

**MTA Doktori értekezés**

**Az ischaemiás kórállapotok befolyásolhatósága az  
idő függvényében**



**Dr. Szijártó Attila**

Semmelweis Egyetem

Budapest

2015

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	2
Rövidítések jegyzéke .....	6
1. Bevezetés, irodalmi áttekintés .....	8
1.1. Ischaemia, reperfúzió - Hiány és többlet paradoxona .....	9
1.1.1. Alapfogalmak.....	9
1.1.2. Ischaemia térben és időben .....	12
1.2. Az ischaemia-reperfúziós károsodás mechanizmusa.....	13
1.2.1. Lokális károsodások.....	14
1.2.2. Szisztémás hatások.....	22
1.3. Ischaemia-reperfúziós károsodás csökkentésének lehetőségei .....	25
1.3.1. Az IR károsodást mérséklő sebészeti eljárások.....	25
1.3.2. Az IR károsodást mérséklő nem sebészeti eljárások.....	38
2. Esetismertetések.....	47
2.1. Alsóvégtagi kritikus ischaemia .....	47
2.2. A máj ischaemiás-reperfúziós károsodás.....	54
3. Célkitűzések.....	58
4. Anyagok és módszerek.....	60
4.1. Kísérleti elrendezés - Műtéttechnika .....	60
4.1.1. Törvényi háttér.....	60
4.1.2. Állatok .....	60
4.1.3. Anesztézia, testhőmérséklet és a műtét ideje .....	60
4.1.4. A műtét menete - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálat .....	61
4.1.5. Csoportbeosztás - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálata .....	61
4.1.6. A műtét menete - Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata .....	63
4.1.7. Csoportbeosztás - Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata .....	65
4.2. Vizsgált paraméterek - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálata.....	66
4.2.1. Hemodinamikai vizsgálatok.....	66
4.2.2. Hisztológiai vizsgálatok.....	67
4.2.3. Izomrost életképesség (NBT - morfometria).....	68
4.2.4. Laboratóriumi vizsgálatok .....	69
4.2.5. Redox-státusz .....	69
4.2.6. Molekuláris vizsgálatok (ELISA).....	69
4.2.7. Távoli szervek károsodásaink vizsgálata.....	69
4.3. Vizsgált paraméterek - Máj ischaemia-reperfúziós károsodások vizsgálata.....	72

4.3.1. Hemodinamikai vizsgálatok.....	72
4.3.2. Hisztológiai vizsgálatok.....	72
4.3.3. Életképesség vizsgálat (NBT morfometria) .....	74
4.3.4. Laboratóriumi vizsgálatok .....	74
4.3.5 Redox-státusz .....	74
4.3.6. Molekuláris vizsgálatok (ELISA) .....	75
4.4. Statisztikai analízis.....	75
5. Eredmények .....	77
5.1. Rövididejű végtagi ischaemia vizsgálata és mérséklése PostC segítségével .....	77
5.1.1. Végtagi mikrocirkuláció vizsgálata .....	77
5.1.2. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata.....	77
5.1.3. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata .....	78
5.1.4. Szabadgyök szint - luminometriás vizsgálatok .....	79
5.1.5. Szérum TNF-a szint meghatározás .....	79
5.1.6. Szérum IL-6 szint meghatározás.....	80
5.2. Rövididejű végtagi ischaemia veseszövődményeinek vizsgálata PostC segítségével .....	80
5.2.1. Vese mikrocirkuláció vizsgálata.....	80
5.2.2. Vese fénymikroszkópos vizsgálata .....	81
5.2.3. Anti-myoglobin immunhisztokémiai vizsgálat .....	81
5.2.4. Lipid peroxidáció .....	82
5.2.5. Vese funkció meghatározása.....	82
5.2.6. Szöveti HSP-72 szint meghatározás.....	83
5.3. Rövididejű végtagi ischaemia tüdőszövődményeinek vizsgálata PostC segítségével .....	83
5.3.1. Tüdő fénymikroszkópos vizsgálata.....	83
5.3.2. Tüdő szövet nedvességtartalma (W/D arány).....	83
5.3.4. Szöveti MPO aktivitás meghatározás .....	84
5.3.5. Szöveti HSP-72 szint meghatározás.....	84
5.3.6. Artériás vérgázanalízis.....	84
5.4. Rövid idejű végtagi ischaemia bélszövődményeinek vizsgálata és mérséklése PostC segítségével.....	85
5.4.1. Artériás középnyomás meghatározása .....	85
5.4.2. Arteria mesenterica superior véráramlásának vizsgálata .....	85
5.4.3. A vékonybél mikrocirkulációjának vizsgálata .....	85
5.4.4. A vékonybél fénymikroszkópos vizsgálata .....	87
5.4.5. Bél mikrocirkuláció és szövettani károsodás közti korreláció .....	88
5.5. Kritikus ischaemia időtartamának meghatározása .....	88

5.5.1. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata.....	88
5.5.2. Izomrost életképesség meghatározása.....	89
5.6. Hosszú idejű (kritikus) végtagi ischaemia mérséklése PostC segítségével.....	90
5.6.1. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata.....	90
5.6.2. Izomrost életképesség meghatározása.....	91
5.6.3. Elektronmikroszkópia.....	92
5.6.4. Izomszövet nedvességtartalma (W/D arány).....	92
5.6.5. Laboratóriumi vizsgálatok.....	93
5.7. Izomrost életképesség meghatározás (NBT) vizsgálata.....	93
5.7.1. Végtagi mikrocirkuláció vizsgálata.....	93
5.7.2. Ischaemiás károsodás vizsgálata.....	94
5.8. A hosszú idejű ischaemia-reperfúziós károsodás vizsgálata.....	97
5.8.1. Izomrost életképesség meghatározása.....	97
5.8.2. Félvékony metszetek fénymikroszkópos vizsgálata.....	97
5.8.3. Elektronmikroszkópia.....	98
5.9. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - távoli szervi perkondicionálás (I-PerC).....	100
5.9.1. Artériás középnyomás meghatározás.....	100
5.9.2. Máj és alsó végtagi mikrocirkuláció vizsgálata.....	100
5.9.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata.....	101
5.9.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT).....	102
5.9.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet).....	102
5.9.6. Szérum TNF- $\alpha$ szint meghatározása.....	103
5.10. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata és a távoli szervi perkondicionálás (I-PerC) neurális hatásmechanizmusának tanulmányozása.....	104
5.10.1. Artériás középnyomás meghatározása.....	104
5.10.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata.....	104
5.10.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (morfometria).....	105
5.10.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT).....	106
5.10.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet).....	106
5.11. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - Levosimendan előkezelés vizsgálata.....	107
5.11.1. Artériás középnyomás meghatározása.....	107
5.11.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata.....	108
5.11.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (HE, Sudan IV, TUNEL, PARP).....	108
5.11.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT).....	110
5.11.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet).....	111
5.11.6. HSP-72 szint meghatározása.....	112

5.11.7. Életképesség meghatározás (NBT) .....	112
5.12. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - "Rövid latenciájú" glutamin előkezelés (Glu-R) vizsgálata	113
5.12.1. Artériás középnyomás meghatározása .....	113
5.12.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata .....	113
5.12.3. Máj metszeteinek fénymikroszkopos vizsgálata (HE, TUNEL, caspase-3) .....	114
5.12.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT) .....	114
5.12.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum) .....	114
5.12.6. TNF- $\alpha$ -szint meghatározása.....	115
5.13. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - "Hosszú latenciájú" glutamin (Glu-H) előkezelés vizsgálata .....	115
5.13.1. Artériás középnyomás meghatározása .....	115
5.13.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata .....	116
5.13.3. Máj fénymikroszkopos vizsgálata (HE, Sudan IV, TUNEL, PARP).....	116
5.13.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT) .....	118
5.13.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum) .....	118
5.14. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - PJ-34 előkezelés vizsgálata .....	119
5.14.1. Artériás középnyomás meghatározása .....	119
5.14.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata .....	119
5.14.3. Máj fénymikroszkopos vizsgálata (HE, TUNEL) .....	120
5.14.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT) .....	121
5.14.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum) .....	121
6. Megbeszélés .....	122
7. Következtetések .....	156
8. Új megállapítások .....	158
9. Összefoglalás .....	159
10. Summary .....	160
11. Irodalomjegyzék .....	161
12. Közleményjegyzék .....	180
13. Szcintometria.....	188
14. Köszönetnyilvánítás.....	190

## Rövidítések jegyzéke

ADP	adenozin difoszfát
AIF	apoptosis indukáló faktor
ALT/ALAT	alanin-aminotranszferáz
AMP	adenozin monofoszfát
AMS	arteria mesenterica superior
APAF	apoptoticus proteáz aktiváló faktor
APTI	aktivált parciális tromboplasztin idő
AST/ASAT	aszpartát-aminotranszferáz
ATP	adenozin trifoszfát
BAD	Bcl-2-associated death promoter
BUN	blood urea nitrogen/karbamid
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
cGK	cGMP függő kináz
cGMP	ciklikus guanilát-cikláz
CGRP	calcitonine gene-related peptide
CK	kreatin-kináz
cNOS	konstitutív NO szintáz
cTnI	cardiac troponin I
CsA	cyclosporin-A
EM	elektron mikroszkópia
ERK	extracellulárisan regulált kináz
ET	endothelin
Gln	glutamin
GSH	glutation
HE	hematoxilin-eozin
HIF1- $\alpha$	hypoxia inducible factor 1 alfa
HO	hem oxigenáz
HSP	heat shock protein
IL	interleukin
INF- $\gamma$	interferon- $\gamma$
iNOS	indukálható nitrogén oxid szintáz
INR	international normalised ratio
I-PreC	ischaemiás preconditionálás
IR	ischaemia-reperfúziós
K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub>	mitochondriális adenzin-trifoszfát szenzitív K <sup>+</sup>
LDH	laktát dehidrogenáz
MAPK	mitogen aktivated protein kinase
MARS	mixed antagonistic response syndrome
MODS	multi organ dysfunction syndrome
MOF	multi organ failure
MPO	Myeloperoxidáz

mPTP	mitochondrial permeability transition pore
NA	Nikotinamid
NAD/NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADH-TR	NADH-tetrazólium reduktáz
NBT	nitro tetrazolium blue
NEH-1	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -antiporter 1-es típusa
NF-κB	nukleáris-faktor-κB
NO	nitrogén-oxid
ONOO-	Peroxinitrit
PAR	poli(ADP-ribóz)
PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
Pi	anorganikus foszfát
PI3	foszfatidilinozitol-3
PKB	protein kináz B
PKC	protein kináz C
PM	plató maximum
PMN	polymorphonuclearis
PostC	posztkondicionálás
RFI	renal failure index
RISK	reperfusion injury salvage kinase
RLU	relative light unit
RT	reperfúziós terület
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TNF-α	tumor necrosis faktor-α
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
V-ATP	vacuolaris proton ATP-áz
RIPC	remote ischemic preconditioning
R-PostC	távoli szervi posztkondicionálás

**Megjegyzés:** A dolgozatban az idegen szavak latinos és magyaros írásmódja Fábrián Péter és Magasi Péter szerkesztette Orvosi helyesírási szótár [Akadémia Kiadó, Országos Információs Intézet és Könyvtár, 1992] elveit követik; ugyanakkor az általános ajánlástól (latinos írásmód: anatómiai nevek, kór- és élettani nevek, kórokozók nevei, betegségmegnevezések, műtéti eljárások; magyaros írásmód: szakterületek nevei, orvostechnikai eljárások, műszerek nevei, kémiai vegyületek) a szerző egyes esetekben önkényesen eltér a napi gyakorlatban használt, az angol terminológiát is magába foglaló írásmódokat alapul véve.

## 1. Bevezetés, irodalmi áttekintés

A szövetek perfúziós elégtelenségével járó megbetegedések a népbetegségek közé sorolandóak. A keringési megbetegedések mortalitási mutatóiban jelentkező emelkedés oka nem csupán a cardialis és cerebralis atheroscleroticus kórképekben keresendő, hanem az egyéb szervek, úm. az alsó végtagi krónikus ischaemiás károsodása során fellépő szövődmények is hozzájárulnak mindehhez. A krónikus ischaemiás kórállapotokon felül komoly hangsúlyt kapnak a sürgős ellátási kötelezettséggel járó heveny érelzáródások is. A szöveti perfúzió zavara ezen felül akár tervezetten, műtéti ellátás során is felléphet. A klinikai szituációt nagyban nehezíti, hogy az ischaemia kritikus hossza - tehát a reverzibilitás, funkcionális megtarthatóság időtartama - még máig sem világos minden szerv esetében. A szervek ischaemia toleranciája egymástól nagyban különbözik, ugyanakkor az ischaemiára adott szöveti válasz jellege sok tekintetben azonos. A szerv vérellátásának helyreáll(it)ását követő reperfúziós jelenségek paradox károsodásokat hoznak létre. A lokális ischaemia-reperfúziós (IR) károsodást generalizálódó, szisztémás gyulladással válaszjelenség kísérheti, melynek kimenetele akár fatális véget érő többszervi elégtelenség is lehet. A sebészi technikák és az aneszteziológia fejlődésével megjelent kiterjesztett resectios műtétek, a szervtranszplantációk, valamint a heveny verőér-elzáródások kapcsán fellépő ischaemia-reperfúziós károsodások csökkentésére, illetve a szövetek ischaemia toleranciájának növelésére nagy a klinikai igény. Ezekben a szituációkban a károsodás mértéke alapvetően befolyásolja a posztoperatív szövődmények kialakulását, nem utolsósorban a beteg túlélését.

Az utóbbi évtizedek felismerése, hogy az ischaemiás állapot során kialakuló szöveti oxigén-, és tápanyaghiány számos adaptációs mechanizmust indít el a sejtekben. Ezen adaptív folyamatok képesek lehetnek egy szerv ischaemia toleranciájának növelésére, a reperfúziós károsodások mérséklésére. A rövid ciklusú repetitív ischaemiás és reperfúziós periódusok alkalmazása az ischaemia előtt (prekondicionálás), vagy az után (posztokondicionálás) napjaink igen aktív kutatási területe. A fejlődés azonban nem állt meg itt. Ismertté vált, hogy egy adott szerv, szervrészlet keringés-mediált károsodása nemcsak lokális hatásokkal mérsékelhető, hanem egy távolabbi területen létrehozott, rövid ischaemia-reperfúziós epizódok alkalmazásával is. Ennek alapján a „célszervi kondicionáló eljárások” mintájára további, távoli szervi eljárások kipróbálására is sor került. A fenti sebészi adaptív - az ischaemiához „hozzászoktató” - módszerek háttérében álló különböző jelátviteli utak vizsgálatához kísérletesen alkalmazott gátló- és aktiválószerkezetek a jövőben, terápiásan is



használható gyógyszerek fejlesztéséhez jelenthetnek alapot. A fenti módszerek klinikai alkalmazása gyermekcipőben jár még ugyan, de a kezdeti tapasztalatok reményteljesek és további vizsgálatokra ösztönöznek.

Jelen munka azon gyakorló sebész szemével íródott, aki napi tapasztalatait, kérdéseit kísérletes elrendezésekbe fordítva keres választ az egyes szervek ischaemia-reperfúziós károsodásainak leírására, illetve azok kivédésének lehetőségeire. Ezt hivatott képviselni az alábbiakban tárgyalt két szerv keringészavarait bemutató egy-egy klinikai példa is. A szerző vizsgálatainak célpontjául két olyan szervet, szövetet választott (alsó végtagi vázizomzat, máj), melyek az ischaemia-reperfúziós károsodás szempontjából, annak időbeli lefolyásában és így a károsodások mérséklését célzó beavatkozások időzítetttségében jelentős eltéréseket mutatnak. Míg az alsó végtagi ischaemiás tolerancia eléri a 8-12 órát, addig májszövet esetében ez nagyjából mindösszesen egy órára tehető. Amíg az izomszövetben kialakuló reperfúziós válaszjelenségek az ischaemia-reperfúziós károsodások „tisztá” formáját mutatják, úgy a májban a speciális szöveti struktúra és a helyhez kötött macrophagok jelenléte nagymértékben megváltoztatja a folyamat dinamikáját, kimenetelét. Továbbá míg az alsó végtagi akut verőér-elzáródások egy jelenős része nem műtéti szituációhoz kötött, tehát nem tervezetten hozzuk azt létre, hanem heveny tromboemboliás jelenségek klinikai megjelenése kapcsán lép fel (számottevően leszűkítve a terápiás lehetőségek tárházát), addig a májszöveten létrehozott ischaemiás inzultus az esetek döntő hányadában tervezett műtéti beavatkozás része. Ennek megfelelően, míg az előbbi esetben a már kialakuló ischaemia és az azt követő károsodások kivédése lehet a cél, addig a máj esetén az ischaemiás tolerancia perioperatív növelése a klinikai végpont.

## **1.1. Ischaemia, reperfúzió - Hiány és többlet paradoxona**

### **1.1.1. Alapfogalmak**

Az ischaemia - vagy angolszász írásmódnak megfelelően ischemia - szavunk görög eredetű: ισχαιμία. Jelentése az „ischo” = visszatartás és a „haima” = vér szóösszetételből ered. Az ischaemia definíciója alatt kóronctani szempontból a szövetek vér-, míg élettani szempontból azok oxigénhiányos állapota értendő; azonban valójában a szövetek számára elérhető oxigénkínálat, illetve azok oxigénigénye közötti egyensúly megbomlása képi a problémát, akár az előbbi komponens csökkenése, akár az utóbbi emelkedése folytán. Az így kialakult szervi, szöveti károsodást ischaemiás sérülésnek nevezzük, amelyet elsősorban

az oxigénhiányos állapot időtartama határoz meg. Az ischaemia egy ponton túl visszafordíthatatlan károsodások forrása, ahogy ezt John Hunter is megfogalmazta 1839-ben: „*Blood ...appears to carry life to every part of the body, for whenever the whole or a part is deprived of fresh blood it very soon dies*”. [1]

Az ischaemia több formában is alakot ölthet az oda vezető kórállapotok szerint. Definíciója, illetve felosztása során a rendező elv önkényes. Lokalizáció és időbeli lefolyás tekintetében jelentős, eltérő szöveti és szisztémás következményekkel járó megjelenést mutat. Az ischaemia kapcsán így beszélhetünk globális és részleges; abszolút és relatív formákról.

*Globális ischaemia*, ha a szervezet egészének vérellátása, vérkeringése elégtelenné válik. Megjelenése elsősorban a shock kórfolyamatában észlelhető, ahol a kiváltó októl független akut, progresszív haemodynamikai zavar lép fel, mely a szövetek oxigenizációjának elégtelenségéhez vezet. A shock egyes típusaiban, a vérellátás zavara a vér *de facto* hiányából (haemorrhagias shock) ered; így hozva létre globális, mindenre kiterjedő ischaemiás állapotot. Ugyanakkor egyes shock formák estén a vérellátás zavara a hirtelen megjelenő vazodilatáció és/vagy hypotenzió (anaphylaxiás shock) miatt jön létre. *Részleges, parciális ischaemia* az egy szervre, szervrendszerre (vagy akár végtagra) lokalizált ischaemia. Ez lehet akár arteriosclerosis szövődményei kapcsán megjelenő keringési megbetegedések típusos formája (stroke, myocardialis infarktus) vagy létrejöhet egészséges érpálya mellett embólia, kompresszió vagy akár dissectio következtében. Parciális ischaemiával találkozunk kiterjesztett műtéti megoldások (májresectiók, transzplantációk stb.) során végzett érkirekesztések kapcsán is. *Abszolút ischaemia* fogalma a szöveti oxigénellátás teljes hiányát jelenti. Ezzel szemben *relatív ischaemiáról* beszélünk, ha a keringő, oxigénszállításra alkalmas elemek megléte kifogástalan, de a subcelluláris szinten ható gátló (cián) vagy szétkapcsoló-szerek (pl.: 2,4-dinitrophenol) megakadályozzák a mitochondriális légzési lánc megfelelő működését. Relatív ischaemiaként értelmezendők még azon (kór)állapotok is, mikor az oxigénkínálat-oxigénigény egyensúlya az oxigénigény drasztikus növekedése miatt alakul ki, „fiziológiás”, vagy egyébként „nyugalmi” oxigénkínálat mellett, így pl. túlfokozott szív működés (baleset, abúzus, pszichés sokk) miatti myocardialis infarctus, stb. Relatív ischaemiás folyamatok közé sorolható a „wash-out” fenomén kapcsán észlelt csökkent oxigénellátás is, mely a szerző korábbi kutatási szerint - speciális körülmények között - regenerációs triggermechanizmusok alapja is lehet. [2]

Ischaemiáról alkotott fogalmaink között a kritikus ischaemia és az ischaemia tolerancia megismerése - filozofikus mélységekbe tekintve - a félig teli, félig üres pohár problematikájára világít rá. *Ischaemia tolerancia* az a vértelenségben eltöltött leghosszabb időtartam, melyet követően a szervi funkciók visszatérnek, illetve a regeneráció biztosított (azaz a folyamat még reverzibilisnek tekinthető). Ezzel szemben, illetve emellett, a toleranciát jelző időkorlát átlépésével érhető el a *kritikus ischaemia*, mely az a hevenyen kialakuló ischaemiás esemény, időpillanat, melyet követően a revaszkularizáció (már) nem teszi lehetővé a szerv túlélését (azaz a folyamat irreverzibilis károsodásokat eredményezett). Minden sejt, szövet, szerv esetén más és más a tolerálható vagy kritikusnak nevezett ischaemiás időtartam. Populációs szinten a kritikus ischaemiás időtartam az a vértelenségben eltöltött idő, mely a populáció több, mint 50%-ában a szervben nagy kiterjedésű necrosishoz, vagy halálhoz vezet. [3] Ez az időtartam agy esetén percek, míg a vázizomzat kapcsán hosszú órákat is jelenthet.

Fontos azonban megjegyezni, hogy az ischaemia ugyanakkor Janus arcú jelenség is, mint azt majd a jelen dolgozat további része is igazolja. Előjáróban annak említése fontos, hogy amíg az elégtelen vérellátási körülmények és azt követő szöveti kórállapotok a szervek vagy a szervezet károsodását, akár halálát jelentik, jelenthetik, addig az ischaemia egyben adaptív válaszjelenségek induktora is. Ezen utóbbi tulajdonsága révén mind az angiogenezis, mind a későbbiekben tárgyalt adaptív, „hozzászoktató” sebészeti mechanizmusok elhagyhatatlan szereplője is maga az ischaemia.

A reperfüzió a vértelenség végét jelenti. A vér ismételt beáramlása nélkülözhetetlen a szervek, szövetek túléléséhez és az életműködés visszatéréséhez. A reperfüzió helyreállítja a szövetek oxigén és energiaellátását, valamint elszállítja az ischaemia ideje alatt felhalmozódott toxikus metabolitokat. A jelenség így egyrészt megmenti az ischaemia során reverzibilisen károsodott sejteket, másrészt paradox módon a sejtek további súlyos szerkezeti és funkcionális károsodásához vezet. Ezen utóbbi jelenséget reperfüziós károsodásként tárgyalja az irodalom.

Az alapfogalmak közt megemlítendő a majd később részletezendő (ld.: 1.2.2 fejezet) reperfüziós szindróma, mely nagy mennyiségű szövetet érintő, jelentős IR károsodás után kialakuló, lokális és szisztémás szövődeményekkel járó komplex tünetegyüttes. [4] A szindróma lokális komponense az ischaemiát elszenvedett szövet károsodását, szisztémás

komponense pedig az IR károsodás helyétől távol eső régiókban, másodlagosan kialakuló többszervi elégtelenséget, szisztémás gyulladáshoz vezető reakciót jelenti. [5]

### **1.1.2. Ischaemia térben és időben**

Az ischaemia időben egy hosszú, folytonos spektrumot alkot. A spektrum egyik végpontját az egészséges érrendszer mellett létrejött akut, heveny vérkeringési elégtelenségek (pl. embolizáció, műtéti kirekesztések) képezik, míg a spektrum másik végén a krónikus ischaemia foglal helyet, ahol a beszűkült ereken át már csak minimális a „szupportív” tápanyagellátás. A két végállapot között helyezkednek el a krónikus keringési zavarok akut hanyatlásai.

Heveny keringési elégtelenségben, akut ischaemiában a szervek, vagy a szervezet számára az oxigén és tápanyagok részleges vagy teljes hiánya hirtelen elviselhetetlenné válik, nincs idő a kompenzáló mechanizmusok kialakulására, így egy ponton túl ("point of no return") az ischaemia nem túlélhető. Klinikus szeméssel vizsgálva az akut ischaemia jelentőségét - a szervi érintettség mellett - az irreverzibilitás (ld. kritikus ischaemia) gyors bekövetkezése és így az időfaktor kulcsszerepe adja. Az akut ischaemiás léziók felismerése a legtöbb esetben nem nehéz; a progresszió szervenként különböző ütemű, de viszonylag gyors. Amennyiben nem sikerül időben ellátni ezeket a kórállapotokat, akkor a gyakori, maradandó károsodások mellett a szisztémás szövődmények miatt kialakuló magas halálozási aránnyal is számolni kell. A hevenyen fellépő keringészavarok kapcsán a kórlefutást befolyásoló tényezők közé sorolható (1) az érintett szerv ischaemiás tolerancia ideje; (2) a reziduális perfúzió mértéke; (3) a kollaterális rendszer fejlettsége; (4) az elzáródott ér nagysága; illetve (5) az ischaemiás szövetek mennyisége. Gyakorlati tapasztalat, hogy szerencsére a reziduális perfúzió, illetve a kollaterális rendszer miatt az ischaemia ritkán lesz komplett. Különbség észlelhető nagyobb régiókat ellátó nagy erek (jobb kollaterális hálózat, de nagy tömegű ischaemiás szövet) és a kisebb erek elzáródása (végartériák így az ischaemia lokálisan súlyosabb, de a szisztémás reperfúziós károsodások veszélye kisebb) között.

A heveny keringési elégtelenség állapotai között különleges helyet foglal el a iatrogen módon, tervezetten, műtéti beavatkozás kapcsán létrehozott ischaemia. Ekkor az operálandó szerv ischaemiás toleranciájának ismerete folytán, a vaszkuláris kirekesztések időtartamának szabályozásával a szöveti károsodás kivédhető, jelentősen mérsékelhető. Ugyanakkor amennyiben az adott szerv, szövet eleve károsodott (pl: zsírmáj, cirrhosis,

kemoterápiát követő májkárosodás stb.), úgy a populációs szinten ismerni vélt szervi ischaemiás tolerancia jelentős mértékben módosulhat. Ezen utóbbi felismerés megléte arra sarkalja az operatórt, hogy a tervezett műtéti ellátás során az esetleges - még populációs szinten belül elviselhetőnek ítélt érkirekesztések által létrejött - szervi károsodásokat mérsékelje. Ennek módszereként alkalmazhatóak a későbbiekben tárgyalásra kerülő adaptív sebészeti technikák.

A fentiekkel szemben a hosszan fennálló, krónikus, részleges vagy akár teljes verőérszűkület, egy bizonyos mértékig képes a szövetek vérellátását kollaterális hálózatokon át biztosítani (pl. alsó végtagi krónikus ischaemia), továbbá a szerveket, szöveteket adaptálni egy alacsonyabb ellátási szinthez. A kollaterálisok kialakulása és az ezzel kapcsolatosan megfigyelt ér-újjonnan képződés (angioneogenesis) az ischaemia Janus arcú tulajdonságainak egyike. A kompenzáció (a hypoxia indukálta angiogenesis) eredményként a szerv alapvető funkciói nyugalmi állapotban megtartottak lehetnek. A „nyugalmi helyzet” feletti igénykor a kollaterálisok ellátási képességei azonban elégtelenek lesznek, hiszen igaz azok összkalibere még elegendő lenne, de speciális szerkezetből fakadóan (spirális lefutás) keringési ellenállásuk fokozott (ld.: 8. ábra). Így a hirtelen fellépő oxigénigény kielégítésére a dugóhúzószerűen lefutó kollaterális erek már nem elegendőek. Ezen esetekben a fokozott igény mellett megjelenő keringési elégtelenséget klinikai manifesztáció is kíséri (claudicatio, intermittens angina abdominalis). A krónikus vérellátási zavarhoz társuló heveny romlás klinikai képe igen változatos, két azonos forma szinte nem is fordul elő. [6]

## **1.2. Az ischamia-reperfúziós károsodás mechanizmusa**

Az akut verőér elzáródások (úm. alsó végtagi ischaemia), illetve a tervezett műtétek (major máj resectiok) során alkalmazott érkirekesztések sok esetben igen nagy tömegű szövet ischaemiás károsodásához vezetnek. A sejtek életben maradásához elengedhetetlen a vérkeringés és az oxigenizáció az adott szerv ischaemia-toleranciájának megfelelő időn belül történő helyreállítása. Ismert tény ugyanakkor, hogy paradox módon az anaerob metabolizmusra áttért sejtek reperfúziója újabb károsodást okoz. Az IR károsodás mértéke alapvető meghatározója a kirekesztett szerv posztoperatív regenerációjának, a műtét kapcsán megjelenő komplikációknak, és így a betegek életkilátásainak. Az IR során fellépő károsodások következményei lokális és szisztémás szinten jelennek meg.

### 1.2.1. Lokális károsodások

A sejtekben létrejött károsodások egy része már az ischaemia ideje alatt visszafordíthatatlan jelenséggént lép fel, egy másik része viszont a reperfüzió során kibontakozó további károsodás eredményeként jelenik meg. [7]

#### 1.2.1.1. Az ischaemiás sérülés jellemzői

Az **ischaemiás sérülés** lényege, hogy csökken az ionhomeostasis fenntartáshoz szükséges energia. Kiürülnek a nagy energiájú foszfát-raktárak, károsodnak a membránfunkciók, a mitochondriális enzimrendszer zavara végül sejthalálhoz vezet. Az ischaemiát reduktív stresszállapot jellemzi, annak következtében, hogy a Szentgyörgyi-Krebs ciklusba belépő elektrondonorok jelentős NADH felhalmozáshoz vezetnek, tekintve, hogy a terminális oxidáció (ATP szintézis) elmarad. Az oxidatív foszforiláció gátoltsága révén, az ischaemia következtében anaerob folyamatok indulnak el, melyek hatására acidosis alakul ki. A lokális protonkoncentráció megemelkedése serkenti a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -antiporter 1-es típusát (NHE-1), mely egy  $\text{H}^+$ -t szállít kifelé a sejtből egy  $\text{Na}^+$ -ért cserébe. Ezen felül a membránfunkciók sérüléséből fakadóan a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -pumpa működése is zavart szenved, mely következménye  $\text{Na}^+$ , vele párhuzamosan víz további beáramlása. Mindezen folyamatok intracellularis nettó  $\text{Na}^+$  felhalmozódást eredményeznek, mely lelassítja a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  kicserélő rendszert, sőt egy ponton túl meg is fordíthatja működésének irányát. Ennek hatására az ischaemia alatt nagymennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  áramlik a sejtbe, melynek egy részét a mitochondriumok felveszik, illetve ezzel egy időben a  $\text{Ca}^{2+}$  a foszfolipázok, a kalmodulin által regulált proteázok és endonukleázok aktivációját indukálja. [8]

#### 1.2.1.2. A kritikus ischaemia detektálása

A tisztán ischaemiás események fent említett legizgalmasabb pillanata az ischaemiás tolerancia átlépése, illetve a kritikus ischaemiás idő, a „point of no return” elérése. A kritikus ischaemia pillanatának **sejtszintű** megállapítása - azaz a sejthalál bekövetkeztének detektálás valamilyen változó függvényében - csak biokémiai és ultrastrukturális módszerekkel elképzelhető. A biokémiai mérhető paraméterek közé tartoznak: (1) ATP és bomlástermékeinek koncentráció mérése (ADP, AMP, Pi, inozin, xantin, hypoxantin); (2) anaerob bomlástermékek meghatározása (laktát); (3) energiaraktárak felmérése (glikogén, foszfo-kreatin); (4) pH változások detektálása; (5) ioneltérések mérése ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ), (6) respirációs enzimaktivitási vizsgálatok. [9] Szívizomsejteken végzett vizsgálatok szerint

a sejten belüli ATP koncentráció csökkenése jól jelzi károsodás mértékét: 80-90%-os ATP-szint csökkenés sejtnecrosishoz vezet. [10] Más, szintén szívizmon végzett vizsgálatok azt igazolták, hogy 60 perc ischaemia után már a nagyenergiájú foszfátok felét inozin, xantin, hypoxantin tette ki, melyek arány a 150. percre döntővé vált az ADP és AMP mellett, míg ATP nem volt detektálható. [9] Harántcsíktolt izomzat tekintetében pedig igazolódott, hogy az glikogén koncentráció csökkenése csak a hetedik órára, míg a foszfo-kreatin szint megfeleződése kb. 1,5 óra múlva észlelhető. [11] Mások azt igazolták, hogy a kritikusnak vélt intramyocelluláris pH a foszfo-kreatin szintek esésével egyidőben jelentkezik az ischaemia második órájában. [12] Sejtszintű kritikus ultrastrukturális változásokat elektronmikroszkóppal a mitokondriumokban detektálhatunk először, ún.: duzzadás (mely csak gyanújel, mértéke az idővel nő), denz testek megjelenése, külső membrán szakadása. Magi eltérések szintjén karyopiknózis (duzzadt mag, széli heterokromatinizáció, prominens nucleolus csak gyanújel, mértéke az idővel nő), karyorrhexis észlelhető. [13] A fenti biokémia és ultrastrukturális módszerek érzékenyek ugyan, de hosszú vizsgálati időt vesznek igénybe, így klinikai alkalmazhatóságuk nincs és ilyen formán nem is hordoznak releváns információt, tekintve, hogy a szöveti sejtösszetétel is inhomogén (erektől való távolság, sejt életkora stb).

