

A vesetranszplantáció során jelentkező iszkémia/reperfúziós károsodás csökkentésének új lehetőségei

Doktori tézisek

dr. Antal Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Fekete Andrea, Ph.D, egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók:

Dr. Dolgos Szilveszter, Ph.D, adjunktus

Dr. Piros László, Ph.D, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Nyirádi Péter, MTA doktor, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Szijártó Attila, MTA doktor, egyetemi docens

Dr. Kriván Gergely, Ph.D

Budapest
2019

Bevezetés

Ahogy világszerte nő a várható élettartam, úgy emelkedik a krónikus betegségek előfordulása is. Az akut valamint krónikus vesekárosodás kapcsán kialakuló végstádiumú veseelégtelenség prevalenciája is rohamosan nő, jelenleg világszerte 8-16% között van; az elmúlt negyven évben a betegek száma megtízszereződött. Magyarországon is hasonló tendencia tapasztalható, a betegség előfordulása évente 6-7%-kal emelkedik. A betegek vesepótló kezelést igényelnek, a definitív megoldást a vesetranszplantáció jelenti.

A donorhiány mellett komoly kihívást jelent a beültetett vese hosszútávú működésének javítása is. Az immunológiai és sebészeti technikák fejlődésének köszönhetően az első évben a graft túlélés közel 95%-os, de a késői graft diszfunkció továbbra is a hosszútávú túlélés limitáló tényezője. A vesetranszplantáció során elszennvedett iszkémia/reperfúziós (I/R) károsodása az egyik legfontosabb akut és krónikus graft működést befolyásoló faktor.

A vese I/R károsodása a transzplantáció mellett számos más esetben is előfordulhat, mint például sokk, szívelégtelenség, valamint szuprarenális aorta műtét kapcsán. Az I/R károsodás okozta mortalitás magas, és a terápiás lehetőségek sem optimálisak.

E probléma leküzdésével számos kutatás foglalkozik. Egy részük a különböző iszkémiás betegségekben (miokardiális infarktus, stroke) jól ismert nemi különbséget vizsgálja. A nők rizikója ezekben a kórképekben alacsonyabb a férfiakhoz képest, mely a menopauzát követően megszűnik. Ezt a nemi különbséget többek között munkacsoportunk is kimutatta a vese I/R károsodásában, transzplantáció kapcsán is.

Korábban igazoltuk, hogy a nőstény patkányok posztisztkémiás vesekárosodása enyhébb mint a hímeké, továbbá, hogy a vérkeringésben második legnagyobb mennyiségben keringő szteroid hormon, a nemi hormonok prehormonja, a dehidroepiandroszteron (DHEA) javítja a hímek posztisztkémiás túlélését.

Mivel hormonhatásán túl ismert, hogy a DHEA a sigma-1 receptor (S1R) endogén agonistája, így a továbbiakban kísérleteink erre a még sok tekintetben ismeretlen receptorra irányultak. Az S1R többek között a szelektív szerotonin felvételt gátló (SSRI – selective serotonin reuptake inhibitor) gyógyszerek receptora, legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszerben fordul elő. Vizsgáltuk az S1R lokalizációját, funkcióját, szerepét a vesében. Kimutattuk, hogy az S1R aktivációja protektív a vese I/R károsodásával szemben.

Mivel az ösztrogén szintén az S1R endogén agonista ligandja, felmerült az S1R szerepe a nemi különbség létrejöttében.

A nemi különbség, illetve az S1R protektív hatásának kialakulásában korábban több jelátviteli útvonal szerepét is vizsgáltuk, kimutattuk a hősokk válasz (hősokk fehérje-72 (HSP-72)) fokozott aktiválódását és így protektív szerepét nőstény patkányokban, valamint az S1R által aktivált protein kináz B (Akt) – endoteliális nitrogén-monoxid szintáz útvonal renoprotektív hatását.

