

VESE MELEG ÉS HIDEG ISZKÉMIÁS – REPERFÚZIÓS KÁROSODÁS VIZSGÁLATA ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLBEN

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Hardi Péter

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Kovács L. Gábor

Programvezető: Dr. Jancsó Gábor

Témavezetők: Dr. Jancsó Gábor

Prof Dr. Menyhei Gábor



Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

Pécs, 2017

1. Bevezetés

A transzplantálandó szerv keringésének leállítása elengedhetetlen a transzplantáció folyamán. Ezen iszkémiás periódus alatt a szervben komplex patofiziológiai változások következnek be. Bár a szerv vérellátásának helyreállítása létfontosságú az iszkémiás károsodás megakadályozásában, reperfúzió kapcsán további károsodások léphetnek fel. Ezt az iszkémiás károsodásra adott, reperfúziókör fellépő paradox választ hívjuk iszkémiás-reperfúziós károsodásnak (I/R). A vese I/R-a a fő oka az akut veseelégtelenségnek egészséges és transzplantált vesében egyaránt.

Ezen károsodások nem csak transzplantáció, de számos olyan érsebészeti eljárás kapcsán is kialakulhatnak, ahol a vese vérellátását biztosító arteria eredésének szintje feletti aorta leszorítás szükséges. Szepszis illetve újraélesztés kapcsán kialakuló szisztémás hipoperfúzió is kóreredetként szerepelhet. A vese I/R patofiziológiája komplex folyamat s részleteiben még nem teljesen ismert. Számos tanulmány igazolta a gyulladáshoz vezető, reaktív oxigén szabadgyökök(ROS), citokinek, kemokinek, aktivált leukociták által okozott sejtkárosodást. A vese tubulussejtek, endoteliális sejtek specifikus válaszokat mutatnak mind az iszkémiás, mind a reperfúziós szakban, melyek végeredményben sejtkárosodáshoz vezetnek. A vese I/R folyamatainak megértésére irányuló kutatások nemcsak a transzplantáció rövid és hosszútávú eredményeire lehetnek jótékony hatással, de számos egyéb klinikai kórfolyamatot is kedvezően befolyásolhatnak.

1.1. vese iszkémiás –reperfúziós károsodás

A vese I/R károsodás generalizált, vagy lokális oxigén és tápanyag ellátási zavar, illetve a sejtanyagcsere végtermékek eltávolítási zavarának következménye. A kettő közt fellépő egyensúly zavar következtében a tubularis epiteliális sejtek károsodást szenvednek, súlyos esetben apoptózis, nekrozis lép fel (akut tubuláris nekrozis [ATN]), kezdetben funkcionális elégtelenséget okozva. Számos gyógyszer illetve patofiziológiai állapot vezethet generalizált, vagy lokális vérellátási zavarhoz.

1.1.1. Endotél a vese iszkémiás-reperfúziós károsodásban

Az endotél és a simaizom sejtek kritikus szerepet játszanak az akut veseelégtelenség patofiziológiájában. Az endotél sejt szabályozza az ér tónust, leukocita funkciót, simaizomsejt reakciókat. Endotél károsodás és posztiszkémiás károsodás esetén a vese arteriolák fokozottabb vazokonstriktiót mutatnak az egészséges vese arteriolákhoz képest, a megnövekedett endotelin-1, angiotenzin-II, tromboxán A₂, prostaglandin H₂, leukotrién C₄ és D₄, adenzin, fokozott szimpatikus stimuláció miatt. A vazodilatatív anyagok(acetilkolin,

bradikinin, NO) csökkent volta szintén a vazokonstriktió irányába tolja el az egyensúlyi állapotot. Az értónus vazokonstriktió irányába történő elmozdulását vazoaktív citokinek (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-32) és az iszkémiásan károsodott érben fokozottan létrejött endotél-leukocita adhézio és leukocita aktiváció erősíti, mely többek között sejt felszíni adhézio molekula (ICAM-1) fokozott expressziójának a következménye. Az aktiválódott leukocitákból, endotél sejtekből felszabaduló citokinek hatására „circulus vitiosus” tovább fokozódik a leukocita aktiváció és endotél-leukocita adhézio, melynek eredményeképpen a kapilláris keringés romlik, elzáródik. A felszabaduló citokinek emellett gyulladásos reakciót aktiválnak, tovább rontva az iszkémia által okozott keringészavart. A károsodott endotélben a sejt-sejt közti kapcsolódás megbomlik, az aktin citoskeleton felszakadása, a perivaszkuláris mátrix bomlása következtében fokozott permeabilitás lép fel, következményes intersticiális ödémával, mely tovább rontja a meglévő keringészavart.

1.1.2. gyulladás a vese iszkémiás-reperfúziós károsodásban

Az iszkémiás károsodásban mind a természetes, mind az adaptív immunválasz fontos szerepet játszik. A természetes, nem antigén specifikus immunválasz a neutrofil sejtek, monociták, makrofágok, dendritikus sejtek (DC), természetes öltő sejtek aktiválódását foglalja magába. Az adaptív immunválasz specifikus antigén jelenlétében órákon belül aktiválódik és napokig is eltarthat, melyben a dendritikus sejtek érése, antigén prezentáció, T-limfociták profifariója és aktivációja, T- és B-limfociták közötti kölcsönhatás a döntő jelentőségű. Az iszkémia következtében aktiválódott fehérvérsejtek már a reperfúzió első fél órájában nagy számban kapcsolódnak a vese külső medullában lévő peritubuláris kapillárisok endotéljéhez. Proteázokat, mieloperoxidázt, reaktív oxigén szabadgyököket, citokineket termelnek, melyek fokozott permeabilitáshoz, tubularis epitél és endotél sejtintegritás csökkenéséhez, fokozott vesekárosodáshoz vezetnek.

1.1.3. Komplement aktiváció a vese iszkémiás-reperfúziós károsodásban

A komplement aktiváció fontos meghatározója a vese I/R kialakult gyulladásnak. Vesében csaknem döntően alternatív úton történik. Hatására fokozódik az endotél sejtek sejt felszíni adhézio molekula expressziója. A keringésben legnagyobb számban lévő, makrofágokból származó C3 komplement fehérjét a DC-k kovalensen megkötik felszínükön, ami T sejt aktivációhoz vezet.

1.2. I/R diabéteszes vesében

Az anyagcsere zavarok, mint a diabétesz, hiperkoleszterinémia, hipertónia mind növelik az I/R kockázatát. Humán vizsgálatok és állatkísérletek is igazolták, hogy közepes szintű hiperkoleszterinémia is csökkentette az arteriolák endotél függő relaxációját, mely szuperoxid dizmutáz (SOD) adásával kivédhető volt. Állatkísérletek igazolták hogy az