Az (alsóvégtagi) izomszövetet érintő akut ischaemiás események klinikai megjelenése (embólia, trombosis stb.) során a szöveti szintű kritikus ischaemia detektálása különös jelentőséggel bír, tekintve, hogy ezen „pont” ismerete elengedhetetlen az optimális terápia - revaszkularizáció vagy amputáció - megválasztásában. A hosszantartó ischaemiát követő revaszkularizáció súlyos, életveszélyes állapotot idézhet elő (ld. reperfüziós szindróma). Ebből következik, hogy rekanalizációra abban az esetben érdemes törekedni, ha a végtag megmenthetőségének reális esélye áll fent. Amennyiben izomkárosodás súlyossága olyan fokú, hogy a revaszkularizáció a végtag túlélését már nem képes biztosítani a végtag amputációja lehet csak terápiás értékű.

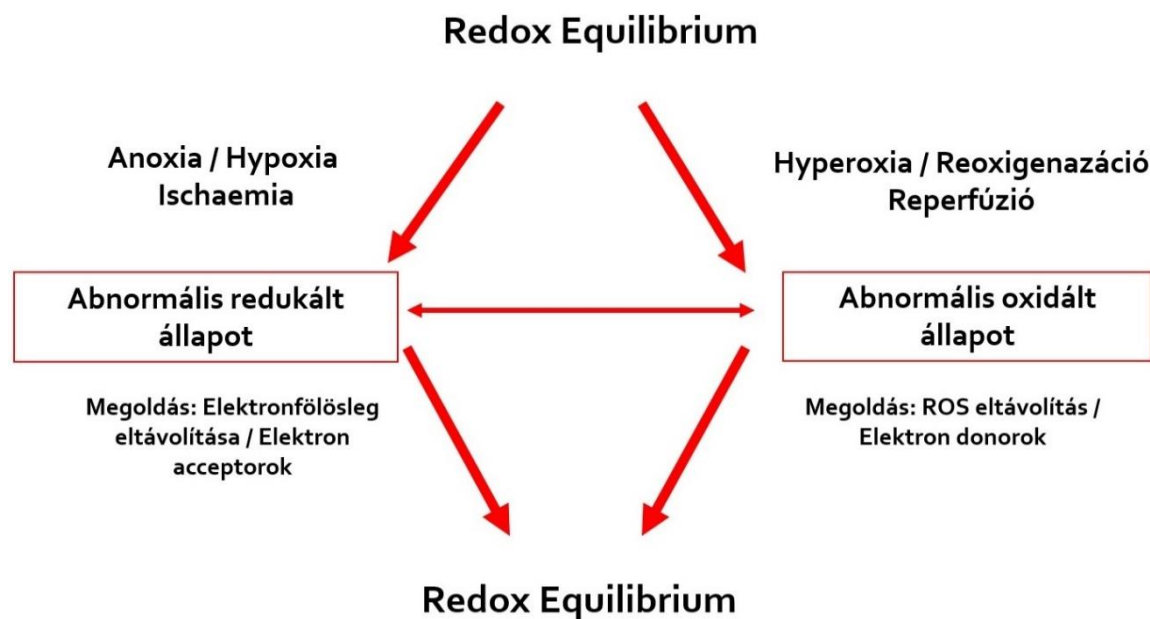
Az ischaemia okozta izomkárosodás megítélésére azok a módszerek optimálisak, melyek a sejtek energiaháztartását vizsgálják, tekintve, hogy az energiaraktárak kimerülése a sejthalál egyik legfontosabb kiváltó tényezője. [14] A sejtek, szövetek ATP koncentrációjának biokémiai meghatározása időigényes, a klinikai gyakorlatban nem alkalmazható eljárás. Ezért az energiahordozók közvetlen meghatározása helyett a celluláris energia-szint indirekt vizsgálatára alkalmas eljárások jelenthetik a megoldást. A mitokondriumok megléte, mint energiatermelő egységek, a sejtek túlélésének kulcsa [15],

így ezek kimutatása kézenfekvő módszer. A mitochondrialis légzési lánc aktivitása ischaemia alatt csökken, mely aktivitás-csökkenés enzim-kémiai módszerek segítségével rövid idő alatt kimutatható különböző tetrazólium sók alkalmazásával. A működő enzim-komplexek a tetrazólium sókat redukálják, ezzel színes reakciótermék (formazán) keletkezik. [16] Ha a mitochondriumok károsodnak, úgy az oxidációs enzim-komplexek működése is megszűnik, így nem képesek a tetrazólium sók hasítására, tehát a festődés elmaradása a mitochondriumok károsodását jelzi. [17] A tetrazólium sókkal történő makroszkópos festődés megszűnése jól korrelál a necrosis jelenlétével. [18] Számos tetrazólium vegyület közül az ún. „nitroblue tetrazolium” (2,2p-di-p-nitrofenil-5,5r-difenil-3,3t-(3,3'dimetoxi-4,4'-bifenilén)ditetrazolium-diklorid) az mely a legalkalmasabb az ischamiás károsodás mértékének meghatározására tekintve, hogy alacsony lipidoldékonysága miatt nincs álpozitivitás, illetve optimális redox potenciálja miatt kevés a nem specifikus (pl.: endoplazmatikus retikulumban) melléktermék. [16] A reakció a klinikai gyakorlati hasznosíthatóságához a keletkezett reakciótermék mennyiségét számszerűsíteni kell. A tetrazólium redukció mértékének meghatározásához használt egyik klasszikus módszer spektrofotometriás elven alapul [19], 585 nm-en, kalibrációs egyenes segítségével. [20] Habár a keletkezett reakciótermék koncentrációjának csökkenése a károsodás mértékét jól jelzi [21], a módszer klinikai alkalmazhatóságát nehezíti, hogy az eljárás mindaddig kizárólag revaszkularizációt követően került kipróbálásra. További hátráltató tényező, hogy az előkészítési idő igen hosszú. Egy másik kvantifikációs módszer ún. planimetria [22], mely során az izmot, vagy annak egy megfelelő méretű darabját, tetrazólium sót tartalmazó festékbe mártjuk, a szövet a festéket diffúzióval felveszi, majd a mitokondriumok a tetrazólium sót átalakítják, mely makroszkóposan láthatóvá válik, az izom elszíneződik. A károsodott területek nem mutatnak színreakciót. A mintában a reakciót mutató és nem mutató régiók aránya a minta teljes területéhez képest ad egy arányszámot. A módszer előnye a gyorsaság, hátránya viszont, hogy a megfelelő szenzitivitás eléréséhez nagy mennyiségű szövetmintára van szükség, ami a klinikai gyakorlatban elfogadhatatlan. Habár a fenti módszerek a betegágy melletti diagnosztikában nem használhatóak, de erősségük, hogy mindkét technika esetében a kapott eredmények jól korrelálnak az ultrastrukturális változásokkal. [17]

### 1.2.1.3. A reperfüziós károsodás mechanizmusa

A *reperfüzió* során a sejtek oxigén ellátása hirtelen helyreáll, mely következtében a redukzív folyamatokat követően egy oxidatív stressz helyzet alakul ki (1. ábra).





1. ábra Az ischaemia és reperfúzió redox homeosztázisa. Az ischaemia-reperfúzió jellemzése, mint redukív-oxidatív stressz állapot.

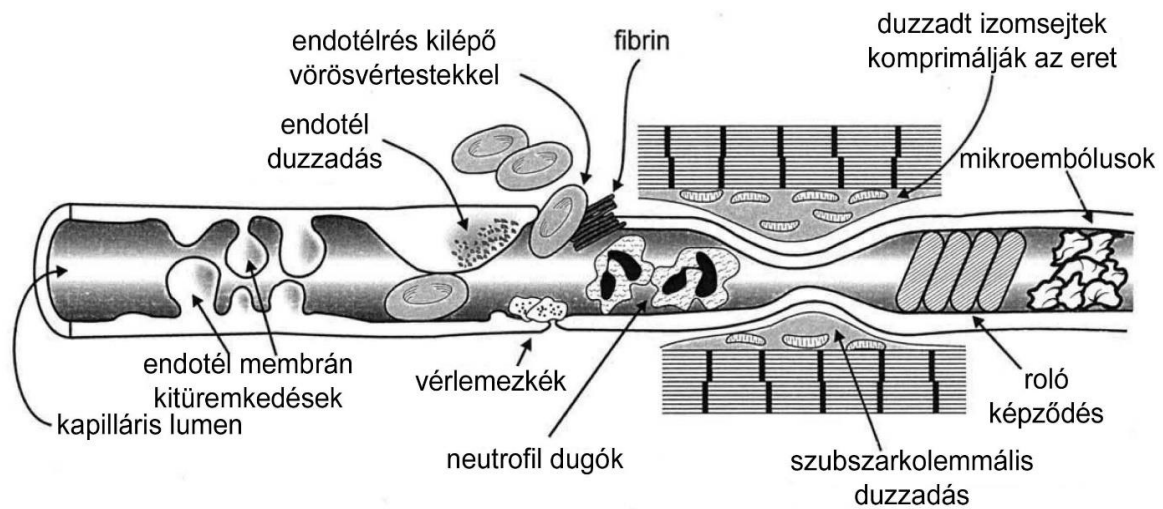
Az oxidatív folyamatok során szabadgyökök (ROS: reactive oxygen species) leginkább az ATP bomlástermékeként keletkező hipoxantin további átalakítása kapcsán képződnek [23], mely folyamatot a ischaemia hatására,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependens út révén, xantin-oxidázzá átalakult xantin-dehidrogenáz enzim katalizálja. [24] A keletkező szabadgyökök ( $\text{O}^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HOCl}^{\cdot}$ ) adduktképzési hajlamuk révén károsodásokat okoznak a membrán lipidekben, proteinekben, szénhidrátokban és nukleinsavakban. A reaktív gyökök a DNS-molekulákban keresztkötéseket, nukleinsav-hasításokat és bázis-hidroxilációt indukálnak. Károsító hatással vannak a többszörösen telítetlen zsírsavakra, lipidperoxidációt hozva létre, melynek eredményeként lipidperoxidok képződnek. A lipidperoxidok hatására lipid-lipid, lipid-protein, protein-protein diszulfid-híd keresztkötések jönnek létre, valamint protein- és zsírsavhasadás alakul ki. A folyamat eredményeként a létfontosságú szubcelluláris enzimek, a celluláris kontraktilis apparátus sérülései jönnek létre, továbbá a sejtmembrán integritásának, valamint a mitokondrium-membrán energiatermelésének és iontranszport működésének károsodását okozzák. [25] A reaktív oxigén gyökök képződéséhez hozzájárul továbbá az ischaemia során a mitokondriumban felhalmozódott nagy mennyiségű  $\text{Ca}^{2+}$  is. [26, 27] A megnövekedett intramitochondriális  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció hatására egy részt a mitokondrium membránjában elhelyezkedő elektrontranszportért felelős enzimek és molekulák (NAD, FAD, citokrom B, koenzim Q) redukciója következik be. Ez rontja a légzési lánc hatásfokát, így további szabadgyök melléktermékek képződéséhez vezet [28],

továbbá az mPTP (mitochondrial permeability transition pore) nevű nem specifikus óriáscsatorna megnyílását eredményezi. [29] Ezen csatorna nyitása teljesen felborítja a belső membrán szigorúan szabályozott szelektív permeabilitását, mely a mitochondrium duzzadását okozza, a protongradiens megszűnik, az oxidatív foszforiláció szétkapcsolódik. A fentiek mellett az organelum alkotóinak (pl.: citokróm c stb) szabad vándorlása indul(hat) meg, mely a sejthalál módjában kulcsfontosságú lesz. Végeredményben az egész sejt intracelluláris organizációja felbomlik.

Az ischaemia-reperfúziós károsodás nem csak a szöveti sejteket érinti, hanem az endothel sejteket is. Subcelluláris károsodások mellett az endothel sejtek funkciójában is zavar támad: az energiaraktárak kiürülése, egyes bioaktív anyagok csökkent produkciója (pl. prosztaciklin, nitrogén-oxid (NO)), és más anyagok fokozott képződése (pl. endothelin (ET), tromboxán A<sub>2</sub>), illetve a sejtek felszíni molekuláinak megváltozása (pl. P-selectin megjelenése) következik be. [30] Az előbbiekhöz hasonlóan számos gén átíródása felgyorsul (adhéziós molekulák, citokinek), vagy szuppresszálódik (konstitutív NO szintáz (cNOS), thrombomodulin). [31] Paradox módon a „gyógyító” hatást hozó reperfúzió a folyamat progresszióját eredményezi. Morfológiailag megfigyelhető az endothel sejtek elemelkedése a bazális membránról és gyulladásszerű sejtek, elsősorban aktivált neutrophil granulocyták kitapadása az sejtek felszínéhez. Összefoglalóan a folyamatot az endothel-dysfunkciónak említi az irodalom. [32, 33]

A továbbiakban az elhalt sejtekből kiszabadult intracitoplazmatikus komponensek, valamint - főként a venulák területén létrejövő - endothel diszfunkció gyulladásszerű folyamatokat indítanak be. Ennek fő elemei a leukocyták kemokin és citokin mediálta bevándorlása, érfalhoz való adhéziója, transzendotheliális leukocyta-migráció, vérlemezke-fehérvérsejt aggregáció, albumin-extravasatio, és fokozott reaktív szabadgyök felszabadulás. [34] A postcapilláris venulákkal szomszédos intersticiális területen elhelyezkedő mastocyták és macrophagok szintén aktiválódnak az IR károsodás kapcsán, így fontos szerepet játszanak a gyulladásszerű reakció amplifikációjában és környező szövetek közé való terjesztésében. [35] A gyulladásszerű sejtek jelenlétével az energiadependens „killing” mechanizmusok kapcsán megjelenő fokozott reaktív szabadgyök-felszabadulás tovább fokozhatja a reperfúziós károsodás mértékét. [36] A nagymértékű leukocyta migráció és kitapadás, amihez hozzájárulhat még a vörösvértestek összetapadása, a kialakuló mikrotrombusok és a megnövekedett extravaszkuláris nyomás a reperfúzió alatt, lokálisan a véráramlást megnehezítheti, így az úgynevezett „low-flow” [37] vagy „no-reflow” [38, 39]

jelenség keretében a lokális ischaemiát prolongálhatja, a reperfúziót „foltossá” teheti (2.ábra).



2. ábra: A "no-reflow" fenomén. Forrás: Reffelmann T, Kloner RA. 2002

A mikrokeringés változásaiban, illetve a foltos reperfúziós kép megjelenésében jelentős szerepe van az NO/ET egyensúlynak is. Az ischaemia alatt a csökkentő energia-, és szubsztrát (L-arginin) ellátás miatt csökken a NO termelése, mely az ET/NO egyensúlyt az endothelin felé billenti, így kezdeti vazokonstriktió látható, majd a reperfúzió beálltával az endogen és exogen NO szintézis megugrik, mely eredményeként (számos interakció mellett, pl.: E-selectin gátlásból fakadó gyulladáscsökkentő sejtes kapcsolatok gyengülése) vazodilatáció észlelhető. [40]

Ugyanakkor az IR megváltoztathatja a NO és szuperoxidok termelése közti kényes egyensúlyt is. A ma leginkább elfogadott nézet szerint normál körülmények között a NO-képződés mértéke messze meghaladja a reaktív szabad gyökök felszabadulásának ütemét. Ez lehetővé teszi, hogy a NO (1) hatékonyan pufferralja, megkösse a minimális mennyiségű intracelluláris szabad gyököket, (2) csökkentse az arteriolák tónusát a simaizomzat ciklikus guanilat-cikláz (cGMP) aktivációján keresztül, (3) megakadályozza a vérlemezkék aggregációját és trombus képződését, végül (4) minimálisra csökkentse az adhézió interakciókat a leukocyták és az endothel sejtek felszíne között. Ezzel szemben ischaemia után, a reperfúzió első perceiben az egyensúly hamar felborul és a szuperoxidok oldalára billen el. Ebben szerepet játszik mind az excesszív szabadgyök képződés (endothel és fehérvérsejtek részéről egyaránt), mind a NO-termelés csökkenése. Az elégtelen mennyiségű NO szabad gyökökkel reagál, ezáltal nem tudja kifejteni említett jótékony

hatásait, sőt igen agresszív peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) képződik belőle. A  $\text{ONOO}^-$  elősegíti további reaktív oxigéngyökök ( $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) képződését, melyek hatására a venulákban nagy sebességgel kialakul a gyulladásos válasz. Ezen folyamatok hatására szöveti ödéma képződik, mely tovább ronthatja a szövet véráramlását, a szöveti hypoxia hosszabb idejű fenntartásához járulva hozzá. [41]

#### 1.2.1.4. *Ischaemia-reperfúziót követő sejthalál*

Morfológiailag az IR változások (rutin festési eljárással) a folyamat csak egy viszonylag későbbi időpontjában detektálhatóak, amikor a subcelluláris események jelentős része már lezajlott. A sejthalál jelentős részben necrosis által (sejtduzzadás, karyopcnosis, karyorrhesis, a sejtek széttöredezése) megy végbe, de az IR károsodásban apoptosis (sejtsugorodás; kromatin marginalizáció, kondenzáció és fragmentáció; "apoptotic body" megjelenése) is megfigyelhető. [42] A necrosis és apoptosis hátterében az ATP depléción és az mPTP csatorna kóros nyitása áll, tekintve, hogy a mitochondriális károsodások kapcsán nem csak energetikai krízis alakul(hat) ki, hanem a pl. citokróm-c kiáramlással a caspase-dependens apoptosis is beindul. Ezek alapján elmondható, hogy a mitochondriális áteresztőképesség nagymértékben megszabja a sejthalál módját. A fentiek mellett a sejthalál módja függ a DNS-károsodás mértékétől is (ld.: PARP enzimek szerepe a sejthalálban: 1.3.2.2.2). Az apoptotikus és necrotikus sejthalál nem feltétlenül különálló és független események; ezért ezen közös utakat „necrapoptosis”-ként vagy „aponecrosis”-ként is nevezi, tárgyalja az irodalom. [43, 44] A szerző saját vizsgálatainak egy része is ezen mechanizmus befolyásolásával (PJ-34 PARP inhibitor máj IR-ban [45]), illetve az mPTP csatorna gátlásával (NIM-811 cyclosporin-A analóg alsó végtagi IR-ban [46]) kívánta az ischaemiát követő gyulladást mérsékelni.

Összességében elmondható, hogy az ischaemia-reperfúziós károsodás egy redox-imbalansz (redukto-oxidatív stressz) indukálta, antigén-independens gyulladásos reakció, mely a sejtek károsodásához, necro-apoptoticus elhalásához vezet.

#### 1.2.1.5. *Szerv-specifikus keringészavarok*

Az ischaemia leírása kapcsán az egyik legnehezebb feladat a vérellátási zavarok okozta funkcionális különbségek bemutatása. Megállapítható, hogy minden szövet, szerv sajátos architektúrájából fakadóan más-más módon és az ischaemia más-más fokán mutat elégtelen működést. Tekintve hogy a dolgozat középpontjában az alsó végtagi és máj

ischaemia áll, így ezen szervekre jellemző sajátosságok az alábbiakban külön kerülnek megbeszélésre.

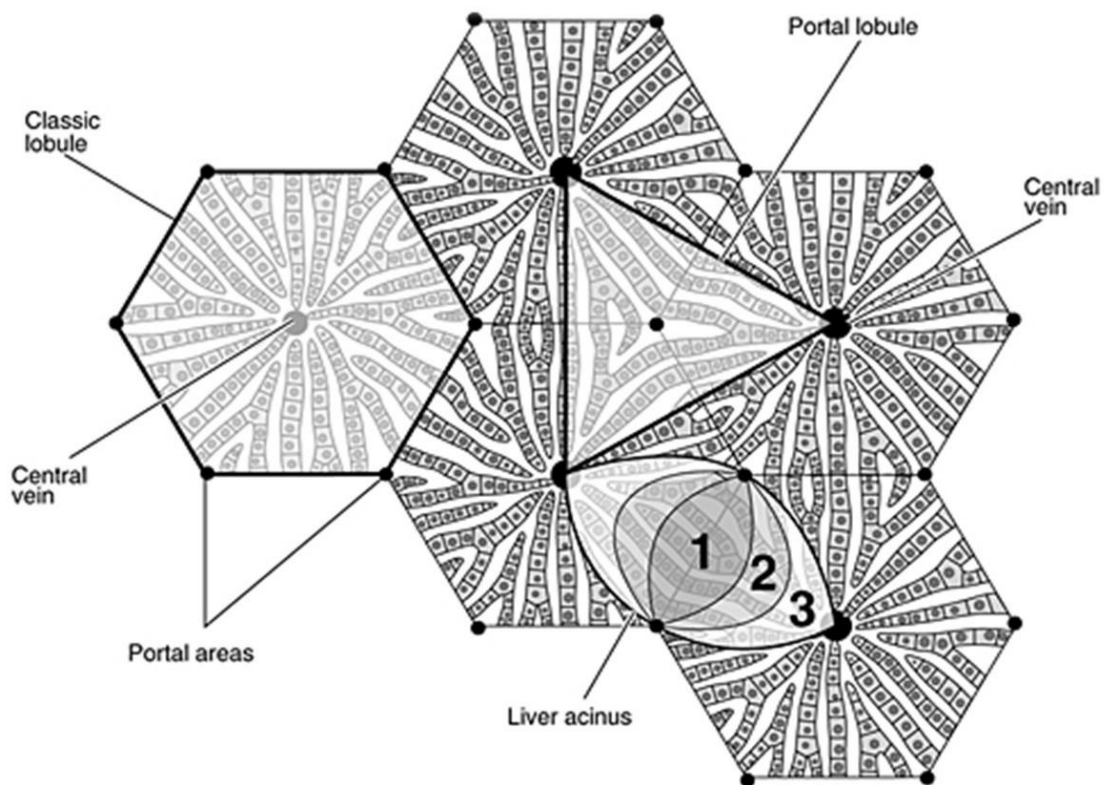
#### 1.2.1.5.1. Az izomszövet IR károsodásnak megjelenése

A fent részletezett lokális károsodások alsó végtagi vázizomzat esetén a fasciarekeszek zártsága miatt egy sajátos kórkép az ún. compartment szindróma kialakulását eredményezheti. A kórállapot lényege, hogy végtagokon az IR kapcsán fellépő intracelluláris duzzadás és ödéma sokkal súlyosabb myopathiát okozhat mintha azt egy fasciarekeszekbe nem szorított IR modellben vizsgálnánk. Alsó végtagi compartment-szindrómáról beszélünk, ha az adott fasciarekeszben a nyomás annyira megnő, hogy a keringésromlása miatt az izomszövetek oxigénellátása elégtelenné válik. [47] A folyamat végeredménye az izomtömeg további ischaemiája és következményes duzzadása, mely a zárt fasciarekesz következtében az intracompartmentalis nyomás (ICP) kritikus, 35–40 Hgmm-ig történő emelkedését eredményezi. Ilyen nyomás mellett a kapillárisok nutritív funkciója megszűnik, az izom perfúziója elmarad, a szöveti hipoxia hosszabb idejű fennmaradása észlelhető. [48] Amennyiben ezt az öngerjesztő folyamatot dekompressziós fasciotomiával nem szakítjuk meg, az ischaemiás események tovább folytatódnak, egészen az irreverzibilis elváltozások kialakulásáig [49, 50] és végül a végtag elvesztéséhez vezetnek. Az izomszövet súlyos károsodása során a széteső izomrostokból nagy koncentrációban kerülhetnek továbbá a keringésbe toxikus, intracelluláris komponensek (például myoglobín és különféle ionok, főként  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{K}^+$ ), mely hozzájárulhatnak egy szisztémás gyulladásos tünetegyüttes kifejlődéséhez. [51]

#### 1.2.1.5.2. A májszövet IR károsodása – anatómia és funkció

A Rappaport-féle májacinus modellt (3. ábra) alapul véve [52] funkcionálisan - oxigén- és tápanyag ellátottság szempontból - a májlebenykében három eltérő zónát különíthetünk el. [53] Az **I. zóna** sejtjei jutnak a legnagyobb tápanyag és oxigénkoncentrációjú vérhez, sejtjeinek anyagcséréje ezért a legélénkebb, dominálnak az oxidatív anyagcsere, és a glükoneogenezis enzimjei. Oxigénmentes állapotban az I. zóna sejtjei pusztulnak el legkésőbb, és regenerálódnak a leggyorsabban, ugyanakkor toxikus károsodáskor (gyógyszerek, mérgek, baktériumtoxinok) e zóna sejtjeinek pusztulása a legszembetűnőbb. A **III. zóna** a vena centrálisához közeli májsejtekből áll, amelyek tápanyagban és oxigénben már csak jóval szegényebb vérhez jutnak, ennek megfelelően a glikolízis enzimjei az uralkodóak a sejtek enzimprofiljában. A sejtek elektronmikroszkópos

vizsgálatánál szembevetendő a sima felszínű endoplazmás retikulum nagy mennyisége, melynek enzimeji a méregtelenítésben (pl.: konjugációs enzimek), és a lipidszintézisben vesznek részt (pl.: koleszterinszintézis). Ischaemia esetén a III. zóna sejtjei duzzadnak meg (elfolyási ellenállást képezve), majd pusztulnak el leghamarabb, és regenerációs képességük is a legalacsonyabb. A mérgező anyagok károsító hatásának azonban jobban ellenállnak, mivel a károsító ágensek koncentrációja itt már alacsonyabb. **A II. zóna** sejtjei az I. és III. zóna közötti átmenetnek felelnek meg.



3. ábra: Rappaport féle funkcionális májacinus modell. Forrás adaptálva: Rappaport, A.: International review of physiology, 1979

### 1.2.2. Szisztémás hatások

Mind az állatkísérletben létrehozott ischaemiás modellek, mind klinikai tapasztalatok alapján a reperfüzióval megemelkedik a plazma tumor necrosis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), illetve interleukin-6 (IL-6) koncentrációja, tehát egy szisztémás gyulladási reakció veszi kezdetét. [54] Ennek oka egyrészt, hogy a termelődött szabadgyökök aktiválják a redox-szenzitív transzkripciós faktorokat (pl.: nukleáris-faktor- $\kappa$ B [NF- $\kappa$ B]), ezzel indukálva a különböző gyulladási mediátorok (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) felszabadulását, létrehozva egy lokális gyulladási reakciót az ischaemiás szövetben. [55] Ezen fenti, szolúbilis, nem antigén specifikus

fehérjék a szisztémás gyulladás mediálásában több szinten is részt vesznek: (1) elősegítik a gyulladással sejtek aktivációját és kitapadását a távoli szervekben, (2) akut vaszkuláris károsodást idéznek elő az érrendszer egész területén, (3) szisztémásan fokozzák az erek permeabilitását. [56] Összességében ezen citokinek felszabadulása egy adaptív védelmi mechanizmus, az akut fázis reakció része és a regeneráció beindításában betöltött szerepének köszönhetően előnyös a szervezetre nézve, a károsodást követő túlélést szolgálja. Egy ponton túl azonban a folyamat kontrollját veszti és az egész szervezet veszélyeztető szisztémás reakció kialakulásához vezet.

Az IR károsodások szisztémás megjelenésének speciális formája az egyes prolongált ischaemiás idővel járó, nagy szövetmennyiséget érintő kórfolyamatok (pl.: alsó végtagi nagyér-műtétek), melyek kapcsán fellépő súlyos, életet veszélyeztető jelenség az ún. reperfüziós szindróma. [5] A szisztémás események kiinduló pontja az ischaemiára adott lokális gyulladással válasz, melynek generalizálódása vezet a távoli szervekben észlelhető károsodásokhoz. [57] A kórkép szisztémás következményei között említendő a szisztémás gyulladással válaszreakció: SIRS (systemic inflammatory response syndrome) és az ebből kifejlődő többszervi károsodás: MODS (multi organ dysfunction syndrome), illetve többszervi elégtelenség: MOF (multi organ failure), ami döntően a kardiovaszkuláris rendszer-, a tüdő-, a vese- és a gastrointestinális traktus károsodásából áll. A tünetcsoport kezelésében valódi oki terápiára még nincs mód. Következményei nagyon súlyosak, a betegek intenzív osztályos ellátást igényelnek, azonban a mortalitás így is nagyon magas.

A lokális gyulladással folyamat generalizálódását különböző mediátorok helyi és szisztémás képződése (pro-inflammatorikus citokinek, complement, akut fázis fehérjék, véralvadással kaszkád, neuroendocrin mediátorok), valamint gyulladással sejtek lokális akkumulációja segíti elő. A folyamat progressziójában vélhetően a pro-inflammatorikus citokinek szerepe a legfontosabb, melyek lokálisan szabadulnak fel, két részletben: (1) akut szak során: TNF $\alpha$  és az IL-1 $\beta$  megjelenése 1-2 órával a lokális károsodással kezdete után, valamint (2) subacut szakban, melyet főleg IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 és interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) felszaporodással jellemez. [58] A pro-inflammatorikus mediátorok hatásainak egyik célpontja az érrendszer. A szisztémás keringésbe kerülő TNF $\alpha$  és IL-1 $\beta$  csökkentik az endothel sejtek NO termelését, ugyanakkor fokozzák az erek körüli simaizmokban és a neutrophil granulocytákban az iNOS (indukálható NO-szintáz) enzim szintézisét. [59] A neutrophilek és a simaizom sejtek NO-termelése meghaladja az endothel bazális NO termelésének ütemét, ami vazodilatációhoz vezet. Az endothel csökkent NO szintézise adhéziós molekulák

megjelenését iniciálja a sejt felszínén, [56] ehhez még hozzáadódik a különböző kemokinek és citokinek direkt hatása, ami végeredményben a gyulladós sejtek kitapadását segíti. A citokinek és a felszabaduló reaktív oxigén metabolitok további hatása a polymorphonuclearis leukocyták aktiválása, fagocytosisuk elősegítése, proteáz termelésük stimulálása. A gyulladós sejtek ezután képesek a további károsító folyamatokat iniciálni, kapilláris-permeabilitás növekedést, lokális gyulladást hozva létre a különböző szervekben.

A fenti folyamatokkal párhuzamosan beindul a generalizált gyulladás ellensúlyozásában szerepet játszó reakció a CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome), mely patomechanizmusában a fő szerep az anti-inflammatoricus citokineknek (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) jut. Ezek a mediátorok mérséklék bizonyos transzkripciós faktorok aktivitását (pl. NF- $\kappa$ B), amelyek a pro-inflammatoricus citokinek szintéziséért felelősek, illetve serkentik az anti-inflammatoricus citokinek képződését. Ezen felül csökkentik a macrophagok endotoxin érzékenységét [60], valamint az antigén prezentáló sejtek MHC II receptor expresszióját. [61] A folyamatok következményeként immunszuppresszió jön létre. A SIRS és CARS egymással antagonistá hatású, a közöttük kialakuló egyensúly fogja meghatározni a szervezet tényleges válaszreakcióját. Az egyensúly felborulása mindenképpen káros a szervezet számára. A két mechanizmus folyamatos „kompetícióját” mixed antagonistic response syndrome-nak (MARS) nevezzük. Amennyiben a SIRS progrediál, következményeként több szervi elégtelenség alakulhat ki, mely többszörös, szekvenciális lefolyású, egész szervrendszereket érintő működési elégtelenség. A MODS/MOF során a keringő citokinek hatására kardiális diszfunkció lép fel, ami részben a mediátorok direkt hatása [62], részben a megnövekedett NO felszabadulás következménye, mivel a megnövekedett NO szint befolyásolja a szívizomsejtek adrenerg és cholinerg ingerekre adott válaszát. [63] A szív csökkent funkciója és a szisztémás vazodilatáció hypotenzióhoz, a szervek csökkent perfúziójához vezet. A csökkent perfúzió a gastrointestinalis traktus ischaemiáját okozza, mely erre kifejezett érzékenységet mutat. Extrém esetben akár stressz-indukált gastritis, mesenterialis ischaemia, ischaemiás colitis, pancreatitis, cholecystitis, hepatitis is létrejöhet. Az ischaemiás károsodás továbbá a mucosa permeabilitásának növekedéséhez, bakteriális transzlokációhoz vezethet. [64] A portális vérben baktériumok és endotoxin jelennek meg, melyek a májba jutva aktiválják a jelen lévő Kupffer-sejteket. Az aktivált Kupffer-sejtek citokinek (pl. TNF $\alpha$ -t) termelnek, növelve ezen mediátorok mennyiségét a véráramban. Ezen kívül az endotoxin bekerülve a szisztémás keringésbe toxikus károsodásokat okozhat, macrophagokat aktiválhat. Mindkét folyamat



hozzájárul a generalizált gyulladás továbbfejlődéséhez, ami a MODS progresszióját okozhatja. A tüdőben a perikapilláris gyulladás, és a következményes transzszudáció már korán diffúziós akadályt képez a gázcsere útjában, és emiatt légzési elégtelenség (ARDS) alakul ki. Ez igen gyors klinikai állapotromláshoz vezet, emiatt klinikailag korábban észlelhető a tüdő károsodása MODS-ban, szemben az egyéb szervek napok alatt kialakuló funkció csökkenésével. [65] Az ischaemizált szövetek revaszkularizációja, különösen, ha nagytömegű végtagi izomzatról van szó, metabolikus acidózissal, hyperkalaemiával és myoglobinaemiával jár, mindez myoglobinuriához, akut tubuláris necrosishoz, akár veseelégtelenséghez is vezethet. A hasi aortán végzett, az alsó végtagokat is érintő műtétek, illetve az azt kísérő IR inzultust követően az esetek 1-28%-ában alakul ki átmeneti, vagy akár tartós vesekárosodás, 1-5%-ában akut veseelégtelenség is létrejöhethet. [66, 67] Ezen tünetek együttesét myonephropathiás metabolikus szindrómának nevezi az irodalom. [68] A perioperatív vesekárosodás kialakulásának mechanizmusa több komponensű.

