

Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar
Egészségtudományi Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bódis József az MTA doktora, egyetemi tanár, dékán

A vékonybél autotranszplantáció kísérletes vizsgálata és szerepe az életminőségre

Habilitációs előadás

Dr. Ferencz Andrea PhD

PTE ÁOK Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

Pécs, PAB Székház, 2010. május 20.

TÖRTÉNELMI ÁTTEKINTÉS

- 1902 Carrel: első kísérletes béltranszplantáció (Lyon Medico 1902;98: 859-64.)
- 1959 Lillehei: orthotopikus vékonybél átültetés kutyákon (Ann Surg 1959;150: 543-60.)
- 1971 Monchik, Russel: heterotopikus transzplantáció patkányon (Surgery 1971;70: 693-702.)
- 1960-80 Első klinikai próbálkozások Európában és az USA-ban
- 1988 Grant: első sikeres human béltranszplantáció, melyet cadaver donorból Cyclosporin védelmében végzett el (Lancet 1990; 335: 181-4.)
- 1992 Új immunosuppresszáns, a tacrolimus (FK506) bevezetése a vékonybél transzplantációban (Ann Surg 1995; 222: 270-82.)
- 1994 Intestinal Transplant Registry létrehozása

THE INTESTINAL TRANSPLANT REGISTRY

Argentína: 2
Ausztria: 1
Belgium: 3
Brazília: 2
Kanada: 4
Chile: 1
Kína: 5
Kolumbia: 1
Nagy-Britannia: 4
Franciaország: 2
Németország: 4
Olaszország: 4
Japán: 3
Mexikó: 1
Hollandia: 1
Portugália: 1
Spanyolország: 1
Svédország: 4
Svájc: 1
Törökország: 1
USA: 31

21 ország 77 centrumában történik vékonybél v. multiviscerális transzplantáció.
Recipiensek és a graftok 1 éves túlélése 60-65%,
5 éves túlélése 60% alatt.

Magyarországi klinikákon nincs bélátültetés.
A témában 1-2 kutatóhelyen folynak vizsgálatok

VÉKONYBÉL TRANSZPLANTÁCIÓ INDIKÁCIÓI

Gyerek	Felnőtt
Aganglionosis (Hirschsprung disease)	Crohn's disease
Congenital epithelial mucosal disease	Desmoid tumors
Gastrochisis	Gardner's syndrome/familial polyposis
Intestinal atresia	Ischemia
Necrotizing enterocolitis	Trauma
Radiation enteritis	Volvulus
Volvulus	Inflammatory bowel disease
Short gut syndrome	Hollow visceral myopathy
	Radiation enteritis
	Secretory diarrhea
	Autoimmune enteritis
	Short gut syndrome

Több mint 75%-nak hiánya (rezekciója) és/vagy működészavara

Malabsorpciós szindróma

Totál parenterális táplálás (1969-)

1 éves túlélése 75-90%

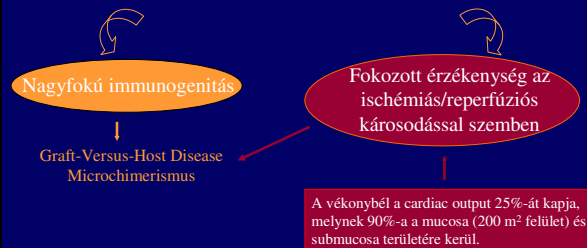
Szövődmény:

- cholestasis,
- irreverzibilis májkárosodás (fibrózis),
- rekuráló szepszis,
- trombózis

Transzplantáció

A KUTATÁS ALAPJA

A vékonybél transzplantáció sikerét befolyásoló tényezők

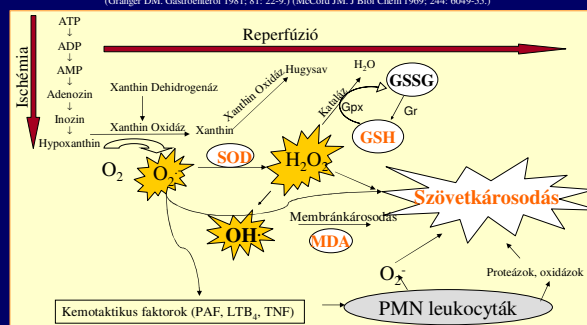


A KUTATÁS FŐ IRÁNYVONALAI

1. A bélszövet oxidatív károsodása meleg ischémia és reperfúzió hatására
2. A bél ischémiás/reperfúziós károsodásának mérséklése hideg konzerválással
3. A vékonybél ischémiás prekondicionálása
4. Differenciál Scanning Kalorimetriás vizsgálatok
5. PACAP-al végzett vizsgálatok
6. A vékonybél ischémiás posztokondicionálása

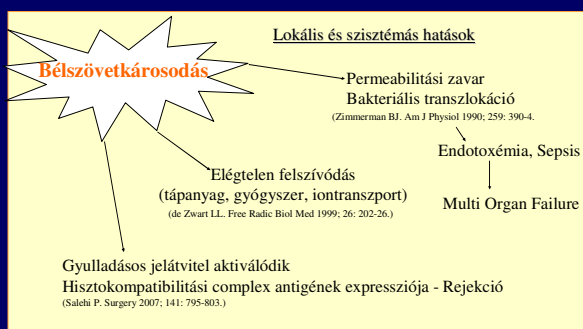
A BÉLSZÖVET OXIDATÍV KÁROSODÁSA MELEG ISCHÉMIA ÉS REPERFÚZIÓ HATÁSÁRA

(Granger DM. Gastroenterol 1981; 81: 22-9.) (McCord JM. J Biol Chem 1969; 244: 6049-55.)



Az ischémiás szövetkárosodást elsősorban az OFR-s okozzák, melyek a reperfúzió alatt felszaporodnak. Az endogén védelem elégtelenné válik, kialakul az oxidatív stressz állapota membránkárosodásokkal, permeabilitás fokozódásával, transzportfolyamatok zavarával. (Ferencz et al. Magyar Seb 1999; 52: 205)

A BÉLSZÖVET OXIDATÍV KÁROSODÁSA MELEG ISCHÉMIA ÉS REPERFÚZIÓ HATÁSÁRA



A BÉLSZÖVET OXIDATÍV KÁROSODÁSA MELEG ISCHÉMIA ÉS REPERFÚZIÓ HATÁSÁRA

KÉRDÉSEINK

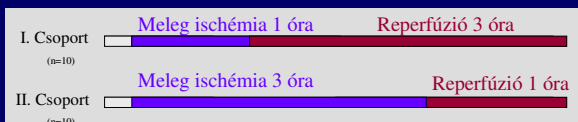
Milyen mértékű oxidatív károsodás lép fel különböző időtartamú meleg ischémia/reperfúzió esetén?

Hogyan változik a bélszövet morfológiája?