A hősokk fehérjék (HSP) a chaperon (gardedám) fehérjék családjába tartoznak. Szerepük, hogy a sejt stressz állapotában termelődve/aktiválódva védelmet nyújtanak a sejt működésében, struktúrájában fontos szerepet játszó molekuláknak. A hősokk válasz egyedüli beindítója a hősokk faktor-1 (*HSF-1*), mely stressz hatására a citoszolból a sejtmagba kerül, és aktiválja egyes HSP-k transzkripcióját. Aktiválásában az *Akt* szerepét is kimutatták. A *HSP-72* I/R károsodás esetén a sejtsztruktúra és -polaritás megőrzésében játszik szerepet. Legfontosabb ismert funkciója a vesében a Na^+/K^+ ATPáz (*NKA*) ioncsatorna stabilizálása a bazális membránon. A *HSP-27* szintén leginkább I/R inzultus esetén aktiválódik, a mikrofilamentumok és membránlipidek stabilizálásában vesz részt.

Jelen értekezés témája a női nem, valamint az S1R védő funkciójának ismeretében az S1R-nek a nemi különbség létrejöttében betöltött szerepének, valamint a HSP-k aktiválásán keresztüli protektív hatásának kimutatása *in vivo* I/R és transzplantációs állatmodellen, valamint *in vitro* sejtenyészet vizsgálatával.

Célkitűzések

1. Kimutatható-e a *nemi különbség* az S1R aktiválódásában és a hősokk válaszbán a vese I/R károsodása során?
2. Szerepet játszik-e az *S1R* aktiválása a vese I/R károsodásában?
3. A *17 β -ösztradiol* közvetlenül szerepet játszik-e az S1R és a hősokk válasz aktivációjában?
4. Az S1R agonista fluvoxamin (Flu) hatásos-e vesetranszplantáció során a *prezervációs folyadékba* adva a károsodás mérséklésére?

Módszerek

I/R és autotranszplantációs patkánymodell és kezelési csoportok

Kísérleteinket 200 ± 15 g súlyú Wistar patkányokon végeztük. Az ovariektómia 7 nappal az inzultus előtt történt.

A vese I/R károsodását a bal vese hilus 50 perces lefogásával idéztük elő, a jobb vesét az iszkémiás idő végén távolítottuk el. Ezen a modellen két kísérletsorozatot végeztünk: elsőként (I) a nemi különbséget vizsgáltuk nőstény, hím és ovariektomizált nőstény (ovx) állatokon; a második sorozatban (II) hím patkányokon a S1R agonista Flu előkezelés hatását elemeztük. Kontrollként áloperált állatokat használtunk. (n=6-8/csoport)

A transzplantációs modellben a patkányok bal veséjét eltávolítottuk, majd 2 órára hideg prezervációs folyadékba (Custodiol) helyeztük. A meleg iszkémiás idő minden esetben 35 perc volt. Ezen a modellen (III) azt vizsgáltuk, hogy a Flu a prezervációs folyadékba adva is kifejti-e protektív hatását. Kontrollként szintén áloperált állatok szolgáltak. (n=8/csoport)

I. kísérletsorozat: nemi különbségek

mintavétel: 2 (T2) és 24 órával (T24) a reperfúzió után

1. **nőstény**
2. **hím**
3. **ovx**

II. kísérletsorozat: S1R aktiválás

előkezelés 30 perccel az iszkémia előtt, mintavétel 24 órával (T24) a reperfúzió után

1. 20 mg/ttkg **Flu** intraperitoneálisan (ip.)
2. 20 mg/ttkg **Flu** és 1 mg/ttkg S1R antagonistá N,N-dipropil-2-[4-methoxy-3-(2-fenilethoxy)-fenil]-thylamin-monohidroklorid (**NE-100**) ip.
3. izotóniás sóoldat (vehikulum - **veh**)

4. áloperált patkányok (**kontroll**)

III. kísérletsorozat: transzplantáció

mintavétel 24 órával (T24) a reperfúzió után

1. **Custodiol**
2. **Custodiol + 0,003 mg/ml Flu**
3. áloperált patkányok (**kontroll**)

A mintavételhez az állatokat újra elaltattuk, az abdominális aortából vérmintát vettünk, valamint a begyűjtött veséket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk a további kísérletek elvégzéséhez.