A reperfüziós szindróma terápiájával kapcsolatban az eddigi próbálkozások, mint a citokinek mennyiségének csökkentése, proteináz inhibitorok, antioxidánsok alkalmazása, egyelőre nem bizonyultak eredményesnek, ezért érdekesebb a szindróma megelőzésére fókuszálni, sem mint a már létrejött szövődeményeket kezelni. Erre a legalkalmasabbnak tűnnek az adott szerv IR toleranciáját befolyásoló adaptív technikák, melyek révén az ischaemiát megelőzően, az alatt, vagy a reperfüziós kezdeti szakaszán tudunk beavatkozni, megelőzve ezzel a fent részletezett tünetek kialakulását.

### **1.3. Ischaemia-reperfüziós károsodás csökkentésének lehetőségei**

Az ischaemia jelenségének felismerését, majd Jennings és munkatársai által 1960-ban bemutatott, a reperfüziós károsodásról szóló elméletet követően számos sebészi és nem sebészi stratégia került kidolgozásra, melyek célja a továbbiakban kialakuló sérülések limitálása. [69] Ezzel párhuzamos az elmúlt évtizedek során számos gyógyszerkészítmény került kifejlesztésre, valamint sebésztechnikai adaptív módszerekkel is sikeres próbálkozások történtek.

#### **1.3.1. Az IR károsodást mérséklő sebészeti eljárások**

Az IR károsodást mérséklő sebészi technikák közé tartozó eljárások egy része, mintegy elő-, illetve felkészíti a keringésből későbbiekben kirekesztett szervet egy nagyobb ischaemiás inzultusra, növelve annak ischaemiás tűrőképességét (ischaemiás

prekondicionálás), míg más módszerek a műtét során, az érkirekesztés felengedése után, a kezdeti reperfúziós károsodás mérséklését veszik célba („gradual, staged” reperfúzió, kontrollált reperfúzió és a posztkondicionálás).

#### *1.3.1.1. Fokozatos és kontrollált reperfúziós technikák*

Alkalmazhatunk a kirekesztés után „lépcsőzetes” felengedést, amikor is a véráramlást **fokozatosan** állítjuk vissza a nulla szintről a „kontrollálatlan” szintre. [70] Ez a módszer 30-60%-kal képes csökkenteni a szívizom-ischaemia után kialakuló infarktus kiterjedését, ugyanakkor a coronaria endothel-füctiójára nincs kedvező hatással [71]. Továbbá a fokozatos felengedés jelentősebb neutrophil akkumulációval jár az ischaemiának kitett területen. Hátránya még, hogy nem szabályozható pontosan a felengedés mértéke. Az egyes kirekesztések során, még azonos operatőr esetében is, változik a felengedés dinamikája, így hatásának mértéke széles határok között ingadozhat.

A **kontrollált reperfúzió** a kezdeti reperfúzió egyes aspektusainak változtatásával próbálja kiküszöbölni, illetve enyhíteni a reperfúziós károsodásban szerepet játszó tényezőket. Kontrollált reperfúzió során az ischaemia végén nem rögtön kerül felengedésre a kirekesztés, hanem először a proximális érszakaszból vett, majd 6:1 arányban összesen mintegy 500 ml speciális összetételű oldattal hígított vér kerül beadásra az ischaemizált érszakaszba. [72] A módszer előnye, hogy kontrollálhatjuk a kezdeti reperfúziós nyomást. Ezt 60 Hgmm alatt tartva megelőzhető a postischaemiás ödéma kialakulása. A kontrollált reperfúzió alkalmazását myocardialis ischaemiánál írták le először [73], de használhatónak bizonyult alsó végtagi kirekesztés után is. [74] A módszer hátránya, hogy megvalósítása körülményes és az alkalmazásához új eszközök beszerzése szükséges.

#### *1.3.1.2. Adaptív sebészeti mechanizmusok - sebészeti kondicionálási technikák*

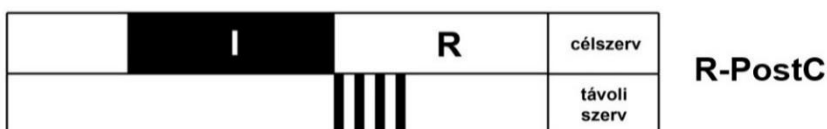
Az adaptív sebészeti mechanizmusokban közös, hogy olyan több ciklusból álló, meghatározott idejű, repetitív reokklúziós és reperfúziós periódusok váltakozásából felépített sebésztechnikai eljárások, melyek a szövetek adaptív védelmi mechanizmusait aktiválják (4. ábra). A folyamat eredménye, hogy nő a szövetek ischaemiás toleranciája vagy csökken a reperfúziós károsodás mértéke. A sebészi intervenciókra jellemző, hogy subcellularis jelrendszereket összekapcsolva, szignál transzdukciót beindítva hozzák létre a sejtfüctiók direkt modulálását, mely szigorú időkorláthoz kötött, azaz csak a „megfelelő

időben” (pl. reperfúzió közvetlen kezdete) alkalmazva váltható ki a védelmi hatás, mely összességében „mindent vagy semmit” jellegű. [75]

### Lokális kondicionálási eljárások



### Távoli szervi kondicionálási eljárások



4. ábra: Kondicionálási technikák. I-PreC: Ischaemiás prekondicionálás; PostC: (ischaemiás) Posztkondicionálás, RIPC: remote ischemic preconditioning, azaz távoli szervi prekondicionálás, R-IPer: távoli szervi perkondicionálás, R-PostC: távoli szervi posztkondicionálás

A szervi ischaemia előtt alkalmazott algoritmus a 'pre-', az ischaemia után, közvetlenül a reperfúzió elején alkalmazott kezelés 'post-' előtagot kapja a „conditional”-ások megnevezésekor. Ezen mechanizmusokat lokális kondicionálási eljárásoknak nevezzük, mivel az adaptív sebésztechnikai manővert azon szerven alkalmazzuk, ahol az ischaemia-reperfúzió is bekövetkezik. Az ischaemia-reperfúziós károsodás mérséklésére továbbiakban megszületett egy újszerű, alternatív gondolat, mely szerint a protektív hatást előidéző ischaemia-reperfúziós periódusok nem csupán lokálisan, hanem egy a célszervi ischaemia helyétől távol eső szerven, vagy érterületen is alkalmazásra kerülhetnek. [76, 77]

A dolgozat témáját képző alsó végtagi és máj ischaemiás károsodásoknak kivédési lehetőségei, a terápiás algoritmusok merőben különböznek egymástól. Míg a végtagi ischaemia elsődlegesen akut kórkép formájában jelentkezik, így csupán a már fellépő

károsodások mérséklésre, posztkondicionálásra van lehetőség, addig a máj ischaemia többnyire előre tervezett, elektív műtétek részeként jelentkezik, ezáltal lehetőség van a kondicionálási technikák széles palettájának alkalmazására. A fentieket figyelembe véve jelen bevezető fejezetben a különféle előkezelések a máj ischaemiás reperfúziós károsodásának vonatkozásában, míg az utókezelések a végtagi ischaemiával kapcsolatban kerülnek bemutatásra.

#### 1.3.1.2.1. Ischaemiás prekondicionálás

A szervi kirekesztése előtt, egy, vagy több ciklusban alkalmazott rövid, ischaemia-reperfúziós periódusokból álló ischaemiás prekondicionálás (I-PreC) védő hatását először myocardiumban írták le 1986-ban Murry és munkatársai. [78] Megfigyeléseik szerint állatmodellben, a többszörösen, rövid ideig alkalmazott ischaemiás periódusok megóvták a szívizomzatot egy ezt követő, hosszabb ischaemiás inzultustól. Miután a módszer hatásossága kutyaszíven, majd más állatfajokon is igazolódott, 1993-ban megkezdődtek az első humán alkalmazások. [79] Ezt követően az eljárás hatásos voltát, illetve kísérletes majd klinikai alkalmazhatóságát az 1990-es évek elején már más szervekben, így vázizomban [80], agyban [81], vesében [82], májban [83], és vékonybélben [84] is felismerték. Az I-PreC módszere ígéretes lehetőségnek bizonyult hosszantartó kirekesztéssel járó beavatkozások, illetve különböző szervek transzplantációja kapcsán. Magyar vonatkozásait tekintve a vékonybéltranszplantáció kapcsán alkalmazott kutatásokban Ferencz Andrea és munkatársainak munkássága úttörő jellegűnek mondható. [85-90]

Az I-PreC alkalmazhatóságát egy fontos idő-függés jellemzi. I-PreC során egy korai, három órán belül észlelhető, és egy késői, hosszú távú, 24 órán túl megjelenő hatás fejlődik ki („second window of protection”). A kettő közötti időtartam viszont egy „védelem nélküli ablak”. [91] Az idő az általunk elindított molekuláris folyamatok kifejlődéséhez kell. A pontos biokémiai, (pato)fiziológiai háttér számos eleme mára ismerté vált lehetőséget teremtve az egyes lépések farmakológiai befolyásolására is (ld.: levosimendan [1.3.2.2.3.]).

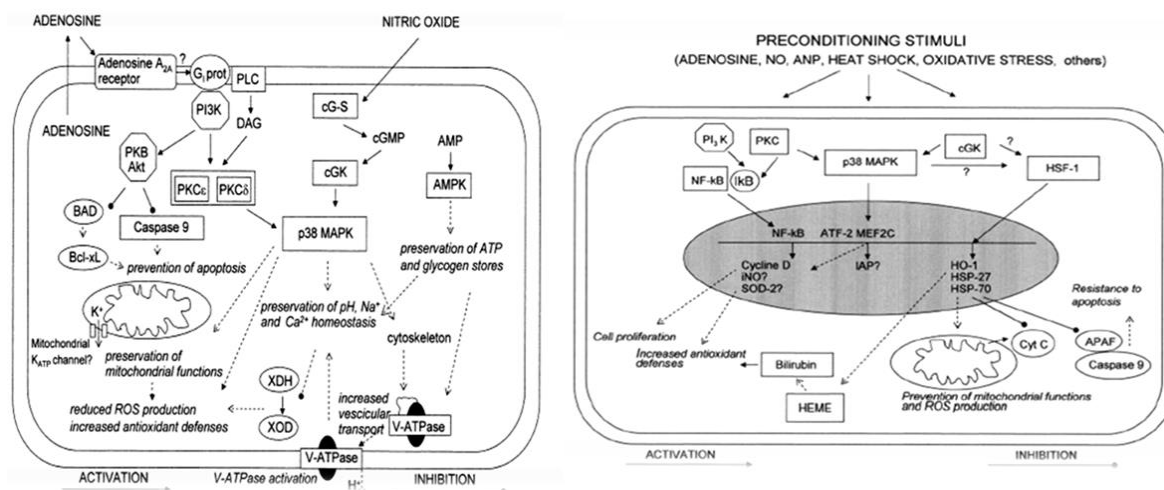
A prekondicionálás időablakainak megfelelően megkülönböztetünk korai, illetve késői kondicionálási algoritmusokat. A **korai prekondicionálás** bizonyos sejtfunkciók közvetlen modulálásán, illetve gyulladáshoz vezető reakció gátlásán keresztül érvényesül, melyben adozin, NO és proteinkináz-C (PKC) játszik meghatározó szerepet. [92] A korai I-PreC protektív hatása feltételezhetően abból következik, hogy csökkenti az IR károsodás egyik leglényegesebb elemének, a sejt energia háztartásának károsodását [93], továbbá p38-

mitogen-activated protein kinase (MAPK) regulált útvonalon csökkenti a celluláris  $\text{Na}^+$  felvételt. [94]

Az I-PreC hatásának kifejlődésében jelentős szerepet tölt be az ionháztartás megőrzése vacuolaris proton ATP-áz (V-ATP) csatornákon keresztül. [95] A I-PreC hatására a V-ATP-áz proton pumpa membránba történő kihelyeződésével megindul a  $\text{H}^+$  ionok kipumpálása, ami megakadályozza a  $\text{Na}^+$  dependens puffer rendszerek, például a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter beindulását. Ez az effektus a  $\text{Na}^+$  akkumulációját csökkentheti, így a májsejtek IR károsodásának mértéke is csökken. (5. ábra) A pumpa gátlásával felfüggeszthető az I-PreC által kivédett acidosis és  $\text{Na}^+$  akkumuláció. [96]

Az I-PreC egy másik fontos hatása a caspase-3 down-regulációja, ezzel az apoptózis megakadályozása. [97] Az I-PreC által beindított protein kináz-B (PKB; másnéven Akt - serine/threonine-specific protein kinase; PKB/Act)) aktiváció a BAD (Bcl-2-associated death promoter) és a caspase 9 rendszerek gátlásán keresztül képes az apoptózis megakadályozására. [98] A mechanizmus másik fontos tényezője a NF- $\kappa$ B transzkripciót gátló hatás, ami a TNF- $\alpha$  és a Fas-ligand mediált apoptosist egyaránt csökkenti. [99]

A korai I-PreC további fontos következménye a gyulladáshoz vezető válasz mérséklése. Az I-PreC adenosin  $\text{A}_{2\text{A}}$  receptorok stimulálásán keresztül gátolja a leukocita adhéziót, ezzel csökkentve a postischaemiás neutrophil infiltrációt. [100] Az adenosin továbbá aktiválja az eNOS-t az endothel sejtekben, ezáltal a NO szintje megemelkedik. [101] A keletkező NO cGMP szintetáz enzimet aktivál. A cGMP szint emelkedésének a következménye egyrészt simaizom relaxáció, mely javítja a mikrocirkulációt, másrészt pedig a cGK (cGMP függő kináz) - p38 MAP kináz útvonalon keresztül a PKB/Akt aktivációja, ami meghatározó szerepet bír különböző receptor mediálta jelenségekben (lásd később). Az I-PreC egyéb korai hatásai: TNF- $\alpha$  termelés csökkenése a reoxigenizáció során. [102] A TNF- $\alpha$  termelés csökkenésének legfontosabb következménye a P-selectin expresszió csökkenés, mely a szisztémás gyulladáshoz vezető válasz elleni védekezés kulcseleme. [92]



5. ábra A preconditionálás korai (bal oldali kép) és késői hatásmechanizmusa (jobb oldali kép). Forrás: Carini R, Albano E. - Gastroenterology 2003

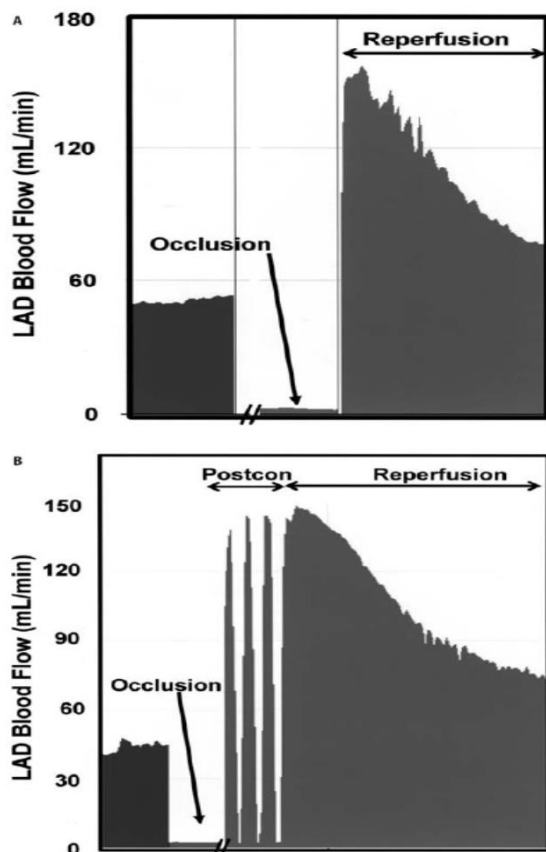
A **Késői preconditionálás** során főként gén expressziós változásokon, új fehérjék megjelenésén alapul a protektív hatás, melynek kulcs szereplői a HSP (heat shock protein) molekulák. E fehérjék upregulációja fontos antiapoptotikus és anti-inflammatorikus tényező. [103] A HSP-27, HSP-70 és HSP-72 kiemelkedő jelentőségű, ugyanis ezen molekulák citokróm c-hez, APAF-1-hez (apoptoticus proteáz aktiváló faktor), valamint AIF-hez (apoptosis indukáló faktor) kötődve megelőzik a caspase-ok aktivációját és a következményes apoptosist. [104] A HSP-27 a cytoskeleton rezisztenciáját növeli az aktinnal való kapcsolata révén. [105] Fontos tényező a HSP-k Hem oxigenáz [HO]-1 moduláló hatása, [106] mely fehérje upregulációja egy fontos antiapoptotikus és anti-inflammatorikus tényező. [107] Patkánymodellben gátlásával teljesen felfüggeszthető az I-PreC hatás, serkentésével pedig előidézhető. [108] (5. ábra)

A preconditionálás fő védő hatása receptor-mediált jelenségekben rejlik. Hatására többek között adozin, bradikinin és opioidok szabadulnak fel. Ezek kötődnek és stimulálják a G-protein asszociált receptorokat a sejtmembránban, mely által különböző szignáltranszdukciós utak aktiválódnak. A szignálmechanizmusok aktivációja bifázikus módon történik, mivel a kinázok aktivációja és a receptorátrendeződés (1) a tartós ischaemia kezdetén ( $\epsilon$ -izofarmáját a PKC-nek, NO mediált aktivációja a protein kináz G-nek, stb.); valamint (2) az ischaemia vége után a reperfüzió kezdeti perceiben (foszfatidilinozitol-3 [PI3] kináz / Akt és extracellulárisan regulált kináz [ERK] (a RISK – reperfusion injury salvage kinase út része) történik. Végző lépésként a receptor mediált szignáltranszdukció a mitokondriumokon konvergál és stabilizálja a mitokondriális membránt, gátolja az mPTP csatornanyitást, mellyel megelőzi a mitokondriális duzzadást és ruptúrát. [109]

A prekondicionálást több mint 20 éve alkalmazzák humán gyakorlatban. Számos preklinikai és klinikai tanulmány is rámutat hatásosságára májműtétek során kialakuló ischaemia-reperfúziós károsodás vonatkozásában. [110-112] E tanulmányok alapján, a prekondicionálás képes javítani a máj mikrocirkulációját, redox-homeosztázisát, mérsékelni a lokális és távoli szervi károsodások mértékét. [113] Máj ischaemiás prekondicionálásával kapcsolatos első humán vizsgálatot Clavien és munkatársai végezték 2000-ben. Tanulmányukban igazolták, hogy 30 perces folyamatos vaszkuláris kirekesztést megelőzően alkalmazott átmeneti ischaemia-reperfúziós ciklus (10 perc ischaemia majd 10 perc reperfúzió) képes mérsékelni a hepatocyta károsodást jelző transzamináz-szint emelkedését. [110] Ugyanezen munkacsoport nevéhez fűződik az első randomizált klinikai vizsgálat, mely megerősítette a módszer hatékonyságát. [114] Később további prospektív tanulmányok támasztották alá az adaptív sebésztechnika módszer alkalmazásának szükségességét nem csak egészséges, de steatotikus és cirrhotikus májak operatív ellátás kapcsán is. [112, 115] Ugyanakkor, a mindennapi rutinban az I-PreC ellen szól, hogy klinikai alkalmazhatósága csupán elektív beavatkozásokra korlátozódik, tekintve, hogy alkalmazására az ischaemiás epizód előtt kell sor kerüljön.

#### 1.3.1.2.2. Ischaemiás posztkondicionálás

A posztkondicionálás (PostC) definíció szerint a reperfúzió kezdetén a szöveti véráramlás ismételt, rövid, több ciklusban alkalmazott megszakítása (6. ábra). Csak ezen ismételt ischaemia-reperfúziós epizódokat követően jön létre a szerv szabad reperfúziója. A módszer alapját az a megfigyelés képezi, miszerint az IR károsodások szabályozásában részt vevő folyamatok jelentős része a reperfúzió kezdeti perceiben indul el.



6. ábra: A posztkondicionálás algoritmusai. Fent: IR áramlási események koránárián (LAD), lent: postC alkalmazása. LAD: left anterior descending artery - forrás: Vinten-Johansen et al. Basic Res Cardiol 2005

A posztkondicionálás koncepcióját először Vinten-Johansen fogalmazta meg 2002 augusztusában. A témában született első közleményeket ugyanez a munkacsoport publikálta. [116] E tanulmányok alapján kutyában a posztkondicionálás az ischaemiás prekondicionálással összehasonlítható mértékben volt képes csökkenteni a szívinfarktus kiterjedését. A protektív hatás kifejtése szempontjából meghatározó a módszer alkalmazásának időbelisége. E tekintetben a reperfúzió első pillanatai kritikusak. Amennyiben a posztkondicionálást egy perccel a reperfúzió megindulása után kezdjük, úgy a kardioprotektív hatást elveszítjük. [117] A késlekedés nélküli, szigorúan a reperfúzió első perceiben történő alkalmazásnak az oka a rapidan lejátszódó szubcelluláris biokémiai folyamatok célzása (pl.: mPTP-csatorna

nyitás), melyek döntő része már a reperfúzió legelején lezajlik, így pár perc után a folyamat irreverzibilissé is válik. Hasonlóképpen a kardio- és vaszkuloprotektív hatás szempontjából lényeges az alkalmazott ischaemia-reperfúziós ciklusok hossza, [117] amit valószínűleg a szerv, illetve az adott faj metabolikus rátája határoz meg. [118] Ciklushossz tekintetében kutyákban és nyulakban a 30 + 30 másodperces időtartam bizonyult hatékonynak. [119, 120] Patkány esetében azonban kizárólag a 10, illetve 15 másodperces időtartamok képesek csökkenteni az infarktus méretét. [121, 122] A szerző és munkatársai vékonybél postkondicionálást vizsgáló kísérletei is azt igazolták, hogy a kedvező hatás patkányokban 10 másodperces ciklusokkal érhetőek el. [123] Human adatok arról számolnak be, hogy az ideális hatás eléréséhez koszorúereken 4 x 1 perces ciklusok szükségesek. [124-126]

A posztkondicionálás során tehát elengedhetetlen, hogy beavatkozásra közvetlenül a reperfúzió legelején sor kerüljön, illetve fontos a megfelelően rövid ciklushosszak alkalmazása. Összességében tehát a kórfolyamat mechanizmusába való beavatkozásra csak



egy szoros időkeret áll a rendelkezésre. Klinikai alkalmazhatóság szempontjából a PostC az I-PreC-al összehasonlítva alkalmazhatóbb módszernek tűnik, hiszen a védelmi hatások a szöveti ischaemia után hozhatók létre, tehát összekapcsolható tulajdonképpen minden revaszkularizációt célzó orvosi beavatkozással. Ennek megfelelően alkalmazása ígéretes lehetőségnek tűnik nem csak tervezett műtétek (szervtranszplantáció, vértelenségben végzett műtét), de akut érelzáródások (coronaria-elzáródást) kezelése során is.

A poszt kondicionálás mechanizmusának minden részlete ugyan még nem ismert, azonban a későbbiekben bemutatott kísérletes munka egy része ezen protektív mechanizmus effektivitásának bemutatását célozza meg, így a technika hatásában résztvevő subcelluláris komponensek alaposabb megismerése elengedhetetlennek tűnik.

A poszt kondicionálás protektív hatásainak hátterében meghúzódó subcellularis mechanizmusok közös végpontja a mitochondrium integritásának megőrzése. [4] A mitochondriumok épsége kulcsfontosságú a sejtek túlélése érdekében. Az integritás szempontjából legfontosabb tényezők a mPTP csatornák. Ischaemia alatt a csatornák zárva vannak, majd a reperfüzió első perceiben - pontosan azon rövid időablakban, ahol poszt kondicionálással beavatkozhatunk - megnyílnak. Számos faktor képes növelni a csatornák nyitási valószínűségét, például: a mitochondrialis mátrix megnövekedett  $Ca^{2+}$ -szintje, a belső membrán normális membránpotenciáljának megingása, szabad gyökök. Szintén képesek a pórus nyitási valószínűségét megnövelni bizonyos zsírsavak és a szervetlen foszfát, azonban ezen vegyületek mind csak  $Ca^{2+}$  jelenlétében hatékonyak. Természetesen léteznek a pórus megnyílását gátló tényezők is, mint a sejt-szintű acidózis, a megfelelően magas ATP, ADP és NADH-koncentrációk. A bivalens kationok is ide sorolhatók, mivel versengenek a  $Ca^{2+}$ -mal az mPTP  $Ca^{2+}$ -kötő helyéért. [29]

Poszt kondicionálással mind a pórusok nyitását elősegítő reaktív szabad gyökök mennyisége, mind az intracelluláris és mitochondrialis magas  $Ca^{2+}$ -szint csökkenthető, illetve az PostC hatására emelkedő NO szint szintén gátló hatású az mPTP csatornákra. [127] Az intracelluláris  $Ca^{2+}$  koncentrációk csökkentésében a PKC $\epsilon$  izoenzim játszik szerepet, mely aktiválódik mind I-PreC, [128] mind PostC [103] során. Az enzim aktivált állapotában foszforilálja a  $Ca^{2+}$ -érzékelő receptort, amely G-fehérjéhez kapcsoltan az IP3 felszabadulást serkenti. [103] A foszforilálás inaktiválja a receptort, így megszűnik a  $Ca^{2+}$  felszabadulását indukáló szignál. Ezen kívül a phosholamban fehérje foszforilálásával a PKC aktiválja a SERCA-pumpát (Sarco/Endoplasmic Reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase), gyorsítva ezzel az

intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  felvételét a sarcoplasmaticus reticulumba. A folyamatok végeredménye az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szint csökkentése, ami megóvja a sejteket a  $\text{Ca}^{2+}$  által mediált károsodásoktól. A mitochondriális  $\text{Ca}^{2+}$  többlet csökkenését a mitochondriális adenosin-trifoszfát szenzitív  $\text{K}^+$  ( $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ ) csatornák megnyílása is képes előidézni. [129] A csatorna működése ezen felül megváltoztatja a mitochondriumok alakját, így javul az elektron-transzport. [130] Igazolt, hogy ezen ioncsatorna nem szelektív inhibitora - az oralis antidiabeticum glibenclamid - megakadályozta a PostC infarctus-csökkentő hatását. [131] Ennél még fontosabb, hogy ugyanezt észlelték a mitochondriális  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ -csatornák szelektív gátlószerének, az 5-hydroxydecanoate (5-HD) alkalmazásakor, ezzel igazolva ezen csatorna szerepét.

Az alapszintű NO-termelés PostC hatására megmarad, így feltételezhetően szintén meghatározó szerepet bír a folyamat háttérmechanizmusában. Az mPTP csatornák nyitási valószínűségének csökkentésén túl a NO feltehetőleg mediátor funkciót is betölt, hiszen az endothel sejtekben expresszálandó eNOS enzim célpontja az PostC során aktiválódó „reperfusion injury survival kinase (RISK)” rendszereknek. [132] A RISK csoportba tartoznak a PI3 kináz (foszfatidilinozitol-3,4,5-triszfoszfát kináz), az Akt, a MEK, továbbá az ERK-1 és -2, mely kinázoknak mind a pre- mind a poszt kondicionálás mechanizmusában szerepük van. [133]. A poszt kondicionálás protektív hatása döntően a PI3 kináz - Akt ún. „pro-survival” jelátviteli utak által mediált. [121] Ezt igazolja, hogy a PI3 kináz specifikus gátlószer, a wortmannin csökkenti a PostC károsodást mérséklő potenciálját. [134]

Ahogy ez a prekondicionálásnál is említésre került a poszt kondicionálás esetében is jelentős mediátor az adozin. A PostC során az endogén adozin kimosódása késleltetett, így lokális koncentrációja hosszabb ideig marad magas és eredményesebben tudja kifejteni jótékony hatását. [135] Az ischaemia alatt az ATP bomlásából jelentős mennyiségű adozin képződik, melynek hatása multifaktoriális. Az adozin vazodilatátor hatású, gátolja a neutrophil granulocytá aktivációt, adhéziót [136], csökkenti a reaktív oxigén gyökök és citokinek felszabadulását [137], mely folyamatok mind az IR károsodás csökkentése felé hatnak.

A postC mechanizmusában ugyancsak meghatározó szereppel bír a szövetek megőrzöttebb  $\text{H}^+$  koncentrációja a reperfüzió kezdeti másodperceiben. Normál esetben egy szerv „szabad” reperfüzióval körülbelül 40 másodperc alatt rendeződik a szöveti pH. Poszt kondicionálás lassítja a protonok, a tejsav és a ketonsavak kimosódását az ischaemizált

szövetből, hosszabb ideig fenntartva a lokális acidosist. Ezen lokális extracelluláris proton-gazdag környezet, egyrészt hatással van  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter rendszerre, másrészt önmagában képes gátolni az mPTP csatornák megnyílását [138], hiszen csökkenti a nyitás szempontjából esszenciális  $\text{Ca}^{2+}$  affinitását a csatornához. [139] Vizsgálatokkal igazolták, hogy a szöveti acidosis fenntartásával imitálni lehet a PostC hatását. [139]

Mindent összevetve, a PostC hatásmechanizmusa didaktikailag 3 eseménysorra bontható, úgy, mint (1) mechanikai események (ödema mérséklődése, „no-reflow”, az adenozin késleltetett kimosódása), (2) celluláris események (neutrophil-dependens-, és independens szabadgyök-képződés és citokin-felszabadulás) és (3) molekuláris események („reperfusion injury survival kinases”, apoptosist reguláló enzimek). Valószínűleg a legfőbb útvonal, melyet a necrosis ill. apoptosist mérséklésében kiemelhetünk, a  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ -csatornák ill. az mPTP szerepe. Bár, ezen mitochondrialis effektorok nem az egyetlen mozgatórugói a folyamatnak.

#### 1.3.1.2.3. Távoli szervi kondicionálási technikák

A fent bemutatott „célszervi kondicionáló eljárások” mintájára további, távoli szervi eljárások kipróbálására is sor került. Ilyen eljárás a célszerv ischaemiája előtt/után alkalmazott távoli szervi pre/poszt-kondicionálás (remote pre/postconditioning), valamint egy teljesen új elképzelés a célszervi ischaemia alatt alkalmazott távoli szervi ischaemiás perkondicionálás (remote preconditioning). A távoli szervi kondicionálási technikák klinikai alkalmazhatóságának fontos kritériuma az eljárás invazivitásának mértéke. A minimál-invazív eljárások alapját Birnbaum és munkatársainak kutatási eredményei szolgáltatják: a célszervi ischaemia-reperfúziós károsodás mértékét alsó végtagi flexor izomzaton létrehozott kondicionálási ciklusokkal valósították meg. [140] Az első non-invazív eljárás alkalmazása Oxman és munkatársainak nevéhez fűződik: a kondicionáló ischaemia-reperfúzió ciklusokat az alsó végtag köré helyezett elasztikus leszorító eszköz segítségével valósították meg. [141]

A **remote preconditioning**, vagy **távoli szerven végzett perkondicionálás (R-IPre)** definíciószerűen: a prolongált vértelenségnek kitett szerv ischaemiáját megelőzően, más szerven rövid, repetitív reocclusió és repperfúziós periódusok alkalmazását jelenti.