A BÉLSZÖVET OXIDATÍV KÁROSODÁSA MELEG ISCHÉMIA ÉS REPERFÚZIÓ HATÁSÁRA

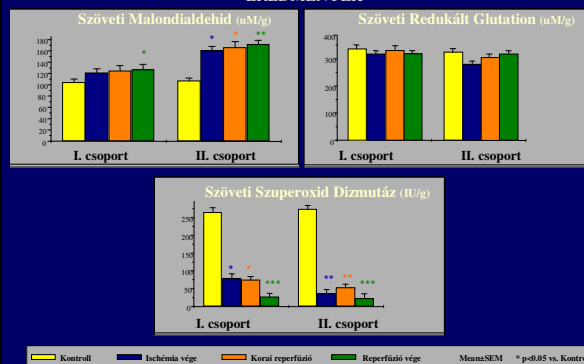
ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti protokoll: Keverék kutyákon (n=20) meleg ischémia/reperfúzió vizsgálata

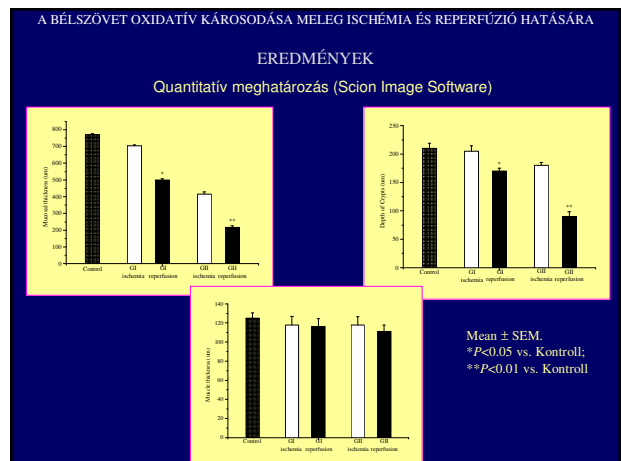


A BÉLSZÖVET OXIDATÍV KÁROSODÁSA MELEG ISCHÉMIA ÉS REPERFÚZIÓ HATÁSÁRA

EREDMÉNYEK



(Ferencz et al. Folia Hepatologica 2001; 6: 28.)



KÖVETKEZTETÉS

Vékonybél 1 órás meleg ischémiája fokozta a membránkárosodást és csökkent az endogén antioxidáns kapacitás, melyet főként a SOD aktivitásának drámai csökkenése jelzett.

Az oxidatív stressz 3 órás meleg ischémia hatására tovább fokozódott.

A reperfúzió alatt a káros mechanizmusok tovább nőttek.

A mucosa és crypta károsodás szignifikáns volt mind az 1, mind a 3 órás csoportokban.

Az izomban jelentős morfológiai eltérést nem találtunk.

A KUTATÁS FŐ IRÁNYVONALAI

1. A bélszövet oxidatív károsodása meleg ischémia és reperfúzió hatására
2. A bél ischémiás/reperfúziós károsodásának mérséklése hideg konzerválással
3. A vékonybél ischémiás prekondicionálása
4. Differenciál Scanning Kalorimetriás vizsgálatok
5. PACAP-al végzett vizsgálatok
6. A vékonybél ischémiás posztkondicionálása

KONZERVÁLÓ OLDAT/HIDEG ISCHÉMIÁS IDŐ

1976 Collins fejlesztette oldat
1976 Eurotransplant Organisation módosította Collins oldatát
1986 University of Wisconsin oldat bevezetése

EC, UW, HTK a leggyakrabban használt konzerválásra.

Ma sincs kialakult álláspont, hogy melyik oldat a bél számára optimális. (Wei L. World J Gastroenterol 2007; 13: 3684-91.)

1999. A kutatások során nem alakult ki konszenzus abban a tekintetben sem, hogy mennyi a bél számára elviselhető leghosszabb hideg ischémiás idő.

2007. 6-8 óra maximális hideg ischémiás idő

A klinikum számára ma is az az ajánlás, hogy a vékonybél hideg ischémiás idejét a minimumra kell csökkenteni, és mielőlt lehet át kell ültetni.

Az EC és UW oldat összetétele		
Tartalom (mmol/l)	EC oldat	UW oldat
Glukóz	198	-
Laktobióz	-	100
Raffinóz	-	30
Foszfát puffer	100	25
Bikarbonát puffer	10	-
Allopurinol	-	1
Adenozin	-	5
Glutatin	-	3
Hydroxetil keményítő (kollod)	-	50 g/L
Na ⁺	10	30
K ⁺	115	120
Mg ²⁺	-	5
pH	7.2	7.4
Osmolalitás (mOsm/L)	355	320

(Müllbacher F. Transplant Proc. 1999; 31: 2069-70.)

A BÉL ISCHÉMIÁS/REPERFÚZIÓS KÁROSODÁSÁNAK MÉRSÉKLÉSE HIDEG KONZERVÁLÁSSAL

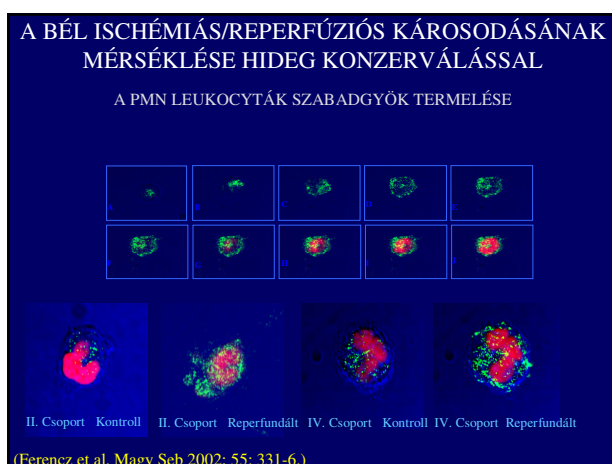
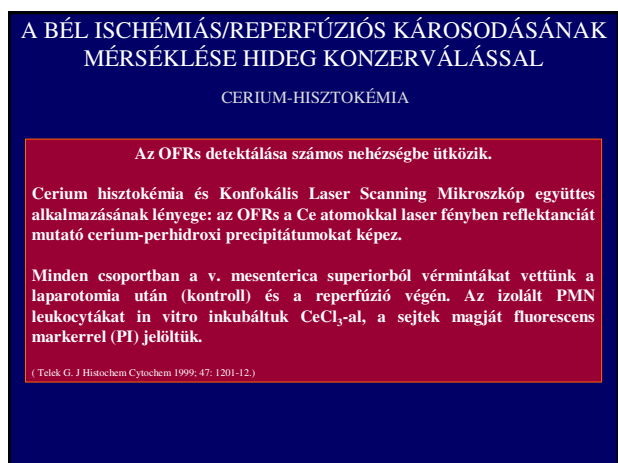
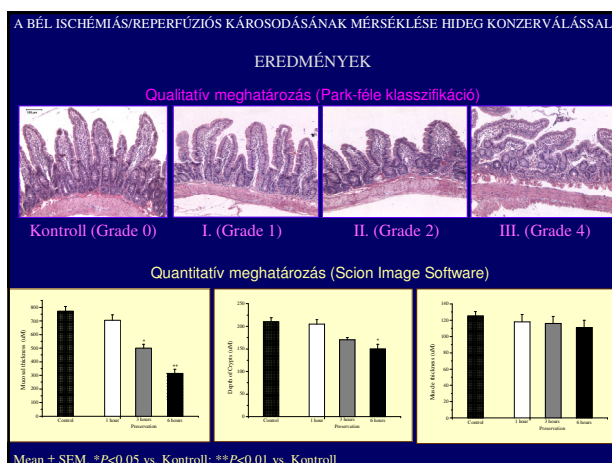
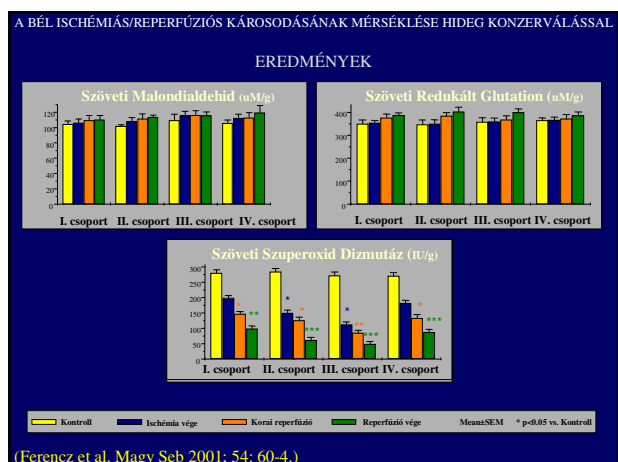
KÉRDÉSEINK

Milyen mértékű oxidatív károsodás lép fel különböző időtartamú hideg konzerválás és reperfúzió esetén ?

