

**A periosteum mikrokeringésének zavara reperfúzió
során**

Dr. Gera László

Ph.D. Tézis

**Bács-Kiskun Megyei Kórház, Traumatológia Osztály
Kecskemét**

**2006
Szeged**

BEVEZETÉS

Traumatológiai kóresetek, törések és lágyrész sérülések általános jellemzője a végtagok átmeneti ischaemiája. Hasonló, átmeneti ischaemia, vagyis ischaemia-reperfúzió (I-R) valósul meg a rekonstrukciós sebészetben gyakran használt eljárások alatt, pl. maxillo-facialis tumor resectio vagy trauma által okozott szövethiányok pótlására alkalmazott vascularizált csont autograftok és osteomyocutan lebenyek átültetésekor. A transzplantált graftok túlélése nagymértékben függ a vérellátás sebészi helyreállítástól és a mikrokeringés életképességétől. A hipoperfúziós fázist követő reperfúzió, vagyis a vérellátás megfelelő visszaállása azonban az egyre tökéletesedő sebészi technikák ellenére is limitált. Ennek oka a hipoxiás fázist követő reperfúziós – gyulladásos jelenségek kaszkádszerű aktiválódása (Schoenberg és mtsai *Acta Physiol Scand.* 124(4):581-9,1985), melyek kóros biokémiai és mikrokeringési változásokat egyaránt magukban foglalnak.

A csonthártya legfőbb funkciója a cortex védelme és táplálása, de a teljes csont állapota is nagymértékben függ a periosteum aktivitásától. A csonthártya élettani jelentőségére utal, hogy a periosteum vérellátásának helyreállítása már önmagában biztosítja a csontgraft túlélését, akkor is, ha a graft rosszabb vérellátású közegbe kerül (Berggren és mtsai *J Bone Joint Surg Am.* 64(1):73-87,1982). Ennek alapján a csonthártya mikrokeringése kiváló, korai indikátora a csontot érintő keringési elváltozásoknak, különös tekintettel az autotranszplantációt követő korai reperfúziós fázisra.

Jelen kísérleteinkben intravitális fluoreszcens videomikroszkópiát alkalmaztunk a csonthártya mikrokeringési változások *in vivo* megjelenítésére, mely révén számszerűsíteni tudtuk az I-R károsodás alatt a csonthártyában kialakuló gyulladásos leukocyta-endothelsejt interakciók minőségi és időbeli változását, és a perfúzió zavarát egyaránt. Kísérleteink elsődleges célja az I-R mikrokeringési szintű következményeinek vizsgálata és befolyásolása volt. Ennek részeként a kórfolyamat olyan tényezőit kívántuk megismerni, melyek befolyásolása révén csökkenhet a strukturális és funkcionális károsodás a helyi mikrokeringés szintjén.

A reperfúzió által okozott mikrokeringési diszfunkció pathomechanizmusa csak részben ismert. Néhány vizsgálat szerint az endothelium által termelt vasoconstrictor endothelin peptid (ET) döntő szerepet játszhat az I-R-hoz kapcsolódó események közvetítésében, mely hatás főleg az endothelin-A (ET-A) receptorok aktivációján keresztül érvényesül (Rubanyi és mtsai *Pharmacol Rev.* 46:325–415,1994; Schlichting és mtsai *Shock* 3:109–15,1995). Az ET felszabadulás vasoconstrictort hoz létre hipoxia vagy ischaemia

mellett bekövetkező kísérletes és klinikai kórállapotokban (Rubanyi és mtsai *Pharmacol Rev.* 46:325–415,1994) és a leukocytá-endothelsejt interakciók fokozódását okozhatja a mikrokeringésben *in vivo* (Boros és mtsai *Gastroenterology* 114(1):103-14,1998). Az ET receptorok megtalálhatók a csontban az erek simaizom sejtjein (Filep és mtsai *Eur J Pharmacol.* 219:343–4,1992) és az ET-A receptor aktiváció vasoconstrictiot vált ki a csont mikrokeringésében (Coessens és mtsai *J Orthop Res.* 14:611–7,1996). Az ET szerepe a csont mikrokeringésében azonban még nem tisztázott, ezért jelen munkánk első részében az endogén ET hatását vizsgáltuk a csonthártya I-R pathomechanizmusában.