Kezdetben az egy érágyon belüli távoli szervi kondicionálások jelentek meg. Először 1993-ban Przyklenk és munkatársai számoltak be egy újabb lehetőségről, hogy adott szerv,

szervrészlet ischaemia-reperfúziós károsodása nemcsak lokális hatásokkal mérsékelhető, hanem egy távolabbi területen létrehozott rövid ischaemia-reperfúzió epizódokkal is. [142] A kísérlet rámutatott arra, hogy a bal arteria coronaria, circumflexus ágán (CX) végzett „távoli” prekondicionálás képes csökkenteni az ischaemiás károsodás mértékét egy másik coronaria ágon (LAD). Habár az említett kísérletben a prekondicionált terület még egy „érágy”-on belül tartózkodott a védeni kívánt szívmuszkulációval, mégis ezt a közleményt tekinthetjük az első próbálkozásnak a „remote preconditioning” vizsgálatára. Későbbiekben már „valódi” remote preconditioning eredményes alkalmazásáról is beszámoltak, melyek már távolabbi, nem egy „érágyon belüli” szervek, például vese és bélrendszer rövid IR periódusainak kardioprotektív hatását vizsgálták. [143, 144] Nagy jelentőségű volt a felismerés, miszerint a tranziens végtagi ischaemia is felhasználható, mint az IR károsodást csökkentő kezelés, ugyanis ez a klinikai alkalmazhatóság körét jelentősen kiszélesítette a beavatkozás non-invazív (nagy nyomású mandzsetta alkalmazása) mivoltának köszönhetően. A későbbiekben a „célszervi kondicionáló eljárások” mintájára további távoli szervi eljárások kipróbálására került sor. Ilyen eljárás a célszerv ischaemiája után alkalmazott távoli szervi posztkondicionálás (remote postconditioning), valamint egy teljesen új elképzelés: a célszervi ischaemia alatt alkalmazott távoli szervi ischaemiás prekondicionálás (remote preconditioning).

A **remote postconditioning**, vagy távoli **szervi ischaemiás posztkondicionálás (R-IPost)**, során a prolongált vértelenségnek kitett szerv reperfúziójának kezdetén, egy másik szervben létrehozott rövid, repetitív reocclusió, és reperfúzió epizódok váltanak ki protektív hatást.

Ezen távoli szervben végzett ischaemiás posztkondicionálás jótékony hatását vizsgálva igazolták, hogy rövid renális IR epizódoknak kardioprotektív hatása van, majd egy zömében magyarokból álló kutatócsoport alkalmas és egyszerűen kivitelezhető eljárásnak találta a „remote postconditioning”-ot. [145, 146] Állatkísérletekben vérnyomásmérő mandzsetta alkalmazásával idéztek elő alsó végtagi IR periódusokat közvetlenül, 90 perces LAD occlusiót követően.

A **remote preconditioning**, vagy **távoli szervben végzett ischaemiás preconditionálás (R-IPer)** definíciószerűen: a prolongált vértelenségnek kitett szerv ischaemiája alatt, más szervben rövid, repetitív reocclusió, és reperfúzió epizódok alkalmazását jelenti.

Schmidt és mtsai. 2007-ban megjelent közleményükben ezen eljárás kardioprotektív hatásosságát igazolták, mely az első sikeres kísérletes demonstrációja a távoli szerven végzett ischaemiás perkondicionálásnak. [147] Kísérleteik során sertések szívének arteria coronaria sinistra, LAD ágán idéztek elő 40 perces okklúziót, melyet 120 perc reperfúzió követett. A kezelt csoportnál a LAD okklúzió alatt 4 ciklusban alkalmaztak 5 perc kirekesztést, majd 5 perc felengedést az alsó végtagon. Az eredmények szerint az R-IPer képes volt a myocardialis infarktus méretének, a veszélyes kamrai arrhythmia előfordulásának csökkentésére, valamint megkímélte a systolés és dyastolés funkciót. Hasonló eredményeket publikált Li és kutatócsoportja 2010-es közleményükben, melyben az R-IPer-t klinikai szituációban vizsgálták. [148] Megfigyelték, hogy a perkondicionált csoportban a cTnI (cardiac troponin I) csúcskoncentrációja 40%-os, szignifikáns csökkenést mutatott a kontroll csoporthoz képest.

Klinikai vizsgálatból származó eredményeket a távoli szervi perkondicionálással kapcsolatban legelőször 2010-ben Rentoukas és munkatársai (néhány hónappal Li és mtsai. előtt) közöltek adatokat. Megfigyelésük szerint perkután coronaria intervencióban részesült betegek azon csoportjában, ahol felső végtagi remote perkondicionálást is végeztek ott lényegesen nagyobb hányadban sikerült a PCI-t követően teljes ST-szakasz normalizálódást elérni, a nem kondicionált csoporthoz képest (73 vs. 53%), valamint a cTnI csúcskoncentráció is jóval alacsonyabb volt az R-IPerC csoportban. [149]

A távoli szervi kondicionálási eljárások számos közös jelátviteli úton, mediátoron keresztül fejtik ki hatásukat, azonban bizonyos folyamatokban jelentősen eltérnek egymástól. Távoli szervi kondicionálás hatásmechanizmusára felállított, az irodalomban található számos hipotézis közül három jelentőset érdemes kiemelni: **(1)** humorális **(2)** neurális, illetve **(3)** szisztémás kölcsönhatásokat feltételeznek a célszerv és a távoli szerv között. [76, 77]

A **humorális hipotézis** szerint a távoli szerv ischaemiás periódusainak következtében transzportálható mediátorok kerülnek a vérkeringésbe, melyek felelősek az eljárás kedvező hatásaiért. Számos modell áll rendelkezésre a humorális faktor szerepének igazolására, például távoli szervi perkondicionálással kezelt nyúl vérének nem kezelt állatba történt transzfúziójával sikerült protektív hatást elérni a nem kezelt állaton is. A számos „gyanúba keveredett” mediátor molekula közül említendő a bradykinin, az adenozin, az opioidok, a calcitonine gene-related peptide (CGRP), az endocannabinoidok, és a hypoxia inducible

factor 1 alfa (HIF1- $\alpha$ ), melynek NF- $\kappa$ B szignáltranszdukciós kaszkádon keresztüli gátlása feltehetően jelentős szereppel bír a R-IPer mechanizmusában. A célszervi ischaemia alatt alkalmazott végtagi kondicionálás protektív hatását a nem szelektív adenzin receptor antagonistá 8-sulfophenyl theophylline képes megszüntetni, ami az adenzin kulcsfontosságú szerepét feltételezi. [146, 150]

A **neurális hipotézis** kapcsán igazolták, hogy az R-IPer szívizom-infarktus csökkentő potenciálja megszűnik a ganglion blokkoló hexamethonium jelenlétében, mely neurális hatások jelenlétét sugallta. [143] Későbbi, különböző receptor gátló vegyületekkel végzett vizsgálatok felvetették, hogy ennek a mechanizmusnak a háttérében feltehetően a távoli szervben felszabaduló humorális mediátorok, úgymint adenzin, [144, 151] bradykinin, [152] CGRP [153], afferens neuronokat stimuláló hatása állhat. A CGRP hatásmechanizmusában elsődlegesen a NO kapszaicin szenzitív szenzoros neuronokat aktiváló hatását feltételezik, melyekből a CGRP felszabadulva és a szívbe transportálódva PKC- $\epsilon$  aktiválva fejt ki protektív hatást, tekintve, hogy a távoli szervi kondicionálás protektív hatása az afferens neuronok kapszaicinnel történő gátlásával felfüggeszthető. [154]

**Szisztémás válaszreakciók hipotézise** szerint a távoli szervi, csakúgy, mint a lokális prekondicionálás egyaránt képes az egész szervezet, illetve a célszerv géntranszkripció profilját anti-inflammatorikus és anti-apoptoticus irányban befolyásolni, részben egyes pro-inflammatorikus gének downregulációja, másrészt egyes anti-inflammatorikus gének upregulációja révén. Feltehetően a protektív hatás távoli szervi kondicionálás eljárások esetében is egy szignál transzdukciós kaszkádon keresztül valósul meg (G-protein kapcsolt PKC- $\epsilon$ , mitochondriális  $K^+$ <sub>ATP</sub> csatorna stb). [144, 155] Ahogy a pre-, és a poszt-kondicionálásban, úgy a távoli szervi kondicionálások is a RISK kaszkád bizonyos prosurvival kinázainak aktiválódását idézik elő. Az útvonal távoli szervi kondicionálások esetében történő aktiválódásának tényéről léteznek irodalmi adatok, azonban az aktiválódás mechanizmusáról nem állnak rendelkezésre információk. Ez az útvonal valószínűleg a közös és egyben kiemelt jelentőségű jelátviteli út.

### **1.3.2. Az IR károsodást mérséklő nem sebészeti eljárások**

Az irodalomban nem csupán sebésztechnikai megoldásokról, de számos farmakoterápiás próbálkozásról is olvashatunk, ahol különböző anyagokkal kísérelték meg befolyásolni a reperfüzió eseményeit.

### 1.3.2.1. Farmakológiai előkezelések

#### 1.3.2.1.1. Gyógyszeres előkezelések a kondicionálási útvonalak befolyásolása nélkül

Az IR-károsodás mérséklésére, elsősorban a sejtinterakciók csökkentésére használt szerek teljesség igénye nélkül az alábbiak, tekintve, hogy sokuk már historikus jellegű:

(a) *Antikoaguláns kezelés:* Érsebészetben az optimális antikoaguláció szükségessége egyértelmű, de érkirekesztések kapcsán igazolt hatása, hogy javítja a mikrocirkulációt. Csökkenti ún. no-reflow jelenséget, a leukocytá-endothelium interakciót, a thrombocytá-aggregációt és a mikrotrombusok kialakulását. [156]

(b) *Leukocytá-gátlás:* Kedvező eredmények olvashatók kísérleti modellekben alkalmazott leukocytá-endothel adhéziót gátló vegyületek, antitestek (anti-Mo1, anti-CD11b, anti-CD18) használatáról. [157]

(c) *Szabadgyökfogyó vegyületek, antioxidánsok:* Az A-, C-, E-vitaminok antioxidáns hatással is rendelkeznek. Önmagukban nem annyira hatékonyak, mint a szabadgyökfogyó vegyületek, de együtt alkalmazva ezeket a vitaminokat, illetve más farmakológiai szerekkel kombinálva (pl. prosztaciklin-analóg iloprosttal) [158], képesek szinergistaként jobb hatásfokkal csökkenteni az IR-károsodást. [159] Az allopurinol, a xantin-oxidáz non-kompetitív gátlószereként csökkenti a ROS-képződést. [160] Az oxigéntartalmú szabadgyökök gátlásával lehetőség nyílik a következményes folyamatok gátlására is, mint pl. a kemokin hatású leukotriének, thromboxán szintézise. [161]

(d) *Értágítók:* Az ischaemia alatti vazokonstriktió elvi kivédésére használt módszer a végtagi ischaemia kapcsán [162-165], de egyértelmű hatás nem igazolható.

(e) *A vér reológiai tulajdonságaira és alakos elemeire ható szerek:* A thrombocytá-aggregációgátló, és a vörösvértestek alakváltozását befolyásoló szerek sorolhatók ide. [166]

(f) *Mitochondriális támadásponttal rendelkező szerek:* Tekintve, hogy az IR károsodás patomechanizmusában a mitochondriumok meghatározó jelentőséggel bírnak, így számos a mitochondriális funkciót befolyásoló farmakológiai ágens kipróbálásra került. A mitochondriális metabolizmus modulációjára ható szerek (*trimetazidine, ranolazine, dichloroacetát, karnitin-palmitoiltranszferáz inhibitorok, koenzim-Q<sub>10</sub>, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> csatorna blokkolók*) [167], vagy a mitochondriális ROS képződésre/eliminációra ható szerek (*ginkgo biloba, transz-resveratrol, propofol, nitronok, carvedilol, ebselen, koenzim-Q<sub>10</sub>, exogén*

*SOD*, *xantin-oxidáz inhibitor* és különböző vitaminok, mint *C-*, *E-vitamin*) [167] közül azonban egyik sem bizonyult hatásosnak.

#### 1.3.2.1.2. Kémiai pre-, postcondicionálásra használt szerek

Kémia kondicionáló szereknek nevezzük egységes megállapodás - de nem határozott definíció - szerint azon kémiai kezeléseket, melyek a sebészi adaptív kondicionáló eljárásokban a megismert receptorokon, szignáltranszdukciós utakon, effektorokon vagy subcellularis organelleken hatnak és így képesek az sebészi technikák hatásait utánozni. [168]

(a) *Adenosin*: Kardioprotektív szerepe ismert, mely hatását endokrin, paracrin vagy juxtakrin (neutrophyl - endothel interakció befolyásolásával) módon is képes kifejteni. [169]

(b) *mPTP csatorna gátlók*: A cyclosporin-A (CsA) volt az első vegyület, melynek igazolták mPTP gátló hatását. [170] A CsA megfelelő lenne az IR károsodás kivédésére az mPTP csatorna gátló hatásánál fogva, azonban az IR kórképekben nem kívánatos a T-sejt proliferáció gátlásából adódó immunszuppresszív hatása. Ezen felül mellékhatása lehet a nefrotoxicitás, karcinogenezis, neurotoxicitás, és hepatotoxicitás. Ezért előtérbe kerültek olyan vegyületek, melyek különböző molekulaszervezeti változtatások által megőrzik a CsA mPTP gátló hatását, azonban nem rendelkeznek az immunszuppresszív és egyéb káros mellékhatásokkal. Ilyen vegyületek a különböző CsA analógok, mint a sanglifehrin-A [171], Debio025 [172] és a NIM-811. Ezen utóbbi vegyülettel a szerző munkacsoportja részletesen is foglalkozott. [46]

(c) *K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> csatornán ható szerek*: A kezdeti, kisebb sikereket hozó mitokondriális K<sup>+</sup><sub>ATP</sub>-csatorna aktivátorok (diazoxid, minoxidil, nicorandil) alkalmazása után teret kaptak (c/1) *a volatilis anesztetikumok*. Igazolást nyert, hogy isoflurane közvetlen hatással van a szívizomzatra, csökkenti a szívizomzatban (műtéti kirekesztés által) előidézett ischaemiás terület nagyságát a K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> csatornák aktiválása révén. [173]. Ezen felül az az ionodilatator hatású [174] (c/2) *Levosimendan* (ld: 1.3.2.2.3) szintén a képes antiischaemiás hatások kifejtésére.

#### 1.3.2.2. Speciális, a kísérletekben alkalmazott kezelésekről részletesen

A farmakológiai előkezelések kapcsán a dolgozat további részeiben megjelenő három előkezelésre használt szer részletes bemutatására most kerít sort a szerző.



### 1.3.2.2.1. Levosimendan - Farmakológiai kondicionálási technika

A levosimendan dekompenzált szívelégtelenség kezelésére használt inodilatátor hatású molekula. A szívizom kontraktilis elemeinek  $\text{Ca}^{2+}$  iránti érzékenyítésén keresztül fejt ki pozitív inotróp és anti-stunning hatást, valamint a vaszkuláris simaizomzat szarkolemmális  $\text{K}^+$ ATP-csatornáit nyitva hoz létre vazodilatációt. Igazolták, hogy a szarkolemmális  $\text{K}^+$ ATP-csatornák mellett a mitokondriális  $\text{K}^+$ ATP-csatornák nyitására is képes [175], mely felismerés kiindulási pontot jelentett a vegyület anti-ischemiás hatását vizsgáló *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok számára. Ezek alapján ma a levosimendant kardioprotektívnek tartják. [176] Több eredmény is alátámasztja továbbá, hogy más pozitív inotróp vegyületekkel ellentétben nem hoz létre áramlás-csökkenést a splanchnikus területen, inkább kedvezően befolyásolja a vékonybél [177], illetve a máj keringését [178, 179], valamint protektív hatást képes kifejteni a szeptikus akut veseelégtelenséggel szemben. [180] Mindezen tulajdonságai potenciálisan képessé tehetik az IR károsodásának mérséklésére is, hovatovább a levosimendan metabolizmusa során egy hosszú féléletidejű aktív metabolit keletkezik, mely körülbelül 72 órán keresztül van jelen hatásos koncentrációban a keringésben [181], így optimális, mint hosszú hatású szer.

A levosimendan farmakológiai hatásai közé tartozik a  $\text{Ca}^{2+}$  érzékenyítő hatás [182], mely sajátossága, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás dinamikájától független, nem jár intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -koncentráció emelkedéssel, mely az IR károsodások molekuláris mechanizmusát tekintve kifejezetten előnyös lehet. [183]

A levosimendan antiischemiás hatásához alapvetően két különböző mechanizmus járul hozzá: a szívizom oxigénigényének csökkentése, illetve a mitokondriális  $\text{K}^+$ ATP-csatornákon keresztül érvényesülő protektív hatás. [184] Ezen utóbbi hatás védi a mitokondriumot a  $\text{Ca}^{2+}$ -túlterheléssel szemben, szabályozza a mátrix térfogatát, stabilizálja a membránpotenciált, segíti a légzési lánc integritásának megőrzését, valamint a magas energiájú foszfátok megtartását. Levosimendannal kapcsolatban igazolást nyert, hogy képes ezen csatornák nyitására mind szívizomból, mind hepatocytákból izolált mitokondriumok esetében. Ennek alapján valószínűsítik, hogy célzott sejtszintű protektív hatás létrehozására is képes az IR károsodással szemben.

#### 1.3.2.2.2. Glutamin

Egyre több klinikai vizsgálat támasztja alá, hogy katabolikus állapotokban – mint amilyen a műtéti stressz is – csökken a szervezet glutamin (Gln) szintje, ami így konstitucionálisan esszenciális aminosavvá válik. [185] A perioperatív ellátás során a táplálásterápia részeként nagyobb mennyiségben, parenteralisan bevitt glutaminnak antiinflammatorikus hatást tulajdonítanak: a glutamin képes csökkenteni a gyulladás során keletkező ROS mennyiségét. [186] Ennek következménye lehet az a tény, mely szerint a vénásan alkalmazott glutamin szupplementáció mérsékli a posztoperatív szövődmények számát, csökkenti a morbiditást és a mortalitást.

A glutamin szervezetünkben legnagyobb mennyiségben előforduló szabad aminosav, főként vázizomban raktározódik, ahonnan szükség esetén felszabadul. Fontos szerepet tölt be a sav-bázis homeosztázis szabályozásában, valamint a sejtekben biztosítja az összeköttetést a szénhidrátok és proteinek metabolizmusa között. Szerepet játszik a fibroblasztok, a lymphocyták és az enterociták növekedésében, illetve a szervezet nitrogén-egyensúlyának fenntartásában. [187] Glutaminhoz kötött az ammónia-, és az ureaszintézis, a vesében és a májban lejátszódó glukoneogenezis, a glutation-szintézis és a központi idegrendszer neurotranszmitter-szintézise. [188] Szükséges továbbá a nukleotidszintézishez is, főleg a gyorsan proliferáló sejtekben [189], mely ténnyel magyarázható az immunrendszer sejtjeinek fokozott glutamin igénye. Hiányában a DNS- és a fehérjeszintézis egyaránt gátlás alá kerül. Intracelluláris koncentrációja a mitokondriumok ATP-szintézisét stimulálja, ezért alacsony glutamin tartalom esetében a mitokondriális légzési lánc aktivitása lassul. [190] Bár a glutamin nem esszenciális aminosav, nagy trauma, jelentős sebészeti beavatkozás, szepszis, csontvelő transzplantáció, intenzív kemo- vagy radioterápia során átmenetileg külső bevitel válhat szükségessé, hiszen ilyen esetekben a de novo szintézis nem képes a szervezet valós Gln szükségletét fedezni. [190]

A glutamin közvetve vagy közvetlenül befolyásolja a sejtproliferációt, a sejt differenciációt, és a sejthalált. Főbb hatásaira vonatkozó ismereteink nagyrészt transzformált sejtvonalak vizsgálatából származnak: elsősorban apoptosist moduláló effektusairól számolnak be a nemzetközi irodalomban. Az exogén glutamin szupplementáció a különféle sejtvonalakban proliferációt serkentő hatással bír, míg a glutamin megvonás differenciáltabb fenotípusú sejteket eredményez. [191] Az intracelluláris Gln koncentráció egy bizonyos kritikus szint alá csökkenése apoptosist

indukálhat [192], a megfelelő glutamin tartalom ugyanakkor fontos protektív tényezőként lehet jelen külső károsító stimulusokkal szemben. Így hatására csökken például a sejtpusztulás mértéke extrém hőhatást, valamint besugárzást követően. [193]

A glutamin, mint a glutation (GSH) bioszintézis alapanyaga, hatással van az antioxidáns védekezési rendszer működésére és kapacitására, sőt mi több esszenciális szerepe van a sejtek redox homeosztázisának fenntartásában. [194] A redox státusz befolyásolásán keresztül képes közvetett módon hatást gyakorolni a sejtek szignáltranszdukciós útjaira, valamint a sejtproliferációra. Képes továbbá az iNOS-expresszió gátlásán keresztül a szisztémás gyulladásos válasz és az ezzel összefüggésbe hozható szervkárosodások mérséklésére. [195] Ezen hatása hozzájárulhat a toxikus nitrozatív gyökök keletkezésének csökkentéséhez is az IR késői szakában. A szabadgyök termelésre gyakorolt gátló hatásának, illetve az antioxidáns kapacitás javulásának egyaránt szerepet tulajdonítanak ischaemiás szívbetegekben a glutaminban gazdag diéta következtében tapasztalt kardioprotekció kialakulásában. [196] Az oxidatív károsodás csökkenését segíti elő továbbá indirekt módon a glutamin által kiváltott gyulladáscsökkentő hatás is, melynek hátterében részben a HSP70-termelés fokozódása állhat. Ez a hőszokkfehérje képes fontos proinflammatorikus transzkripciós faktorok, mint az NF- $\kappa$ B, vagy az AP-1 gátlására és ezáltal potens antiinflammatorikus hatást fejt ki. [197]

A fenti tulajdonságai alapján a glutamin potens terápiás eszköz lehet az IR károsodások mérséklésére. Korábbi kísérletes eredmények azonban ellentmondóak. Máj ischaemia-reperfúzió állatkísérletes modelljében, glutamin parenterális alkalmazása emelte a GSH és az antiapoptotikus Bcl-2 koncentrációját, míg a májsejt károsodásra utaló laktát-dehidrogenáz, aszpartát-aminotranszferáz és alanin-aminotranszferáz enzimek, valamint a proapoptotikus hatású Bax-fehérje szérumszintje csökkent. [198, 199] Ugyanakkor Noh és mtsai. szerint az előkezelés hatására a HSP-szint nem emelkedik jelentősen, illetve alig csökken a neutrophyl beáramlás és a necrosis mértéke IR károsodást követően. [200] A postischaemiás glutamin kezelés pedig Fukatsu és mtsai. szerint kifejezetten súlyosbítja az IR károsodást. [201]

A glutamin klinikai alkalmazása során gond, hogy a glutamin monoamin formában csekély oldékonysággal és stabilitással rendelkezik. Alanil-glutamin (Ala-Gln) dipeptidként (Dipeptiven<sup>®</sup>, Fresenius Kabi) ezzel szemben sokkal jobb farmakokinetikájú vegyületnek bizonyult. [202] Számos klinikai vizsgálat erősíti meg a glutamin parenterális

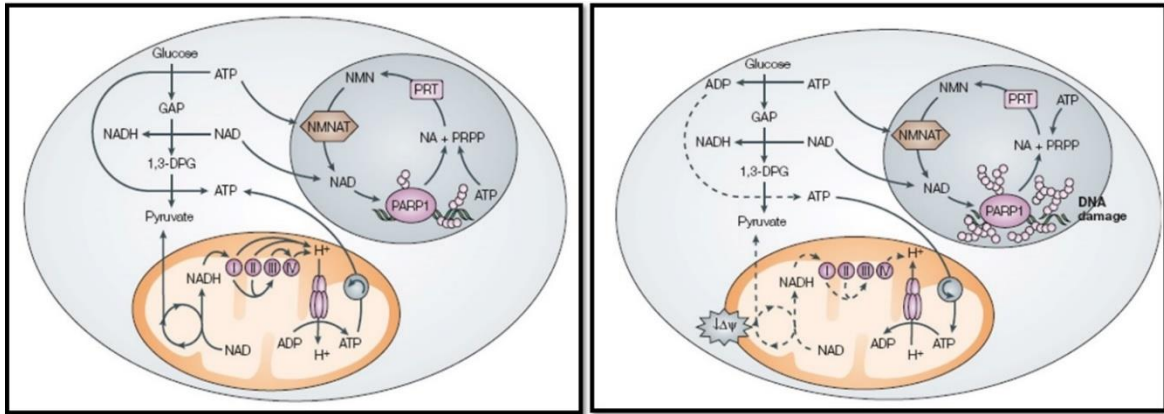
alkalmazásának indokoltságát a műtét utáni, metabolikus szempontból is kritikus napokban, amikor az immunstátusz és a nitrogén-egyensúly javítására egyaránt szükség van. Humán alkalmazásban a parenterális glutamin ajánlott mennyisége 0,5 g/ttkg/nap.

#### 1.3.2.2.3. PJ-34 PARP inhibitor

A sejtmag enzimjeinek jelentős részét a poli(ADP-ribóz) polimerázok (PARP-ok) teszik ki, összesen 17 felé izoforma ismert. A sejtekben legnagyobb mennyiségben PARP1 izoforma fordul elő. A PARP-1 az összes képződő RNS 3,5%-ának az expresszióját szabályozza, illetve a transláció és a fehérjelebontás szabályozásával végigkíséri a gén- és fehérjeexpresszió teljes vonalát. A PARP1 molekula két fő hatása: szerepe van a DNS károsodások kijavításában és így mellékhatásként működése során a sejt energiaraktárait depletálhatja; proinflammatorikus gének transzkripcióját serkenti. [203]

A PARP1 egyik fő szerepe a DNS károsodás felismerése (*szenzor funkció*) és a repair-komplexek működésének elősegítése (*szignál funkció*). A DNS-kötő régió a DNS szabadgyökök, ionizáló sugárzás, alkiláló szerek, hypoxia hatására létrejött egyszálú, illetve kétszálú lánctöréseit érzékeli. A PARP1 aktivitás eredményeként a DNS-sérülés helyén a kromatinállomány fellazul, dekondenzálódik, így a PARP javítja a sérült terület hozzáférhetőségét a repair-enzimek számára. [204] A PARP számos repair-enzim aktivitását fokozza, többek között a sérült láncdarab kitöltéséért („gap filling”) felelős DNS-polimerázt, és a láncok összekapcsolásáért („ligáció”) felelős DNS ligáz III-t. [205] A poli(ADP-ribóz) (PAR) lánc energiát is szolgáltat a repair enzimek számára, melynek folytán *energiatranszport molekulának* is tekinthetjük. A PARP aktivációt követően a katalitikus domén működésének eredményeként az energia metabolizmusban esszenciális szerepet betöltő NAD<sup>+</sup>-ot (nikotinamid-adenin-dinukleotid) elhasítja nikotinamiddá (NA) és ADP-ribózzá. Az utóbbi szolgál építőköként egy polinukleotid polimerhez, a PAR-hoz, ami kovelensen képes kötödni az akceptor fehérjékhez. A PARP aktivációja, működése során tehát csökkenti szubsztrátjának, a NAD<sup>+</sup>-nak a szintjét. Végző soron a PARP működésének hatására a sejt energiaszintje csökken, ami patológiás körülmények az enzim túlaktiválódása esetén a sejt necrosisát okozhatja (7. ábra). További kedvezőtlen hatásai közé irándó, hogy a PARP1-nek szerepe van számos, *gyulladásához kapcsolódó transzkripció faktor* aktiválásában, így patológiás körülmények között egy olyan önmagát erősítő folyamat indul be, melynek során a gyulladásos mediátorok túlzottan felszaporodnak, fokozva ezzel a szerv károsodását. [206]

A PARP szerepe a sejthalálban azáltal is fontos, hogy mind az apoptózis, mind a necrosis folyamatába beavatkozik, melyek ischaemia-reperfúziós károsodás kapcsán egyaránt jelen vannak. A sejthalál módja nagymértékben függ a DNS-károsodás mértékétől is. [207] Eszerint a modell szerint a károsító hatásnak kitett sejt számára háromféle út lehetséges: **(1) enyhe fokú DNS károsodás** kapcsán a PARP enzim a fiziológiás szerepét tölti be, aktiválódik, a károsodott szakasz kijavításra kerül, a sejt túlél. **(2) nagyfokú DNS károsodásban** a sejt fiziológiás válasza (a DNS-ének sérülése a p53 fehérje megjelenését váltja ki, ami felfüggeszti a sejt ciklust addig, amíg a DNS ki nem javítódik) a hibát már nem tudja kijavítani, így a p53 mint transzkripció faktor, a bcl-2 és bax génekre hatva beindítja az apoptózis programját. Az apoptózisban a PARP-nak nincs aktív szerepe, hanem bizonyos caspase-okhoz kapcsolódik, mely a PARP inaktiválódásával jár. Tehát nagyfokú DNS-károsodásra a sejt válasza apoptózis, amely endogén szabályozó faktorok (p53, AIF) hatására játszódik le. **(3) excesszív DNS károsodás** esetén a PARP túlaktiválódik. A PARP túlzott működése során – mely a DNS-lánc hibáinak kijavítására irányul – a szubsztrátként szolgáló NAD<sup>+</sup>-ot fokozottan bontja, a sejt NAD<sup>+</sup>-poolja drámaian lecsökken. Ebből következik, hogy a NAD<sup>+</sup>-dependens energiatermelő celluláris folyamatok, úgymint az anaerob glikolízis, a citrátkör leállnak. A citrátkör működésének felfüggesztésével együtt jár, hogy a citokrómokból álló mitochondriális légzési lánchoz nem érkezik elegendő elektron, ami mitochondriális diszfunkcióhoz, a mitochondriális membrán depolarizációjához vezet. Ennek eredményeképpen az ATP-szintáz enzim ATP-ázként kezd működni, tovább csökkentve ezzel a sejt energiaraktárait. ATP hiányában az energiaigényes folyamatok leállnak, mint például a membrán integritásáért felelős Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa, a membrán szétesik, az intracelluláris enzimek „kiömlenek” a sejtől. Tehát az excesszív károsodást szenvedett, energetikai krízisbe kerülő sejt necrosissal pusztul el, elősegítve ezzel a lokális gyulladás kialakulását. A nekrotizált sejtek bekebelezéséért felelős macrophagok további proinflammatorikus és kemotaktikus molekulák termelésével fokozzák a gyulladással választ. Az enzim gátlásának köszönhetően a sejt energiaraktárai nem fogynak el, elegendő energiát biztosítva ezáltal az apoptózis ATP-t igénylő lépéseihez, és a membrán integritásának fenntartásához (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-pumpa). [205]



7. ábra: A PARP fiziológias működése (bal oldali kép) és túlaktivációja okozta károsodás (jobb oldali kép) Forrás: Jagtap P, Szabo C: Nat.Rev.Drug Discov. 2005

A fentiek következtében a PARP enzim sejtciklusban betöltött szerepére, az enzim gátlása, úgy onkológiai kezelések elemeként, mint például IR inzultus kapcsán alkalmas módszer lehet a kialakuló lokális károsodások gátlására és így a szisztémás szövődmények mérséklésére. A kifejlesztett PARP inhibitorok száma jelentős, 2014 végén és 2015 elején mind az amerikai FDA, mind az európai EMA engedélyezte egy PARP-inhibitor humán célú felhasználását petefészek-karcinómában szenvedők kemoterápiás kezelésére.

## 2. Esetismertetések

A dolgozat következő alfejezetében a szerző egy-egy saját gyakorlatában előforduló, publikált [208] esetismertetéssel kívánja a későbbiekben tárgyalt kísérletes modellek problémafelvetését bemutatni, közelebb hozni. Az alábbi esetek vezettek a modellek megtervezéséhez, illetve a klinikai kérdések kísérletes megválaszolása is könnyebben értelmezhetővé válik ezek klinikai megismerése után. Az első eset egy mindkét alsó végtagot érintő, prolongált 3 napos ischaemiát követően operált betegünk esetét mutatja be. A második eset hivatott a még tolerálható, de jelentős klinikai tünetekkel is járó máj ischaemia-reperfúziós károsodást bemutatni, mely hűen tükrözi a májszövet rövid ischaemiás toleranciáját és az ebből fakadó súlyos, akár életet veszélyeztető lefolyást, mely elhárítására jelenleg is nagy a klinikai igény.

### 2.1. Alsóvégtagi kritikus ischaemia

A bemutatásra kerülő B.I. 55 éves férfibeteg kórelőzményében évtizedek óta tartó dohányzás, hipertónia, hyperlipidaemia, ischaemiás szívbetegség, krónikus pitvarfibrilláció, krónikus bronchitis, depresszió, proximális szelektív vagotómia, cholecystectomy és hasfali rekonstrukció szerepel. Dysbasiás panaszai 7 éve kezdődtek, azóta a beteg több rekonstruktív érsebészeti beavatkozáson esett át, úm.: jobb oldali a. iliaca communis perkután transzlumináris angioplasztika; jobbról balra vezetett ilio-femorális crossover bypass; jobb oldali ilio-femorális bypass; jobb oldali femoro-poplitealis supragenualis Dacron bypass.

Felvételére 3 nappal korábban, hirtelen kezdődő a jobb, majd a bal alsó végtagon kialakult, csípőtől lefelé megjelenő nyugalmi fájdalom és járásképtelenség miatt került sor. A fizikális vizsgálat során perifériás pulzus egyik végtagon sem volt tapintható. Mindkét alsó végtagon a krónikus érbetegséget kísérő trófikus zavarok mellett az akut artériás elzáródás klinikai tüneteit észleltük a végtagok hűvösségével, sápadtságával, mozgásképtelenségével, érzészavarával és súlyos, nyugalmi végtagfájdalommal.