arteriolák endotéljében megnövekedett SOD szint fokozott NO termeléshez vezet, és a posztisztkémiás venulákban fokozódik a fehérvérsejtek kitapadása, migrációja, albumin extravazációja LDL receptor hiányos egerkeben, ami csökkenthető koleszterin szegény diétával. Az diabéteszes szövetek I/R –ban a fokozott szabadgyök termelés és a fehérvérsejtek „gördülése”, kitapadása, albumin kiáramlás szintén fontos szerepet játszik. Egyes sejtfelszíni molekulák fokozott expressziója a „rolling”(P-selectin), míg más molekulák a fehérvérsejtek közötti interakciók fokozódását idézi elő (CD11/CD18, ICAM-1). Diabéteszes patakányokban az I/R-ban jellemző fokozott leukocita-endotél interakció csökkenthető PAF receptor antagonistá vagy leukotrién bioszintézist gátló szer adásával. I/R-ban a diabéteszes állatok venuláiban és az azokat körülvevő szövetekben fokozott oxidatív stressz figyelhető meg. Jól ismert, hogy a diabéteszes állatok posztisztkémiás venuláiban felszaporodó lipid mediátorok képezik a szabad gyökök fő forrását, melyben xantin-oxidáz kulcsszerepet játszik. Az I/R-ra adott válasz különbözik a hiperkoleszterinémias és diabéteszes állatokban. Úgy tűnik, hiperkoleszterinémia esetén a megnövekedett albumin extravazáció a fokozott leukocita-endotél interakció következménye, míg diabéteszben a leukocita független folyamatok játszanak központi szerepet az I/R-ban létrejött endotél diszfunkcióban. A lényeg az endogén adaptációs folyamatok csökkenése.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk alapját két kísérlet képezte. Az első sorozatban 45 perces bal vese iszkémiát idéztünk elő patkányokban, melyet 90 perces reperfúzió követett. Ebben a kísérletben a nátrium petozán poliszulfát (PPS) I/R-ra adott lehetséges védő hatását kívántuk igazolni mind diabéteszes, min egészséges állatokban. Vizsgáltuk az oxidatív stressz mértékét, a gyulladáshoz vezető válaszreakciókat, a lehetséges strukturális károsodásokat és különböző apoptotikus és antiapoptotikus jelátviteli utakat.

A következő kérdésekre kerestünk választ:

2.1 Képes-e egy hosszantartó intravénás PPS előkezelés csökkenteni egy későbbi vese I/R egészséges patkányok esetén?

2.2 Milyen hatása van a hosszantartó I/R előtt intravénásan adott PPS egy későbbi vese iszkémiás károsodás lefolyására diabéteszes állatok esetén?

2.3 Van-e hatása az iszkémiát követően egyszeri nagy dózisban adott PPS-nak az I/R-ra normál patkányokban?

2.4 Csökkenthető-e a diabéteszes állatok I/R károsodása a reperfúzió előtt adott nagy dózisú PPS adásával?

A második kísérletben vese perfúziós rendszert készítettünk patkány vese eltávolítást követően.

Transzplantációkor az eltávolított szervet mielőbb perfundálni és szállítani kell, hogy a szerv funkcióját megőrizzük. A transzplantátum életképességének meghatározása nagy gondosságot igényel. Az eltávolított szervek működőképességének vizsgálatát a perfúziós rendszerek alkalmazása megkönnyíti.

2.5 Kísérletünkben arra a kérdésekre kerestük a választ, hogy milyen károsodás éri a vese szövetet iszkémia alatt, és hogy lehet ezen károsodásokat kivédeni, megelőzni biztosítva ezzel a transzplantálandó szerv jobb túlélését.

3. VESE I/R INDUKÁLT OXIDATÍV STRESSZ ÉS GYULLADÁSOS VÁLASZ CSÖKKENTÉSE PPS ADÁSÁVAL KÍSÉRLETES ÁLLATMODELLBEN.

Az akut veseelégtelenség (AVE) leggyakoribb oka az I/R mind a szervezetben lévő, mind a transzplantáció céljából eltávolított vese esetén. Az akut veseelégtelenség hagyományosan egy gyors lefolyású (órától pár hónapig tartó) vesefunkció romlás, melyet a megnövekedett szérum kreatinin szint jellemez. Újabb definíció szerint a vesefunkció egy rapid, pár óra alatt bekövetkező romlása, melyet specifikus labor és klinikai paraméterek segítségével diagnosztizálhatunk.

Az AVE továbbra is önállóan képez jelentős morbiditási és mortalitási veszélyt olyan betegeknél, akik különböző érsebészeti beavatkozásokon estek át, ahol a mellkasi aortán, vagy indirekten a veséket ellátó artériákon, vagy bármilyen kismencedencei, alsó végtagi verőeken történt a beavatkozás, mely veseerek fölötti aortakirekesztést igényelt. Ezen beavatkozások a kirekesztési idő függvényében okoznak vese I/R, mely AVE-hez vezethet. A vese sejtszintű, vagy molekuláris válasza egy I/R-ra komplex folyamat és még nem tisztázott teljes egészében. Számos tanulmány vizsgálta a I/R-ban a különböző gyulladós folyamatok, a jelátviteli utak szerepét. Úgy hisszük, a gyulladós folyamatoknak központi szerepe van az AVE patofiziológiájában. Többet igazolták a különböző gyulladás ellenes szerek, mint pl: mikofenolát, alfa-melanocita stimuláló hormon vesevédő hatását AVE-ben. Az I/R a gyulladás mellett sejtelkárosodást is okoz az érintett vesében. Legérzékenyebben a vese tubulus sejtek reagálnak az iszkémiára, mely egy ponton túl apoptózishoz, sejtelhaláshoz vezethet (ATN- akut tubularis nekrózis).

A PPS szemiszintetikus szulfatált polianion, mely az USA-ban egy gyulladós betegség, az intersticiális cisztitis kezelésére van törzskönyveztve. Gyulladás csökkentő hatása nem teljesen ismert, bár leírták, hogy csökkenti a lipopoliszacharid mediált nukleáris faktor (NF κ B) aktivációt, csökkenti a leukocita elasztáz és komplement aktivitást. Bizonyítottan csökkentette a tubulointersticiális gyulladást megőrizve a vesefunkciót kísérletes 5/6 nefrektómizált patkányokban, ill. csökkentette az albuminúria mértékét, a vesekárosodás mértékét, a tubulointersticiális gyulladást diabéteszes egerekben. Ezek alapján feltételeztük, hogy a PPS gyulladásellenes hatása előnyös lehet az AVE-ben jelentkező sejtelkárosodás csökkentésében, a veserek endotél stabilizációja az I/R kivédésében.

3.2. célkitűzés:

Jelen kísérlet célja a vese I/R károsodás folyamatának sejtszintű monitorizálása, továbbá a PPS vese I/R károsodásra gyakorolt hatásának vizsgálata hosszútávú preoperatív és egyszeri

intraoperatív adagolás esetén egészséges és diabéteszes patkányban. Összehasonlítottuk a két különböző PPS adagolás apoptotikus (bax) és antiapoptotikus (bcl-2) jelátviteli utakra, az oxidatív stressz mértékét meghatározó plazma malondialdehid (MDA), redukált glutation (GSH), tiol csoportra (-SH), szuperoxid dizmutáz szintre gyakorolt hatását. A gyulladásos válasz mértékét a szérumban tumor nekrosis faktor (TNF α), interleukin 1 (IL-1), a DNS károsodás mértékét a foszfo p53 (p-p53) meghatározásával végeztük. A szerkezeti eltérések vizsgálatára szövettani vizsgálatokat végeztünk.

3.3. Anyag és módszer

3.3.1. Állatmodell

60 darab 200-250g közötti súlyú Wistar patkányt használtunk a kísérlethez, melyeket a Charles River Breeding Laboratories-től szereztünk be. Az állatokat egyéni ketrecekben, szabályozott hőmérséklet és fényviszonyok között, légkondicionált teremben tartottuk. Táplálékhoz, folyadékhoz szabadon juthattak, melyet 12 órával a vizsgálatok előtt megvontunk az állatoktól.

Diabéteszes állatok:

A diabétesz kialakulását egyszeri (50mg/kg) streptozotocin (STZ) adásával érték el, melynek ismert a hasnyálmirigy β sejtjeire gyakorolt irreverzibilis toxikus hatása.