A kísérletek második sorozatában a foszfatidilkolin (PC) kezelés hatékonyságát vizsgáltuk a fenti kórképben. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy az I-R folyamatához fizikai membrán defektus, PC degradáció és az endogén PC források kimerülése társul (Bruhl és mtsai *Life Sci.* 75:1609-20,2004; Jones és mtsai *Am J Path.* 135:541-56,1989; Gross és mtsai *Trends Cardiovasc Med.* 2:115-24,1992). Az is bizonyítást nyert, hogy az ischaemiás prekonkondicionálás visszaállítja a membránok stabilitását és egyidejűleg megakadályozza a foszfolipid degradációt (Bruhl és mtsai 2004). Ezek az eredmények azt sugallták, hogy a PC, mint mindenütt jelenlévő membránképző entitás, káros ingerek hatására depletálódhat, és az endogén PC raktárak feltöltése kedvező hatású lehet (Jones és mtsai *Am J Path.* 135:541-56,1989). A csont esetében azt is kimutatták, hogy az endogén PC számos élettani folyamatot befolyásolhat, így szabályozza a csontképződés indukcióját (Han *Connec Tissue Res.* 44:160-6,2003), a reszorpciót (Kwak és mtsai *Biochem Pharmacol.* 67:1239-48,2004) valamint a kalcifikációt is (Bonucci és mtsai *Eur J Histochem.* 41:177-90,1997). A PC szerepe azonban nem ismert a végtag ischaemiával járó kórállapotok vonatkozásában. Kísérleteink második sorozatában tehát megvizsgáltuk a PC kezelés hatását a csonthártya mikrokeringésére, a szöveti leukocytá akkumulációra és a gyulladásos reakciók fokozódásában szerepet játszó hízósejtek degranulációjára.

CÉLOK

A jelen munka során célul tűztük ki:

- a végtag I-R által kiváltott mikrokeringési változások vizsgálatát. Ez magában foglalta a szöveti perfúzió minőségi változásainak, az elsődleges és másodlagos leukocytá-endothelsejt interakcióknak, a leukocyták szöveti inváziójának valamint a szöveti hízósejt degranuláció mértékének vizsgálatát,

- az endogén ET szerepének tisztázását a tibia periosteumának ischaemiás károsodása során az ET-A receptor gátlás révén,
- és a PC kezelés hatásának vizsgálatát a fenti mikrokeringési és szöveti reakciókra.

MÓDSZEREK

Sebészi előkészítés

Kísérleteinkben Wistar patkányokat használtunk pentobarbitál altatásban. A tibia mediális felszínének periosteumát operációs mikroszkóp alatt a m. gracilis posterior atraumatikus módszerrel történő átmetszése révén készítettük elő az intravitális mikroszkópiás vizsgálatra.

Kísérleti protokoll és csoportok

Kísérleteinket két fő sorozatban végeztük. Az első sorozatban az endogén ET hatásait vizsgáltuk négy kísérleti csoportban. Itt az első csoport álműtött kontrollként szolgált ($n = 4$), a másodikban ($n = 5$) 60 perc teljes végtag ischaemiát idéztünk elő az a. femoralisra felhelyezett miniklip és tourniquet együttes alkalmazásával, melyet 180 perc reperfüzió követett. Az állatok harmadik ($n = 5$) és negyedik csoportjában ($n = 4$) az utóbbi kísérleti protokollt alkalmaztuk az ET-A receptor antagonistá ETR-p1/fl peptid (Kurabo Ltd., Osaka, Japan; 100 nmol kg^{-1}) és a BQ 610 (100 nmol kg^{-1} , Sigma Chemical) reperfüzió elején történő intravénás adása mellett.

A kísérletek második sorozatában az exogén PC hatását vizsgáltuk a periosteum mikrokeringési és a környező izom biokémiai reakcióira teljes végtag I-R során. Ebben a sorozatban az első két csoport álműtött, hordozóanyaggal ($n = 7$) vagy PC-vel kezelt ($n = 6$) kontrollként szolgált, míg a másik két csoportban a fent ismertetett módon ischaemiát hoztunk létre hordozóanyag ($n = 7$) vagy PC ($n = 6$, 50 mg kg^{-1} , Phospholipid GmbH, Köln, Németország) reperfüzió elején történő intravénás adása mellett. A kísérletek végén a környező izomból (m. gracilis anterior) biopsziákat vettünk biokémiai és szövettani analízis céljából.