Az azonnali laborvizsgálatok (1. táblázat) emelkedett fehérvérsejt számot valamint magas kreatin-kináz (CK) szintet igazoltak. Az alvadási paraméterek (international normalized ratio: INR, aktivált parciális tromboplasztin idő: APTI), traszamináz (aszpartát

aminotranszferáz: ASAT, alnin aminotranszferáz: ALAT) valamint a szérumban a karbamid, kreatinin, kálium és CK-MB koncentrációk nem mutattak kóros eltérést.

1. táblázat A laborparaméterek változása

Paraméter	Mértékegység	Normálérték	Felvételkori érték	Posztoperatív érték
LDH	U/L	110-210	196	28377
ASAT	U/L	5-45	20	8110
ALAT	U/L	5-45	17	6340
CK	U/L	24-195	742	102920
CK-MB	U/L	0-34	45	277
INR	-	0,8-1,2	1,2	6,1
APTI	sec.	30-40	34	180
pH <sub>artériás</sub>	-	7,35-7,45	7,39	7,2
Kreatinin	μM/L	60-110	76	310
Amiláz	U/L	30-100	42	800
Lipáz	U/L	10-60	14	1620



8. ábra: sürgősségi angiográfiai vizsgálat: infrarenalis komplett aorta okklúzió (nyíl) bőséges kollaterális keringéssel.

Tekintettel a beteg anamnézisére urgens angiográfiát végeztünk, mely az aorta infrarenalis, a bifurkáció feletti komplett elzáródását igazolta (8. ábra).

Az elvégzett vizsgálatok alapján akut műtétet javasoltunk. Kétoldali lágyékhajlati, illetve supragenuális popliteális feltárást végeztünk. A korábbi graft-rendszerek revíziója mindhárom graft elzáródását mutatta, melyet Fogarty szerint embolectomivál próbáltuk rekanalizálni, ami azonban csak átmenetileg bizonyult sikeresnek. Néhány percen belül a korábbi graft-rendszer ismételt komplett elzáródását észleltük. A fennálló helyzet megoldására aorto-bifemorális bypassst végeztünk. Ezzel egyidőben mindkét

lábszár mindhárom izomrekeszén elvégeztük a preventív fasciotomiát. A műtét végén a



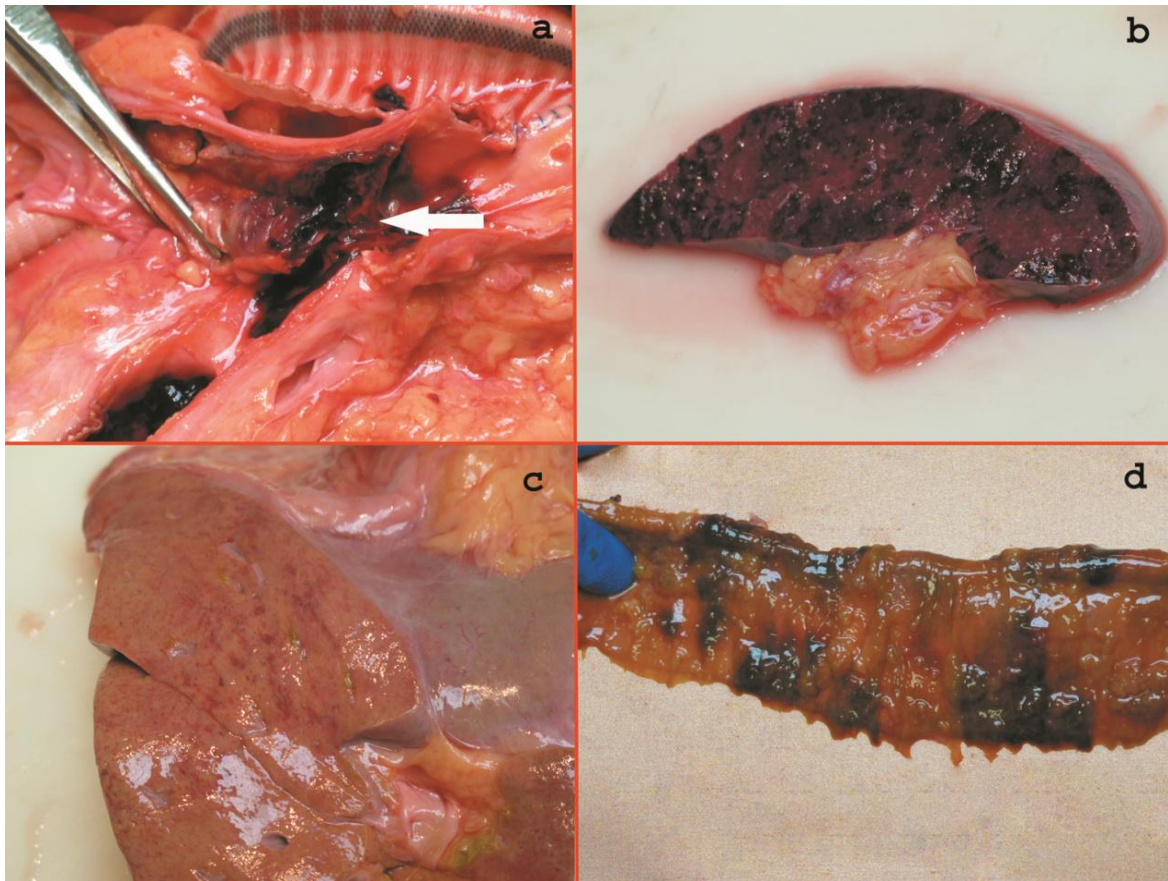
perifériás pulzusok mindkét oldalt tapinthatóvá váltak. A közvetlen posztoperatív szakban ismételt folyamatosan romló alsó végtagi keringést észleltünk a végtagok jelentős mértékű duzzadása mellett. Ennek megfelelően a posztoperatív 6. órában reoperáció mellett döntöttünk, melynek során perifériás, az artéria femoralistól distalis irányú dezobliterációt végeztünk, valamint a korábbi lábszári fasciotomiát mindkét oldali comb izomrekeszeire is kiterjesztettük. A műtét végén jó femorális és popliteális pulzus volt tapintható, ugyanakkor a sikeres revaszkularizációt követően a beteg állapota fokozatosan romlott. A műtétet követően a beteg laboreredményeiben (1. táblázat) a szérumban CK, laktát-dehidrogenáz (LDH) szintek jelentős emelkedést mutattak, mely súlyos fokú izomkárosodásra utal. A beteg légzési státusza a posztoperatív szakban folyamatosan romlott, gépi lélegeztetést igényelt. Oliguria mellett a szérumban kreatinin szint több mint háromszorosára emelkedett, fokozatosan kialakuló akut veseelégtelenség jelentkezett, akut hemodialízisre kényszerültünk. A csekély mennyiségű ürült vizeletben myoglobin jelenléte volt igazolható. A máj transzamináz szintjei jelentős emelkedést mutattak, valamint az alvadási paraméterek folyamatos romlása volt megfigyelhető. Jelentősen emelkedett CK-MB szintet mértünk. A fokozatosan hanyatló keringést folyamatosan emelkedő dózissal vazopresszor terápiával (noradrenalin, 5 - 7,5 µg/ttkg/óra) egy ideig sikerült ellensúlyozni, azonban a posztoperatív 19. órában progresszív keringésromlás volt megfigyelhető. A műtét utáni 27. órában keringésösszeomlás következett be, majd a beteg exitált.

A törvények előírásának megfelelő, a halál beállta után 3 nappal boncolás történt, mely során az infrarenalis aorta réteges, száraz tapintatú trombus általi okklúzióját láttuk, melyet az átjárható aorto-bifemorális bypass graft áthidalt (9/a. ábra). A többi szerv *postmortem* eltéréseit a 2. táblázat mutatja.

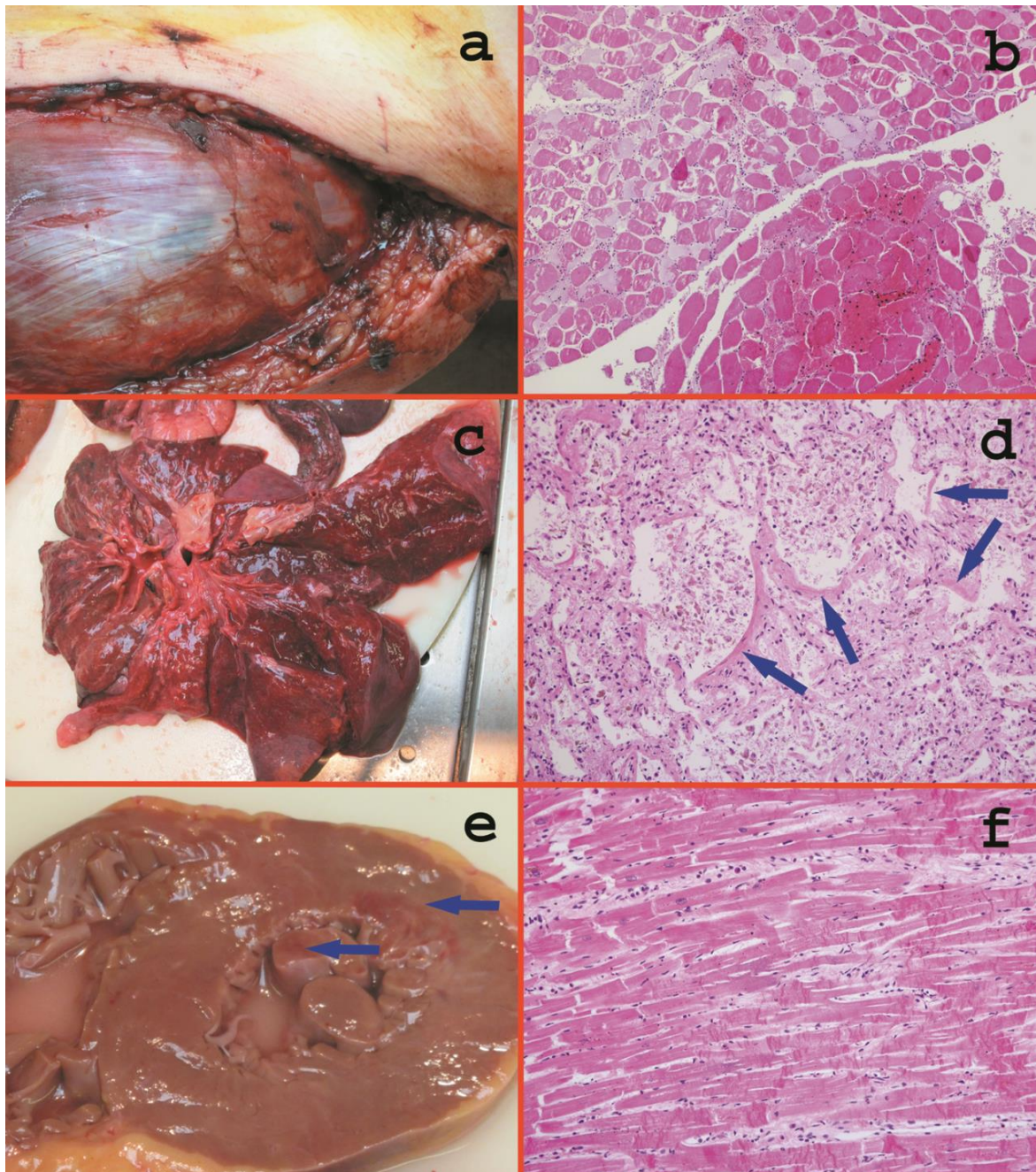
2. táblázat Az érintett szervek *postmortem* eltérései

szerv	makroszkópos kép	mikroszkópos kép
<b>izom</b>	a fasciotomiás nyílásokon kitüremkedő duzzadt, feszes tapintatú izom (10/A ábra).	Felületesebb biopsziákban részben necrotikus izomrostok gyulladással besűrűsödés, azonban a metszetek kb felében az izomrostok kevésbé károsodtak. (10/B ábra). A mély biopsziás mintákban ép területek nélküli igen súlyos károsodás jelei, váltakozó bevezetett és elhalt részek
<b>tüdő</b>	metszlapja vörösen foltozott, tészta tapintatú, nyomásra híg habos szilvalészerű folyadék ürült belőle; (10/C ábra)	sok helyen atelektázias területek, hialin membrán kezdemények és levált sejtek voltak láthatóak az alveolusok lumenében (ARDS korai, exszudatív szak); (10/D ábra)
szerv	makroszkópos kép	mikroszkópos kép

<b>szív</b>	bal kamrában 1,5 cm átmérőjű transzmurális infarktus (10/E. ábra)	mikroinfarktuskok, gócban gyulladással sejtes beszűrődés (10/F ábra)
<b>lép</b>	morzsálékony, metszlapján halvány és bevérzett területek (9/B ábra)	-
<b>máj</b>	metszlapján halványabb parenchyma, bal lebenyében 5 cm-es területen pontszerű bevérzések (9/C ábra)	Zsíros degeneráció a véna centrálisok körül fibrózis nélkül (akut degeneráció)
<b>jejunum</b>	nyálkahártyán sötétvörös foltozott mukózális infarktuskok, fokális, szegmentális mintázatban (9/D ábra)	-
<b>egyéb zsigerek</b>	akut pankreatitisznek megfelelő apró necrotikus gócbok a peripankreatikus zsírszövetben valamint a gyomor nyálkahártyáján eróziók.	-



9. ábra A különböző szervek makroszkópos megjelenése a boncolás során: (a) thrombussal (nyíl) kitöltött aorta, valamint a szabad lumenű aorto bifemorális graft; (b) lép állományában halvány és bevérzett területek; (c) májban halványabb ábrázoló parenchyma és pontszerű bevérzések; (d) jejunum nyálkahártyáján sötétvörös foltozott mukózális infarktuskok fokális, szegmentális mintázatban

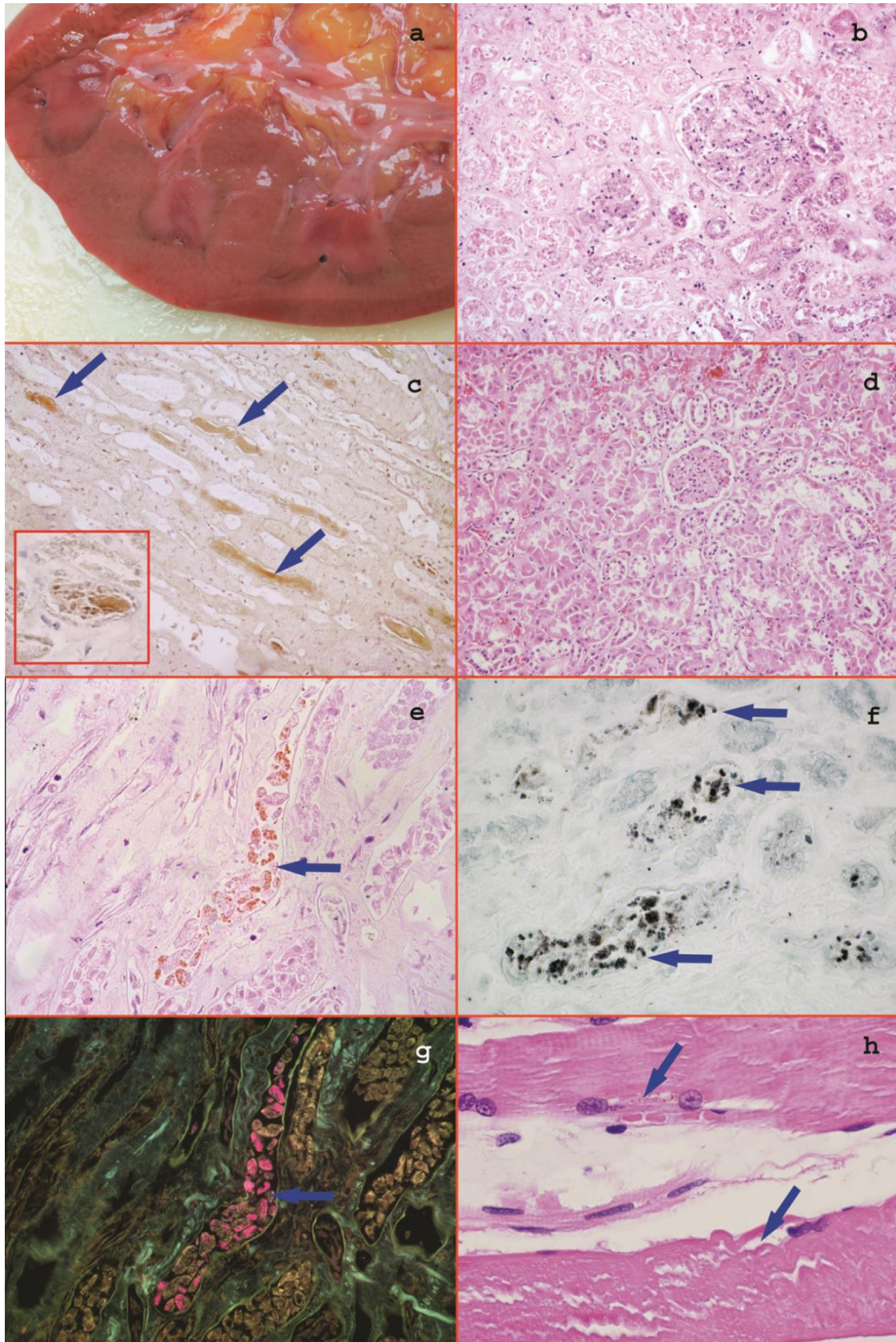


10. ábra Az egyes szervek boncolást követő makro (a, c, e)- és mikroszkópos (b, d, f) megjelenése. Festés: Hematoxillin-eosin, 200x. (a,b) vázizom (m. quadriceps femoris); (c, d) tüdő; (e,f) szívizom

Tekintve hogy a **vesék** vizsgálata a „várt” kép mellett meglepetésekkel is szolgált, így ezen patológiai leletek a következőkben részletesebben is bemutatásra kerülnek. Makroszkóposan a vesék megduzzadtak, felszínük halvány árnyalatú volt. A kéreg-velő állomány határa élesen elkülönült, jelentősen készélesedett (11/A ábra). Mikroszkóposan az akut tubuláris necrosis súlyos jelei voltak megfigyelhetőek (11/B ábra). Egy másik, vesekárosodást nem mutató elhunyt, kontrollként szolgáló betegből készült veseszöveti meszet (11/D ábra: ép struktúra) alapján elmondható, hogy a súlyos vesekárosodás nem a

boncolás során kialakuló autolízis következménye, hanem az alsó végtagi károsodás direkt szövődményeként jelent meg. A csupán sporadikusan előforduló, megtartott szerkezetű juxtamedulláris proximális tubulusok illetve főként a gyűjtőcsatornák lumenében kifejezett eozinofiliát mutató, homogén precipitátumok voltak láthatóak, melyekben aspeciális festési eljárásokkal mioglobin jelenléte volt igazolható (11/C ábra; a *mioglobin szövettani metszeteken történő kimutatására benzidin-peroxidáz reakciót, [209] és anti-mioglobin immunhisztokémiát alkalmaztunk - primer antitest: nyúl poliklonális anti-humán myoglobin; RP 029, Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA, Egyesült Államok*) A kéregvelő határán elhelyezkedő proximális tubulus sejtekben továbbá barna színű granuláris pigment jelenléte volt megfigyelhető (11/E ábra). Az elvégzett Berlini-kék festés negatív volta a pigment hemosziderin tartalmát kizárta. A pozitív Sudan Black B festés (11/F ábra), illetve a granulomok fokozott autofluoreszcenciája azonban arra utalt, hogy a pigment a tubulus sejtekben jelenlévő lipofuscinnak felel meg. (11/G ábra; *Leica DM RXA motorizált fluoreszcens mikroszkóp - Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Németország, 400x; A képrögzítés: Leica DFC365 FX (Leica Microsystems) monokróm digitális kamera, Texas Red, FITC és DAPI filterek a filterekkel készült képek egybeolvasztása (rendre: vörös, zöld és kék csatornák) CW4000 FISH szoftverrel (Leica Microsystems)* Minthogy a vizsgált, lipofuscint tartalmazó tubulussejtek relatíve épnek mutatkoztak a lipofuscin önmagában feltehetőleg nem toxikus a tubulussejtekre. Ennek igazolására ismételten átvizsgáltuk az izmok szövettani metszeteit, melyeken az izomrostokban lipofuscin jelenléte volt igazolható, illetve néhány metszeten a széttöredezett rostokban a lipofuscin felszabadulása is azonosítható volt (11/H ábra).

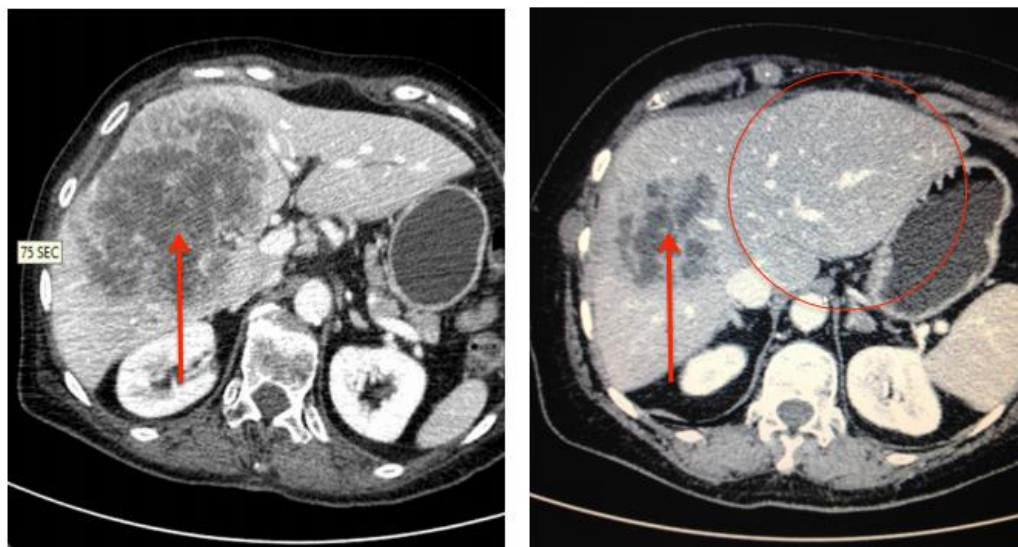
Jelen alfejezetben tehát egy 72 órás hosszúságú, akut alsó végtagi ischaemiát elszenvedett beteg esetét ismertettük. A gyors érsebészeti beavatkozások a végtag keringését rendezték, azonban az ischaemiás-reperfúziós károsodás szövődményeként súlyos lokális és szisztémás szövődmények alakultak ki. Az alsó végtag jelentős, a végtagok szinte teljes necrosisával járó károsodása mellett, távoli szervi elégtelenség alakult ki a szívben, tüdőben, a gasztrointesztinális és alvadási rendszerben, valamint a vesékben, mely végül a beteg halálához vezetett. Ezen esetismertetés egy konkrét klinikai példán keresztül mutatja be az alsó végtagi ischaemiás-reperfúziós károsodások lehetséges következményeit, felhívja a figyelmet ezek lehetséges fatális kimenetelére, valamint az időben való felfedezés fontosságára.



11. ábra A vesében látható elváltozások (Festés: hematoxillin-eosin [b, c, d, e, g, h], Sudan Black B [f]) (a) makroszkópos elváltozások; (b) akut tubuláris necrosis mikroszkópos képe; (c) mioglobinnel jelenléte a disztális és a proximális (inset) tubulusokban; (d) kontroll vese szövettani képe; (e) barna pigment a proximális tubulusban, mely Sudan festéssel fekete reakciót ad, ill. (f) autofluoreszcenciát mutat (g, h) a szétesett izomrostokból lipofuszcinn granulumok szabadulnak ki. Eredeti nagyítás: 200x [b, c, d], 400x [e,g], 600x [f, h]

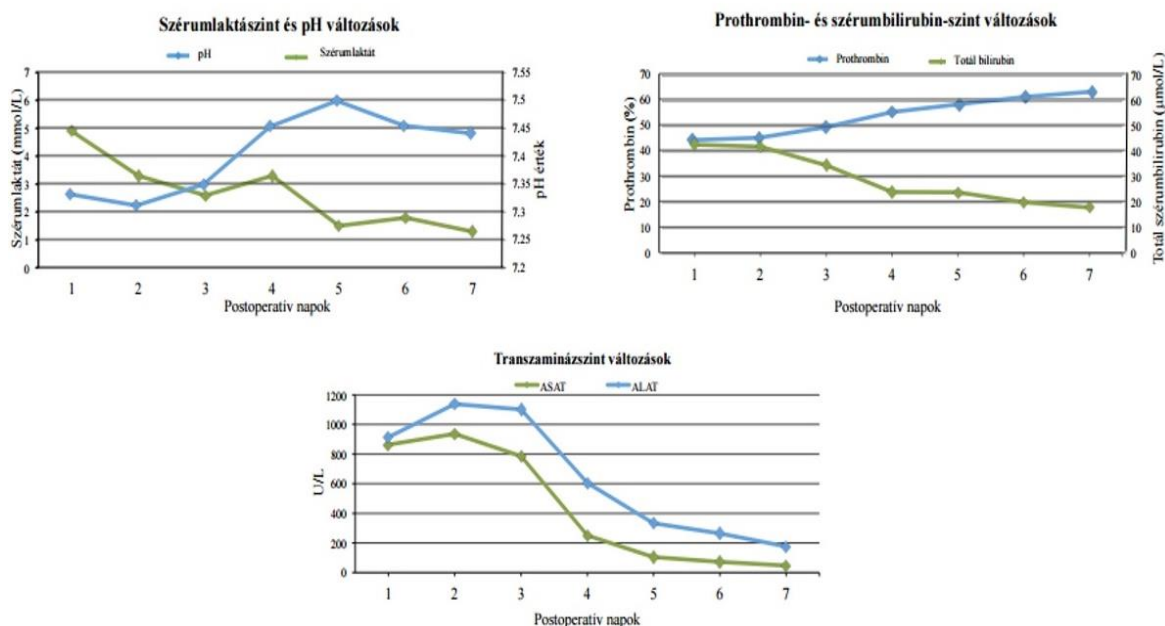
## 2.2. A máj ischaemiás-reperfúziós károsodás

Hatvanéves B.M. nőbeteg kórelőzményében bal oldali emlődaganat (invazív ductalis carcinoma; cT2 N2 M1; Her2 poz; ER/PR 80%) szerepel axilláris nyirokcsomó áttéttel és soliter (2 cm) májmetastasisissal. Az onkológiai konzílium alapján a beteg az emlőműtét megelőzően neoadjuváns kezelésben részesült (4 x TAC [Taxotere, Adriamicin cyclophosphamid]), mely mellett regresszió nem volt észlelhető, így mastectomiát és axillaris *en bloc* lymphadenectomiát végeztünk. A beteg továbbiakban radioterápiával kiegészített herceptin+docetaxel elsővonalbeli kezelésben részesült, mely az emlő tekintetében hatásos kezelésnek igazolódott, lokális recidíva nem volt észlelhető. Ugyanakkor a kezelés alatt jelentős progressziót mutató (8cm) májbeli térfoglalásból mintavétel történt, mely az emlődaganat áttétét igazolta. A képalkotók (PET-CT, CT) alapján további távoli disszemináció nem volt detektálható, ugyanakkor a májtumor kiterjedése alapján a metastasis sebészi ellátására jobb oldali hemihepatectomia jött számításba. A tervezett májresectiot követően megmaradó, visszamaradó funkcionáló májszövet (future liver remnant: FLR) egészséges máj esetében elegendőnek bizonyult volna (28 %), de megelőző kemoterápiás kezelések miatt a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően (FLR<30%) két lépcsős májresectio mellett döntöttünk. Az első műtét kapcsán a jobb vena portae ág lekötése illetve cholecystectomy történt. Nyolc hetet követően az elégségesnek vélt bal lebenyi regeneráció és további progressziót nem mutató CT kép ellenére az intraoperatív UH vizsgálattal a máj S4 segmentuma felé propagáló, azt részben érintő satellita metastasisok kerültek felismerésre ezért a jobb hemihepatectomia nem volt kivitelezhető, kiterjesztett jobb oldali hemihepatectomiára (trisegmentectomiára) az FLR nem volt elegendő (FLR<sub>S1-S2-S3</sub> < 30%). Az onkológiai konzílium javaslata alapján további intravénás kemoterápia (gemcitabin) vált szükségessé. A négy hónappal később végzett kontroll CT vizsgálat távoli disszeminációt továbbra sem igazolt, ugyanakkor a satellita metastasisok méretbeli regresszióját (5 mm alattiak), a jobb lebeny atrophiját és az I-es, II-es, III-as szegmetum további, jelentős (FLR 35,5%) hypertrophiáját mutatta (12. ábra). Jelen helyzetben a beteget ismételt resectiós tervvel, jobb oldali trisegmentectómia elvégzése céljából felvettük klinikánkra.



12. ábra bal kép: kezdeti alacsony, resectiora alkalmatlan volumenű bal lebeny, kiterjedt jobb oldali tumerral, jobb kép: jelentős hypertrófiát mutató bal lebeny.

*Lege artis* műtéti előkészítést követően intermittáló hilaris vaszkuláris kirekesztés (2x25 perces kirekesztés közte 10 perc felengedés) mellett a trisegmentectómiának megfelelő vonalban a ligamentum falciforme hepatis mellett a S1, S2, S3 szegmentek meghagyásával resectiot végeztünk. Az intraoperatív vérvesztés kb. 650 ml volt. A máj állománya - vélhetően a tartós kemoterápiás kezelések hatására - az egészségestől eltérő, zsíros degenerációt mutató, törékeny volt. 185 perces műtéti idő után, korrigált haemostatus mellett a korai posztoperatív időszakban a sav-bázis paraméterek acidózis irányába mutattak eltolódást ( $\text{pH}_{\text{min}}$ :7,32;  $\text{BB}_{\text{min}}$ :40 mM/L,  $\text{BE}_{\text{max}}$ :-12,5 mM/L,  $\text{seLaktát}_{\text{max}}$ :7,4 mM/L [Radiometer ABL 80 - Radiometer Medical ApS Åkandevej 21 DK-2700, Brønshøj, Denmark]), a beteg gépi lélegeztetése nem volt megszüntethető. A beteg általános állapota a komplex intenzív kezelés ellenére sem javult, az első posztoperatív napon tudata továbbra is beszűkült volt, szérumszintje tovább emelkedett ( $\text{seLaktát}_{\text{max}}$ :9,4 mM/L). Ezen kívül laborértékekben (a laborparaméterek meghatározása rutin klinikai tesztek elvégzésével történt - Semmelweis Egyetem, Központi Laboratórium) kiugró szérumszintek (ASAT: 864 U/L; ALAT: 915 U/L) és emelkedett GGT (144 U/L) szint volt mérhető. Testszerte jelentkező oedema, csökkent diurézis ( $\text{eGFR}$  60,6 ml/perc/1,73m<sup>2</sup>) és prothrombinráta (51%), illetve emelkedett gyulladásos (WBC: 26,24 G/L; CRP: 37,2 mg/L) és szérumbilirubin (16,3  $\mu\text{mol/L}$ ) értékek voltak megfigyelhetők (13. ábra). Az elvégzett képalkotó vizsgálatok intervencióra nem szoruló konkomitáló jobb oldali mellüregi folyadékgyülemet és közepes fokú ascites igazoltak.



13. ábra Posztoperatív labor paraméter változások

Ezen paraméterek a májelégtelenség kritériumainak (minimum 2 egymást követő napig emelkedő se bilirubin, csökkenő prothrombin ráta, emelkedő se laktát, encephalopathia [210]) megfeleltek. A progresszív májelégtelenség etiológiájának hátterében felmerült a máj keringészavar lehetősége. Ennek tisztázására CT angiográfiás vizsgálatot végeztünk, amely alapján a máj arterio-portalis és vénás keringése kielégítőnek bizonyult, ugyanakkor a parenchyma inhomogén densitásúnak mutatkozott. Ez alapján felvetődött, hogy a májelégtelenség hátterében a korábbi onkológiai kezelések hatására jelentős károsodást elszenvedett máj egyebekben tolerálható átmeneti vaszkuláris kirekesztése következtében fellépő ischaemia-reperfúziós kórallapot állt.

További konzervatív kezelés mellett a beteg általános állapota a harmadik posztoperatív naptól javulást mutatott. A gépi lélegeztetés megszüntetésével egyidőben a veseelégtelenséget jelző paraméterek normalizálódtak, átmeneti polyuriás fázis után fiziológias laborértékeket detektáltuk, a májelégtelenségre utaló paraméterek egy hét alatt normalizálódtak. Az átmeneti ascites diuretikus kezelés és albuminpótlás mellett megszűnt. A javuló máj- és veseelégtelenséggel párhuzamosan a súlyos katabolikus állapot miatt 5 napon át 500 mg/ttkg parenterális glutamin (N(2)-L-alanil-L-glutamin, Dipeptiven, Fresenius Kabi) kezelést állítottunk be. További szövődményre utaló jelet nem észleltünk,



így a beteg a 14. napon szövődménymentesen távozott klinikánkról, onkológiai kezelése jelenleg is folyamatban van.