Hogyan változik a bélszövet morfológiája?

Milyen mértékű a PMN leukocyták szabadgyökök termelése?

Hideg konzerválás hatására hogyan változik a programozott sejthalál mértéke?



KÖVETKEZTETÉS

Vékonybél hideg konzerválása mérsékelte mind a kialakuló oxidatív, mind a morfológiai károsodásokat.

Modellünkben az EC és UW oldatokban tárolt graftok esetén szignifikáns eltérést nem találtunk.

A konzerválást követő reperfúzió alatt ugrásszerűen megnőtt a PMN leukocyták szabadgyök termelése és a sejtek DNS károsodása.

A KUTATÁS FŐ IRÁNYVONALAI

1. A bélszövet oxidatív károsodása meleg ischémia és reperfúzió hatására

2. A bél ischémiás/reperfúziós károsodásának mérséklése hideg konzerválással

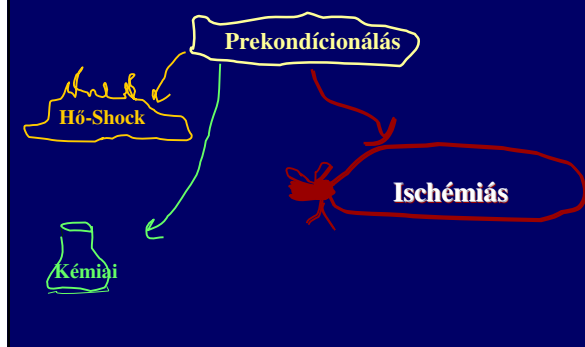
3. A vékonybél ischémiás prekondicionálása

4. Differenciál Scanning Kalorimetriás vizsgálatok

5. PACAP-al végzett vizsgálatok

6. A vékonybél ischémiás posztkondicionálása

A PREKONDÍCIONÁLÁS

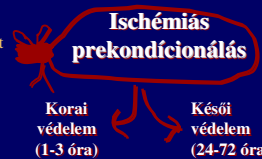


ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁS (IPC)

1986 Murry: IPC, mint endogén adaptációs mechanizmus (Murry CE. Circulation 1986; 74: 1124-36.)



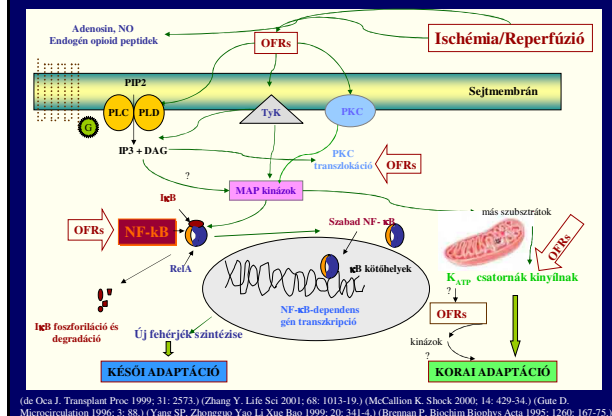
Ennek kiváltására olyan rövid I/R-s ciklusokat alkalmazunk, melyek nem okoznak szervkárosodást, de aktiválják az endogén védelmi rendszert, s így a szövet jobban ellenáll a későbbi, tartósabb ischémiás behatással szemben. (Yellon DM. Cardiovasc Res 1998; 37: 21-33.)



Számos szövetnél (szív, máj, vázizomzat, agy) kimutatásra került, hogy az IPC korai és késői formája fokozza a szerv I/R károsodással szembeni toleranciáját. (Iskanda T. Shock 1997; 8: 86-94.) (Baxter GF. Circulation 1994; 90: 2993-3000.)

(Ferencz et al. Transplant Proc 2004; 36: 286-8.)

IPC KASZKÁD MUCOSA SEJTEKBEN



(de Oca J. Transplant Proc 1999; 31: 2573.) (Zhang Y. Life Sci 2001; 68: 1013-19.) (McCallion K. Shock 2000; 14: 429-34.) (Gute D. Microcirculation 1996; 3: 88.) (Yang SP. Zhongguo Yao Li Xue Bao 1999; 20: 341-4.) (Brennan P. Biochim Biophys Acta 1995; 1260: 167-75.)

A VÉKONYBÉL ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁSA

KÉRDÉSEINK

Hogyan befolyásolja az IPC alkalmazása a konzervált bélszövetben kialakuló oxidatív stressz mértékét?

Milyen mértékű a PMN leukocyták szabadgyök termelése IPC hatására?

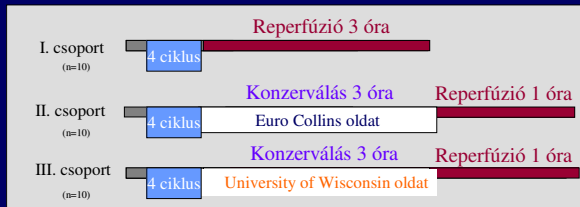
Vékonybél IPC során történik-e NF-κB transzkripciós faktor aktiválódás és hány ciklus szükséges ehhez?

A VÉKONYBÉL ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁSA

ANYAG ÉS MÓDSZER



Kísérleti protokoll: Keverék kutyákon (n=30) total orthotop vékonybél autotranszplantáció

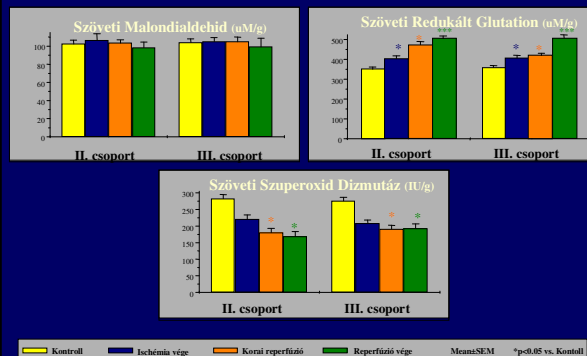


Ischémiás prekondicionálási protokoll

4 ciklus (1 ciklus = 5 perc ischémia + 10 perc reperfúzió)

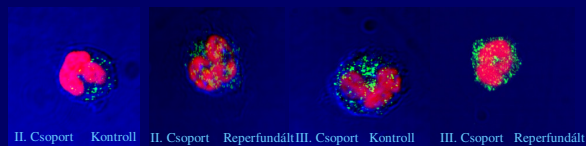
A VÉKONYBÉL ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁSA

EREDMÉNYEK



A VÉKONYBÉL ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁSA

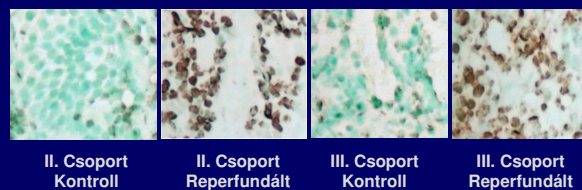
CERIUM-HISZTOKÉMIA



(Ferencz et al. Surgery 2002; 132: 877-84.)

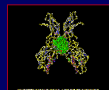
A VÉKONYBÉL ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁSA

A DNS KÁROSODÁS KIMUTATÁSA BÉLSZÖVETBEN



A VÉKONYBÉL ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁSA

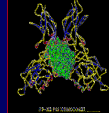
NUCLEAR FACTOR KAPPA BINDING (NF-κB)



1986. Sen és Baltimore a HIV vírus enhancer és promoter régióján a kappa könnyűlánc transzkripció aktiválásának mérése során mutattak ki egy olyan szekvenciát, melyhez a NF-κB kötődött. (Sen R. Cell 1986; 46: 705-16.)