***In vitro* kísérletek**

Humán proximális tubulus sejt tenyészetén (HK2) az ösztrogén direkt hatását vizsgáltuk. A sejteket 24 óráig inkubáltuk az adott szerrel.

Kezelési csoportok:

1. 10 nM **17 β -ösztradiol**
2. 10 nM **17 β -ösztradiol + 3 μ M NE-100**
3. izotóniás sóoldat (**kontroll**)

Mérési módszerek

Funkcionális laboratóriumi vizsgálatok

A szérumból meghatároztuk a karbamid, kreatinin, és aszpartát transzamináz (AST) értékeket.

Szövettani vizsgálatok

A vese strukturális károsodásának mértékét hematoxin-eozin (HE) és perjódsvav-Schiff (PAS) festett vesemetszeteken értékeltük ki szemikvantitatív módon, pontrendszer segítségével. Az első

kísérletsorozatban a glomerulus kollapszust, tubulus nekrozist és hialinizációt, intersticiális léziót és leukocita infiltrációt értékeltük ki. A második sorozatban már csak a tubulus nekrozist vizsgáltuk, a harmadik sorozatban pedig a tubulus károsodásakor észlelhető lumen kitágulást mértük.

Western blot analízis

Mind az *in vivo*, mind az *in vitro* kísérletek során mértük az S1R, Akt, HSF-1, HSP-72, HSP-27 és NKA szinteket. A denzitometriás értékeket Ponceau red festés által kapott összfehérje mennyiségre és belső kontrollra korigáltuk.

Immunhisztokémiai vizsgálat

A HK2 sejtek immunfluoreszcens festését a HSF-1 és S1R lokalizációjának meghatározásához végeztük el.

Apoptózis vizsgálat TUNEL teszttel

A transzplantációs kísérletsorozatban nyert veseszövet metszetein végeztük el a terminal deoxynucleotidyl transferase dUTPnick-end labeling (TUNEL) tesztet az apoptotikus sejtek arányának meghatározásához.

Kvantitatív reverz transzkriptáz PCR

A *bcl2* és *bax* mRNS szinteket valós idejű reverz transzkripció polimeráz-láncreakció módszerrel vizsgáltuk. A célfehérjék mRNS expresszióját *Rn18s* háztartási gén hányadosaként határoztuk meg.

Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést GraphPad Prism szoftver statisztikai programmal végeztük. A parametrikus adatokat átlag \pm SEM (standard error of mean: standard hiba) értékkel, a nem-parametrikus adatokat középérték \pm szórás értékekkel adtuk meg. Normális eloszlás esetén egyutas faktoriális variancia analízist (ANOVA, Analysis of variance) és Bonferroni *post hoc* tesztet használtunk. A nem

parametrikus adatoknál Kruskal-Wallis és Dunns illetve Fisher féle *post hoc* tesztet alkalmaztunk. Statisztikailag szignifikánsnak minden esetben a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

Eredmények

Nőstényekben mérsékeltebb a vesefunkció romlása és a vese strukturális károsodása

24 órával az inzultust követően minden állat vesefunkciója jelentős romlást mutatott, de a nőstény állatoknak mind a karbamid mind a kreatinin szintjei szignifikánsan alacsonyabbak voltak a hímekéhez képest. A PAS festett metszetek vizsgálatával a nőstények veséjében kevesebb glomerulus kollapszust, kisebb mértékű leukocita infiltrációt és intersticiális léziót figyeltünk meg a másik két csoporthoz képest.

Nemi különbségek az S1R, pAkt, hősokk fehérjék és NKA szintekben

Az S1R és a foszforilált (aktivált) Akt (pAkt) szintje csak inzultus hatására emelkedett meg a nőstényekben, és T24-re már visszacsökkent. Az általa aktivált fehérjék szintje lényegében egyező dinamikát mutatott. A HSF-1, HSP-72, HSP-27 és NKA szintje már a kontroll nőstényekben is magasabb volt, majd inzultus hatására tovább emelkedett, az NKA T2-ben, a többi fehérje T24-ben érte el a maximumát. Az ovx állatok értékei a hímekkel többnyire egyezők voltak, mely a női hormonok szerepét bizonyítja.