Jelen eset kapcsán a máj klasszikus ischaemia-reperfúziós károsodásának klinikai lefolyásán keresztül kívánta a szerző bemutatni és hangsúlyozni a kórállapot több szerve, szervrendszerre kiterjedő, életveszélyt jelentő fontosságát. Igaz, ezen eset kapcsán az intermittáló kirekesztés időtartama nem tűnt extrém hosszúságúnak, mégis elegendőnek bizonyult a kemoterápiás kezelést követően károsodott májszövet esetén. A növekvő tendenciát mutató sebészi radikalitás elengedhetetlen előfeltétele a komplex neoadjuvans kezelés is, így egyre több eset kapcsán várhatóak hasonló szövődmények. Az eset egyrészt felhívja a figyelmet a napi májsebészeti gyakorlatban észlelhető ischaemia-reperfúziós jelenségek lehetőségére, másrészt kérdéseket vet fel a megelőzés tekintetében.

### 3. Célkitűzések

A Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikáján a jelen dolgozat szerzője által vezetett Kísérletes Sebészeti Részleg már hosszú évek óta foglalkozik az ischaemia és a reperfüzió témakörével, illetve a fenti károsodások mérséklésére irányuló technikák vizsgálatával. A kísérleti elrendezések alapjául a sebészi beavatkozásokat modellező alsó végtagi és máj ischaemia-reperfüziós patkánymodell szolgál. A jelen értekezés az elmúlt évek kísérletes vizsgálatainak felvonultatását célozza meg, klinikai, gyakorlat-orientált irányban továbbgondolva azokat, tekintve, hogy a kísérletek megtervezéséhez a korábbi esetismertetések során is felvetett problémák, kérdések vezettek.

A kísérletsorozat egyik célja egy olyan alsó végtagi ischaemiás modell megalkotása volt, ahol a kisméretű izomszöveti károsodás mellett potenciálisan fennállt a távoli szervek érintettségének lehetősége is. Ezt követően a kísérletek középpontjába az alsó végtagi kritikus ischaemiás idő meghatározása került. A kritikus időpillanat meghatározásához egy, a szerző munkacsoportja által kifejlesztett új metodikai eljárás került kidolgozásra, mely mind rágszáló modellen, mind későbbiekben klinikai körülmények között is képes lehet az ischaemiás károsodás mértékének terápiás időablakon belüli meghatározására. A szerző további célja volt a kialakult károsodás mértékének csökkentésére alkalmas eljárás, a poszt-kondicionálás vizsgálata akut alsó végtagi verőér-kirekesztés kisállat modelljén.

Részleteiben az alsó végtagi verőérkirekesztéssel járó kísérleteink az alábbi kérdésekre keresték a választ:

1. Rágszáló modellben milyen mértékű lokális és távoli szervi károsodást képes létrehozni egy prolongált, de kritikusnak nem mondható, műtéti helyzetet is modellező infrarenális aortakirekesztés?
2. A fenti modellben milyen hatásokkal bír a reperfüzió kezdetén alkalmazott adaptív sebésztechnikai manőver - a poszt-kondicionálás - mind a célszerv, mind a távoli szervek (vese, tüdő, bél) tekintetében?
3. Az izomszöveten létrehozott, fokozatosan hosszabbodó ischaemiás időtartamok milyen fény-, és elektron mikroszkópos változásokat okoznak? Hol van a kritikus ischaemia határa?

4. Az általunk alkalmazott NBT enzimhisztokémián alapuló új módszer alkalmas-e a kialakult károsodást megfelelő érzékenységgel detektálni?
5. Alkalmas-e a posztkondicionálás hosszú idejű ischaemiát követően a szövettani károsodás mértékének csökkentésére?

Folytatólagosan az alsó végtagon megszerzett tapasztalatokat májszövetre adaptáltuk, figyelembe véve azt a klinikai igényt, hogy máj esetében az ischaemiás tolerancia növelése a cél, nem pedig a már kialakult károsodások mérséklése. Májszöveten alkalmazott távoli szervi ischaemiás perkondicionálás és farmakológiai kezelések új kísérletes utakat nyitottak, melyek az alábbi kérdések megválaszolását célozzák:

1. Máj ischaemia-reperfúziós károsodása kapcsán az alsó végtagról indított ischaemiás perkondicionálás hogyan befolyásolja a máj szöveti károsodását? Milyen változások észlelhetők a szisztémás paraméterekben, úm.: hemodinamika, redox-homeosztázis, gyulladáshoz való válaszreakció?
2. Milyen jelentőséggel bír a neurális integritás megléte a távoli szervi ischaemiás perkondicionálás esetén?
3. Hogyan befolyásolható a máj ischaemia-reperfúziós károsodása - a kémiai kondicionálási potenciállal bíró - levosimendan alkalmazásával?
4. Milyen hatással és milyen feltételezett mechanizmussal hat a máj ischaemia-reperfúziós károsodására a glutamin?
5. Hogyan befolyásolja a preoperatív alkalmazott PJ-34 PARP inhibitor a máj károsodását ischaemia-reperfúziós modellben?

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Kísérleti elrendezés - Műtéstechnika

#### 4.1.1. Törvényi háttér

Kísérleteink során az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvény, valamint a 40/2013 (II.4) Kormányrendelet szerint elvárt követelményeknek megfelelően jártunk el. Munkánkat az Egyetemi Állatkísérleti Bizottság, később Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (Semmelweis Egyetem, Budapest) által jóváhagyott, a Pest Megyei Kormányhivatal, Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága által kiadott engedélyek alapján végeztük.

#### 4.1.2. Állatok

Kísérleteink során 200-300g súlyú, hím Wistar patkányokat használtunk (Semmelweis Egyetem Központi Állatház, Budapest). Az állatok tartása standard körülmények közt, a napszaki változásokat követő mesterséges megvilágítás mellett, 22-24°C-os hőmérsékleten történt. Az állatok száraz tápot és vizet kaptak *ad libitum*.

#### 4.1.3. Anesztézia, testhőmérséklet és a műtét ideje

Az anesztézia indukciója intraperitoneálisan beadott 75 mg/ttkg ketaminnal (Calypsol®) és 7,5 mg/ttkg xilazinnal (Xylasin®) történt. Az altatás fenntartására 25 mg/ttkg/óra ketaminnal és 2,5 mg/ttkg/óra xilazinnal került sor infúziós pumpa segítségével a jobb oldali vena jugularis-on keresztül. Az intraoperatív folyadékvesztés pótlására 3 ml/ttkg/óra fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk intravénásan. Az állatok hőmérsékletét fűthető műtőasztal (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus, Holliston, MA, Amerikai Egyesült Államok) segítségével a kísérletek alatt mindvégig 36,5-37,5°C között tartottuk. A cirkadián ritmus esetleges zavaró hatásainak kizárása érdekében a műtéteket közel azonos időben indítottuk.

#### **4.1.4. A műtét menete - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálat**

Intraperitoneális anesztézia-indukciót követően a jobb vena jugularis interna kireparálása után 22 G-s polietilén kanül került bevezetésre, melyen keresztül a műtét időtartama alatt az általános anesztézia fenntartása és a parenterális folyadékpótlás biztosítása történt. A fenntartó altatás megkezdését követően invazív vérnyomás monitorozása céljából a bal artéria carotis communis kireparálására és kanülálására került sor. Ezt követően az állatok bal lábszárának külső oldalán, a végtag tengelyével párhuzamosan ejtett 2 cm hosszú bőrmetszés segítségével a m. biceps femoris laterális felszíne feltárással került. A metszésen keresztül a térd felett 0,5 cm-rel lézer Doppler áramlásmérő került rögzítésre, majd 5 perc alapáramlást regisztrálása történt. A medián laparotómiát a hasi aorta infrarenális szakaszának kireparálása követte, mely után az aortára, közvetlenül a bifurkáció felett atraumatikus mikroklip (Aesculap Yasargil FT260T, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Németország) került felhelyezésre. Az ischaemia alatt a hasüreget tovaftató varratsorral zártuk. Adott hosszúságú ischaemiás szakaszt (3, 4, 6, 8, 9 óra) követően az okklúziót megszüntettük, melyet csoportbeosztástól függően 2-72 óra hosszúságú reperfúziós periódus követett (lásd csoportbeosztás 2. táblázat). A reperfúzió ideje alatt az altatást fenntartottuk, valamint a hasüreget kétrétegű tovaftató varratsorral zártuk. Az állatok egy csoportjában közvetlenül a reperfúziót megelőzően posztkondicionálást (PostC) végeztünk 6 ciklusban, ciklusonként 10 másodperc reperfúzióval, 10 másodperc reokklúzióval, összesen tehát 2 percen keresztül (lásd csoportbeosztás 2. táblázat). A kísérlet végeztével az állatokat altatásban a jobb kamra punkcióján keresztül kivéztettük, majd izom (m. tibialis anterior) és egyéb mintavételre került sor. Az áloperált csoportban nem került felhelyezésre mikroklip, minden más tekintetben - az időbeli viszonyokat is figyelembe véve - pontosan úgy jártunk el, mint a többi csoportban.

#### **4.1.5. Csoportbeosztás - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálata**

Az állatok csoportbeosztását és a felhasznált állatok számát az 3. táblázat tartalmazza.

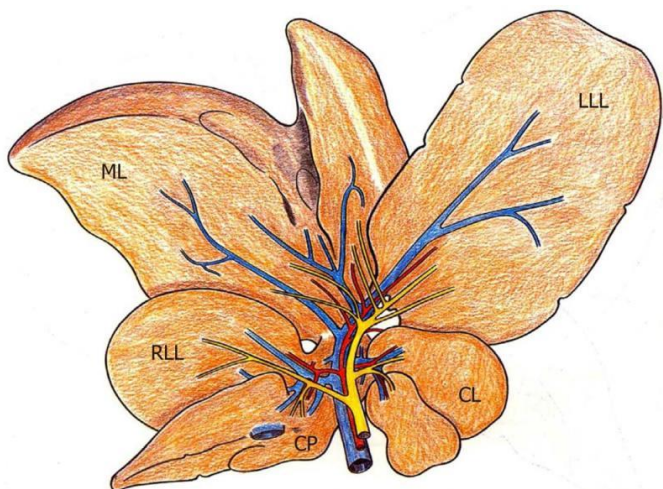
3. táblázat Kísérleti elrendezés. Alsóvégtagi ischaemia-reperfúziós károsodás vizsgálata.

Kísérlet	Csoport-beosztás	Ischaemia ideje	Reperfúzió						PostC	n	
			2 óra	4 óra	6 óra	12 óra	24 óra	72 óra			
Rövid idejű végtagi ischaemia	Áloperált*	-	-	-	-	-	-	+	+	-	10
	IR	3 óra	-	+	-	-	-	+	+	-	30
	PostC	3 óra	-	+	-	-	-	+	+	+	30
Rövid idejű végtagi ischaemia vese szövődményei	Áloperált*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
	IR	3 óra	-	+	-	-	-	-	-	-	8
	IR	3 óra	-	-	-	-	+	-	-	-	8
	IR	3 óra	-	-	-	-	-	+	-	-	8
	PostC	3 óra	-	+	-	-	-	-	-	+	8
	PostC	3 óra	-	-	-	-	+	-	-	+	8
	PostC	3 óra	-	-	-	-	-	+	-	+	8
Rövid idejű végtagi ischaemia tüdő szövődményei	Áloperált*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
	IR	3 óra	-	+	-	-	-	-	-	-	10
	IR	3 óra	-	-	-	-	+	-	-	-	10
	IR	3 óra	-	-	-	-	-	+	-	-	10
	PostC	3 óra	-	+	-	-	-	-	-	+	10
	PostC	3 óra	-	-	-	-	+	-	-	+	10
Rövid idejű végtagi ischaemia bél szövődményei	Áloperált*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24
	IR	3 óra	-	+	-	-	-	-	-	-	24
	PostC	3 óra	-	+	-	-	-	-	-	+	24
Kritikus ischaemia meghatározása	I	4 óra	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	I	6 óra	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	I	8 óra	-	-	-	-	-	-	-	-	6
Hosszú idejű végtagi ischaemia	Áloperált*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24
	IR	8 óra	+	-	-	-	-	-	-	-	6
	IR	8 óra	-	-	+	-	-	-	-	-	6
	IR	8 óra	-	-	-	+	-	-	-	-	6
	IR	8 óra	-	-	-	-	+	-	-	-	6
	PostC	8 óra	+	-	-	-	-	-	-	+	6
	PostC	8 óra	-	-	+	-	-	-	-	+	6
	PostC	8 óra	-	-	-	+	-	-	-	+	6
Izomrost életképesség vizsgálata	I	4 óra	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	I	6 óra	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	I	8 óra	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	I	9 óra	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	IR	8 óra	+	-	-	-	-	-	-	-	6
	IR	9 óra	+	-	-	-	-	-	-	-	6
<b>Teljes állatszám</b>										<b>391</b>	

I: Ischaemia, IR: Ischaemia-reperfúzió, PostC: posztkondicionálás, n: állatszám, \* az áloperált csoportok esetén a műtét időtartalma megfelel az adott kísérleti csoportban alkalmazott ischaemia és reperfúzió hosszával.

#### 4.1.6. A műtét menete - Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata

A kísérletekben használt állatmodell alapját a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti



14. ábra: A patkánymáj anatómiája. RLL: right lateral lobes, ML: median lobe, LLL: left lateral lobe, CL: caudate lobe. Forrás: Maria-Angeles Aller és mtsai: World J Hepatol. 2012

Klinikáján kifejlesztett modell képezi (Kupcsulik P. és munkatársai 1979).

[211, 212] Lényege, hogy

patkánymáj lebenyezett szerkezetét alapul véve (14. ábra), a máj

tömegének nagy részét képező

mediális (median lobe: ML) és bal

lateralis (left lateral lobe: LLL)

lebenyek a keringésből

kirekeszthetők, mialatt az jobb

lateralis (right lateral lobe: RLL) és

caudalis (caudate lobe: CL)

lebenyeken át a splanchnikus keringés zavartalan, így az állatok által nehezen tolerált splanchnikus pangás, illetve anhepaticus fázis elkerülhető.

Az anesztézia biztosítását (megegyezik a végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálatoknál leírtakkal) felső-középső medián laparotomia, majd a CL májlebenyek mobilizálása követte. A mikrocirkulációs áramlás regisztrálása lézer Doppler áramlásmérő segítségével történt. A felszíni mérőfej a máj LLL lebenyén mindig azonos lokalizációban került felhelyezésre. A máj ischaemia indukcióját megelőzően 5 perces alapáramlás regisztrálására került sor. A kísérlet során a ML és LLL lebenyek biliovascularis nyelére atraumatikus mikroklipet helyezve a májban 60 perces – a szerv közel kétharmadát érintő – szegmentális ischaemiát hoztunk létre. Az ischaemia utolsó 5 percében a shunt-ölő lebenyek (RLL, CL) eltávolításra kerültek, így a reperfúzió kizárólag az előzetesen ischaemiásan károsodott lebenyeket érintette. A reperfúzió ideje alatt az altatást fenntartottuk. A kísérlet végeztével az állatokat altatásban a jobb kamra punkcióján keresztül kivéztettük, majd máj és egyéb szöveti mintavételre került sor. Az áloperált csoportban nem került felhelyezésre mikroklip, minden más tekintetben - az időbeli viszonyokat és lebeny reszekciókat is figyelembe véve - pontosan úgy jártunk el, mint a többi csoportban.

Az állatok egy részénél, csoportbeosztástól függően (lásd 3. táblázat) különböző sebészi, illetve farmakológiai (elő)kezelést végeztünk az ischaemia idejét megelőzően, illetve az ischaemia alatt. *Távoli szervi kondicionálást* vizsgáló (ischaemiás

perkondicionálás: I-PerC) csoportokban az aorta infrarenális szakaszának atraumatikus mikroklippel történő okklúziójával, a 60 perces máj ischaemia 20. percétől kezdődően 4 ciklusban (5 perc ischaemia, 5 perc reperfüzió) perkondicionálást végeztünk az alsó végtagi vázizomzaton. Az állatok egy részénél az I-PerC háttérmechanizmusának vizsgálata érdekében, a szegmentális máj ischaemiát megelőzően, a nervus femoralis és ischiadicus hozzávetőlegesen 0,5 cm hosszú resectioját végeztük, melyet 20 perc regenerációs időszak követett (-N csoportok). "**Rövid latenciájú**" **glutamin előkezelés csoportban** (Glu-R) az állatok közvetlenül a máj ischaemiáját megelőzően 400 mg/ttkg Dipeptiven<sup>®</sup> (Fresenius Kabi, Budapest, Magyarország) infúzióban részesültek 3 óra alatt. "**Hosszú latenciájú**" **glutamin előkezelés csoportban** (Glu-H) az állatok 24 órával az ischaemiát megelőzően 500 mg/ttkg Dipeptiven<sup>®</sup> infúzióban részesültek 5 óra alatt, 1 ml/h sebességgel. Dipeptiven<sup>®</sup> választott dózisa megegyezik a kísérlet idejében ajánlott (és jelenleg is érvényben lévő) klinikai dózissal, viszont az ajánlás változását követve eltér a korábbi vizsgálatban (Glu-R) adott (400 mg/ttkg) mennyiségtől. Mindkét fent említett glutamin adagolással végzett kísérletben az áloperált és az IR-kontroll csoport esetében 1 ml/h sebességgel, kevert aminosav (Aminoven<sup>®</sup>, Fresenius Kabi, Budapest, Magyarország) oldatot infundáltunk azonos volumenben az ischaemia előtt 3 órával („rövid latenciájú” csoport), illetve 5 órán keresztül 24 órával a műtét előtt („hosszú latenciájú” csoport). A **PARP inhibitor előkezelt csoportban** PJ-34 szelektív PARP-1 inhibitor alkalmaztuk (Inotek Pharmaceuticals Corporation, Massachusetts, Beverly, Amerikai Egyesült Államok) 1 órával a máj ischaemia előtt 10 mg/ttkg dózisban intravénásan. Itt az áloperált és az IR-kontroll csoportban fiziológias sóoldatot kaptak az állatok azonos térfogatban. **Levosimendan 1 (Lev-1) és -24 (Lev-24) előkezelt csoportoknak** megfelelően, az előkezelést közvetlenül a műtét előtt, vagy az ischaemiát 24 órával megelőzően végeztük 5 ciklusban. A levosimendan (Simdax<sup>®</sup>, OrionPharma Kft, Magyarország) testtömegre számítottan adható dózisát (kalkulációs séma: 24µg/kg bólus + 0,4µg/kg/h infúzió) 5x5 perc alatt adtuk intravénásan, infúziós pumpa segítségével. Az infúziós ciklusok között 10-10 perc szünetet tartottunk. Az IR-kontroll és az áloperált csoportokban az állatok azonos módszerrel és azonos volumenben kapták a vegyület oldószerként használt 5%-os glukóz oldatot.



#### 4.1.7. Csoportbeosztás - Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata

Az állatok csoportbeosztását és a felhasznált állatok számát a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat Kísérleti elrendezés. Máj ischaemia-reperfúziós károsodás mérséklése.

Kísérlet	Csoport-beosztás	Ischaemiás idő	Reperfúzió				Kezelés	n
			1 óra	6 óra	24 óra	168 óra		
Távoli szervi ischaemiás perkondicionálás	Áloperált <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	24
	IR	60 perc	+	-	-	-	-	8
	IR	60 perc	-	+	-	-	-	8
	IR	60 perc	-	-	+	-	-	8
	PerC	60 perc	+	-	-	-	PreC	8
	PerC	60 perc	-	+	-	-	PreC	8
	PerC	60 perc	-	-	+	-	PreC	8
Távoli szervi ischaemiás perkondicionálás neurális hatásmechanizmusának szerepe	Áloperált <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	7
	Áloperált-N <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	-	7
	IR	60 perc	-	-	+	-	-	7
	IR-N	60 perc	-	-	+	-	-	7
	PerC	60 perc	-	-	+	-	PreC	7
	PerC-N	60 perc	-	-	+	-	PreC	7
	Farmakológiai kondicionálás - Levosimendan	Áloperált <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	Rindex-5
Lev-1		-	-	-	-	-	Lev-1	5
Lev-24		-	-	-	-	-	Lev-24	5
IR-1		60 perc	-	+	-	-	Rindex-5	10
IR-24		60 perc	-	+	-	-	Rindex-5	10
IR+Lev-1		60 perc	-	+	-	-	Lev-1	10
IR+Lev-24		60 perc	-	+	-	-	Lev-24	10
Farmakológiai kondicionálás - Glutamin-R	Áloperált <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	0,9% NS	15
	IR	60 perc	-	+	-	-	0,9% NS	15
	Glu-R	60 perc	-	+	-	-	Glu (3 óra)	15
Farmakológiai kondicionálás - Glutamin-H	Áloperált <sup>#</sup>	-	-	-	-	-	Aminoven	10
	IR	60 perc	-	-	+	-	Aminoven	10
	Glu-H	60 perc	-	-	+	-	Glu (24 óra)	10
Farmakológiai kondicionálás - PARP-inhibitor	Áloperált <sup>#</sup>	60 perc	-	-	-	-	0,9% NS	15
	IR	60 perc	0,5h	-	-	-	0,9% NS	15
	PJ-34	60 perc	0,5h	-	-	-	PJ-34 (1 óra)	15
<b>Teljes állatszám</b>								<b>289</b>

IR: Ischaemia-reperfúzió, I-PreC: Ischaemiás perkondicionálás, PerC: Ischaemiás perkondicionálás, Lev: Levosimendan, NS: fiziológiás sóoldat, Glu: Glutamin, \*: előkísérlet az optimális ischaemiás idő meghatározására (módszerek és eredmények részletes bemutatására jelen dolgozatban nem kerül sor), #: az áloperált csoportok esetén a műtét időtartalma megfelel az adott kísérleti csoportban alkalmazott ischaemia és reperfúzió hosszával

## 4.2. Vizsgált paraméterek - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálata

### 4.2.1. Hemodinamikai vizsgálatok

#### 4.2.1.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az állatok artériás középnyomását és szívfrekvenciáját a jobb oldali arteria carotis communisba vezetette polietilén kanül segítségével invazív vérnyomásmérővel (Dasy Lab V9.00.02., National Instruments Corporation, Austin, TX, Amerikai Egyesült Államok) regisztráltuk.

#### 4.2.1.2. Szöveti mikrocirkuláció

A bal alsó végtagi (m. biceps femoris) perfúzió mértéke lézer Doppler áramlásmérővel (MOOR Instruments Ltd, London, UK; DRT4, kétcsatornás eszköz;  $\lambda = 632,8$  nm; monokromatikus; 2 mW HeliumNeon lézer) került rögzítésre. A műszer a kibocsátott lézer fény Doppler-elv alapján történő visszaverődésének detektálásának révén működik. Az eszköz on-line adatrögzítéssel és számítógépes feldolgozással regisztrálja a mérőfej alatti kb. 1 mm<sup>3</sup>-es szövethengerben a kapillárisokban mért átlagos áramlást, vörösvértest koncentrációt és a hőmérsékletet. Az áramlási adatok által kirajzolt görbék összehasonlíthatósága érdekében, matematikai korrekció történt. Ennek alapja az ischaemia alatti áramlási átlagérték - az ún. biológiai nulla érték - minden flux értékből való kivonása, és az adatok relatív skálán való ábrázolása, melyen a 0%-os értékének az ischaemia alatti áramlást, míg 100%-os szélsőértékének az alapáramlást vesszük. Az ezt követő reperfúzió leírására újabb fogalmak bevezetésére van szükség: (1) plató maximum (PM) - a reperfúziós szakasz végső szakaszához (utolsó mért 10 perc) tartozó értékek számtani átlaga. (2) Reperfúziós terület (RT) - kiszámítása a reperfúzióhoz tartozó görbe alatti terület integrálásával történik. Az utóbbi paramétert az adatok jobb összehasonlíthatósága érdekében egy hipotetikus, már a reperfúzió nulla pillanatában 100%-os áramlással jellemezhető áramlási függvény görbe alatti területének százalékában adtuk meg. A feldolgozásnál minden áramlási görbe individuális kiértékelése történt. A kísérleti elrendezés szempontjából egy csoportba tartozó egyedek értékei átlagolásra kerültek. Ezt követően történt az átlagolt áramlási értékek grafikus megjelenítése.

#### **4.2.2. Hisztológiai vizsgálatok**

##### *4.2.2.1. Rutin hematoxilin-eozin festés - fénymikroszkópos vizsgálat*

Minden állatból a bal oldali m. tibialis anterior azonos anatómiai lokalizációjából történt szövettani mintavétel. Az izomminták 4 %-os formalinban való 24 órás fixálását követően paraffinba kerültek beágyazásra. A rutin szövettani vizsgálatok elemzése konvencionális fénymikroszkóppal (Olympus BX50 mikroszkóp Olympus DP70 kamerával felszerelve; Olympus Corporation, Tokió, Japán) történt 3-5 µm vastag metszeteken, hematoxilin-eozin (HE) festést követően. A vizsgáló patológus a minták jelzését nem ismerte. Az izomkárosodás szemikvantitatív kiértékelésére McCormack és munkatársainak „Fourfold divided frame counting” módszerét alkalmaztuk: [213] az izom teljes keresztmetszetéről 200x-os nagyítással 15 db fénykép készült, mely lefedte az izom teljes területét. Ezek után minden egyes fényképet 4 egyenlő részre osztottunk, majd a negyedeket sorba rendeztük. Random generátorral meghatároztuk a negyedek vizsgálati sorrendjét. Egy vizsgált negyedben minden izomrost beosztásra került sérült, vagy nem sérült csoportba. Sérültnek tekintettünk egy rostot, ha körvonala egyenetlen volt, vagy megszakadt, szerkezete, vagy színe inkonzisztens volt, intracellulárisan vacuolák voltak jelen, és/vagy a magok elkülönültek a rosttól. Mindegyik állatból összesen 300 izomrostot értékeltünk, hogy a megfelelő abszolút hibaszázalékot elérjük.

##### *4.2.2.2. Elektronmikroszkópia*

A jobb oldali végtagokat intraarteriális katéteren keresztül először meleg (37 °C-os) 4%-os paraformaldehid oldattal töltöttük fel, majd ezt hideg 2%-os glutár-aldehid oldat infúziója követte összesen 30 percen keresztül. A tibialis anterior izomból ezek után 1x1 mm-es szakaszok kerültek eltávolításra, melyeket 2%-os glutár-aldehid oldatban további 1 órán keresztül fixáltuk, ezt 1 %-os ozmium-tetroxid oldatban történő további fixálás követte (1 óra). A mintákat - növekvő alkohol sorban történő dehidrációját követően - aralditba (Durcupan ACM Fluka, Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) ágyasztuk. Ultramikrotóm segítségével ultravékony szeletek készültek, melyeket uranil-acetáttal és vezércitráttal kontrasztoltuk, majd Hitachi H7500 transzmissziós elektronmikroszkóp (Hitachi Ltd, Tokió, Japán) segítségével vizsgáltuk. Az elektron mikroszkópos képeket Olympus-SIS digitális kamera (Megaview II) segítségével készítettük.

A félvékony metszeteket toluidin-kékkel festve fénymikroszkóposan vizsgáltuk Zeiss Axiophot mikroszkóppal, mely AxioCam HRc digitális kamerával (Carl Zeiss, Oberkochen, Németország) volt felszerelve.

#### 4.2.2.3. Nedvességtartalom meghatározás - Wet/dry arány

Az izomszövet nedvességtartalma a jobb oldali alsóvégtag megmaradt izomtömegéből került meghatározásra. Az izmok tömegét a kivételt követően azonnal meghatároztuk (nedves tömeg), majd az izmokat +80°C-os környezetbe helyeztük 3 napig száradni, amíg egy állandó súlyt el nem értek (száraz tömeg). Ezt követően a kiszáradt izmok tömege újra meghatározásra került. A következő képlet segítségével a mért tömegekből az izom nedvességtartalma meghatározható, melyet százalékban adunk meg:  $(\text{nedves tömeg} - \text{száraz tömeg}) / \text{nedves tömeg} * 100$ .

#### 4.2.3. Izomrost életképesség (NBT - morfometria)

Az bal oldali m. tibialis anteriorból vett izommintákból 3 µm vastag fagyasztott metszetek készültek, melyeken NADH-tetrazólium reduktáz (NADH-TR) enzimhisztokémiai reakciót alkalmaztunk. A festődési különbségek minimalizálása végett az összes minta feldolgozása azonos napon történt. A festés során a metszeteket azonos időben, frissen készített aliquot oldatban inkubáltuk. Az életképesség kvantitatív meghatározása morfometriás szoftverrel történt (Leica QWin Pro, Leica Microsystems). Tíz véletlenszerűen választott látótér került kifényképezésre metszetenként 600x-os nagyítással. A mérések során alkalmazott szintartomány meghatározása két, a szoftvert rendszeresen használó patológus által történt a fiziológiás kontroll állatok metszetei alapján (R; G; B: 150; 105; 175 – 0; 0; 66). Az elemzés során a szoftver által meghatározásra került a szintartományban található pixelek (tehát a keletkezett, mitokondrium specifikus festődés kiterjedése) száma, melyet a képen található izomrostok összterületéhez arányítottunk. Az összes rost életképességének (össz-életképesség) meghatározásán kívül elvégeztük az I-es (lassabb összehúzódásra képes, oxidatív) és a IIb (gyorsan összehúzódó, glikolitikus) típusú izomrostok életképességének szelektív meghatározását is. Az egyes egyedekhez tartozó eredmények átlagolásra kerültek. A végső eredményt kezeletlen kontroll állatok értékeihez viszonyítva adtuk meg százalékban.

#### **4.2.4. Laboratóriumi vizsgálatok**

A jobb kamrai punkcióból nyert vér 10 perces, szobahőmérsékleten történő centrifugálását (3000 rpm) követően, a felülúszót folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd a további analízisek elvégzéséig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A mérések a mintavételt követő 24 órán belül spektrofotometrián alapuló, klinikai laboratóriumi automatán (Beckman Coulter AU480/2011, Beckman Coulter Inc, Brea, CA, Amerikai Egyesült Államok), rutin tesztek felhasználásával történtek. A szérum CK, LDH, valamint a transzamináz (ALAT, ASAT) szintek különböző időpontokban kerültek meghatározásra. .

#### **4.2.5. Redox-státusz**

A szabadgyök szint vizsgálatát szérum mintákból végeztük, Heide-Bögl-féle luminometriás módszerrel (Blázovics-féle módosítás). [214] A felhasznált reakcióelegy hidrogénperoxidot, luminolt és mikroperoxidázt (SIGMA, St. Louis) tartalmaz. A mérés elméleti alapja, hogy a meghatározás során a luminol szabadgyökök hatására gerjesztett állapotba kerül és fényt bocsát ki, amely luminométerrel (Lumat LB9051; Lumat Bertold, Windbad, Germany) detektálható. A fényintenzitást a szövetben fellelhető gyökfogó vegyületek csökkentik. Az eredmények Relative Light Unit (RLU) egységben kifejezve kerülnek megadásra. Ezek alapján a fényintenzitás (RLU) arányos a mintában található szabadgyökök koncentrációjával. Az antioxidánsok kimutatása nmol nagyságrendben történik.

#### **4.2.6. Molekuláris vizsgálatok (ELISA)**

A szérum TNF- $\alpha$  és IL-6 szinteket szendvics ELISA módszerrel mértük kereskedelmi forgalomban elérhető kitek segítségével (TNF- $\alpha$  immunoassay kit, R&D Systems, Minneapolis, USA; Quantikine® Rat IL-6 Immunoassay kit, R&D Systems, Minneapolis USA). Az abszorbanciát 450 nm-en határoztuk meg (háttérméréssel 540 nm-en) spektrofotométer segítségével.

#### **4.2.7. Távoli szervek károsodásaink vizsgálatai**

##### **4.2.7.1. Vese**

A vese mikrocirkulációja a bal vese áramlási viszonyainak mérésélezer Doppler áramlásmérővel került regisztrálásra a kísérlet alatt (technikai részletek lásd 4.2.1.2. fejezet).

A kísérlet végeztével azonos anatómiai lokalizációból (bal vese) történt vese szöveti mintavétel, melyek 24 órás 4 %-os formalinos fixálását, paraffinba ágyazásuk követte. A *szövetteni vizsgálatok* konvencionális fénymikroszkóp segítségével történtek, 3-5 µm vastag metszeteken, HE festést követően. A metszetek fénymikroszkópos kiértékelése (60x-os nagyítás) során a tubuláris, intersticiális károsodás jellemzőinek értékelése egy szövettani pontrendszer segítségével történt [215], a tubulussejt necrosis és a csapadékképződés alapján: 0: nincs károsodás; 1: ≤10%; 2: 10-25%; 3: 25-45%; 4: 45-75%; 5: >75%.

A vese szövetének *myoglobin* detekciójára a mintákat nyúlban termeltetett poliklonális humán anti-myoglobin antitesttel (1:50, Diagnostic BioSystems) 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. A létrejött antigén-antitest reakció kimutatására peroxidáz konjugált szekunder antitestet használtunk (Dako). Kromogénként 3-diaminobenzidint (DAB) alkalmaztunk, majd háttérfestést Gill-féle hematoxilinnal végeztünk. A reakció értékelését fénymikroszkóp (200x és 600x nagyításon, Olympus BX mikroszkóp) segítségével végeztük. Az antitest ellenőrzésére pozitív kontrollként az izomszövetet használtuk fel.