3.3.2. Renal ischaemia-reperfusion model

Az állatok altatása intraperitoneálisan adott ketamin (500 mg / 10 ml) és diazepam (10 mg / 2 ml) 1:1(0.2 ml / 100 g = 5 mg ketamine + 0.5 mg diazepam / 100 g) arányú keverékével végeztük. EKG felhelyezés és artéria karotisz kanülálás történt a vérnyomás monitorizálása céljából. Bőrfertőtlenítést követően medián laparotómiát végeztünk, a folyadék háztartás fenntartása érdekében 2 ml meleg fiz. sóoldatot fecskendeztünk a hasüregbe. A gyógyszerbeadás, vérvétel céljából a v. mesenterica inf-t kivevő kanüláltuk, kanüláltuk. A bélkacsok óvatos jobbra tartásával látótérbe hoztuk a hasi aortát, mindkét oldali art. renalist. Óvatos preparálást követően mikroklipp segítségével a bal vesét ellátó artériát 45 percre leszorítottuk (I). A hasüregt ezután reverzibilisen zártuk és meleg fiz. sóoldatos törlőt helyeztünk a sebre. Az iszkémia létrejöttét flowméter segítségével ellenőriztük. Az iszkémiás idő leteltével a hasüregt megnyitottuk, majd a mikroklippet eltávolítva a veseérről a reperfüzió fázisa következett 90 percig, melyet a vese színváltozása, és a flowméterrel detektált áramlás igazolt.

3.3.3. A PPS adagolása

A PPS dózisát a humán dózisból számoltuk. Az adagolás kétféle módon történt: preoperatív hosszantartó , alacsony dózisu (25mg/kg naponta) intravénás adagolás műtét előtt és nagy dózisu (100mg/kg), egyszeri intravénás adagolás műtét alatt, az iszkémiás fázist követően a reperfüziós fázis kezdetén.

3.3.4. Kísérleti csoportok

1. csoport: kontroll áloperált csoportnál csak medián laparotómiát végeztünk.
2. csoport: kontroll I/R csoportnál laparotómiát követően 45 perces bal vese iszkémiát 90 perces reperfüzió kísérte egészséges patkányokban (I/R)
3. csoport: iszkémiát követően a reperfüzió előtt egyszeri, nagy dózisu PPS adása történt egészséges állatokban (I/PPS/R).
4. csoport: I/R előtt 1 hétig, alacsony dózisu PPS kezelés jellemzi az egészséges állatokat. (PPS/I/R)

Ugyanezen csoportokat létrehoztuk diabeteszes állatok esetén is, így összesen 8 csoportot vizsgáltunk:

5. kontroll áloperált diabeteszes csoport
6. (DM I/R)
7. (DM I/PPS/R)
8. (DM PPS/I/R)

3.3.5. Az oxidatív stressz parametereinek vizsgálata

A malondialdehid (MDA) mérése: Az MDA a sejtmembránok lipid-peroxidációjának mértékét jelző marker. Meghatározása teljes, alvadásgátolt vérvérből történik fotometriás módszerrel placér, Cushman és Johnson nyomán.

A redukált glutation (GSH) és plazma tiol-csoport (-SH) szintjének meghatározása: Teljes , EDTA-val alvadásgátolt vérből Ellman-reagens felhasználásával Sedlak és Lindsay protokollja alapján történt.

A szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim aktivitás Superoxide Dismutase Assay ELISA Kit-tel (Trevigen Inc., Gaithersburg, USA) végeztük a gyártó protokollja szerint. Ez a módszer a biológiailag aktív SOD meghatározására alkalmas.

3.3.6. Szérum TNF- α és IL-1 meghatározás

Szérum TNF- α és IL-1 meghatározás céljából RAT TNF- α és RAT IL-1 ELISA kitet használtunk (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) a gyártó protokollját követve.

3.3.7. A proapoptotikus (bax) és antiapoptotikus (bcl-2) jelátviteli utak, és a DNS károsodás mértékének (p-p53) western blot vizsgálata

50 mg bal vese szövetet homogenizáltuk jeges TRIS pufferben (50 mM, pH 8.0). A felülúszó fehérjetartalmát bicinchoriníc savval derítettük, hogy a Laemmli oldat 1 mg/ml fehérjét tartalmazzon. A mintákat kétszeres koncentrációjú SDS-poliakrialmid gél-elektroforetikus pufferben tároltuk. A fehérjéket 12%-os SDS poliakrilamid gélben futtatuk és választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk. ezt követően egy éjszakán át 4°C-on az elsődleges antitestekkel inkubáltuk a membránokat (polyclonal Bax antibody, 1:1000 dilution), pospho-p53 MAPK (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸², 1:1000 dilution), (polyclonal bcl-2 antibody, 1:1000 dilution) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). A membránokat ezt követően hatszor 5 percre mostuk Tween-es TBS-ben, majd hozzáadtuk a tormaperoxidázzal jelölt másodlagos antitesteket (1:3000 dilution; Bio-Rad, Budapest, Hungary). Ismét hatszor 5 percre mossuk a membránokat Tween-es TBS-ben, majd kemilumineszcens oldattal láthatóvá tettük a blottot. Az eredményeket Scion Image 4.02 programmal kvantifikáltuk. Minden vizsgálatot négyszer ismételtünk.

3.3.8. Szövettani vizsgálatok

A kísérlet végén terminált állatokból szövettani vizsgálat céljából mintákat vettünk a bal veséből. A szövetminták nem tartalmaztak vesekörüli zsírszövetet vagy fasciát. A szövettani vizsgálatok célja a csoportok közti szerkezeti változások vizualizálása volt. Csoportként 5-6 paraffinba ágyazott blokkot készítettünk, majd metszést követően hematoxylin-eozin festést végeztünk.

3.3.9. Statisztikai analízis

Minden értéket átlag \pm SEM-mel fejeztünk ki. A csoportok varianciája közötti eltéréseket one-way ANOVA analízissel vizsgáltuk, majd szignifikáns eltérés esetén a többszörös összehasonlítások érdekében adekvát post-hoc tesztekkel végeztünk. az eltéréseket szignifikánsnak tekintettük, ha p kisebb volt, mint 0,05.

3.4. Eredmények

3.4.1. Plazma MDA szintek

Az MDA koncentrációja szignifikánsan nagyobb volt minden csoportban a kontrollokhoz képest. Szignifikánsan kisebb MDA szint volt mérhető a 3. (I/PPS/R) csoportban a nem diabéteszes kontrollhoz képest (2. csop –I/R). Diabéteszes állatokban a 8. csoport (DM PPS/I/R) mutatott szignifikáns csökkenést a kontrollhoz (6. csoport DM I/R) képest.

3.4.2. Redukált glutation szintek (GSH)

A GSH szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak minden csoportban az áloperált csoportokhoz képest. A 4. csoportban magasabb értéket mértünk a kontroll 2. csoportjához képest, de ez nem érte el a szignifikancia határát. Ugyanakkor a 3. csoportban szignifikánsan magasabb értéket mértünk a kontroll 2. csoportjához képest. A diabéteszes állatoknál a 8. csoportban mértünk szignifikánsan magasabb értéket a diabéteszes kontroll 6. csoportjához képest.

3.4.3. Plazma tiol csoportok (-SH)

A plazma tiol szintek szignifikánsan alacsonyabbak voltak minden csoportban az áloperált csoportokhoz képest. Mindkét kezelt, nem diabéteszes csoportban (3.4.) magasabb plazma tiol csoport szintet mértünk a kontroll 2. csoportjához képest, de ez nem érte el a szignifikancia határát. Ugyanígy nem volt szignifikáns eltérés a kezelt diabéteszes csoportoknál (7.8.) a diabéteszes kontroll csoportjához képest.