Az S1R agonista Flu mérsékli a vesefunkció romlását és strukturális károsodását

A Flu-val előkezelt állatokban a vesefunkciós értékek kisebb mértékben emelkedtek, a tubulus károsodás enyhébb volt.

A Flu antiapoptotikus hatású

A Flu-val kezelt csoportban az antiapoptotikus *bcl2* gén expressziójának növekedő tendenciáját találtuk, míg az apoptotikus hatású *bax* gén expressziója nem változott. S1R antagonistá hatására a *bcl-2* szignifikánsan alacsonyabb volt.

Flu hatására emelkedik az S1R és a pAkt szintje

Flu kezelés hatására az S1R szintje emelkedett, és ezt a hatást az NE-100 meggátolta. Hasonlóan az S1R által indukált pAkt szintje is a Flu-val kezelt állatokban magasabb értéket ért el, melyet az NE-100 szintén meggátolt.

A Flu vesevédő hatása transzplantációs modellen is érvényesül

A Flu a prezervációs folyadékba adva is mérsékelte a vesefunkciós laborparaméterek emelkedését. Továbbá a tubulus lumen kitágulása, mely a tubulus károsodását jelzi, szintén enyhébb fokú volt a Flu-val kezelt csoportban.

A Flu prezervációs folyadékban adva is antiapoptotikus hatású

A Flu-val kezelt csoportban emelkedett az antiapoptotikus hatású *bcl-2* gén expressziója. TUNEL apoptózis vizsgálat elvégzésével a transzplantációt követően jelentősen megemelkedett az apoptotikus sejtek aránya, azonban a prezervációs folyadékba adott Flu hatására az apoptózis mértéke enyhébb volt.

A 17 β -ösztradiol szerepe az S1R mediált hősokk válasz kialakulásában

Az *in vitro* kíséretek során ösztrogén kezelés hatására az S1R szintjében nem találtunk változást, azonban immunhisztokémiai festéssel kimutattuk, hogy az S1R a kontroll sejtekben perinukleárisan fordult elő, míg az ösztrogénnel kezelt sejtekben mindenhol megtalálható volt intracellulárisan és a sejtmagban is, mely a receptor aktiválódását jelzi.

A HSF-1 szintje ösztrogén hatására emelkedett, emellett ösztrogén hatására a sejtmagba transzlokálódott, mely aktiválódására utal.

A hatás S1R mediált voltát mutatja, hogy az S1R antagonistá NE-100 mind a HSF-1 szintjének emelkedését, mind transzlokációját meggátolta.

A hősokk fehérjék közül a HSP-72-nél tapasztaltunk ösztrogén hatására S1R mediált emelkedést, a HSP-27 nem változott.

Következtetések

1. Kimutattuk a női nem szerepét a vese funkciójának és struktúrájának kisebb mértékű károsodásában, valamint az ovariektómia negatív hatását a vesefunkcióra I/R inzultus esetén.
2. Elsőként igazoltuk a HSP-27 magasabb szintjét nőstény patkányok veséjében alapállapotban, valamint az S1R és a HSP-27 további emelkedését I/R inzultust követően.
3. Igazoltuk a 17β -ösztradiol S1R és HSF-1 transzlokáció általi aktiváló hatását *in vitro* tubulus epitél sejteken, mely hatást az S1R antagonistá adása felfüggesztette. Bizonyítottuk, hogy a 17β -ösztradiol serkenti az S1R, valamint a HSF-1 és HSP-72 hősokk fehérjék termelődését.
4. Kimutattuk az S1R aktivációjának antiapoptotikus hatását a vese I/R és transzplantációs modelljében egyaránt.
5. Az S1R agonista Flu renoprotektív hatását bizonyítottuk transzplantáció esetén a prezervációs folyadékba adva is.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Hosszu A, **Antal Z**, Veres-Szekely A, Lenart L, Balogh DB, Szkibinszkij E, Illesy L, Hodrea J, Banki NF, Wagner L, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. The role of Sigma-1 receptor in sex-specific heat shock response in an experimental rat model of renal ischemia/reperfusion injury. TRANSPLANT INTERNATIONAL 31:(11) pp. 1268-1278. (2018)
IF: 3,196
2. Hosszu A, **Antal Z**, Lenart L, Hodrea J, Koszegi S, Balogh DB, Banki NF, Wagner L, Denes A, Hamar P, Degrell P, Vannay A, Szabo AJ, Fekete A. Sigma 1-Receptor Agonism Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF NEPHROLOGY 28:(1) pp. 152-165. (2017)
IF: 8,655