Intravitális videomikroszkópia

A tibia mikrokeringésének vizsgálatát Zeiss Axiotech Vario 100HD típusú intravitális mikroszkóp segítségével fluorescein isothiocyanat-tal jelzett vörösvérsejtek és rhodamine-6G-vel jelzett leukocyták révén végeztük. A mikroszkópot CCD kamera révén egy S-VHS videorekorderhez kapcsoltuk és a mikrokeringés változásait rögzítettük kontroll állapotban, majd a reperfüzió 30, 60, 120 és 180. percében. A mikrokeringési paramétereket egy számítógép software segítségével „off-line” analizáltuk. A vizsgálat alapjául a következő paraméterek szolgáltak: *funcionális kapilláris denzitás* (FCD, mm^{-1}): az átjárható kapillárisok hossza a

megfigyelt terület nagyságára vonatkoztatva (cm^{-1}), *a vörösvérsejt áramlási sebesség* (RBCV, $\mu\text{m s}^{-1}$), *kitapadt leukocyták száma*, vagyis azok a sejtek, amik nem mutatnak mozgást az endothelsejtek felszínén 30 s alatt (sejtszám / mm^{-2}), *rollingot (gördülést) mutató leukocyták aránya*: vagyis olyan leukocyták százalékos aránya, melyek nem érték el a középvonalba haladó vörösvérsejtek sebességének 40%-át.

Szövetani vizsgálatok

Az I-R-n szintén átesett végtag csontot környező izomszövetében a kísérletek végén vett mintákból toluidin kék és safranin-O festést követően meghatároztuk a hízósejt degranuláció mértékét.

Biokémiai vizsgálatok

A postischaemiás izomszövetből meghatároztuk a mieloperoxidáz enzim aktivitást (MPO, Kuebler módszere szerint *Int J Microcirc.* 16:89-97,1996) a leukocyták szöveti akkumulációjának vizsgálata céljából.

Eredményeink kiértékeléséhez statisztikai analízisként nem paraméteres tesztekkel használtunk.

EREDMÉNYEK

Az endogén ET hatása a periosteum postischaemiás mikrokeringési változásaira

Az I-R hatására az FCD-ben jelentős csökkenés jelentkezett (átlagosan 235 cm^{-1} -ről, 153 -ra, 144 -re, majd 158 cm^{-1} -re csökkent az érték) a reperfúzió 60, 120 majd 180. percére, mely csökkenést mind az ETR-p1/fl peptid, mind a BQ-610 (ET-A receptor antagonisták) jelentősen mérsékelte.

A posztkapilláris venulákban a leukocyták 30%-a mutatott rollingot az endothelsejtek felszínén a kísérletek kezdeti szakában, mely nem változott jelentősen az álműtött állatokban. A 60 perc ischaemiát követő reperfúzió alatt azonban szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető mind az elsődleges, mind a másodlagos leukocytá-endothelsejt interakciókban. Mind a gördülő leukocyták százalékos aránya, mind a kitapadást mutatók száma jelentősen növekedett (a rolling 77% , 71% , és 65% -ra, a kitapadás pedig közel négyszeresére) a reperfúzió 60, 120 és 180. percére. Az ET-A receptor antagonisták kezelése szignifikánsan csökkentették leukocytá-endothelsejt interakciók mindkét formáját a csonthártya venuláiban.

A PC kezelés mikrokeringési, biokémiai és szövettani hatásai végtag I-R során

A második kísérleti sorozatban az RBCV tartósan, míg a PC kezelés hatására csak átmenetileg csökkent a reperfúzió során.

Az FCD szintén szignifikánsan és tartósan csökkent az I-R hatására, ám a PC kezelés következtében a kontrollhoz hasonló értékre emelkedett reperfúzió késői szakára.

A leukocyt rolling 20.8%-ról 34.4-re és 40.0%-ra növekedett a reperfúzió 120 és 180. percére, míg a kitapadás több mint kétszeresére nőtt a kísérlet ezen szakaszaira. A PC hatására ezen értékek mindvégig szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a vivőanyaggal kezelt I-R csoportban.