A kutatások elején úgy vélték, hogy ez csak a B lymphocytákban található meg.

Az NF-κB család tagjai elterjedtek és szerkezetük jól konzerválódott az evolúció során.



Közös jellemzőjük, hogy a citoplazmában inaktív formában egy gátló fehérjéhez, az IκB-hez kötve találhatóak. Aktiválásuk során leválnak az IκB-ről és bejutva a sejtmagba szabályozzák egyes gének expresszióját. (Jobin C. Ann J Physiol Cell Physiol 2000; 278: 451-62.)

Az NF-κB fehérjecsald tagjai: p65 (relA), RelB, c-Rel, v-Rel, p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2). Emlősökben a Rel család valamennyi tagja képes homo- v. heterodimer formát ölteni, ennek köszönhetően számos dimer kombináció jöhet létre.

Ezek közül a dimerek közül a p50-p65 heterodimert nevezzük NF-κB-nek.

A fehérje dimerek feladata, hogy különböző környezeti hatásokra szabályozott génátírást indítsanak el, biztosítva ezáltal a citoplazma és a sejtmag közötti kommunikációt. (Das DK. Ann N Y Acad Sci 1994; 723: 292-307.)

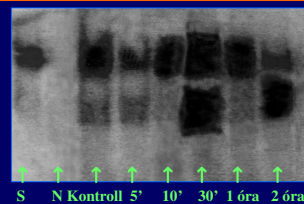
Számos különböző stimulus képes aktiválni ezt a transzkripciós faktor családot. Az OFRs az NF-κB fő indukt. Az NF-κB aktivációja redox szabályozás alatt áll. (van den Berg R. Br J Nutr 2001; 86: 121-7.)

A VÉKONYBÉL ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁSA

AZ NF-κB AKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE EMSA MÓDSZERREL

- gel Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)
- Sejtmag extraktumok készítése mucosa sejt homegenizátumából.
- A fehérjekoncentráció meghatározása Bio-Rad Protein Assay segítségével.
- DNA-fehérje komplexek elektroforézise polyakrilamid gélen.
- A gél analízise Cyclone PhosphorImager System-mel.

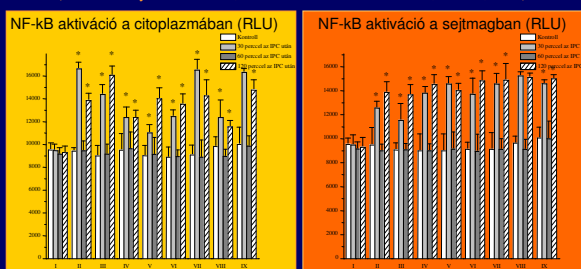
IPC: 4(5+10)



(Ferencz et al. Microsurgery 2006; 26: 54-7.)

A VÉKONYBÉL ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁSA AZ NF-KB AKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE ELISA MÓDSZERREL

(Immunoassay for NF-kB kit, Oxford Biomedical Research®, Oxford, USA)



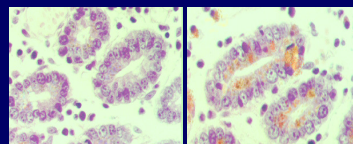
I: no IPC
II: 1+1
III: 2(1+1)
IV: 2+2
V: 2(2+2)
VI: 4(2+2)
VII: 5+10
VIII: 2(5+10)
IX: 4(5+10)

(Ferencz et al. Transplant Proc 2006; 38: 1800-2.)

A VÉKONYBÉL ISCHÉMIÁS PREKONDÍCIONÁLÁSA

AZ IPC KÉSŐI HATÁSAINAK VIZSGÁLATA

Kontroll 24 órával az IPC után



Immunhisztokémia

Szöveti HSP-72 kimutatása (Anti-Heat Shock Protein 70)

KÖVETKEZTETÉS

Az IPC mérsékelte a konzerválás és reperfüzió hatására kialakuló oxidatív károsodásokat.

A konzerválást követő reperfüzió alatt csökkent a PMN leukocyták szabadgyök termelése és nőtt a sejtek DNS károsodása.

Az NF-kB aktiválódás az IPC után 30 és 120 perccel nőtt. Aktivitása bizáizisos jellegű volt és az általunk alkalmazott legrövidebb IPC (1 perc I+ 1 perc R) is fokozta a citoplazmális és nukleáris NF-kB aktiválódását.

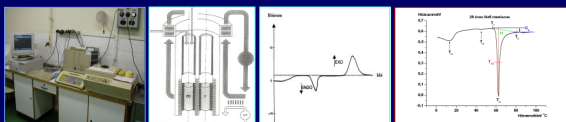
Tehát az IPC mechanizmus vékonybél szövet esetén is a „minden vagy semmi” törvény szerint működik.

Az IPC késői hatásaként kimutattuk a szöveti HSP-72 jelenlétét 24 órával az IPC után.

A KUTATÁS FŐ IRÁNYVONALAI

1. A bélszövet oxidatív károsodása meleg ischémia és reperfüzió hatására
2. A bél ischémiás/reperfüziós károsodásának mérséklése hideg konzerválással
3. A vékonybél ischémiás prekondicionálása
4. Differenciál Scanning Kalorimetriás vizsgálatok
5. PACAP-al végzett vizsgálatok
6. A vékonybél ischémiás poszt kondicionálása

DIFFERENCIÁL SCANNING KALORIMETRIA



A technikát Watson és O'Neill fejlesztett ki 1960-ban.

Termoanalitikai módszer: vizsgált mintában lezajló szerkezeti átalakuláshoz szükséges hőáram mérésére teszi lehetővé a hőmérséklet és az idő függvényében.

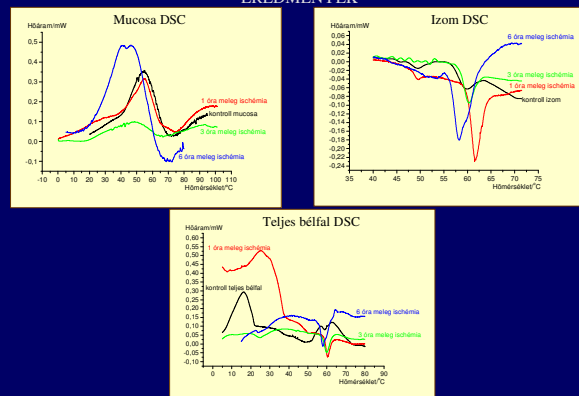
A mért hőáram a minta és a referencia közti hőegyensúly megtartásához szükséges befektetett kompenzációs hőfluxus elektromos teljesítménnyé alakítva (entalpiaváltozás).

A minta makromolekulának konformációjának megbontásakor a befektetett hő nem a belső energia növelésére, hanem ezek szerkezeti átalakulására fordítódik (minta hőt nyel el, endoterm folyamat).

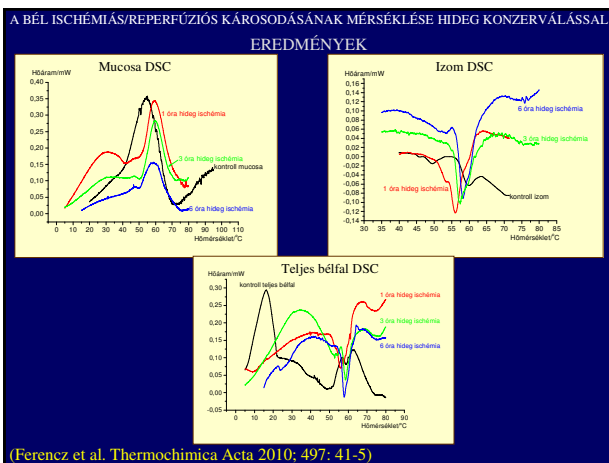
Ha mintánk egy merevebb (stabilabb) struktúrába megy át, akkor a rendszer entrópiája csökken (minta hőt ad el, exoterm folyamat).