A vese *peroxinitrit* szintjének mérése a minták 1.0 M-os NaOH (60:1) mosását követően spektrofotometriás mérés (302nm) segítségével történt. Kontrollként a mintákhoz 100 mM kálium-foszfátot (pH: 7,4) (60:1) adtunk. Az abszorbancia csökkenés mértéke semleges pH értéken került meghatározásra. [216]

A *vese funkció* megítélésére laboratóriumi tesztek végeztünk. Az állatokból vett vérmintákból tíz perces szobahőmérsékleten végzett centrifugálást követően a szérum elválasztásra került. Kémiai analízisek elvégzéséig a minták -80°C-on tároltuk. 24 órán belül, 2,5-szeres hígítás után laboratóriumi automatán (Hitachi 747 Autoanalyzer, Tokyo, Japán) rutin tesztek felhasználásával történtek a mérések. Na<sup>+</sup>-, kreatinin-, karbamid- (BUN: blood urea nitrogen), szintek meghatározásával számítottuk a következő funkciós paraméterek: karbamid/kreatinin hányados, frakcionált Na<sup>+</sup> exkréció:  $(FENa = U_{Na^+} \times P_{kreat.} \times 100 / U_{kreat.} \times P_{Na^+})$ , veseelégtelenségi index  $(RFI = ([Na^+]_{vizelet}] * [kreatinin]_{szérum}) / [kreatinin]_{vizelet})$ .

A *HSP-72* szöveti meghatározását Western-blot technikával végeztük vese homogenizátumból. A sávok vizualizálása megnövelt kemilumineszcenciával történt, majd az eredmények detektálására és számszerűsítésére az ImageJ szoftver használatával (NIH, Bethesda, MD, USA) került sor.

#### 4.2.7.2. Tüdő

Minden állatból a jobb tüdő felső lebenye került eltávolításra, melyeket 4 %-os formalinban fixáltuk 24 órán át, majd paraffinba ágyasztuk. A *szövetani vizsgálatokat* konvencionális fénymikroszkópos elemzéssel (Olympus BX microscope; Olympus Micro Bright Field, Williston, VT) végeztük, 3-5  $\mu\text{m}$  vastag metszeteken HE festést követően. A metszetek kiértékeléséhez egy, az irodalomban alkalmazott tüdő hisztopatológiai pontrendszert [217] vettük alapul, amely az alábbiak meglétét, vagy hiányát veszi figyelembe: (1) alveoláris ödéma, (2) atelektázia, (3) bevézés, (4) gyulladásszerű sejtes infiltráció, (5) vaszkuláris pangás. Mindegyik jellemzőt pontszámmal értékeltük (0: normális, 1: enyhe, 2: közepes, 3: jelentős). A tüdőkárosodás kategorizálása a pontszámok összesítése szerint történt (0-3: normális, minimális; 4-7: enyhe; 8-10: közepes; 11-15: jelentős).

A tüdőszövet *nedvességtartalmát* az izomszövetnél leírt módon (lásd 4.2.2.3. fejezet) határoztuk meg.

A tüdő szöveti *mieloperoxidáz aktivitását* homogenizátumból mértük módosított mieloperoxidáz assay segítségével [218]. A mérés magában foglalja a tetrametil-benzidin hidrogén-peroxid függő oxidációját, amely spektrofotometriával detektálható 450nm-en (UV-1601; Shimadzu, Japan).

A HSP-72 szöveti meghatározását Western-blot technikával végeztük (ld. 4.2.7.2. Vese)

A tüdő funkcionális állapotának megítélésére artériás vérgáz analízist végeztünk. A reperfüzió kezdetén, a második és negyedik órában a bal a. carotis communisból artériás vérmintát vettünk. A mintákat Radiometer ABL80 (Radiometer Medical ApS Åkandevvej 21 DK-2700 Brønshøj Denmark) Astrup gépen vizsgáltuk meg. A  $p\text{O}_2$ ,  $p\text{CO}_2$  értékek kerültek mérésre.

#### 4.2.7.3. Vékonybél

A kísérlet alatt az *a. mesenterica superior véráramlása* folyamatosan regisztrálásra került (T206 Flowmeter; Transonic). Az egyes bélszakaszok mikrocirkulációját lézer Doppler áramlásmérő segítségével regisztráltuk, mely során a duodenum, jejunum és az ileum azonos anatómiai lokalizációban, az antimesenterialis oldalon hosszanti metszés segítségével feltárással került, az eszköz merőfejének mucosa felszínén történő rögzítése céljából.

A kísérlet végeztével minden állatból bél (duodenum, jejunum, ileum) mintavétel történt. Az eltávolított bélszakaszokat 4 %-os formalinban fixáltuk 24 órán át, majd paraffinba ágyasztuk. A *szöveti vizsgálatokat* konvencionális fénymikroszkópos elemzéssel (Olympus BX microscope; Olympus Micro Bright Field, Williston, VT) végeztük, 3 µm vastag metszeteken, hematoxin-eozin (HE) festést követően. A metszetek kiértékeléséhez az irodalomban alkalmazott Chiu-score pontrendszert [219] vettük alapul, mely a szöveti károsodás mértékét egy 1-5 terjedő skálán értékeli.

### **4.3. Vizsgált paraméterek - Máj ischaemia-reperfúziós károsodások vizsgálata**

#### **4.3.1. Hemodinamikai vizsgálatok**

##### *4.3.1.1. Artériás középnyomás meghatározása*

Az állatok artériás vérnyomását a 4.2.1.1 szerint metodikával regisztráltuk.

##### *4.3.1.2. Szöveti mikrocirkuláció*

A májszöveti mikrocirkuláció detektálása lézer Doppler áramlás mérő segítségével történt, azonos anatómiai lokalizációban (V. májlebeny) rögzítve. A technikai részletek és az eredmények kiértékelése megegyezik az alsó végtagi vizsgálatoknál (4.2.1.2. fejezet) leírtakkal.

#### **4.3.2. Hisztológiai vizsgálatok**

A kvalitatív szöveti kiértékelés a reperfúzió végeztével történt mintavételezés eredményeként született HE festett metszetek alapján zajlott. A vizsgáló patológus a minták jelzését nem ismerte, a csoportbeosztás, illetve a beavatkozás módja és ideje tekintetében nem volt tájékozott. A metszet teljes átvizsgálására minden esetben sor került. Az értékelés a máj ischaemiás-reperfúziós károsodásának részjelenségeként ismert eltérések figyelembevételével történt. Kiemelt fontosságú jelek: (1) sejtduzzadás, (2) sinusoidális pangás, (3) vénatágulat, (4) szöveti bevérzés, (5) gyulladós sejtek jelenléte, (6) necrosis jelei: vacuolizáció, karyolysis, karyorrhexis, eosinophilia, (7) apoptosis jelei: sejtsugorodás, a kromatin marginizációja, kondenzációja, fragmentációja, „apoptotic body”-k megjelenése. Egyes vizsgálati csoportok esetén (PerC vizsgálata) a metszetek



szemikvantitatív értékeléséhez a Suzuki pontrendszert használtuk. A mintákon a szinuszoidális pangás, hepatocytá necrosis, illetve hepatocytá degeneráció jelenlétét értékeltük 0-4-ig terjedő skálán. Ezen összetett pontrendszer egyszerűsítésére egy úgynevezett totál-score (az előbb említett paraméterek eredményeinek összege) került bevezetésre. Így minden állat esetében maximálisan 12 pont volt adható.

A necrosis kiterjedésének meghatározása morfometriás elemzés segítségével történt. A HE festett metszetek szkennelését követően (Panoramic 250 Flash whole-slide scanner system, 3DHISTECH, Budapest, Magyarország) a necrosis kvantifikálása automata kép analizáló program segítségével történt (Fraunhofer Mevis Institute, Bremen, Germany). [220] A necrotikus területek aránya százalékban került kifejezésre a következő képlet alapján:  $necrosis\% = \frac{necrotikus\ terület}{[necrotikus\ terület + életképes\ terület]} * 100$

A lipid degeneráció további verifikálása Sudan IV-gyel festett, fagyasztott májmintákon történt hematoxilines háttérfestés mellett. A metszeteket fénymikroszkóp alatt elemezve, szemikvantitatív módon értékeltük.

A DNS-fragmentáció detektálására a TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) reakciót használtuk, melyet kereskedelmi forgalomban lévő kit-tel végeztünk (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) a gyártó protokollját követve. A szöveti struktúra megjelenítésére hematoxilines háttérfestést alkalmaztunk. A metszeteket fénymikroszkóppal értékeltük, mely során részben a demarkált területek arányát határoztuk meg egy adott metszetben, részben pedig 100x-os nagyításon tíz, egymást nem átfedő látótérben 1000 sejtet számoltunk meg, a TUNEL pozitív sejtek számát az összes sejt ezrelékében fejezve ki.

A PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymerase) enzim aktivitását a termék poly(ADP-Ribose) (PAR) molekulák kimutatásán keresztül végeztük az irodalomban közölt módszer alapján. A formalinban fixált májszövetet paraffinba ágyasztuk és 4 µm vastag metszeteket készítettünk. A deparaffinált metszeteket 0,6% hidrogénperoxiddal kezeltük, hogy az endogén peroxidáz aktivitást gátoljuk, majd 0,2 M-os citrát pufferben (pH 3,0) végeztünk antigén feltárást melegítés segítségével. Ezt követően 1,5%-os ló szérummal blokkolt mintákat 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd 1:1000 titerben poliklonális egér PAR-ellenes antitesttel (Calbiochem) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on, majd biotinizált ló anti-egér szekunder antitesttel (1:200) és avidin-biotin-peroxidáz komplexszel (Vector ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) végeztünk kezelést. A peroxidáz

aktivitást DAB (3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride) kromogénnel detektáltuk, majd hematoxilines háttérfestést alkalmaztunk. A metszetek értékelése fénymikroszkóp segítségével történt. A TUNEL aktivitás vizsgálatához hasonlóan számszerűsítettük az összefüggő PAR-pozitivitást mutató területek arányát, majd 1000 különálló sejtet megszámlálva, a környező területek PAR pozitivitását fejeztük ki százalék formájában.

Az apoptózis kimutatására formalinban fixált májszövetet paraffinba ágyaztuk és 4  $\mu\text{m}$  vastag metszeteket készítettünk, majd a deparaffinált metszeteket 0,6% hidrogénperoxiddal kezeltük. Az apoptózis kimutatására a metszeteket aktív caspase-3 (Chemicon International Inc., Temecula, CA, Amerikai Egyesült Államok) ellenes antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át, 4°C-on. PBS-sel való bőséges mosást követően, a metszeteket biotinizált szekunder antitesttel kezeltük. Az immunreakciót avidin-biotin-peroxidáz komplex és diaminobenzidin segítségével tettük láthatóvá.

#### **4.3.3. Életképesség vizsgálat (NBT morфомetria)**

A májsejtek életképességét (mitokondriális funkciót) a 4.2.3. fejezetben leírt enzimhisztokémiai módszer és morфомetriai elemzés alapján történt.

#### **4.3.4. Laboratóriumi vizsgálatok**

A fagyasztott szérummintákból az alanin-aminotranszferáz (ALAT), aszpartát-aminotranszferáz (ASAT) szintek meghatározása laboratóriumi automata segítségével a 4.2.4. fejezetben leírtaknak megfelelően történt.

#### **4.3.5 Redox-státusz**

Az antioxidáns státusz vizsgálata májhomogenizátumból, illetve szérumból történt. Luminometriás össz-scavenger kapacitás meghatározása Heide-Bögl módszerének Blázovics féle módosítással történt az alsóvégtagi vizsgálatoknál leírtaknak megfelelően (4.2.5. fejezet). A redukálóképesség vizsgálata Oyaizu [221] módszere szerint történt, mely a szérumból és a szövet teljes antioxidáns képességéről informál. 200  $\mu\text{l}$  minta bidesztillált vízzel 1 ml-re történő kiegészítése, és 2,5 ml pH 6,6 foszfátpufferrel (0,2M), illetve 2,5 ml 1 %-os  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -oldattal való elegyítése után 20 perces inkubáció zajlott 50 °C-on. A 2,5 ml 10 %-os triklórecetsav-oldat hozzáadása után a reakcióelegy 10 perces centrifugálása történt 2500 rpm-mel. A felülúszó 2,5 ml-ét 2,5 ml bidesztillált vízzel összekeverve, majd 0,5 ml 0,1 %-os  $\text{FeCl}_3$ -oldatot hozzáadva, a minta által emittált fény színintenzitása 700 nm-en mérhető, és arányos a minta redukálóképességével. A továbbiakban a redukálóképesség a

referencia vegyület, az aszkorbinsav redukáló képességének függvényében kerül megadásra (ASE= aszkorbinsav ekvivalens). A kapott eredmény a fehérjéhez (SH-csoport) és a nem fehérjéhez kötött proton donor ( $H^+$ -donor) szummációjának tekinthető, ezért a szerkezet össz antioxidáns státuszáról jól tájékoztat. A redukálóképesség értéke arányos a minta antioxidáns tartalmával.

Szabad szulfhidril (SH) csoportok meghatározása a fehérjékhez kötött antioxidáns paramétereiről informál. A mérések spektrofotométeren Ellman-reagens felhasználásával (5,5-ditiobisz-nitrobenzoesav, SERVA) pH 7,4 Na-foszfát pufferben, 512 nm-en történtek, Sedlak módszere szerint [222]

$H^+$ -donor kapacitás meghatározása során a fehérjék metanol (MERCK, Darmstadt) hozzáadásával kicsapódnak, így ezek antioxidáns tulajdonsága megszűnik. A módszer ennek következtében a fehérjéhez nem kötött antioxidáns kapacitás mértékéről informál. A méréseket Blois és Hatano módszere [214, 223, 224] szerint, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil stabil gyök jelenlétében végeztük. Az aktivitás mérésének alapját az 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) gyök 517 nm-en történő detektálása képezi. A DPPH viszonylagos stabilitása révén megbízhatóan fotometrálnak molekulagyök, melynek abszorbancia maximuma 517 nm-nél mérhető. Az eredményt gátlás %-ban került megadásra. Gátlás % =  $[Abs(kontroll) - Abs(minta)] / Abs(kontroll) \times 100$

#### **4.3.6. Molekuláris vizsgálatok (ELISA)**

A szérum TNF- $\alpha$  szintjét szendvics ELISA módszerrel mértük kereskedelmi forgalomban elérhető kit segítségével (TNF- $\alpha$  immunoassay kit, R&D Systems, Minneapolis, USA) Az abszorbanciát 450 nm-en határoztuk meg (háttérrel 540 nm-en) spektrofotométer segítségével.

A máj szöveti HSP-72 meghatározását Western-blot technikával végeztük. A sávok vizualizálása megnövelt kemilumineszcenciával történt, majd az eredmények detektálására és számszerűsítésére az ImageJ szoftver használatával (NIH, Bethesda, MD, USA) került sor.

#### **4.4. Statisztikai analízis**

Az egyes eredmények kiértékelése során alkalmazott statisztikai próbák pontos megnevezése a tanulmány alapját képező, hivatkozott tudományos közleményekben

megtalálható. A statisztikai vizsgálatokat IBM SPSS Statistics 20.0 szoftver (IBM Corporation, Armonk, NY, Amerikai Egyesült Államok) segítségével végeztük. A táblázatban a mérések eredményét a mért értékek átlagával és a standard deviáció ( $\pm$ SD) megadásával fejeztük ki. Az átlagértékek közötti különbségeket  $p < 0,05$  konfidencia intervallum esetén értékeltük szignifikáns különbségként. Az adatok grafikus megjelenítését Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, Amerikai Egyesült Államok).

## 5. Eredmények

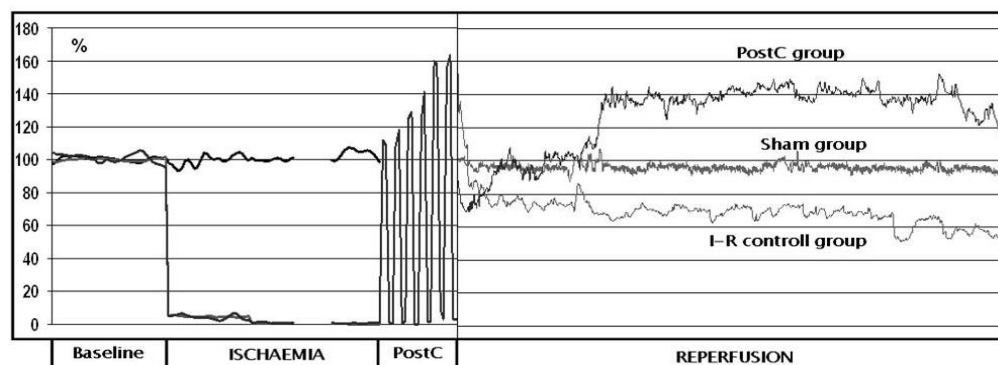
Ebben a fejezetben a tisztább átláthatóság érdekében az eredményeket kísérletenként mutatja be a szerző - alcímben utalva a csoportbeosztás táblázataiban is feltüntetett adatokra.

### 5.1. Rövididejű végtagi ischaemia vizsgálata és mérséklése PostC segítségével

- 3 óra ischaemia és 4-, 24-, valamint 72 óra reperfúzió vizsgálata, poszt kondicionálással -

#### 5.1.1. Végtagi mikrocirkuláció vizsgálata

A végtagi mikrocirkuláció mérés technikai okokból valamennyi vizsgálati csoport esetén a reperfúzió első órájában került kiértékelésre. A görbéket elemezve látható, hogy jelentős különbség adódott a PostC és az IR-kontroll csoport között: a reperfúzió első fél órájában látott kezdeti ingadozások után az IR-kontroll csoportban hypoperfúzió alakult ki, a PostC csoportban pedig a végtag keringése hyperaemiás áramlással normalizálódott. A plató maximumokat (PM) és a reperfúziós területet (RT) alapul véve elmondható, hogy a PostC csoportban a m. biceps femoris mikrocirkulációja a reperfúzió végén szignifikánsan magasabb szintet ért el a nem kezelt IR csoporthoz képest (PM: 123,3 % vs. 62,7%, RT: 113,6% vs. 56,1%,  $p < 0.05$ ). (15. ábra)

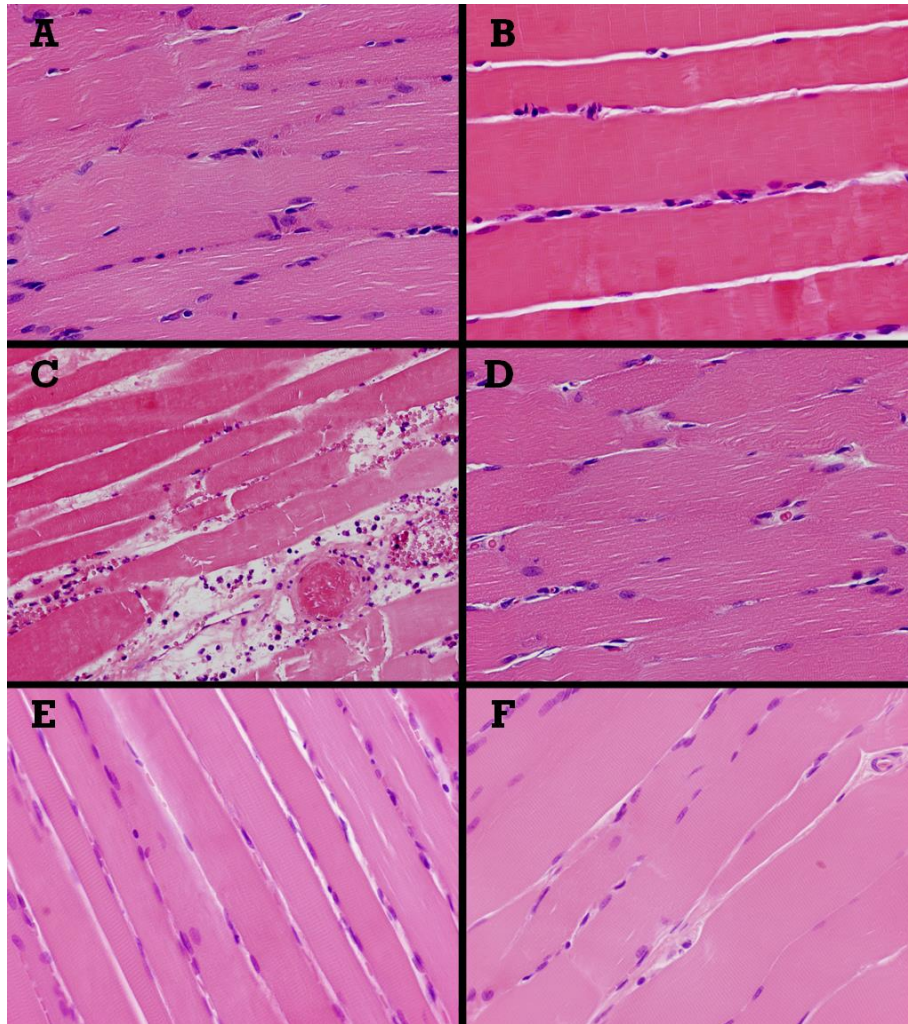


15. ábra Alsó végtagi vázizomzat mikrocirkulációja 3 óra ischaemia és 1 óra reperfúzió alatt, kép forrása: „Postconditioning of the Lower Limb-Protection Against the Reperfusion Syndrome” c. közleményünkből.

#### 5.1.2. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata

Három óra ischaemián és 4 óra reperfúzió átesett állatokban az alsó végtagi izomszöveti metszeteken morfológiai elváltozás nem volt jellemző. A harántcsíkolt és magfestés többnyire megtartott volt, szöveti ödéma nem volt kimutatható. Az IR-kontroll csoportban elvéve kezdődő rhabdomyolysisre jellemző morfológiai kép (hullámossá vált

rosthatar, induló intracelluláris dezorganizáció) ugyan megfigyelhető volt, de érdemleges elváltozásról az áloperált állatok metszeteihez képest nem beszélhetünk egyik vizsgálati csoportban sem. 24 órát követően súlyos szöveti gyulladás bontakozott ki az IR csoport szövettani metszetein, jelentős leukocyta infiltrációval és ödéma képződéssel, míg a PostC csoportban szignifikánsan kedvezőbb szöveti kép volt megfigyelhető. 72 óra reperfúziót követően a gyulladásos reakció lezajlott, patológiai eltérés egyik csoportban sem volt látható (16.ábra).



16. ábra Izomszövet szövettani képei a reperfúzió 4. (A), 24. (C) és 72. (E) órájában, ugyanezen reperfúziós idők posztkondicionálás mellett (B, D, F)

### 5.1.3. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata

A szérum szövetelhalást jelző paraméterei tekintetében (ASAT, LDH, CK) szignifikáns növekedés volt tapasztalható mindkét ischaemia-reperfúzió átesett csoport esetében az áloperált állatok értékeihez képest. A PostC ugyan képes volt mérsékelni ezen

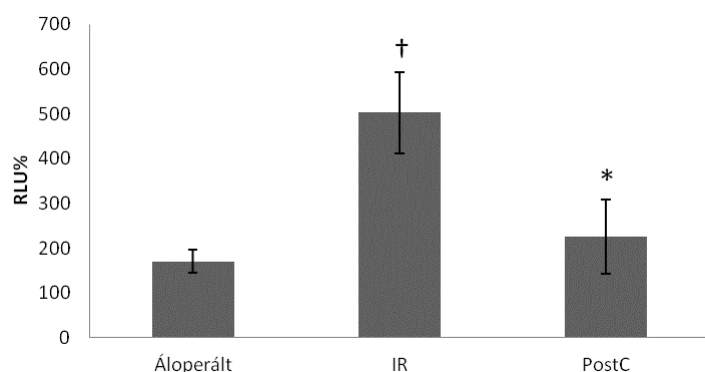
változásokat, de szignifikáns különbség nem mutatkozott a PostC és az IR-kontroll csoport között (5. táblázat).

5. táblázat Laboratóriumi paraméterek változása.

	Reperfúzió (óra)	Áloperált	IR-kontroll	PostC
ASAT [U/L]	4	152,8±29,1	202,2±73,9*	167,0±81
	24	104,5±51,6	267,2±110,6*	235,0±150,8*
	72	56,3±6,6	71,8±37,5	59,1 ±19,0
LDH [U/L]	4	255,0±52,8	1133,7±351,5*	916,1 ±383,6*
	24	272,0±73,2	576,8±117,9*	520,3 ±197,9*
	72	280,6±142,3	237,6±82,3	243,0±73,1
CK [U/L]	4	255,3±46,1	723,6±227,7*	838,5±216,0*
	24	339,0±63,2	406,6 ±236,3	285,7 ±116,8
	72	214,0±83,1	375,1±171,9	356,0±32,2

\* P<0,05 versus áloperált csoport.

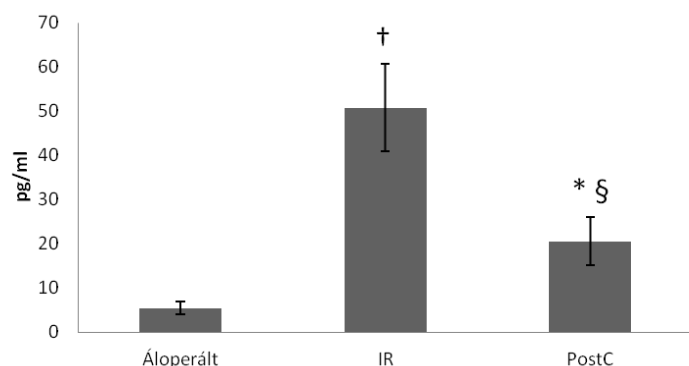
#### 5.1.4. Szabadgyök szint - luminometriás vizsgálatok



17. ábra: Szabadgyök koncentráció, † p<0,05 versus áloperált; \*p<0,05 versus IR-kontroll

Mind az IR-kontroll, mind a PostC csoportban megemelkedett a szabadgyökök szérumszintje. A változás azonban a PostC csoportban szignifikánsan kisebb mértékűnek mutatkozott az IR-kontroll csoporthoz képest (17. ábra).

#### 5.1.5. Szérumszint meghatározás



18. ábra TNF- $\alpha$  szint változása. † p<0,05 versus áloperált; \*p<0,05 versus IR-kontroll; § p<0,05 versus áloperált.

Az áloperált csoporthoz képest szignifikánsan a TNF- $\alpha$  szintek mindkét csoportban emelkedtek voltak. Az IR-kontroll csoporthoz viszonyítva azonban a PostC csoportban szignifikáns csökkenés volt tapasztalható (p<0,05) (18. ábra).

### 5.1.6. Szérum IL-6 szint meghatározás

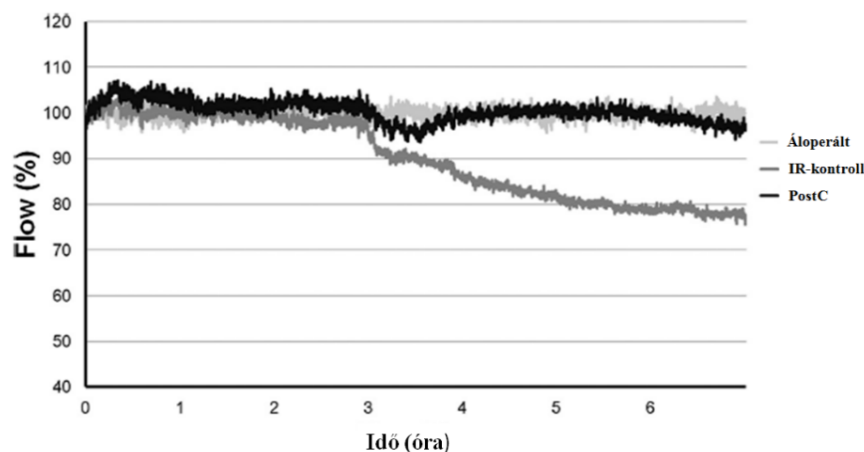
A szérum IL-6 koncentráció szignifikánsan megemelkedett az IR-kontroll (305,2±29,5pg/ml) és a PostC (304±14,5pg/ml) csoportokban az áloperált (187±10,2pg/ml) csoporthoz viszonyítva. Nem mutatható ki azonban szignifikáns különbség a PostC csoport és az IR-kontroll csoport IL-6 értékei között.

## 5.2. Rövididejű végtagi ischaemia veseszövődményeinek vizsgálata PostC segítségével

- 3 óra ischaemia és 4-, 24-, 72 óra reperfúzió poszt kondicionálással -

### 5.2.1. Vese mikrocirkuláció vizsgálata

A vese mikrocirkulációja az infrarenális aorta kirekesztést követően a kiindulási értéken maradt. A végtagi revaszkularizáció során a vese áramlása jelentős mértékben lecsökkent, ugyanakkor, míg a PostC csoportban rövid időn belül normalizálódott, addig az IR-kontroll csoportban tovább romlott a mérési periódus végéig (19. ábra). A számolt paraméterek alapján a vese kéreg perfúziója szignifikánsan jobbnak mutatkozott a PostC csoportban az IR-kontroll csoporthoz képest (RT: PostC: 99,01±2,76% versus IR-kontroll: 82,31±12,23%; p = 0,024, PM: PostC: 96,81±6,14% versus IR-kontroll: 77,21±14,81%; p = 0,037).



19. ábra A vese kéreg mikrocirkulációja az alsó végtagi kirekesztés (3 óra) illetve a reperfúzió első 4 órájának során

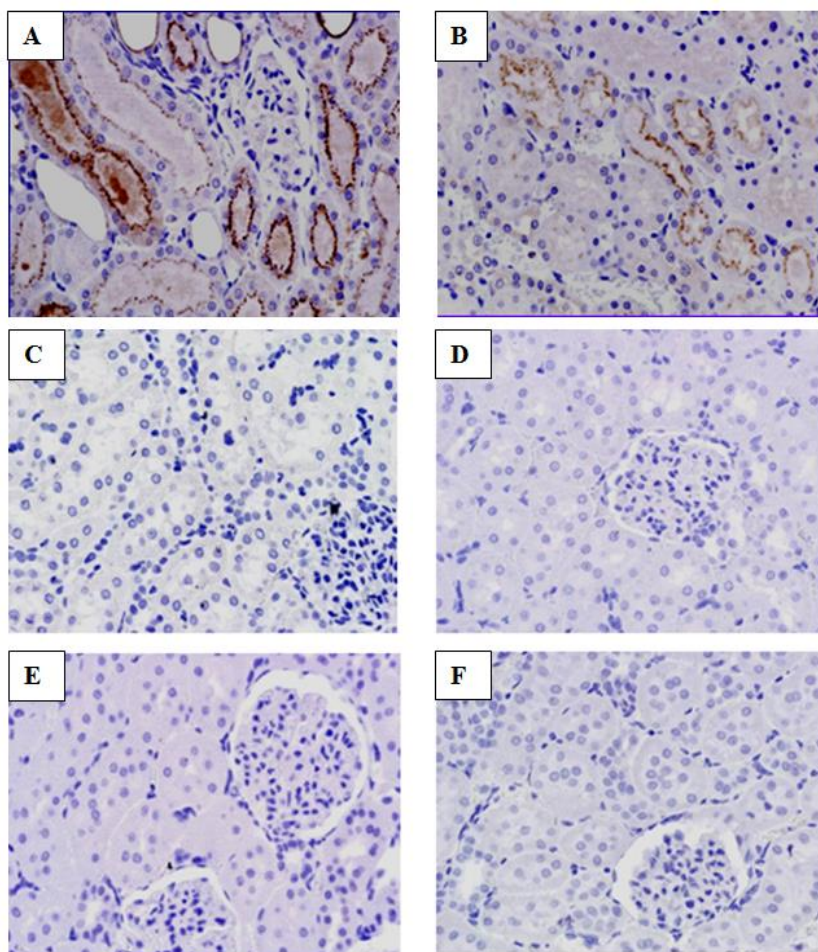


### 5.2.2. Vese fénymikroszkópos vizsgálata

A 4 órás IR-kontroll állatok veseszöveti metszetei egy közepesen súlyos tubuláris károsodásnak megfelelő képet mutattak. A tubulusok lumenét feltehetőleg a filtrálódott nephrotoxinokból összeállt hialincilinderek töltötték ki. A tubulussejtek duzzadtak, bennük finom vakuolizáltság, hydropicus degeneráció mutatkozott. Ugyanakkor sejtelhalás, sejtleválás a bazális membránról nem látszott. A glomerulusokban pangás volt tapasztalható. Mindezen jellemzőket figyelembe véve kedvezőbb szöveti képet kaptunk PostC csoportban: bár itt is sok volt a hialincilinder, de azok nem zárták el teljesen a lument. A 24-, 72 órát túlélő állatok veseszöveti képeit megvizsgálva a folyamatok legalábbis morfológiailag javuló tendenciát mutattak mindkét csoport tekintetében.