Az izom MPO aktivitás mintegy háromszorosára emelkedett, a degranulációt mutató hízósejtek aránya pedig 7,6%-ról 82,5%-ra nőtt az I-R hatására. A PC kezelés mindkét változást szignifikánsan mérsékelte.

MEGBESZÉLÉS

Jelen kísérleteinkben viszonylag rövid ideig tartó, átmeneti végtag ischaemia jelentős kapilláris perfúziós zavart és a leukocyt-endothelsejt interakciók fokozódását eredményezte a periosteum mikrokeringésében, mely együtt járt a szomszédos vázizom leukocyt akkumulációjával és a hízósejtek degranulációjával.

A mikrokeringési változásokat leíró paraméterek közül a kapilláris perfúzió (FCD) csökkenése a szöveti oxigenizáció romlását valószínűsítő paraméter. Ennek hátterében korábbi kísérletes megfigyelések szerint prekapilláris vasoconstrictio, interstitialis oedema, vagy fokozódó leukocyt-endothelsejt interakciók állhatnak. Ezen túlmenően jelen kísérleti eredményeink arról tanúskodnak, hogy az FCD jelentősen javítható az ET-A antagonistá kezelé hatására. Az ET-ről kimutatták, hogy nemcsak erős vasoconstrictor a csontban (Coessens és mtsai *J Orthop Res.* 14:611–7,1996), de szerepet játszik az endothelialis barrier funkció szabályozásában is (Filep és mtsai *Eur J Pharmacol.* 219:343–4,1992). Ezen túlmenően jelentős pro-adhezív hatást is tulajdonítanak a peptidnek; mely az adhéziós molekulák közül a P-selectin révén valósul meg (Sanz és mtsai *Am J Physiol.* 277:H1823–30,1999). Eredményeink arról tanúskodnak, hogy a leukocyt-endothelsejt interakciók is jelentősen mérsékelhetők az ET-A receptor gátlásával. Kísérleteink nem adnak lehetőséget annak vizsgálatára, hogy a fenti faktorok közül melyik az elsődleges tényező a postischaemiás csonthártyában a kapilláris perfúzió vonatkozásában, azonban eredményeink egyértelmű

bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az endogén ET szerepet játszik az I-R-n átesett csonthártya mikrokeringési károsodásában és a folyamat szabályozásában.

Kísérleteinkben nemcsak a leukocytá-endothelsejt interakciók jelentős fokozódását, hanem a környező izomzat hízósejtjeinek degranulációját is megfigyeltük az ischaemiás inzultus hatására. Mindkét jelenséget igen kedvezően befolyásolta a PC kezelés. Különböző kórállapotokban kimutatták, hogy az endogén PC raktárak lecsökkenhetnek (Lieber és mtsai *Alcohol Clin Exp Res.* 21:375-9,1997, Bruhl és mtsai *Life Sci.* 75:1609-20,2004), ezért felvetődik, hogy a jelen hatás hátterében is a membránraktárak részleges helyreállítása áll. Kimutatták ugyanis, hogy noxa hatására a foszfolipáz-D aktiválódik, mely szerepet játszik olyan membrán alkotórészek lebomlásában (és ezáltal biológiai hozzáférhetőségének csökkenéséhez) (Exton és mtsai *Biochim Biophys Acta* 1439:121-33,1999; Hansen és mtsai *Chem Phys Lipids* 108:135-50,2000), melyek endogén védő szerepet játszhatnak az I-R-hoz társuló oxido-reduktív stressz hatásainak ellensúlyozásában (Ghyczy és mtsai *Br J Nutr.* 85:409-14,2001). Éppen ezért a PC kezelés szubsztrátot biztosít ezen enzimrendszernek, és feltételezhetően nem maga a PC, hanem annak metabolitjai fejtenek ki védő hatást intracelluláris szinten. Ezek a hatások a jelenlegi kísérletek azon megfigyeléseire szolgáltathatnak magyarázatot, mikor a mikrokeringés hatékonyságának javulását láttuk a PC hatására. Ezeknek a biokémiai mechanizmusoknak a tisztázása azonban metodikailag túlmutat a jelen kísérlet által adott lehetőségeken.