Garbett et al. Differential scanning calorimetry of blood plasma for clinical diagnosis and monitoring. Exp Mol Pathol 2009; 86: 186-91.

A BÉLSZÖVET OXIDATÍV KÁROSODÁSA MELEG ISCHÉMIA ÉS REPERFÜZIÓ HATÁSÁRA EREDMÉNYEK



(Nedvig et al. J Therm Analysis Calorimetry 2009; 95: 775-9.)



A KUTATÁS FŐ IRÁNYVONALAI

1. A bélszövet oxidatív károsodása meleg ischémia és reperfúzió hatására

2. A bél ischémias/reperfúziós károsodásának mérséklése hideg konzerválással

3. A vékonybél ischémias prekondicionálása

4. Differenciál Scanning Kalorimetriás vizsgálatok

5. PACAP-al végzett vizsgálatok

6. A vékonybél ischémias posztkondicionálása

PACAP



Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide

- A szekretin/glukagon/VIP fehérjecsalcid tagja
- 1989-ben Miyata izolálta birka hipotalamusából a hypophysisbe kifejtett adenilát-cikláz aktiváló hatása segítségével
- 90% PACAP-38, PACAP-27, PACAP-Related Peptide
- „brain-gut” (neurointestinális) peptid

Megtalálható:

- központi és perifériás idegrendszerben
- belső elválasztású mirigy (mellékvese/pajzsmirigy, ovarium, testis)
- respiratorikus traktus
- gastrointestinális traktus (pancreas, máj, bél)

Hatása: neurotransmitter felszabadulás szabályozása, neurotrofik és neuroprotektív vasodilatáció, bronchodilatáció

Anti-apoptotikus, anti-inflammatorikus, citoprotektív hatás

(Gasz B. Ann N Y Acad Sci 2006; 1070: 293-7.)

PACAP A GASTROINTESTINÁLIS TRAKTUSBAN



PACAP koncentráció a GI traktusban
(Hannibal J. Cell Tissue Res 1998; 291: 65-79.)

PACAP-38

PACAP receptorok a teljes béltraktusban kimutathatók: (Laufer et al. 1999; Schultz et al. 2004)
VPAC1 receptor: mucosa (villus és crypta epithel sejtek), myenterikus neuronok
VPAC2 receptor: neuroendokrin sejtek, érfal, simaizom sejtek
PAC1 receptor: myenterikus neuronok, simaizom sejtek

PACAP kimutatott hatása a GI traktusban:

- Szabályozza a gyomorsav elválasztást (Mungan Z. Peptides 1995; 16: 1051-6.)
- Vékonybélmedv elválasztást növeli, motilitást csökkenti (De Winter B. Br J Pharmacol 1998; 124: 1181-6.)
- Aktiválja a Protein Kináz A-t, Thyrozin kinázt, MAPK-t (Zhou Y. Pediatr Res 2005; 58: 1192-7.)

PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK

KÉRDÉSEINK

Meleg I/R-s modellben változik-e az endogén PACAP-38 koncentrációja a vékonybélben?

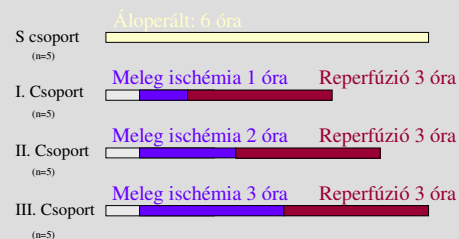
Meleg I/R-s modellben iv. adott PACAP-38 milyen hatással van a szöveti károsodásra és a MAPK aktivitásra?

PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK

ANYAG ÉS MÓDSZER

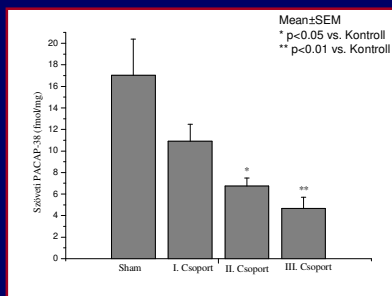


Kísérleti protokoll: Wistar patkányokon meleg I/R-s csoportok létrehozása



PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK

EREDMÉNYEK



Szöveti endogén PACAP-38 koncentrációs meghatározása Radioimmunoassay segítségével.
(Ferencz et al. J Mol Neurosci 2009; 37: 168-76.)

PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK

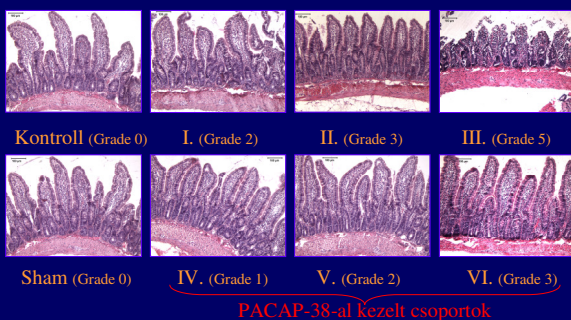
ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleti protokoll: Wistar patkányokon meleg I/R-s csoportok létrehozása



PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK

EREDMÉNYEK

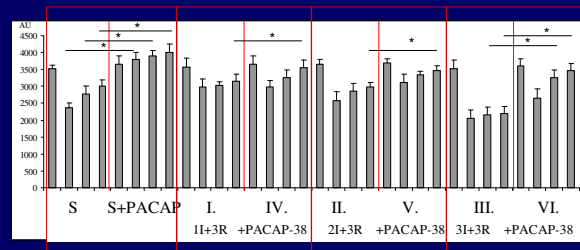


A bél szöveti károsodásának Park-féle hisztológiai klasszifikációja: grade 0-5 (Surgery 1990; 107: 574.)

PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK

EREDMÉNYEK

PHOSPHO-ERK1/2 AKTIVITÁSA



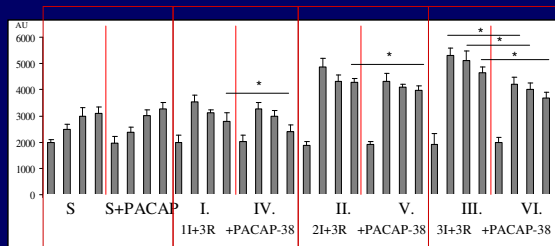
Immunohisztokémia: Phospho-p44/42 MAPK antibody (Cell Signalling®)

(Ferencz et al. FEBS J 2006; 273: 123.)

PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK

EREDMÉNYEK

PHOSPHO-JNK1/2 AKTIVITÁSA

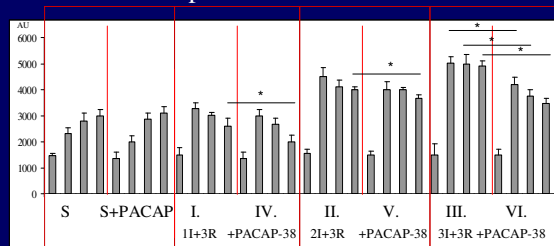


Immunohisztokémia: Phospho-SAPK/JNK antibody (Cell Signalling®)

PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK

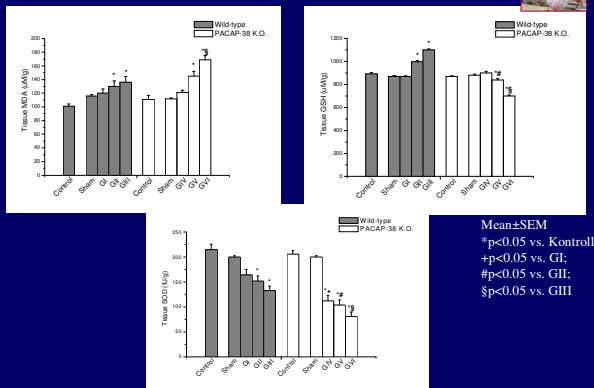
EREDMÉNYEK

PHOSPHO-p38 MAPK AKTIVITÁSA



Immunohisztokémia: Phospho-p38 MAP Kinase antibody (Cell Signalling®)

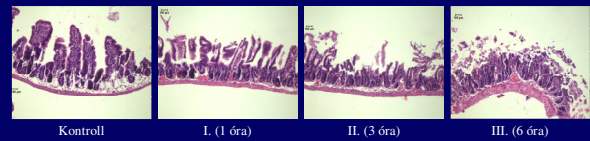
PACAP-38 K.O. VIZSGÁLATOK



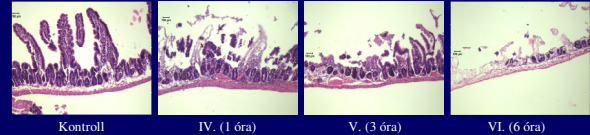
(Ferencz et al. J Mol Neurosci 2010; DOI 10.1007/s12031-010-9357-6)

PACAP-38 K.O. VIZSGÁLATOK

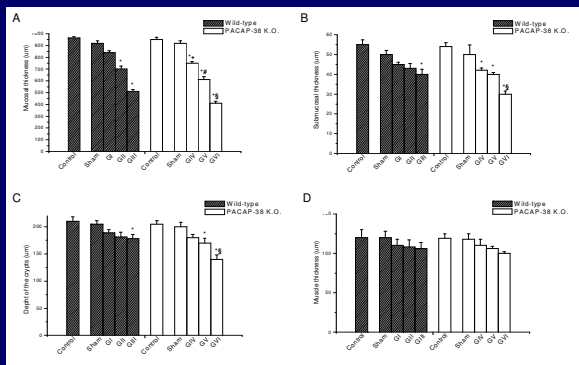
Vad típusú egerek



PACAP-38 K.O. egerek



PACAP-38 K.O. VIZSGÁLATOK



KÖVETKEZTETÉS

Meleg I/R csökkentette az endogén PACAP-38 koncentrációját a bélszövetben.

Meleg ischémiát követő reperfúzió alatt adott i.v. PACAP-38 mérsékelte a szöveti károsodás mértékét.

A meleg I/R hatására a bélszövetben csökkent a foszforilált ERK1/2 és emelkedett a JNK1/2 és p38 MAPK aktivitása, triggerelve a programozott sejthalál folyamatát.

A PACAP-38 kezelés azáltal, hogy fokozta a foszforilált ERK1/2 és csökkentette a JNK1/2 és p38 MAPK aktivitását védő hatással volt a bélszövetben bekövetkező apoptózissal szemben.

PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK 2.

KÉRDÉSEINK

Hideg konzerváláskor az oldathoz adott PACAP-38 befolyásolja-e a szöveti oxidatív stressz mértékét, a struktúrális károsodás kiterjedését és a MAPK aktivitást?

PACAP-AL VÉGZETT VIZSGÁLATOK 2.

ANYAG ÉS MÓDSZER

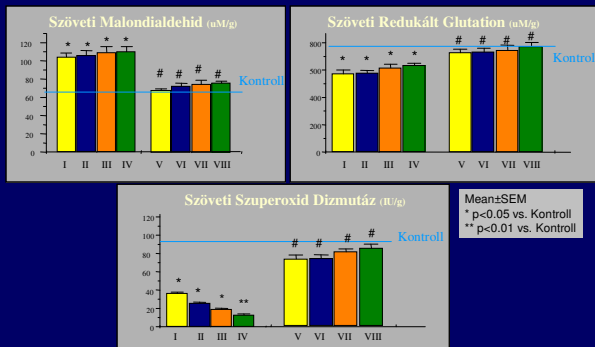


Kísérleti protokoll: Wistar patkányokon vékonybél konzerválás és autotranszplantáció (n=40)

	Konzerválás	Reperfúzió
I.	1 óra UW	3 óra
II.	2 óra UW	
III.	3 óra UW	
IV.	6 óra UW	
V.	1 óra UW + 30 ug PACAP-38	
VI.	2 óra UW + 30 ug PACAP-38	
VII.	3 óra UW + 30 ug PACAP-38	
VIII.	6 óra UW + 30 ug PACAP-38	

PACAP-AL VÉGGZETT VIZSGÁLATOK

EREDMÉNYEK



(Ferencz et al. Transplant Proc 2009; 41: 57-9.)

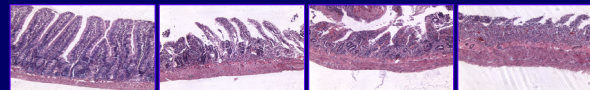
PACAP-AL VÉGGZETT VIZSGÁLATOK

EREDMÉNYEK

Kontroll (Grade 0)



Reperfúzió

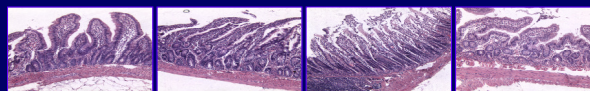


I. (Grade 1)

II. (Grade 2)

III. (Grade 4)

IV. (Grade 5)



V. (Grade 1)

VI. (Grade 1)

VII. (Grade 3)

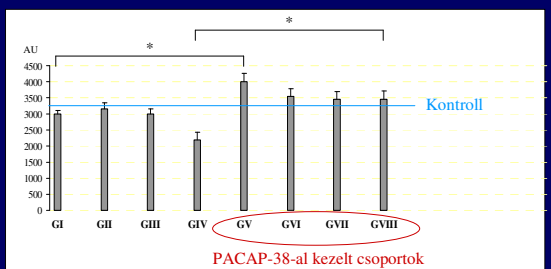
VIII. (Grade 4)

(Ferencz et al. J Mol Neurosci 2009; 37: 168-76.)

PACAP-AL VÉGGZETT VIZSGÁLATOK

EREDMÉNYEK

PHOSPHO-ERK1/2 AKTIVITÁSA



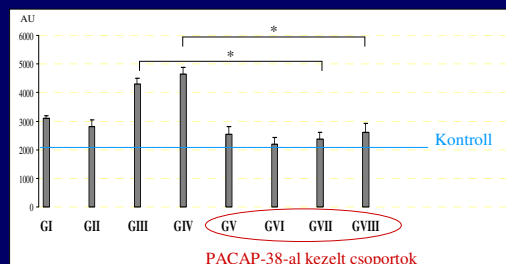
Immunhisztokémia: Phospho-p44/42 MAPK antibody (Cell Signalling®)

(Ferencz et al. Transplant Proc 2009; 41: 60-2.)