3.4.4. Szuperoxid dizmutáz (SOD) enzim aktivitása

Szignifikánsan magasabb SOD aktivitást mértünk a PPS előkezelt(4.) és magasabb, de nem szignifikáns emelkedést az egyszeri dózisban kezelt (3.) nem diabéteszes csoportban a kontrollhoz képest(2.). A diabéteszes csoportokban nem találtunk szignifikáns eltérést.

3.4.5. Szérum TNF- α szintek

A kísérletben megmértük a csoportok TNF- α szintjeit. Szignifikánsan alacsonyabb értéket mértünk egy egészséges (3.) és egy diabéteszes (8.) csoportban a kontroll csoportokhoz képest. Az iszkémia előtt, tartósan adott PPS védő hatása nem mutatható ki egészséges állatokban, míg diabéteszes állatokban ezen hosszantartó adás szignifikánsan csökkentette a szérum TNF- α szintet a kontrollhoz képest.

3.4.6. Szérum interleukin-1 (IL-1)

I/R szignifikánsan emelte a plazma IL-1 szintjét mind az egészséges, mind a diabéteszes állatokban az áloperált csoportokhoz képest. szignifikánsan alacsonyabb érték volt mérhető a 3. csoportban és a 8. csoportban a megfelelő kontrollokhoz képest. A hosszantartó előkezelés szignifikánsan csökkentette a plazma IL-1 szintjét diabéteszes állatokban(8.). Az érték megközelítette az áloperált (5.) állatokban mérhető IL-1 szintet. A reperfúzió előtt adott PPS (7.) számottevően nem csökkentette az IL-1 értékét a kontrollhoz képest (6.).

3.4.7. A proapoptotikus (bax) és antiapoptotikus (bcl-2) jelátviteli utak, és a DNS károsodás mértékének (p-p53) western blot vizsgálati eredményei

A proapoptotikus (bax) és antiapoptotikus (bcl-2) szignálmfehérjék meghatározásához western blot analízist végeztünk. Ugyancsak vizsgáltuk a DNS károsodás mértékére jellemző p-p53 szintet. Eredményeink azt mutatták, hogy jelentősen magasabb volt az expresszió a preoperatív adagolás(4.) esetén egészséges állatokban, míg diabéteszes állatok esetén mindkét adagolás (7.8.) csökkent expressziót eredményezett.

A bcl-2 expresszió jelentősen nagyobb volt PPS adagolás esetén mind diabéteszes, mind egészséges állatokban.

A p-p53 expresszió csökkent az előkezelés hatására normál és diabéteszes állatokban is. Ez a csökkenés, azonban nem volt észrevehető egyszeri PPS adagolás esetén az egészséges csoportban.

3.4.8. Szöveti eredmények

Az I/R kontroll csoportban a vese alap struktúrája változatlan, fibrózis nem tapasztalható. Szöveti elhalás is biztonsággal kizárható. A tubulusok kivezetőcsöveiben acidofil cilinderek láthatóak, melyek festődő fibrin jelentenek: az I/R következtében létrejövő plazmavesztés eredményei. A 3. kezelt csoportban szöveti eltérés nem tapasztalható, míg a 4. csoportban az előkezelés mellékhatásaként felfogható bevézések láthatóak.

Diabéteszes állatokban a tubulus epitél sejtek duzzanata észlelhető (7.), előkezelés hatására pedig (8.) mucinosus váladék retenciója észlelhető elhalás jelei nélkül.

3.5. Megbeszélés

Iszkémiás szerv revaszkularizációja reperfúziós károsodáshoz vezet, mely az iszkémiát követő vérellátás helyreállítására adott integrált válasz. Számos faktor képes befolyásolni ezt a választ, az oxidatív stressz mértékét és a következményes gyulladást. Függetlenül az iszkémia időtartamától, az érintett szövetek milyenségétől, mennyiségétől, az általános metabolikus állapottól (diabétesz, krónikus iszkémia, gyógyszerek stb.)

Az iszkémia az intracelluláris ATP szint csökkenéséhez, következményes hypoxantin szint emelkedéséhez vezet. Kísérletes bizonyítékok szolgálnak az ATP pótlás iszkémiás vesekárosodást csökkentő hatásáról nyulakban. Ismertették, hogy az ATP védő hatását NF- κ B aktiváció útján hozza létre a proximális tubulus sejtek P2Y receptorain keresztül. Jelentős intracelluláris ATP és az oxigén szint csökkenése a kalcium szint egyidejű intracelluláris emelkedésével képezi a fő tengelyét a vese I/R-nak.

Iszkémiában az endotél sejtek vazoaktív anyagokra adott válasza is változik. Számos szubsztráttal próbálták már az I/R mértékét csökkenteni, közülük jónéhány a NO szint befolyásolásával fejtette ki hatását. Egyes hatóanyagok, mint a sildenafil előnyös protektív hatást mutattak miokardium I/R-val szemben. Feltevések szerint a sildenafil endoteliális endogén mediátorok felszabadításával-mint a bradikinin, adenozin- vazodilatációt okoz, mely NO szintézis fokozása és következményes NO felszaporodás eredménye.

A reperfúziós károsodás, egy iszkémia által kiváltott kaszkád, mely oxigén szabad gyökök (ROS) termelődése által végső soron aktív gyulladáshoz vezet. A ROS kulcserepet játszanak az I/R. A reperfúzió korai szakában megjelenő oxigén hatására a xantin oxidáz által katalizált hypoxantin-xantin átalakulás töménytelen szabadgyök képződéshez vezet. A lipidperoxidáció kapcsán keletkező ROS membrán, fehérje, DNS károsodáshoz vezet. Az endogén antioxidáns rendszerek ezeket a károsodásokat próbálják kompenzálni, kivédeni.

Gyakorlatilag az összes sejt vagy szövetféle károsodhat a ROS által. Az egyik legérzékenyebb sejttípus a vörösvérsejt (vvt). I/R alatt a RBC membrán lipidperoxidációja fokozódik, mely következményes sejt deformitásokhoz vezet. A vvt-k deformabilitása létfontosságú a normál keringés, oxigén ellátás fenntartásához: elősegíti a vvt-k szűk kapillárisokon történő átjutását, csökkenti a vér viszkozitását és a nyírófeszültséget a nagyobb erekben.

Az I/R a mikrovaszkuláris apparátus szintjén két fő patomechanizmus által okoz károsodást. A „reflow” fenomént a megnövekedett ROS-k, aktivált gyulladást okozó kaszkád, fokozott endotél-leukocita aktiváció, adhézió és a fokozott kapilláris szivárgás következtében létrejött ödéma jellemzi. Emellett fellépő „no-reflow” fenomén részben az előbbi, részben pedig a kapillárisok direkt I/R létrejött károsodása. Végeredményben intravaszkuláris hemokoncentráció, trombózis, leukocita „dugók” jönnek létre, az endotél sejtek duzzadása, fellépő vazomotor diszfunkció tovább rontja a meglévő ödémát. Ebben a folyamatban az endotél sejtek integritásának megromlása létfontosságú, a megnövekedett intersticiális folyadék pedig a keringés további romlásához vezet.

Kísérletünk célja a PPS vese I/R-ra gyakorolt hatásának vizsgálata volt patkány modellben.