Más témában megjelent publikációk

1. **Antal Z**, Kovacs T, Voros P, Verebely T. Gastric Transposition after Duodenoduodenostomy in Infants with Combined Esophageal and Duodenal Atresia-Report of Three Cases. EUROPEAN JOURNAL OF PEDIATRIC SURGERY 22:(6) pp. 470-472. (2012)
IF: 0,839

2. **Antal Zsuzsanna**, Pintér András, Verebély Tibor, Molnár Dénes, Tulassay Tivadar. Újszülöttkori urológiai beavatkozások: Két gyermeksebészeti centrum tízéves beteganyagának feldolgozása és a műtéti indikációk áttekintése. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 60:(4) pp. 149-153. (2009)
3. Verebély Tibor, Kálmán Attila, Kiss Imre, Vörös Péter, **Antal Zsuzsanna**. Új eljárások a gyermeksebészetben. GYERMEKGYÓGYÁSZAT 60:(1) pp. 91-97. (2009)

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretnék köszönetet mondani Fekete Andreának, témavezetőmnek. Azért, hogy 8 évvel ezelőtt látott bennem lehetőséget, és helyet adott nekem a csapatában. Azért, hogy úgy tanított, hogy közben hagyta a saját gondolataimat is kibontakozni. Azért, ahogy bízott, amikor nem úgy alakultak a kísérletek, ahogy vártuk. Azért, hogy végül a vizsgálataimat olyan mederbe terelte, mely végül sikert hozott. Azért, hogy a csapatunkban olyan légkört teremtett, ahol jó érzés volt dolgozni. Azért, mert a nekem eddig ismeretlen és félelmetes területet, a kutatást élvezetessé tette számomra. Végül azért, hogy mindeközben kezdeti kapcsolatunk mély barátsággá formálódhatott.

Köszönettel tartozom munkacsoportunk minden korábbi és jelenlegi tagjának, amiért önzetlenül befogadtak és vállalták egyéni munkabeosztásomat. Büszke vagyok rá, hogy egy ilyen pozitív gondolkodású, lendületes és elfogadó csapat tagja lehettem. Külön ki kell emelnem Hosszú Ádámot, akivel a legtöbbet dolgoztunk együtt és a legtöbbet segítette munkám minden fázisát. Nagyon sok támogatást és jó tanácsot kaptam Hodrea Judittól és Lénárt Lillától. Végül köszönöm a többieknek, Kószegi Sándornak, Szakibinszkij Edgárnak, Balogh Dórának és Bánki Fanninak a vizsgálatok tervezésében, elvégzésében és értékelésében nyújtott segítségüket.

Szintén hálás vagyok Bernáth Máriaának a kísérletek kivitelezésében való részvételéért.

Hálával tartozom Hamar Péternek a transzplantációs modell felállításában nyújtott hatalmas segítségéért, valamint a Kórélettani Intézet többi munkatársának, hogy biztosították ehhez számomra a helyet, a feltételeket és az időt.

Köszönöm Degrell Péternek, a Pécsi Tudományegyetem patológusának a szövettani vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom Szabó Attila és Tulassay Tivadar professzor uraknak, hogy támogatták, hogy Ph.D. munkámat a klinika kutató laboratóriumában végezzem.

Hálás vagyok gyermeksebész kollégáimnak, Kálmán Attilának, Verebély Tibornak, Kiss Imrének, Vörös Péternek és Tallós Zsuzsának, hogy jelenlétemet nélkülözték a kutatómunkám alatt, valamint érdeklődésükkel és időnként szarkasztikus megjegyzéseikkel lelkesítettek.

Végül köszönöm családomnak is a kedves biztatásukat és támogatásukat.