulation of barrier function and expression on interleukin-6. Kidney Int 1997;51:419-25.
140. Minor T, Isselhard W. Cellular signal level of cyclic AMP and functional integrity of the small bowel after ischemic preservation: An experimental pilot study in the rat. Eur Surg Res 1998;30:144-8.
141. Riera M, Torras J, Cruzado JM, Lloberas N, Liron J, Herrero I, Navarro MA, Grinyo JM. The enhancement of endogenous cAMP with pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat kidney against ischemia through the modulation of inflammatory response. Transplantation 2001;72:1217-23.
142. Kostopanagiotou G, Avgerinos ED, Markidou E, Voiniadis P, Chondros C, Theodoraki K, Smyrniotis V, Arkadopoulos N. Protective effect of NAC preconditioning against ischemia-reperfusion injury in piglet small bowel transplantation: effects on plasma TNF, IL-8, hyaluronic acid, and NO. J Surg Res 2011;168:301-5.
143. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculation pathology and functional consequences. Langenbecks Arch Surg 2011;396:13-29.

7. A szerző publikációi

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

1. **Nedvig K**, Ferencz A, Rőth 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, Rőth E, Ferencz A. Az ischaemiás posztkondícionálás 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 antiinflammatórikus 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 ŐP, Wéber Gy, Rőth 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 ŐP, Wéber G, Rőth 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 analísis in madical application.

Ed: D. Lőrinczy, Akadémiai Kiadó, Budapest, 2011, pp. 255-69.

5. Ferencz A, **Nedvig K**, László E, Magyarlaki 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**, Rácz B, Reglődi D, Tamás A, Rőth E, Wéber Gy, Ferencz A. A PACAP hatása az oxidatív stresszre bél meleg ischémia/reperfúziót követően.
   Folia Hepatologica 2007; 11: 29.
2. **Nedvig K**, Rőth 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**, Rácz B, Reglődi D, Rőth 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**, Rőth E, Lőrinczy D, Ferencz A. Morfológiai és Differenciál Scanning Kalorimetriai vizsgálatok vékonybél meleg ischémia/reperfúziót követően.
   Magy Seb 2008; 61: 178.
5. **Nedvig K**, Rácz B, Tamás A, Reglődi D, Rőth 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, Jávor Sz, Fekecs T, Shanava K, Balatonyi B, Wéber Gy, Ferencz A. Az ischaemiás posztkondicionálás 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, Jávor Sz, Fekecs T, Shanava K, Balatonyi B, Wéber Gy, Ferencz A. Az ischaemiás posztkondicionálás védő szerepe vékonybél-autotranszplantáció során.
   Magy Seb 2010; 63: 267.

Lektorált folyóiratokban megjelent társszerzős, idézhető absztraktok:

1. Ferencz A, Rácz B, Gasz B, Benkő L, **Negvig K**, Tamás A, Reglődi D, Rőth E. A PACAP hatása a vékonybélben bekövetkező ischémiás/reperfúziós károsodásokra.
   Magy Seb 2006; 59, 227.
2. Ferencz A, Rácz B, Gasz B, Benkő L, Nedvig K, Tamás A, Reglődi D, Rőth 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**, Rácz B, Reglődi D, Tamás A, Rőth E, Wéber Gy, Ferencz A. A PACAP hatása az oxidatív stresszre bél meleg ischémia/reperfúziót követően. (poszter) Magyar Szabadgyök Kutató Társaság IV. Kongresszusa, 2007. október 11-13, Pécs.
2. **Nedvig K**, Rőth E, Lőrinczy D, Ferencz A. Morphological and Differential Scanning Calorimetry examination of the small bowel tissue following warm ischemia and reperfusion. (poster) 43rd Congress of European Society for Surgical Research, 21-24 May, 2008, Warsaw, Poland.
3. **Nedvig K**, Racz B, Reglodi D, Roth E, Weber Gy, Ferencz A. Effect of endogenous and exogenous PACAP on the oxidative stress and small bowel tissue lesion. (poster)
43rd Congress of European Society for Surgical Research, 21-24 May, 2008, Warsaw, Poland.
4. **Nedvig K**, Rőth E, Lőrinczy D, Ferencz A. Morfológiai és Differenciál Scanning Kalorimetriai vizsgálatok vékonybél meleg ischémia/reperfúziót követően. (poszter)
Magyar Sebész Társaság 59. Kongresszusa, 2008. június 18-20, Debrecen.
5. **Nedvig K**, Rácz B, Tamás A, Reglődi D, Rőth E, Wéber Gy, Ferencz A. PACAP hatása a szöveti oxidatív stresszre vékonybél autotranszplantációt követően. (poszter)
Magyar Sebész Társaság 59. Kongresszusa, 2008. június 18-20, Debrecen.
6. **Nedvig K**, Rőth E, Ferencz A, Lőrinczy D. DSC examination of intestinal tissue following warm ischemia and reperfusion. (poster)
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. (poster)
18. Ulm-Freiberger Kalorimetrietage, 18-20 Marz, 2009, Freiburg, Germany.
8. **Nedvig K**, Takács I, Horváth Sz, Ferencz S, Jávor Sz, Fekecs Tamás, Shanava K, Balatonyi B, Wéber Gy, Rőth E, Ferencz A. Az ischémiás posztkondícionálás hatásának vizsgálata vékonybél autotranszplantáció során. (előadás)
A Magyar Szabadgyök Kutató Társaság Kongresszusa 2010. június 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. (poster)
4th Central European Congress of Surgery, April 28-30, 2011, Budapest.
10. **Nedvig K**, Völgyi E, Fekecs T, Wéber G, Reglődi D, Rőth E, Ferencz A. Examination of small intestinal cold preservation injury on PACAP knock-out and wild-type mice. (poster) 4th Central European Congress of Surgery, April 28-30, 2011, Budapest.
11. **Nedvig K**, Völgyi E, Fekecs T, Wéber G, Rőth E, Ferencz A. Influence of ischemic postconditioning on the tissue injury following intestinal autotransplantation. (poster)
4th Central European Congress of Surgery, 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 felkészítésében.

Köszönettel tartozom Lőrinczy Dénes Profeszor 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. Rőth Erzsébet egyetemi tanárt és Dr. Jancsó Gábor egyetemi docenst, hogy kutató munkámat támogatták, és a Sebészeti Oktató és Kutató Intézet valamennyi dolgozóját munkám megvalósulásában nyújtott segítségükért.