Ebben a tanulmányban igazoltuk először, hogy az iszkémiát követően, reperfúzió előtt adott nagy dózisú PPS képes volt csökkenteni a vese I/R-t egészséges patkány modellben. Továbbá az is bizonyítást nyert, hogy hosszantartó PPS adagolás egy későbbi I/R-t hatásosan csökkentett diabéteszes patkányokban. Az „előkezelés” előnyös hatását az oxidatív stressz paraméterek változása igazolta, mely nem volt észlelhető egészséges patkányokban. A gyulladáshoz való válaszreakciók hasonlóan alakultak. TNF- α , IL-1 szint szignifikáns változásai az endotél diszfunkció következménye.

Korábban már igazolták a PPS pozitív, agyi erek endoteliumára kifejtett védő hatását bakteriális infekciókkal szemben. Más tanulmány az aterogenezis folyamatával szembeni protektív hatását igazolta, az endotél regeneráció mértékének növelése által.

Jin Wu és társai igazolták, hogy a PPS képes volt a streptozotocin által indukált diabéteszes nefropátia progressziójának csökkentésére az albuminúria, makrofág infiltráció, TNF- α expresszió csökkentése révén. Véleményünk szerint a hosszantartó PPS „előkezelés” jelentős előnyökkel bír egy későbbi vese I/R kivédésében diabétesz állatok esetén, míg normál, egészséges állatokban ez a pozitív hatás nem észlelhető. Másrészt egy esetleges iszkémia alatt, reperfúzió előtt adott nagy dózisú PPS jeletősen csökkentette az I/R-t egészséges patkányokban.

Mindkét állatcsoportban észlelhető pozitív hatás magyarázata a gyulladáshoz való válasz és oxidatív stressz paraméterek csökkenésében kereshető. A különbségek oka feltételezésünk szerint az, hogy diabétesz esetén a fennálló folyamatos gyulladás, oxidatív stressz nem csökkenthető egyetlen dózisú PPS adásával, míg a hosszantartó kezelés már hatásosnak bizonyul.

A csökkent SOD enzimaktivitás is hasonlóképpen magyarázható a diabéteszes állatcsoportban.

A tiol csoportok nem szignifikáns változásai az I/R periódus rövid idejével magyarázható.

3.6. Következtetés

A vese I/R károsodása a mai napig jeletős morbiditási és mortalitási tényező, veseerek szintje fölötti aorta leztorítást igénylő, rekonstrukatív érműtétek esetén. Számos gyógyszeres és nem gyógyszeres eljárást próbáltak már, hogy csökkentsék a vese I/R-t, azonban a nem gyógyszeres, ún. műtét technikai eljárások, (mint pl: pre-, poszt-kondicionálás) nem terjedtek el széles körben a klinikumban. Oka valószínűleg a műtét idő megnövekedésében, így egyrészt a betegre mért fokozott terhelésben, másrészt a gazdasági hátrányaiban kereshető. A farmakológiai kondicionálás előnye pont ebben kereshető: nem növeli a műtét időt, nem jelent újabb technikai kihívást az operáló személyzet felé. PPS az európai klinikai gyakorlatban mint orális antikoaguláns terjedt el, míg az USA-ban az intersticiális cisztitis hatékony gyógyszere. Kísérletes bizonyítékok szolgálnak az oszteoartritiszes elváltozások csökkentésére is. Az általunk végzett kísérletek is alátámasztják jeletős gyulladáshoz való válaszreakciók csökkentő hatását, mely az ismert antikoaguláns hatása mellett effektív az I/R csökkentésében.

4. PPAR-gamma agonista hatása izolált perfundált vesében kialakult iszkémiás károsodásra

4.1. BEVEZETÉS

4.1.1. Transzplantáció, szervkonzerválás

Napjainkban a szervátültetés a legköltséghatékonyabb kezelés végstádiumban lévő veseelégtelenség esetén, míg olyan szervek végstádiumú elégtelensége esetén, mint a máj, a tüdő és a szív, az egyetlen rendelkezésre álló kezelés.

A cadaver szervkivételek esetén általában szükséges a szerv(ek) működőképességét megőrző eljárásokat alkalmazni. Ennek egyik oka, hogy bizonyos szervek (leginkább vese) esetén nem történik meg a donáció előtt a recipiens kiválasztása, hiszen a kiválasztáshoz szükséges immunológiai vizsgálatok a szervkivétel során eltávolított lépdarabból történnek. Ezért a szervkivételt követően még órákra van szükség a beültetés megkezdéséhez a recipiens kiválasztására, behívására és kivizsgálására. Máj- és szívtranszplantáció esetén a betegek kiválasztása már a donáció előtt megtörténik vércsoport kompatibilitás és testméreti hasonlóság alapján.

Másik oka, hogy a donor és a recipiens földrajzilag eltérő helyen tartózkodik, így a szerv eltávolítása után a donorkórházból el kell szállítani a beültetésre szánt szervet a transzplantációs központba. Az átültetés céljából eltávolított szervek működőképességének fenntartásához több módszert kell együttesen alkalmazni. A szervet hűteni kell, hogy a sejtek anyagcseréje a minimálisra csökkenjen a kivétel és beültetés közötti időben. A másik kötelezően alkalmazott szervprezervációs eljárás a konzerváló oldatok alkalmazása. A szervkivétel során olyan összetételű – kifejezetten ilyen célra gyártott oldattal mossák át a szerveket saját erein keresztül – amely hasonló a szerveket alkotó sejtek belső összetételéhez. Különböző szervekhez különböző típusú oldatok használatára van lehetőség. A folyamatos gépi perfúzió egyik alternatív formája a klinikai transzplantációnak. Számos oldat alkalmazható a szervek prezerválására, úgymint Euro-Collins, Ross-Marshall, illetve az University of Wisconsin (UW) oldat. Az UW oldat mondhatni „gold-standardnak” minősül, alkalmas máj, vese és pancreas perfúziójára, és mind klinikai, mind kísérletes modellben kiváló eredményeket mutatott. Sajnos az UW oldat sem minősül a legjobb megoldásnak. Az oldat hátránya a magas viszkozitás, drága, valamint endothelialis diszfunkciót okozhat. A két módszer lehetővé tette a szervek szállítását és néhány óráig történő tárolását a transzplantációig. Ezt a köztes időszakot nevezzük hideg ischaemiának, mialatt a szerv hűtött állapotban és vérkeringés nélkül kerül tárolásra. Ezt a tárolást a különböző szervek különböző ideig képesek tolerálni, ez az ún. ischaemia tolerancia, így hideg ischaemiában 0 °C-on a vese 24-36 órát bír ki károsodás nélkül. A hypothermia önmagában is károsító tényező, így rizikó faktort jelent a szerv működésének beindulását és hosszú távú funkcióját illetően, ezért célszerű a lehető legrövidebb hideg ischaemiás időre törekedni. Veseátültetés esetében a 24 órás hideg ischaemiás idő elfogadható, mert abban az esetben, ha a beültetett vese nem kezd el azonnal működni, funkciója dialysissel helyettesíthető.

Az ischaemiás sérülés következtében kialakuló renalis dysfunctio klinikai megjelenése a vese érintett részeiben bekövetkező sejtelhalás mértékétől függ. Sejt elhalás bekövetkezhet közvetlenül a hypoxiás állapot hatására az ischaemiás periódus alatt, azonban sok sejt éppen a reperfúziót követően pusztul el. Schumer vizsgálatai rámutattak arra, hogy az ischaemiát követő reperfúzió alatt létrejött renalis károsodásban az apoptosishoz is szerepe van. Elmondható, hogy az átültetés sikeréhez tehát nagyban hozzájárul a szerv kivételi technikája, a szerv megfelelő konzerválása, mert mindez alapvetően befolyásolhatja a transzplantáció rövid illetve hosszú távú kimenetelét. A megfelelő technikák alkalmazásával minimalizálni lehet az ischemias, valamint a reperfúziós károsodásokat, ezzel javítva a grafterként alkalmazott szerv utólagos funkcióját, élettartamának prognózisát.