Eredményeink kapcsán felmerül, hogy a PC hatásaként jelentkező kisebb mértékű neutrophil-endothelsejt interakció és a hízósejt degranuláció jelentős mértékű csökkenése összefügghet – vagyis a jelenségek között ok-okozati kapcsolat állhat fenn. A hízósejtekről ismert, hogy nemcsak immunológiai mechanizmusok révén, hanem az I-R-val összefüggésben is - elsődlegesen mechanikus és oxidatív hatások révén - aktiválódnak (Galli és mtsai *N Engl J Med.* 328:257-65,1993). A hízósejt degranuláció egyúttal gyulladáshoz vezető mediátorok felszabadulását eredményezi (Tannenbaum és mtsai *J. Immunol.* 125:325-35,1980). Emellett az ET felszabadulás önmagában is kiválthat hízósejt aktivációt (Boros és mtsai 1998). Az I-R folyamán degranulálódó hízósejtek (Fawcett és mtsai *Anat Rec.* 121:29-51,1951) így hozzájárulnak a leukocytá sequestrációhoz (Thorlacius és mtsai *Biochim Biophys Res Commun.* 203:1043-9,1994; Gaboury és mtsai *J Immunol.* 154:804-13,1995). Ezek a hatások adhéziós molekulák pl. P-selectin, $\beta 2$ integrin and ICAM-1 fokozott expressziója révén valósulnak meg (Kubes és mtsai *J Immunol.* 152:3570-7,1994; Gaboury és mtsai 1995).

A jelen kísérletek nem nyújtottak lehetőséget a periosteumban a hízósejtek által mediált mikrokeringési reakciók közvetlen vizsgálatára. Munkacsoportunk kísérletei a

hízósejtek degranulációja kapcsán azonban hasonló eredménnyel jártak a nyelőcső vonatkozásában is (Erős és mtsai *World J Gastroenterol.* 12:271-9,2006), ahol a PC gyulladáscsökkentő hatása egyértelműen a hízósejtek stabilizálása mellett valósult meg. Ezért feltételezésünk szerint a PC azáltal befolyásolta kedvezően a mikrokeringési gyulladáso mechanizmusokat, hogy a leukocytá aktivációt a hízósejtek stabilizálása révén kivédte.

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. *In vivo* kísérleteink lehetőséget biztosítottak a végtag ischaemia által okozott mikrokeringési változások számszerűsítésére. Az I-R által okozott károsodás a periosteum mikrokeringésének romlásában, a leukocytá-endothelsejt interakciók aktiválásában és a hízósejtek degranulációjában nyilvánult meg.
2. A periosteum postischaemiás károsodása vasoconstrictor mediátorok, köztük az ET felszabadulását eredményezte, mely szerepet játszik a perfúziós zavar és a mikrokeringési szintű gyulladás mediálásában ET-A receptorok aktiválódása révén.
3. A PC kezelés jelentős védő hatású volt a fenti modellben. A kezelés mérsékelte a végtag I-R káros következményeit, csökkentette a perfúzió zavarát és a helyi szöveti gyulladáso reakciót, a leukocyták akkumulációját és a hízósejtek aktivációját. Ezek a megfigyelések felvetik a PC kezelés potenciális terápiás hatását végtag I-R károsodás esetén.

A TÉZIS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

Wolfard A, Csaszar J, **Gera L**, Petri A, Simonka JA, Balogh A, Boros M. Endothelin-a receptor antagonist treatment improves the periosteal microcirculation after hindlimb ischemia and reperfusion in the rat. *Microcirculation* 9(6):471-6. 2002. IF (2002) = 2.125

Gera L, Varga R, Török L, Kaszaki J, Szabó A, Nagy K, Boros M. Beneficial effects of phosphatidylcholine during hindlimb reperfusion. *Journal of Surgical Research* 2006. (accepted for publication). IF (2005) = 1.956

Varga R, **Gera L**, Török L, Kaszaki J, Szabó A, Nagy K, Boros M. Effects of phosphatidylcholine therapy after hindlimb ischemia and reperfusion. *Magyar Sebészet* 2006. (accepted for publication). IF= 0

Varga R, **Gera L**, Kaszaki J, Szabó A, Ghyczy M, Boros M. Phosphatidylcholine treatment improves the periosteal microcirculation following hindlimb ischemia and reperfusion. *European Surgical Research* 36 (S1):14. 2004.