PACAP-AL VÉGGZETT VIZSGÁLATOK

EREDMÉNYEK

PHOSPHO-JNK1/2 AKTIVITÁSA

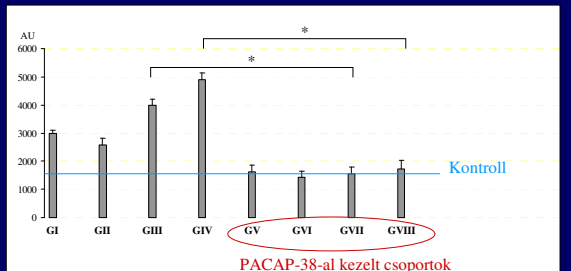


Immunhisztokémia: Phospho-SAPK/JNK antibody (Cell Signalling®)

PACAP-AL VÉGGZETT VIZSGÁLATOK

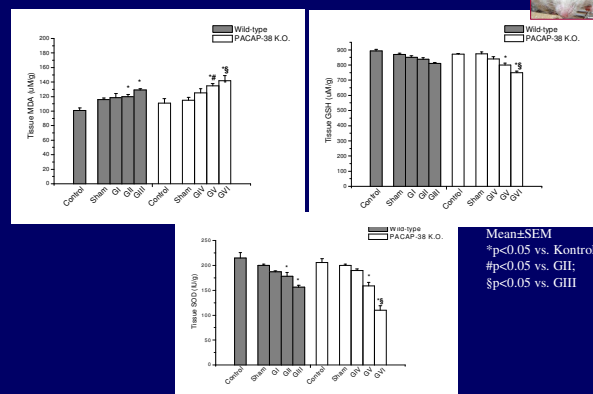
EREDMÉNYEK

PHOSPHO-p38 MAPK AKTIVITÁSA



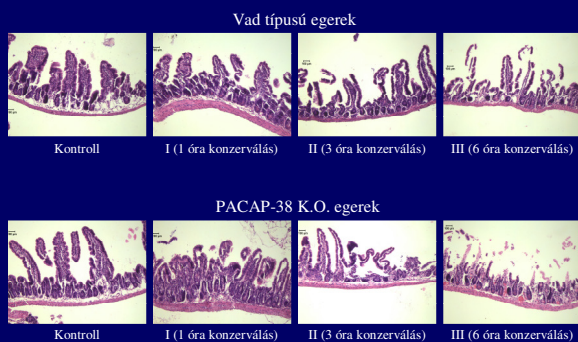
Immunhisztokémia: Phospho-p38 MAP Kinase antibody (Cell Signalling®)

PACAP-38 K.O. VIZSGÁLATOK



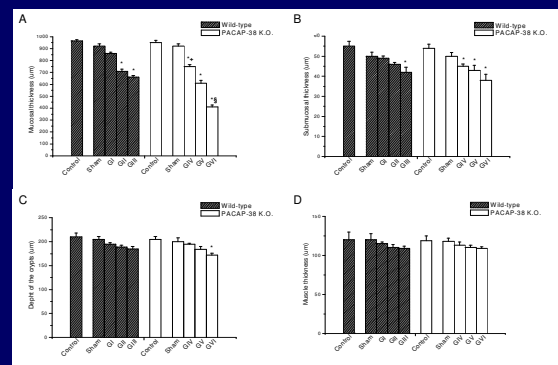
(Ferencz et al. J Mol Neurosci 2010; DOI 10.1007/s12031-010-9352-y)

PACAP-38 K.O. VIZSGÁLATOK



(Ferencz et al. Transplant Proc 2010; DOI: 10.1016/j.transproceed.2010.05.014)

PACAP-38 K.O. VIZSGÁLATOK



KÖVETKEZTETÉS

A konzerváló oldathoz adott PACAP-38 csökkentette a szöveti oxidatív stressz mértékét és mérsékelte a strukturális károsodást.

A PACAP-38 kezelés fokozta a foszforilált ERK1/2 és csökkentette a JNK1/2 és p38 MAPK aktivitását, így a konzervált béliszövetben anti-apoptotikus védő hatást fejtett ki.

Eredményeinket a PACAP-38 K.O. egerekkel végzett vizsgálatok is megerősítették.

A KUTATÁS FŐ IRÁNYVONALAI

1. A béliszövet oxidatív károsodása meleg ischémia és reperfúzió hatására
2. A bél ischémiás/reperfúziós károsodásának mérséklése hideg konzerválással
3. A vékonybél ischémiás prekondicionálása
4. Differenciál Scanning Kalorimetriás vizsgálatok
5. PACAP-al végzett vizsgálatok
6. A vékonybél ischémiás poszt kondicionálása

ISCHÉMIÁS POSZTKONDÍCIONÁLÁS (IPO)

2003. Vinten-Johansen írta le szívizomban. (Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285: 579.)

IPO

Perfúzió Ischémia Reperfúzió

IPC-nél leírt jelátviteli utak aktiválódnak (Vinten-Johansen et al. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285: 579.; Halkov et al. Ann Thorac Surg. 2004;78: 961.; Tsang et al. Circ Res 2004; 95: 230.)

Prosurvival kinázok (RISK: Reperfusion Injury Salvage Kinase) aktiválódnak (PI3PK-Akt, ERK1/2)

Hatás:

- Mitokondriumok ATP-dependens K^+ csatornáinak kinyitása: szabályozza a mitokondriumba beáramló K^+ mennyiségét
- ↓ mitokondriumok Ca^{2+} feltöltődése
- ↑ az ATP szintézis

↓ Az apoptózis

ISCHÉMIÁS POSZTKONDÍCIONÁLÁS (IPO)

KÉRDÉSEINK

Meleg I/R-s modellünkben IPO hatására csökken –e a béliszövetben bekövetkező oxidatív és morfológiai károsodás?

ISCHÉMIÁS POSZTKONDÍCIONÁLÁS (IPO)

ANYAG ÉS MÓDSZER

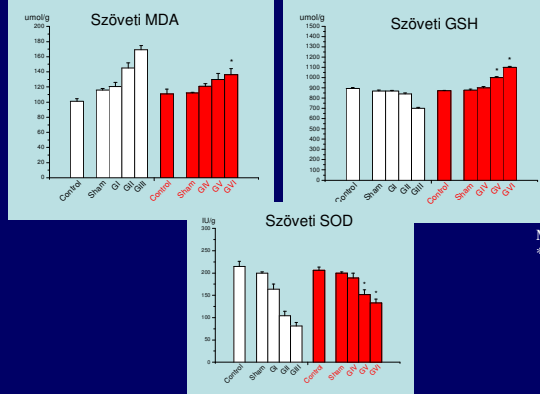


Kísérleti protokoll: sertéseken (n=20) meleg ischémia/reperfúzió vizsgálata

Csoportok:

- I. 1 óra meleg ischémia + 3 óra reperfúzió
- II. 3 óra meleg ischémia + 3 óra reperfúzió
- III. 6 óra meleg ischémia + 3 óra reperfúzió
- IV. 1 óra meleg ischémia + **IPO 3(30"I+30"R)** + 3 óra reperfúzió
- V. 3 óra meleg ischémia + **IPO 3(30"I+30"R)** + 3 óra reperfúzió
- VI. 6 óra meleg ischémia + **IPO 3(30"I+30"R)** + 3 óra reperfúzió

ISCHÉMIÁS POSZTKONDÍCIONÁLÁS (IPO)

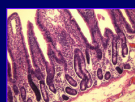
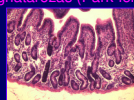


(Ferencz et al. Transplant Proc 2010; DOI:10.1016/j.transproceed.2010.05.024)

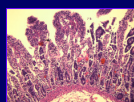
ISCHÉMIÁS POSZTKONDÍCIONÁLÁS (IPO)

Qualitativ meghatározás (Park-féle klasszifikáció)

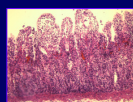
Kontroll
(Grade 0)



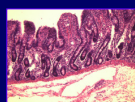
I. (Grade 2)



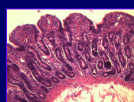
II. (Grade 3)



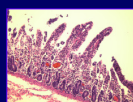
III. (Grade 5)



IV. (Grade 1)



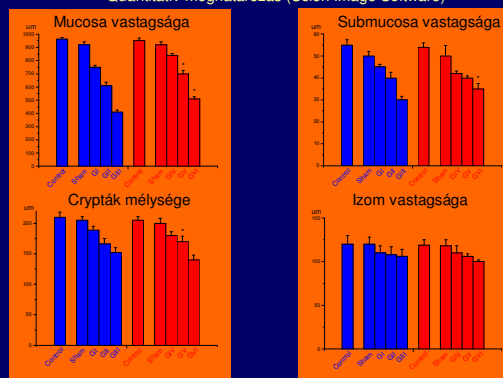
V. (Grade 2)



VI. (Grade 3)

ISCHÉMIÁS POSZTKONDÍCIONÁLÁS (IPO)

Quantitativ meghatározás (Scion Image Software)



ISCHÉMIÁS POSZTKONDÍCIONÁLÁS (IPO)

KÉRDÉSEINK

Hideg konzerválást követő autotranszplantációs modellnkben IPO hatására csökken –e a béliszövetben bekövetkező oxidatív és morfológiai károsodás?