4.1.2. Izolált vese perfúziós rendszer

Az izolált vese perfúziós rendszerrel (IVPR) kapcsolatos tanulmányok a 20. század első évtizedeire vezethetők vissza. Az IVPR alkalmazásával lehetőség nyílik a vese fiziológiájának, patofiziológiájának, valamint farmakológiájának tanulmányozására. A vese olyan szerv, amely talán a legkönnyebben perfundálható, ami anatómiai sajátosságából adódik, mivel egyetlen nagy és jól hozzáférhető artéria vezet hozzá. Az IVPR egy olyan kísérleti modell, amely lehetővé teszi, a vesén keresztül áramló perfúziós nyomás kontrollálását, valamint szabályozható a rendszerbe juttatott anyagok koncentrációja is. Az elmúlt évtizedekben az IVPR alkalmas modellnek bizonyult a vesék transzplantációjának kísérletes vizsgálatára, hogy olyan eljárásokat fejlesszenek ki, amik a szervátültetés után a szerv funkciójának javítására szolgálnak, valamint hasznos lehet a donorokból kivett szerveken végzett különböző prezervációs technikák felállításában is. Az IVPR készítése során törekednünk kell arra, hogy a perfundálni kívánt vese mindvégig intact maradjon, megőrizve ezzel a funkcióját a perfúzió során. Az IVPR során alkalmazott típusos perfúziós médium a Krebs-Henseleit oldat (KHO). Az oldat ionösszetételének kvalitatíve és kvantitatíve is le kell képeznie a szervezet extracelluláris ionmilióját, különös tekintettel a Na^+ , a K^+ és a Ca^{2+} ionokra. A perfúziós oldatnak ezen túlmenően megfelelő ozmolaritásúnak (300 mosmol) kell lenni, valamint pufferkapacitással (CO_2 , HCO_3 rendszer) kell rendelkezni a fiziológiás $7,40 \pm 0,05$ -as pH fenntartásához. Az oldat egyenletes 37°C -os hőmérsékletét a termosztálórendszer biztosítja. A médium egyik legnagyobb előnye, hogy az elkészítéséhez szükséges komponensek szinte minden laboratóriumban elérhetőek, így gazdaságosan el lehet készíteni magát az oldatot.

4.1.3. PPAR- γ agonista

Szintetikus PPAR- γ agonisták (PPAR- γ Ago) a nem inzulinfüggő diabetes mellitus kezelésében használt orális antidiabetikumok egy csoportja is.

Új keletű evidenciaként tartjuk számon, hogy a PPAR- γ aktiváció képes szabályozni a gyulladáshoz való válaszreakciókat, receptor-függő transzrepresszió révén képes számos proinflammatorikus molekula expresszióját gátolni. A reaktív oxigén eredetű szabadgyökök fő forrása a mitokondrium, ezen belül is a légzési lánc I-es és III-as komplexe. Nemrégiben bizonyítást nyert, hogy a rosiglitazon és a pioglitazon képes gátolni a légzési lánc I-es és III-as komplex aktivitását. A PPAR- γ Ago részlegesen szétkapcsolja a mitokondriális légzési láncot, ez érinti az elektrontranszportot és a szuperoxid termelést is. A legfrissebb kutatások leírtak egy új mitokondriális célfehérjét, melyen a PPAR- γ Ago-k kifejthetik hatásukat (mito-NEET). A mito-NEET-ről bizonyítást nyert, hogy kapcsolatban áll a III-as komplex komponenseivel, ez

magyarázhatja a PPAR- γ Ago-k kötődési képességét a mito-NEET-hez, így szelektíven képesek blokkolni különböző mitokondriális célmolekulákat. A PPAR- γ Ago-k ezen hatása, hogy képesek befolyásolni a mitokondriumok funkcióját, magyarázhatja reaktív oxigén intermedierek hatásukra történő csökkent képződése.

Ezen folyamatok mellett a PPAR- γ Ago-ák iszkémia-reperfúziós károsodásokkal szembeni jótékony hatásáról több közlés is született a bél, tüdő, szív, vese és agy tekintetében.

4.2. CÉLKITÚZÉS

Kísérletünkben izolált vese perfúziós rendszer alkalmazásával arra a kérdésre kerestünk választ, hogy az ischaemia alatt milyen károsodások érik a vesét, és milyen módon lehetne ezeket a folyamatokat megelőzni, megakadályozni, ezáltal az átültetendő szerv minél tökéletesebb korai és késői funkcióját biztosítani a transzplantáció során. A perfúziós rendszerben alapoldatként Krebs-Henseleit oldatot alkalmaztunk, és az oldathoz PPAR- γ agonistát, valamint PPAR- γ agonista inhibitorot adtunk. Előzetes kutatásokat követően olyan ischaemiás időt választottunk, amelynek során a vese tubulusaiban már megfigyelhető minimális károsodás, de a tubulus sejtek nagy része még ép. Ezt az időtartam 30 percnél felel meg, az általunk alkalmazott perfúziós idő 60 perc volt, így a mintáink értékelésénél biztosan számíthatunk ischaemias károsodásra.

Jelen kísérletünk célja az, hogy a vesének a transzplantációban is kulcsfontosságú hideg ischaemia toleranciája javítható-e a szerv folyamatos, kontrollált nyomású, oxigenizált perfúziójával, ill. a rendszerbe juttatott PPAR-gamma agonista (PPAR- γ Ago) adásával. Az ischaemia okozta strukturális károsodásokat fénymikroszkóppal, az apoptotikus/antiapoptotikus jelátviteli utak során expresszáldott fehérjéket Western-blottal kívánjuk vizsgálni.

4.3. ANYAGOK és MÓDSZEREK

4.3.1. Műtéttechnikai módszer

A vizsgálatokhoz 40 darab felnőtt, hím Wistar laboratóriumi patkányt használtunk. A narkózt intraperitoneálisan bólusban adott ketamin és diazepam 1:1 arányú keverékével végeztük. A kísérleti állatot hátára fektetve, laparotómiát követően mobilizáltuk a mezenterialis gyököt, meggyőződünk a vesék kb. azonos nagyságáról, illetve azonosítottuk az ellátó ereket (a. és v. renalis), majd az infrarenalis aortaról a kötőszövetes réteget leválasztottuk, így mobilizáltuk a v. cava inferiortól. Na-heparint juttattunk a keringésbe, majd egy percet vártunk.

A bifurcatio aortae magasságában kirekesztettük a keringést, majd atraumatikus microklipp segítségével az a. renalis oszlása alatt lefogtuk az aortát, retrográd módon kanült helyeztük a lumembe és rögzítettük. A kanül behelyezését követően a jobb oldali vesét lekötöttük, majd a suprarenalis aortát is aláöltöttük. A jobb oldali a. és v. renalist, a v. cava inferiort, az urethereket, valamint a suprarenalis aortát a lekötés felett átvágtuk, így teljes mértékben mobilizálhatóvá vált a bal oldali vese, az állatból kiemeltük és azonnal jeges vízbe helyeztük, majd a kanülon keresztül a perfúziót megindítottuk. A jeges víz hőmérsékletét (0 °C), valamint a perfúziós nyomást (125-135 Hgmm) folyamatosan ellenőriztük és fenntartottuk.

4.3.2. Kísérleti csoportok

Az állatokat a perfúzióra használt médium alapján négy csoportba osztottuk és 1 órán keresztül tartó perfúziót indítottunk:

1.csoport: az állatok veséjét 1 órán keresztül a jeges vízbe tettük, itt perfúzió nem történt (kontroll csoport).

2.csoport: az állatok veséjét jeges vízbe tettük, majd KHO-t perfundáltunk keresztül rajtuk.

3.csoport: a veséket jeges vízbe tettük, a perfúzió során a perfundált médium KHO-t és PPAR- γ Ago-t (1mM) tartalmazott.

4.csoport: a veséket szintén itt is jeges vízbe tettük, a perfúziós oldat KHO-t, PPAR- γ Ago-t (1mM) és PPAR- γ Ago Inh-t (1mM) tartalmazott.

4.3.3. Mintavétel

Az egy órás perfúziót követően az egyes csoportokon belül két részre osztottuk a vesemintáinkat. A vesék egy részét 10%-os neutralis formalinba fixáltuk, míg a másik részét homogenizáltuk.

4.3.4. Fénymikroszkópos vizsgálat

Csoportonként a veséket 10%-os neutrális formalinban fixáltuk, majd felszálló alkoholsorban víztelenítettük és paraffinba ágyasztuk. A paraffinba ágyazott blokkokból a vese keresztmetszete mentén készült 5µm vékony metszeteket haematoxin-eosinnal (HE) festettük meg és fénymikroszkóppal vizsgáltuk.

4.3.5. Fehérje-expressziós vizsgálat

A Western-blot vizsgálat során apoptotikus és antiapoptotikus fehérjék kimutatását végeztük. Az apoptotikus fehérjék közül a Bax és p53 fehérjék expresszióját, míg az antiapoptotikusak közül a Bcl-2 fehérjét vizsgáltuk.

4.4. EREDMÉNYEK

4.1. Fénymikroszkópos vizsgálat eredményei

A csoportok fénymikroszkópos kiértékelését követően megállapítottuk, hogy főként a korai, reverzibilis ischaemias károsodás jelei láthatóak, a vesék struktúrája részben megtartott. Súlyos morfológiai változásokat nem lehetett kimutatni.

A PPAR-γ Ago kezelés érzékelhetően képes volt a strukturális károsodásokat enyhíteni. A rendszerhez adott PPAR-γ Ago kezelés mellett minimális eosinophilia megfigyelhető a tubuláris epithelsejtekben, azonban a celluláris vakuolizáció, sejtduzzadás nem látható.

4.2. Western- blot

Bax (23 kDa)

A Bax fehérje esetében az 1. csoportban, ahol nem történt perfúzió, jól kivehető a nagymértékű fehérje expresszió. Ezzel szemben a 3. csoportban, ahol PPAR-γ Ago kezelés történt, jelentősen csökkent a fehérje expressziója. A 2. és 4. csoportban közel azonos mértékű volt a fehérje megjelenése.

p53 (53 kDa)

Az apoptotikus fehérje expressziója hasonlóképpen viselkedett, mint a korábban leírt Bax fehérje. Itt is megfigyelhető a fehérje domináns megjelenése az 1. csoportban. Hasonló mennyiségű fehérje expresszálódott a 2. és a 4. csoportban. A PPAR- γ Ago kezelésben részeült 3. csoportban szintén kisebb mértékű volt az apoptotikus fehérje kimutatása.

Bcl-2 (26 kDa)

Az antiapoptotikus Bcl-2 expressziója nem változott az egyes kísérleti csoportoknak megfelelően. A fehérje mennyisége viszonylag azonos maradt a kísérlet ideje alatt.

4.5. MEGBESZÉLÉS

Az általunk végzett kísérletben izolált vese perfúziós rendszerben dolgoztunk, ahol a transzplantációkor is kulcsfontosságú ischaemias károsodást vizsgáltuk patkányokból kivett, majd perfundált veséken. Kísérletünk célja az volt, hogy miként tudjuk a vese ischaemia toleranciáját növelni, valamint szerkezetét intact módon megőrizni. A rendszerben az alaperfúziós médiumként a Langerdorff által kidolgozott Krebs-Henseleit oldatot használtuk, amihez a csoportoknak megfelelően PPAR-gamma Ago-t és PPAR-gamma Ago Inh.-t adtunk. A perfúziót 1 órán keresztül folytattuk.

A rendszerünk feltételezett egyetlen noxája az ischaemia volt. Az 1 órás perfúziót követően fénymikroszkópos és fehérjeexpressziós vizsgálatokkal mutattuk ki az ischaemia szerkezeti változásait, valamint az ischaemia indukálta preapoptotikus/apoptotikus/anti-apoptotikus fehérjék expresszióját.

A kezeletlen (kontroll) csoportban, ahol nem történt perfúzió, a szövetszövetminták esetén jelentős eltérést találtunk, szövettanilag detektálhatóan súlyosabb károsodást szenvedtek. Itt a korai (reverzibilis) ischaemia szövettani megjelenése volt fellelhető a metszeteken. A 2. és 4. csoportban enyhébb károsodás volt megfigyelhető: fokozott eosinophilia jelenik meg a tubularis sejtek citoplazmájában tubulusok sejtduzzadása nélkül.

A reverzibilis sejtkárosodás fő oka az oxigén hiány. Oxigén hiányában a mitokondriumok működése lecsökken, nem termelődik ATP, a membránpotenciált fenntartó pumpák működése ATP hiányában leáll. A pumpa működés megszűnésének másik következménye a sejtduzzadás, mivel a beáramló nátriumot követi a víz is. HE-festéssel kimutatható a fokozott eosinophilia. Ennek az oka az, hogy a cytoplasma RNS mennyisége csökkent, illetve a proteinek denaturálódnak.

Az általunk PPAR- γ agonistával kezelt csoport (3. csoport) szövettani képén nem látható durva eltérés a vese egészséges hisztológiai képéhez képest. Helyenként látható egy-két eosinophil sejt a tubularis epithelsejtek között. Sejtduzzadás, ödéma azonban nem figyelhető meg. Az szövettani elemzéskor durva, necrotikus morfológiai eltéréseket nem találtunk. A hisztológiai metszetek tanulmányozásakor kifejezetten a reverzibilis, azaz a korai ischaemia jeleit kerestük, hiszen ezek a változások körülbelül az ischaemia kezdetétől 30-40 perc múlva biztosan kimutathatóak.

A Western-blot során három különböző fehérje expresszióját vizsgáltuk: a proapoptotikus Bax, az apoptotikus p53 és az anti-apoptotikus Bcl-2 fehérjét. Az apoptotikus sejthalál kiemelkedő szerepet játszik a vese ischaemia indukálta károsodása esetén (*Saikumar és Venkatachalam, 2003*). A renalis ischaemia esetén már 5-10 perccel a reperfúzió után aktiválódnak a különböző proapoptotikus és apoptotikus jelátviteli utak (pl: p38 MAPK és JNK útvonalak) (*Yin et al., 1997*).

A kontroll csoportnál (1. csoport) domináns megjelenésű volt a Bax és p53 fehérjék expressziója. A 2. és 4. csoportban valamelyest kevésbé expresszáldtak ezek a fehérjék. Az antiapoptotikus Bcl-2 fehérje a kísérlet sorozat alatt nem mutatott eltérést. A fehérje mindegyik csoportban egyformán expresszáldott. A Bcl-2 expressziója nem feltétlenül változik azonnal az ischaemia kialakulását követően az egyéb apoptotikus jelátviteli folyamatokkal együttesen.

A vese izolált rendszerben történő perfúziós modell során létrejövő ischaemias károsodás után az eltávolított veseminták Western-blot vizsgálata azt mutatta, hogy a perfúziós médiumhoz adott PPAR- γ agonista kezelés képes volt csökkenteni az ischaemia indukálta preapoptotikus, valamint apoptotikus Bax és p53 fehérje szintjét.

Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a PPAR- γ agonista alkalmazása izolált vese perfúziós rendszerben a kialakult ischaemiát követően csökkentette az ischaemia indukálta reverzibilis, strukturális elváltozásokat, valamint az ischaemia indukálta apoptotikus jelátviteli folyamatokat.

Az általunk adott PPAR- γ agonista nem fokozta a Bcl-2 expresszióját.

Az alpmédiumként alkalmazott Krebs-Henseleit oldat számottevően nem befolyásolta a korai (reverzibilis) ischaemias károsodás szerkezeti megjelenését a 2. és 4. csoportban.

4.6. KÖVETKEZTETÉS

A szervtranszplantáció klinikai megvalósulása a XX. század orvostudományának egyik legfontosabb előrelépéseként értékelhető, melynek sikeréhez mind az alap kutatások eredményei, mind a klinikai kutatások hozzájárultak. A szervtranszplantáció során ugyanakkor káros mellékhatásokkal is kell számolnunk, melyek a transzplantáció sikerét döntően befolyásolják. A legjelentősebb pathophysiológiai jelensége az ischaemia-reperfusio, vagy akár az ischaemia önmagában is, mely elkerülhetetlen velejárója, mind az élő donoros, mind a cadaver szerv transzplantációjának. Szervtranszplantáció esetében a graftot ért iszkémiás károsodás mai ismereteink szerint a korai és késői graftműködés egyik legfontosabb ún. nem-alloantigén függő rizikófaktora. A donorból eltávolított szerv az azonnali hűtés és gondos perfundálás ellenére is az iszkémiás károsodás jeleit mutatja. Az iszkémia okozta akut vesekárosodás egymással összefüggő kaszkád mechanizmusok sorából áll, melyek akut és krónikus következményekkel járhatnak. Vesetranszplantáció esetén számos faktor tehető felelőssé azért, hogy a vese működése azonnal vagy csak késve indul meg. Ezek közül egyik legfontosabb faktor az ischaemia, melynek során a vese tubulus sejtek károsodnak. A tubulus sejtek funkcionális kapacitása szignifikánsan hozzájárul az adekvat veseműködéshez. Ez azt jelenti, hogy a vesetranszplantáció sikere érdekében törekednünk kell a tubulus sejtek épségének megőrzésére. A szervdonáció során az ischaemias károsodás kialakulásának megakadályozására talán az egyik legjobb módszernek a szervek perfúziója bizonyul. A gyakorlatban használt perfúziós folyadéknak számos követelménynek kell megfelelnie. Legfontosabb, hogy biztosítsa a perfundált szerv továbbélését az izoláció után. Ehhez tartalmaznia kell egyrészt megfelelő mennyiségű oldott oxigént, valamint a szerv funkciójához nélkülözhetetlen tápanyagokat és ionokat.

Jelen kísérletünkben bal oldali patkány veséket izoláltunk és perfundáltunk. Az általunk alkalmazott perfúziós folyadék Krebs-Henseleit oldatot, PPAR- γ agonistát, és PPAR- γ agonista inhibitor tartalmazott.

A PPAR- γ a nukleáris receptor szupercsalád tagja és olyan transzkripciós faktor, mely a szabályozandó gén enhancer régiójának specifikus peroxiszóma proliferátor reszponzív

elementjeihez kötődik. Számos folyamatban vesznek részt, mint például a zsírsejt differenciáció irányításában, az inzulin- szenzitivitás és gyulladási folyamatok szabályozásában, valamint a makrofágok proinflammatorikus mediátor-termelésének down-regulációjában. A PPAR- γ Ago-ák iszkémia-reperfúziós károsodásokra gyakorolt hatását már közölték vékonybélben, tüdőn, szíven, vesén és agyszöveten, valamint nem régen demonstrálták a PPAR- γ Ago-ák iszkémia-reperfúziós károsodásokra gyakorolt pozitív hatását in-vivo alsó végtagi vázizom modellen. (Nagy T. és mtsai., 2015.)

Az apoptózis igen fontos szerepet játszik a teljesen kifejlődött organismusok sejtjeinek egyensúlyának fenntartásában. Kimutatott tény, hogy az apoptózis előfordul a renális tubularis epithelialis sejtjeiben rövid vese ischaemiát követő reperfúziós fázisban.

Kísérletünkben egyrészt vizsgáltuk a PPAR- γ agonista hatását izolált vese perfúziós rendszerben, hogy miként hat az ischaemia indukálta strukturális károsodásokra, ilyen módon növelhető-e a transzplantációban is kulcsfontosságú szerepet játszó vese szövet ischaemia toleranciája. Másrészt az apoptosist megjelenését kívántuk kivédeni a rendszerbe juttatott PPAR- γ agonistával.

A kísérletünk eredményei alapján megállapíthatjuk, hogy a PPAR- γ agonista alkalmazása izolált vese perfúziós rendszerben történő perfúziót követően csökkentette az ischaemias károsodások mértékét. Fénymikroszkópos vizsgálataink igazolták, hogy a PPAR- γ agonista képes csökkenteni az ischaemia okozta strukturális szöveti károsodásokat. A proapoptotikus, valamint az apoptotikus fehérjék expresszióját is csökkentette a PPAR- γ agonista alkalmazása.

A fent összefoglalt eredményeink alapján megállapíthatjuk a PPAR- γ agonista renoprotektív hatását az ischaemia indukálta strukturális károsodás, valamint apoptotikus folyamatok visszaszorításával izolált vese perfúziós rendszerben.

5. ÚJ EREDMÉNYEK

Első kísérletünkben a különböző módon adagolt pentozán poliszulfát nátrium, vese iszkémiás-reperfúziós károsodásra gyakorolt hatásait vizsgáltuk állatmodellen. Kísérletünk második felében természetes PPAR gamma agonista vese hideg iszkémiás-reperfúziós károsodásra gyakorolt hatásait vizsgáltuk izolált szervperfúziós modellen.

Kísérleteink végeztével 5 fontos következtetést vonhattunk le:

Elsőként demonstráltuk in- vivo állatkísérletben, hogy alacsony dózisú, hosszantartó, intravénás PPSN adása jótékony hatású egy későbbi, akut vese iszkémiás károsodás csökkentésében diabéteszes patkányok esetén, míg ez az előny nem észlelhető nem diabéteszes, normál patkányoknál.

Elsőként irtuk le, hogy iszkémiás károsodást követően, reperfúzió előtt adott egyszeri, nagy dózisú, intravénás PPSN csökkenteni képes az iszkémiás-reperfúziós károsodás következtében kialakuló lipid peroxidációt, gyulladásos válaszreakciót normál, nem diabéteszes patkány esetén,

azonban iszkémiás-reperfúziós károsodást megelőzően, hosszantartó, alacsony dózisú intravénás PPSN nem képes befolyásolni egy később bekövetkező iszkémiás-reperfúziós károsodást ezen normál patkányok esetén.

Elsőként demonstráltuk, hogy nem szintetikus PPAR gamma agonista alkalmazása izolált vese perfúziós rendszerben képes csökkenteni a hideg iszkémia által kiváltott, korai reverzibilis, strukturális eltéréseket és az iszkémia által aktiválódott apoptotikus szignál jelátviteli fehérjék mennyiségét.

Igazoltuk, hogy a standard Krebs-Henseleit oldat használata szignifikánsan nem befolyásolja az iszkémiás vese korai, reverzibilis károsodását izolált vese perfúziós állatmodellben.