ISCHÉMIÁS POSZTKONDÍCIONÁLÁS (IPO)

ANYAG ÉS MÓDSZER

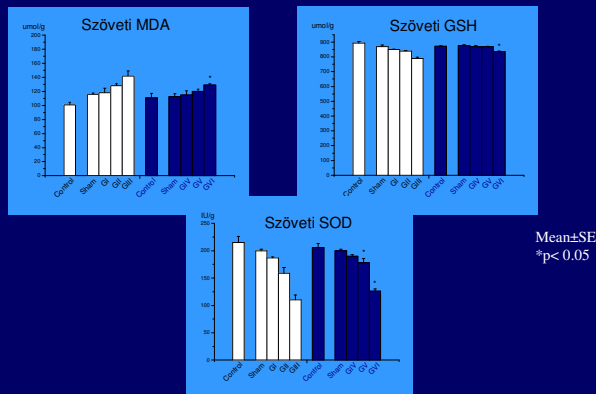


Kísérleti protokoll: sertéseken (n=20) hideg konzerválás UW-ban és autotranszplantáció

Csoportok:

- I. 1 óra hideg konzerválás UW oldatban + 3 óra reperfúzió
- II. 3 óra hideg konzerválás UW oldatban + 3 óra reperfúzió
- III. 6 óra hideg konzerválás UW oldatban + 3 óra reperfúzió
- IV. 1 óra hideg konzerválás + **IPO 3(30"I+30"R)** + 3 óra reperfúzió
- V. 3 óra hideg konzerválás + **IPO 3(30"I+30"R)** + 3 óra reperfúzió
- VI. 6 óra hideg konzerválás + **IPO 3(30"I+30"R)** + 3 óra reperfúzió

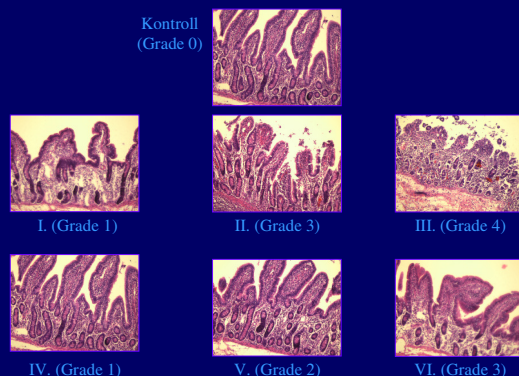
ISCHÉMIA POSZTKONDITIONÁLÁS (IPO)



(Ferencz et al. Transplant Proc 2010; DOI:10.1016/j.transproceed.2010.05.023)

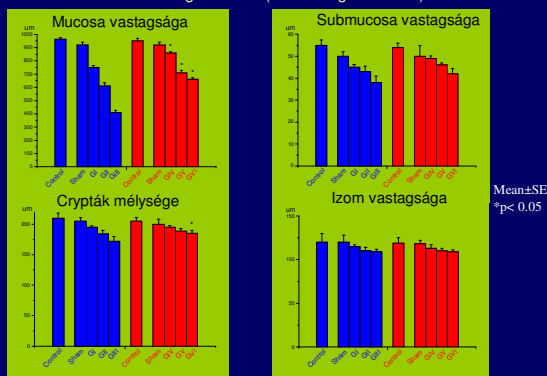
ISCHÉMIA POSZTKONDITIONÁLÁS (IPO)

Qualitatív meghatározás (Park-féle klasszifikáció)



ISCHÉMIA POSZTKONDITIONÁLÁS (IPO)

Quantitatív meghatározás (Scion Image Software)



KÖVETKEZTETÉS

Az IPO csökkentette mind a meleg I/R, mind a hideg konzerválás és autotranszplantációt követő oxidatív és morfológiai károsodások mértékét.

További vizsgálatokat tervezünk a protektív folyamatok hátterének tanulmányozására.

ÖSSZEFOGLALÁS

Megállapítottuk, hogy

- a bélszövet az I/R hatásokkal szemben érzékenyen reagál
- oxidatív stressz kivédésében szerepet játszó endogén antioxidáns védelem kapacitása jelentősen csökken
- hisztológiai módszerekkel a mucosa, a submucosa és a crypták károsodása kimutatható
- DSC igazolta az izomszövetben is bekövetkező strukturális változásokat
- a károsodások csökkenthetők hideg konzerválással
- az IPC és IPO a szervezet védő mechanizmusainak aktiválása révén protektív endogén adaptációs utakat aktivál
- az endogén PACAP-38 mennyisége csökken I/R hatására
- a szisztémásan és a konzerváló oldathoz adott PACAP-38 csökkentette az oxidatív és morfológiai károsodások mértékét

A béltranszplantáció sikerességéhez az immunológiai egyezés mellett a konzerválás minőségének javítása is alapvető fontosságú.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

PTE ÁOK Sebészeti Oktató és Kutató Intézet

Prof. Dr. Weber György
Prof. Dr. Róth Erzsébet
Dr. Temes Gyula, Dr. Lantos János
Dr. Szántó Zsolt, Dr. Borsiczky Balázs
Dr. Rácz Boglárka, Dr. Mohamed T. Jaberansari
Dr. Jancsó Gábor, Dr. Gasz Balázs
Dr. Cserepes Barbara, Dr. Benkő László
Dr. Ferencz Sándor, Dr. Horváth Szabolcs
Dr. Takács Ildikó, Dr. Balatonyi Borbála
Dr. Jávorszki Zoltán, Dr. Koba Shanava
Dr. Süvecz Györgyné, Karádiné Szűcs Mária
Pintérné Henrich Éva, Tóthné Fajók Csilla
Abrudbányai Katalin†, Horváth Beáta
Gelencsér Györgyné, Bakainé Matus Ilona
Csizmadia Jánosné, TDK hallgatók

Kutatásokat támogató pályázatok:

2004-2007. OTKA F046593
2009-2012. OTKA PD 77474
2007-2010. MTA Bolyai János Ösztöndíj
PTE ÁOK Tudományos Bizottsága
NKTH Mecenatúra Pályázatok
Pécsi Szervátültetés Fejlesztéséért Alapítvány

PTE ÁOK Sebészeti Klinika

Prof. Dr. Horváth Ors Páter
Dr. Kalmár-Nagy Károly
Dr. Ásinsz Tavasoli

PTE Anatómiai Intézet

Dr. Reglődi Dóra
Dr. Tamás Andrea
Dr. Lubics Andrea
Dr. Kiss Péter
Dittrich Erzsébet

PTE Biofizikai Intézet

Prof. Dr. Lőrinczy Dénes

PTE Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Dr. Rácz Boglárka

PTE Orvosi Biológiai Intézet

Prof. Dr. Szeberényi József
Dr. Kiss Katalin

DE Gyógyszertani Intézet

Dr. Németh József