### 5.2.3. Anti-myoglobin immunhisztokémiai vizsgálat

Az antimyoglobin immun- hisztokémiai vizsgálatok alapján a reperfüzió 4. órájában a myoglobin megjelent a tubulusok lumenében, illetve a sejtek apikális oldalán az endofagolizoszómákban. Az IR-kontroll csoportban nagyobb mennyiségben voltak jelen a



pozitív festődést mutató fehérjék a PostC csoporthoz képest. A 24 illetve a 72 órát túlélő állatokban az immunfestés eredménye már negatívnak mutatkozott, feltehetően a lebomlott myoglobin epitópok következtében (20. ábra).

20. ábra Anti-myoglobin immunhisztokémia (60x): A.) 4 óra reperfüzió IR- kontroll csoport; B.) 4 óra reperfüzió PostC csoport; C.) 24 óra reperfüzió IR- kontroll csoport; D.) 24 óra reperfüzió PostC csoport; E.) 72 óra reperfüzió IR- kontroll csoport; F.) 72 óra reperfüzió PostC csoport.

#### 5.2.4. Lipid peroxidáció

Négy óra reperfúziót követően a vese homogenizátumban detektált konjugált dién tartalom mind az IR-kontroll, mind a PostC csoportban szignifikánsan megemelkedett az áloperált csoporthoz képest. A konjugált dién koncentráció szignifikánsan magasabbnak mutatkozott az IR-kontroll csoportban a PostC csoporthoz képest (IR-kontroll:  $0,17 \pm 0,04$ , PostC:  $0,14 \pm 0,01$ ;  $p = 0,032$ ).

#### 5.2.5. Vese funkció meghatározása

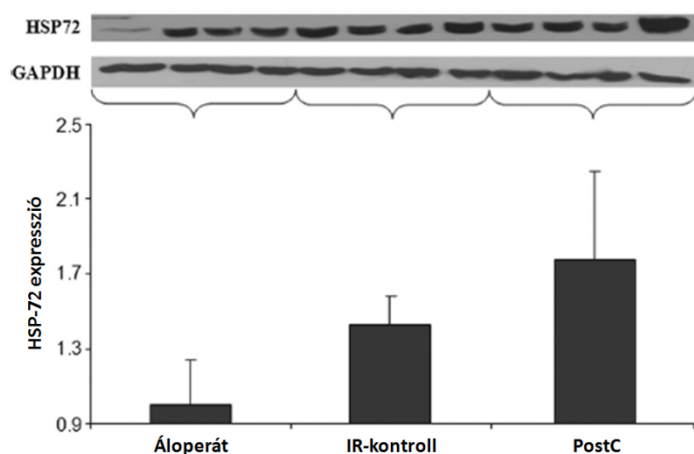
Valamennyi végtagi ischaemia-reperfúzió átesett állatban kialakult kisebb-nagyobb fokú akut vese károsodás.

A reperfúzió 4. órájának végére a karbamid/kreatinin arány, valamint a frakcionált  $\text{Na}^+$  exkréció egyaránt tubuláris típusú veseelégtelenséget jelzett az IR-kontroll csoportban, míg a PostC csoportban kedvezőbb funkcionális paraméterek voltak jellemzők. A számított veseelégtelenségi index (RFI) alapján tartós vese funkció romlás volt feltételezhető az IR-kontroll csoportban, szemben a PostC csoporttal, ahol szignifikánsan kedvezőbb értékek mutatkoztak (6. táblázat).

6. táblázat A vese funkciót jellemző laboratóriumi és számolt paraméterek.

		4 óra reperfúzió	24 óra reperfúzió	72 óra reperfúzió
<b>Kreatinin (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	Áloperált	$67,35 \pm 16,27$	$20,40 \pm 7,50$	$20,35 \pm 4,74$
	IR-kontroll	$219,09 \pm 81$	$92,39,22 \pm 3,32$	$38,07 \pm 2,07$
	PostC	$96,25 \pm 28,07\ddagger$	$26,43 \pm 6,88\ddagger$	$31,10 \pm 6,79$
<b>Karbamid (mmol/l)</b>	Áloperált	$6,31 \pm 0,71$	$5,36 \pm 0,49$	$5,09 \pm 0,13$
	IR-kontroll	$8,03 \pm 0,90$	$6,15 \pm 0,29$	$6,30 \pm 0,64$
	PostC	$6,38 \pm 0,50\ddagger$	$5,55 \pm 0,07$	$5,32 \pm 0,29\ddagger$
<b>Karbamid/Kreatinin</b>	Áloperált	$0,1 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,08$	$0,25 \pm 0,06$
	IR-kontroll	$0,04 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,03$	$0,13 \pm 0,03$
	PostC	$0,07 \pm 0,02\ddagger$	$0,26 \pm 0,05\ddagger$	$0,2 \pm 0,04$
<b>FENa (%)</b>	Áloperált	$0,24 \pm 0,26$	$0,34 \pm 0,09$	$0,87 \pm 0,12$
	IR-kontroll	$2,19 \pm 1,31$	$0,94 \pm 0,29$	$0,98 \pm 0,25$
	PostC	$0,75 \pm 0,50$	$0,50 \pm 0,22$	$0,26 \pm 0,16\ddagger$
<b>RFI (mmol/l)</b>	Áloperált	$0,42 \pm 0,37$	$0,49 \pm 0,12$	$0,77 \pm 0,56$
	IR-kontroll	$2,37 \pm 1,43$	$1,53 \pm 0,45$	$1,51 \pm 0,36$
	PostC	$0,92 \pm 0,32$	$0,77 \pm 0,34\ddagger$	$0,43 \pm 0,28\ddagger$

FENa: frakcionált nátrium exkréció; RFI: renal failure index (vese elégtelenségi index);  $\ddagger p < 0,05$  versus IR-kontroll csoport;  $\ddagger p < 0,001$  versus IR-csoport.



21. ábra HSP-72 expresszió GAPDH-ra normalizálva

(21. ábra).

### 5.2.6. Szöveti HSP-72 szint meghatározás

Ugyan mind az IR-kontroll csoportban, mind a PostC csoportban megnövekedett a HSP-72 expresszió, szignifikáns különbséget az álóperált csoporthoz képest egyik csoportban sem sikerült kimutatni

## 5.3. Rövididejű végtagi ischaemia tüdőszövődményeinek vizsgálata PostC segítségével

- 3 óra ischaemia és 4-, 24-, 72 óra reperfúzió poszt kondicionálással -

### 5.3.1. Tüdő fénymikroszkópos vizsgálata

A 4-, 24-, 72 óra reperfúziót követően a számított tüdőszövettani pontszám szignifikánsan magasabb értéket mutatott az IR-kontroll csoportban az álóperált csoporthoz viszonyítva (a reperfúziós idő előrehaladtával a szöveti károsodás csökkenő tendenciát mutatott). A PostC csoportban a szövettani károsodás szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az IR-kontroll csoporthoz képest valamennyi vizsgált időpontban.

### 5.3.2. Tüdő szövet nedvességtartalma (W/D arány)

A tüdő szöveti nedvességtartalma minden időpontban (4-, 24-, 72 óra) szignifikánsan magasabbnak bizonyult az IR-kontroll csoportban az álóperált csoporthoz képest. A W/D arány szignifikánsan alacsonyabb értéket mutat a PostC csoportban az IR-kontroll csoporthoz képest (7. táblázat).

7. táblázat Tüdő szövet nedvességtartalma.

	4 óra reperfúzió	24 óra reperfúzió	72 óra reperfúzió
<b>álóperált</b>	60,6±2,5 %	64,1±0,7 %	65,3±0,6 %
<b>IR-kontroll</b>	63,2±1,0 % <sup>#</sup>	68,2±1,8 <sup>#</sup>	72,0±1,5 % <sup>#</sup>
<b>PostC</b>	60,1±1,4 % <sup>*</sup>	65,5±1,0 % <sup>*</sup>	68,4±2,1 % <sup>*</sup>

<sup>#</sup> p<0,05 versus álóperált; <sup>\*</sup> p<0,05 versus IR-kontroll

### 5.3.4. Szöveti MPO aktivitás meghatározás

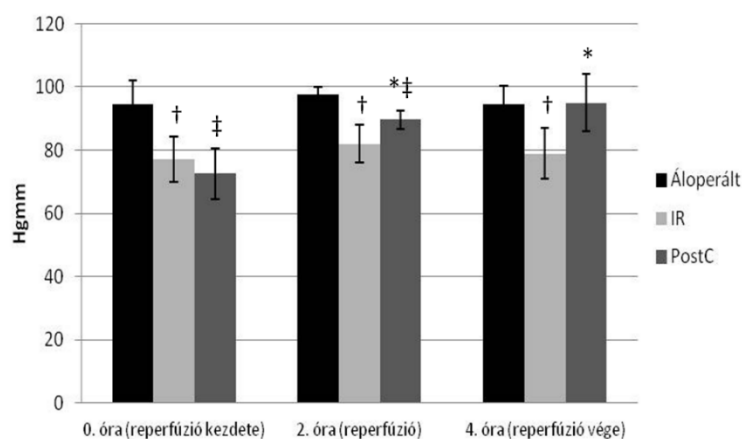
Négy óra reperfúziót követően az IR-kontroll csoport megnövekedett MPO aktivitása jellemző az áloperált csoporthoz képest. Ugyanezen időpontban, a PostC csoportban az MPO aktivitás tekintetében csökkenés tapasztalható az IR-kontroll csoport értékeihez képest, de a különbség nem mutatkozott szignifikáns mértékűnek. Későbbi reperfúziós időpontokban (24, 72 óra) nem volt kimutatható különbség a vizsgálati csoportok között.

### 5.3.5. Szöveti HSP-72 szint meghatározás

A tüdőszövet HSP-72 expressziójának mértéke nem emelkedett meg szignifikánsan az IR-kontroll csoportban az áloperált csoporthoz képest. Ugyan a PostC csoportban alacsonyabb HSP-72 szint mérhető az IR-kontroll csoporthoz képest, a különbség nem volt szignifikáns mértékű. Későbbi reperfúziós időpontokban (24, 72 óra) ugyancsak nem volt kimutatható szignifikáns különbség a vizsgálati csoportok között.

### 5.3.6. Artériás vérgázanalízis

Az artériás pO<sub>2</sub> értéke csökkent az IR-kontroll csoportban az áloperált csoporthoz



22. ábra A PostC szignifikáns mértékben javította az állatok artériás oxigenizációját a reperfúzió ideje alatt. † p<0.05 versus áloperált; \*p<0.05 versus IR-kontroll; ‡ p<0.05 versus áloperált

képest. A PostC csoportban szignifikánsan magasabb értékek voltak mérhetőek a reperfúzió alatti mintavételi időpontokban az IR-kontroll csoporthoz viszonyítva. Az IR-kontroll csoportban az artériás pCO<sub>2</sub> érték megnövekedett az áloperált csoporthoz képest a reperfúzió második és negyedik órájában mérve,

azonban a különbségek nem szignifikáns mértékűek. A PostC csoport esetében az artériás pCO<sub>2</sub> értékek csökkentek az IR-kontroll csoport értékeihez képest, azonban a csökkenés nem tekinthető szignifikánsnak (22. ábra).

## 5.4. Rövid idejű végtagi ischaemia bélszövődmeényeinek vizsgálata és mérséklése PostC segítségével

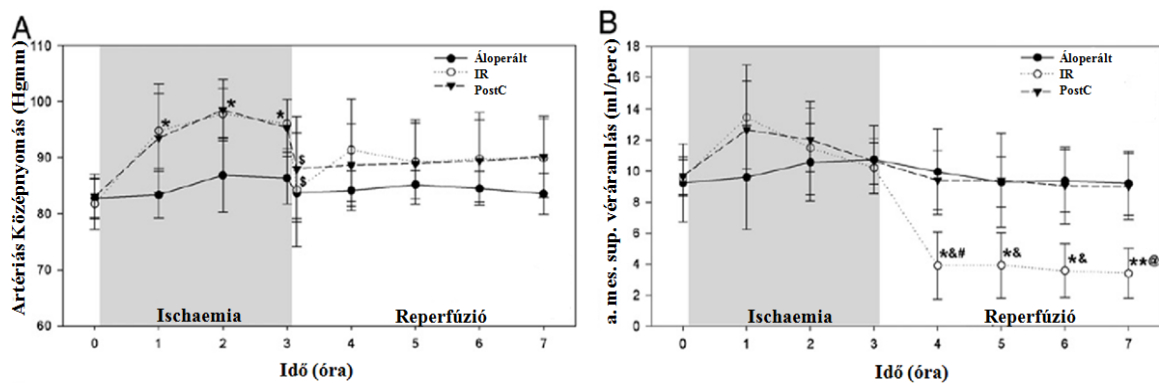
- 3 óra ischaemia és 4 óra reperfúzió poszt kondicionálással -

### 5.4.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az áloperált állatokban az artériás középnyomás értéke nem változott szignifikáns mértékben. Ugyanakkor a 3 óra ischaemia alatt a középnyomás szignifikánsan megnövekedett az IR-kontroll és PostC csoportban áloperált állatok értékeihez képest. A reperfúzió kezdetén azonban az artériás középnyomás visszaesett a kiindulási értékre és a reperfúzió későbbi időpontjaiban már egyik csoport (IR-kontroll, PostC) esetén sem különbözött szignifikáns mértékben az áloperált csoportban látottaktól. Az IR-kontroll és PostC csoportok között szignifikáns különbség nem mutatkozott (23/A ábra).

### 5.4.2. Arteria mesenterica superior véráramlásának vizsgálata

Az IR-kontroll csoportban az a. mesenterica superior (AMS) véráramlása szignifikáns mértékben (közel 60%-al) lecsökkent a reperfúziót követően az áloperált állatok értékeihez képest. A PostC szignifikáns mértékben képes volt javítani az artériás véráramlás mértékét, melynek eredményeként az a. mesenterica superior véráramlása nem különbözött szignifikáns mértékben az áloperált csoportban tapasztaltaktól (23/B ábra).

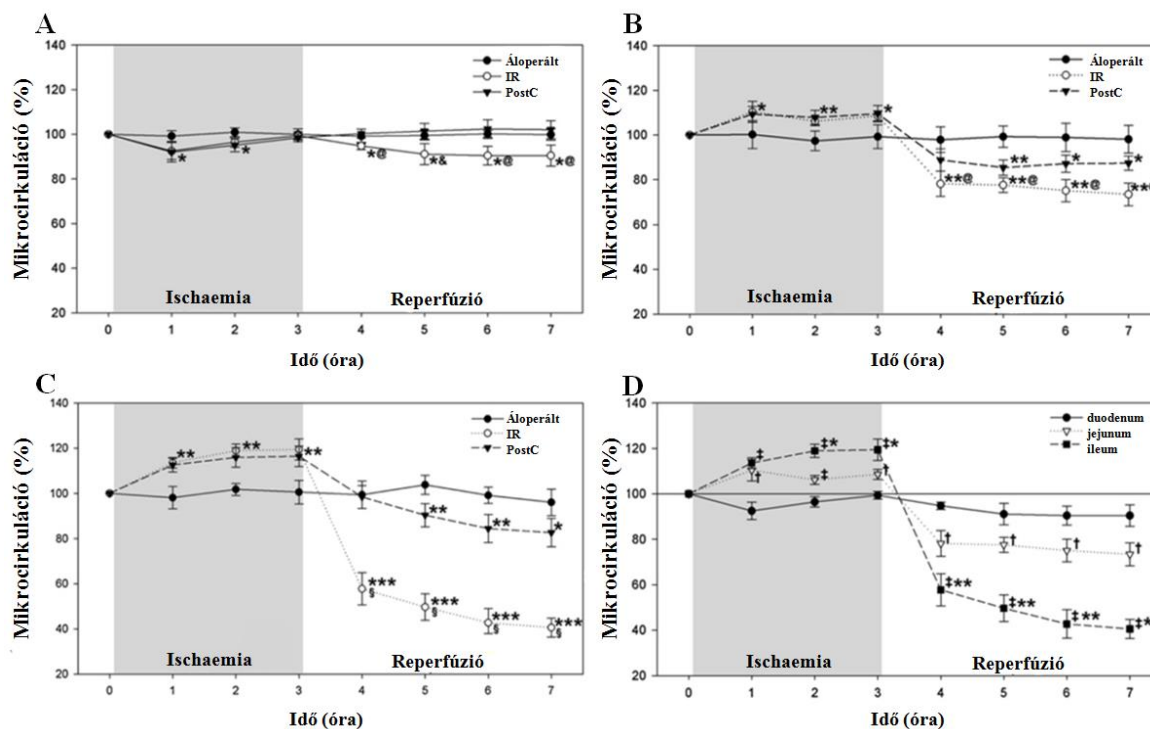


23. ábra A.) Artériás középnyomás és B.) az a. mesenterica superior véráramlásának változása. \* $p < 0.05$  versus áloperált csoport; \*\* $p < 0.01$  versus áloperált csoport; &  $p < 0.05$  versus PostC csoport; @  $p < 0.01$  versus PostC csoport; \$  $p < 0.05$  versus előző időpont az adott csoporton belül; #  $p < 0.01$  vs. versus előző időpont az adott csoporton belül.

### 5.4.3. A vékonybél mikrocirkulációjának vizsgálata

Az infrarenalis aorta kirekesztés következtében a *duodenum* mikrocirkulációja szignifikáns mértékben károsodott mind az IR-kontroll, mind a PostC csoport esetén az áloperált csoport értékeihez képest, mely a 3. órára normalizálódott. Az alsó végtagi

reperfúzió az IR-kontroll csoportban a duodenum mikrocirkulációjának folyamatos csökkenését eredményezte, mélypontját a 2. órában érve el. A PostC szignifikáns mértékben képes volt javítani a duodenum reperfúzió alatti mikrocirkulációját, melynek eredményeként az nem különbözött szignifikáns mértékben az áloperált csoport értékeitől (24/A. ábra).



24. ábra Az egyes bélszakaszok (A - duodenum, B - jejunum, C - ileum) mikrocirkulációja. \*  $p < 0,05$  versus áloperált; \*\*  $p < 0,01$  versus áloperált; \*\*\*  $p < 0,001$  versus áloperált; &  $p < 0,05$  versus PostC; @  $p < 0,01$  versus PostC; §  $p < 0,001$  versus PostC; D.) Az IR-kontroll csoportban az egyes bélszakaszok mikrocirkulációjának összehasonlítása. †  $p < 0,01$  versus duodenum; ‡  $p < 0,001$  versus duodenum; \*  $p < 0,01$  versus jejunum; \*\*  $p < 0,001$  versus jejunum.

Az aorta kirekesztés következtében a *jejunum* mucosalis véráramlása szignifikánsan megemelkedett mind az IR-kontroll, mind a PostC csoport esetén az áloperált állatok értékeihez képest. A végtagi reperfúzió során a bél mikrocirkulációja jelentős mértékben károsodott mindkét csoportban, azonban a PostC csoport állataiban az áramlás-csökkenés szignifikáns mértékben elmaradt az IR-kontroll csoporthoz képest (24/B ábra).

Az IR-kontroll, illetve PostC csoportokban az *ileum* mikrocirkulációja jelentős mértékben megnövekedett a végtagi kirekesztés alatt, maximális értékét a 2. órában érve el. A reperfúzió alatt egy fokozatos áramlásromlás volt detektálható az IR-kontroll csoport állataiban. Ugyan a poszt-kondicionálás képes volt mérsékelni a fenti mikrocirkulációs zavart, az *ileum* keringése így is elmaradt az áloperált csoportban látottakhoz képest (24/C ábra).

Az IR-kontroll csoportban az egyes bélszakaszok ischaemia során mért mikrocirkulációját összehasonlítva megállapítható, hogy míg a duodenum véráramlása károsult, addig a jejunum és az ileum mikrocirkulációja átmenetileg fokozódott, mely áramlás növekedés az ileumban szignifikánsan nagyobb mértékűnek mutatkozott. A reperfüzió alatt valamennyi bélszakasz mikrokeringése csökkent, azonban míg a duodenumban enyhe áramlásromlás volt megfigyelhető, addig a jejunumban kifejezettebb, míg az ileumban jelentős mikrocirkulációs zavar jött létre. Az áloperált és PostC csoportokon belül az egyes bélszakaszok között nem mutatkozott szignifikáns különbség (24/D ábra).

#### 5.4.4. A vékonybél fénymikroszkópos vizsgálata

A fénymikroszkópos vizsgálatok valamennyi bélszakasz tekintetében csupán enyhe szöveti eltéréseket mutattak az áloperált csoport állataiban. A duodenumban a végtagi kirekesztés hatására nem következett be jelentős károsodás sem az IR-kontroll, sem a PostC csoportokban. Ezzel szemben az ileum és a jejunum területén jelentős károsodások jöttek létre az IR-kontroll csoportban az áloperált állatokban látottakhoz képest. Ugyanakkor a PostC képes volt szignifikáns mértékben mérsékelni a szöveti károsodás mértékét mindkét bélszakasz esetén (8. táblázat).

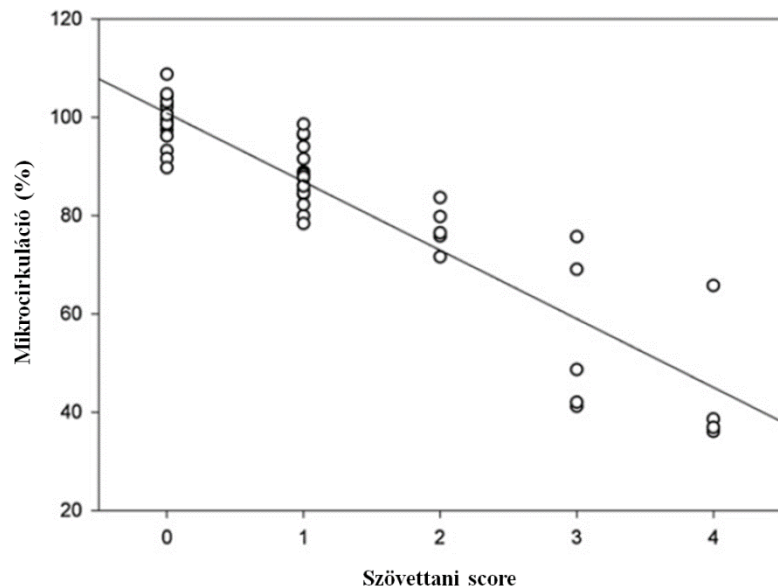
8. táblázat Bélkárosodást jellemző szövettani score

		Szövettani score
<b>Duodenum</b>	áloperált	0 (0; 0)
	IR-kontroll	1 (0; 1)#,\$
	PostC	0 (0; 1)\$
<b>Jejunum</b>	áloperált	0 (0; 0)
	IR-kontroll	2 (1; 3)▯
	PostC	1 (0; 1)†,▯
<b>Ileum</b>	áloperált	0 (0; 1)
	IR-kontroll	3,5 (3; 4)▯,#
	PostC	2 (1; 2)‡,#

▯ p<0,01 versus áloperált; †p<0,05 versus IR-kontroll; ‡ p<0,01 versus IR-kontroll; # p<0,05 versus jejunum; \$ p<0,001 versus ileum.

### 5.4.5. Bél mikrocirkuláció és szövettani károsodás közti korreláció

A kísérleti periódus végén mért mikro-cirkulációs véráramlás és a bél károsodást jelző szemikvantitatív score értékek közt szoros korreláció mutatkozott valamennyi vizsgálati csoport tekintetében ( $r=-0,911$ ;  $r^2=0,847$ ,  $p<0,001$ ) (25. ábra).



25. ábra A bél mikrocirkuláció és szövettani károsodás közti szoros korreláció.

## 5.5. Kritikus

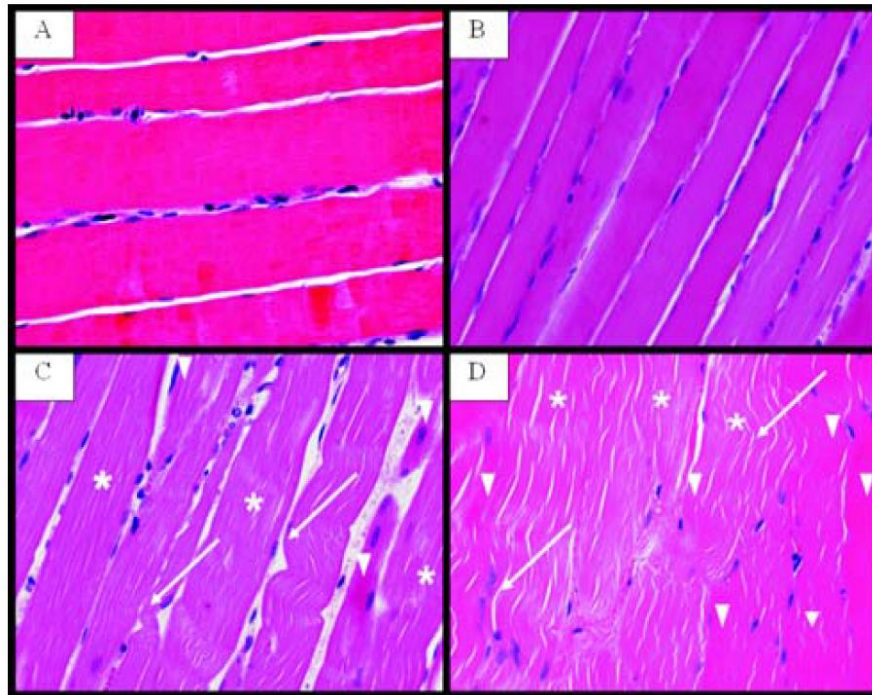
### ischaemia időtartamának meghatározása

- 4-, 6-, 8 óra ischaemia -

#### 5.5.1. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata

Hematoxillin-eosin szövettani eredmények (26. ábra) szerint a 4 órás ischaemia az alsó végtagi izomszövettani metszeteken morfológiai elváltozást nem okozott. A harántcsíkolat megtartottnak bizonyult, szöveti ödéma nem volt látható. 6 óra elteltével intracellularis ödéma jelent meg, a rostok lefutása néhol hullámossá vált, festődésük enyhe hypereosinophiliát mutatott, azonban szerkezetük nagyobb részben, harántcsíkolatuk pedig teljesen megtartott volt. A 8 órás ischaemia jelentős változásokat hozott az izomrostok morfológiai képében: a rostok hypereosinophiliája fokozódott a 6 órás ischaemiás állatok metszeteihez képest. Lefutásuk szinte az egész metszetre kiterjedően hullámossá vált. Az intracellularis ödéma kifejezett-, a rostok határai elmosódottak voltak. Az izomrostokban hyalindegeneráció és finom vacualisáltság volt megfigyelhető, mely az ischaemiás károsodás súlyos voltára utal. Nukleáris eltérések egyik csoportban sem voltak találhatóak.

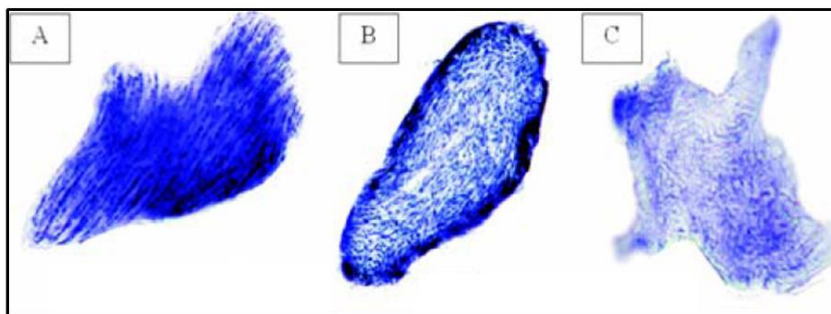




26. ábra Alsó végtagi izomszöveti metszetek (HE, nagyítás: 400×). A: Izomrostok egy egészséges állatból; B: 4 óra ischaemia utáni állapot, érdemi károsodás nem látható; C: 6 óra ischaemia után fokozódó intracelluláris ödéma (\*), valamint kismértékű hyalindegeneráció (nyílhegy) figyelhető meg, egyes rostok lefutása hullámos (nyíl); D: 8 óra ischaemia után kifejezett intracelluláris ödéma (\*), hyalindegeneráció (nyílhegy) figyelhető meg, a rostok lefutása az egész metszet területén hullámos (nyíl), a rosthatárok elmosódnak.

### 5.5.2. Izomrost életképesség meghatározása

Az enzimhisztokémiai vizsgálatok szerint az egészséges izom-szövethez képest a mitokondriumok sűrűsége az ischaemia idejének növekedésével fokozatosan csökkent az izomrostokban. 8 órás ischaemiát elszenvedett állatok rostjaiban vált a csökkenés a



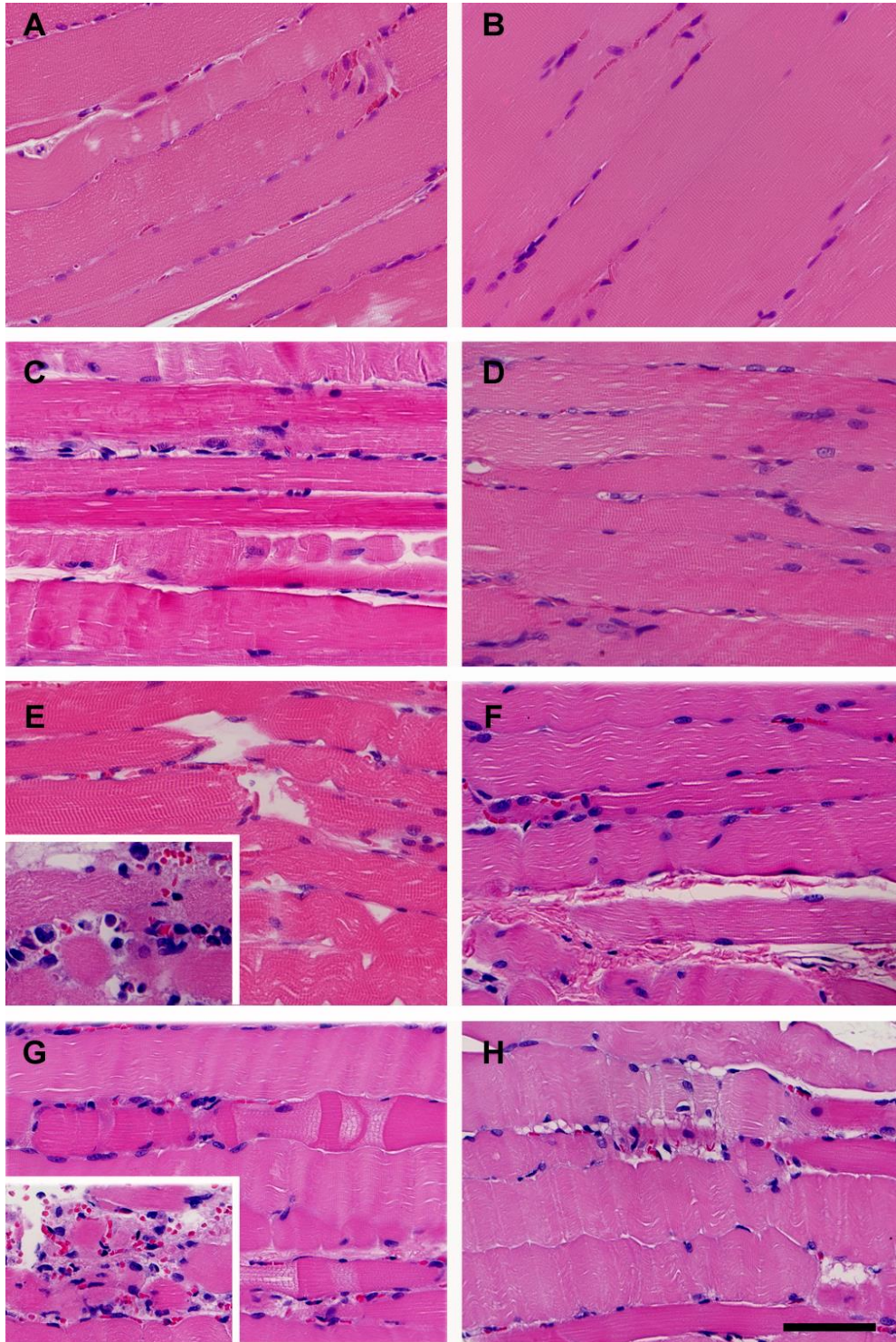
27. ábra Fagyasztott alsó végtagi izommetszeteken történt nitroblue-tetrazolium enzim-hisztokémiai reakció fénymikroszkópos képei (nagyítás: 400×). A: Izomrost egy egészséges állatból, a mitokondriumok (kék foltok) nagy számban figyelhetők meg; B: Áloperált csoportban a mitokondriumok száma az egészséges állathoz képest nem különbözik; C: 8 óra ischaemia után a mitokondriumok számának drámai csökkenése látható

legkifejezettebbé, ezen időtartam után az izomrostokban szinte egyetlen funkcionáló mitokondrium sem volt található, mely feltételezhetően a folyamat kritikus voltát jelzi (27. ábra).

## 5.6. Hosszú idejű (kritikus) végtagi ischaemia mérséklése PostC segítségével

- 8 óra ischaemia és 2-, 6-, 12-, 24 óra reperfúzió és poszt kondicionálás -

### 5.6.1. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata

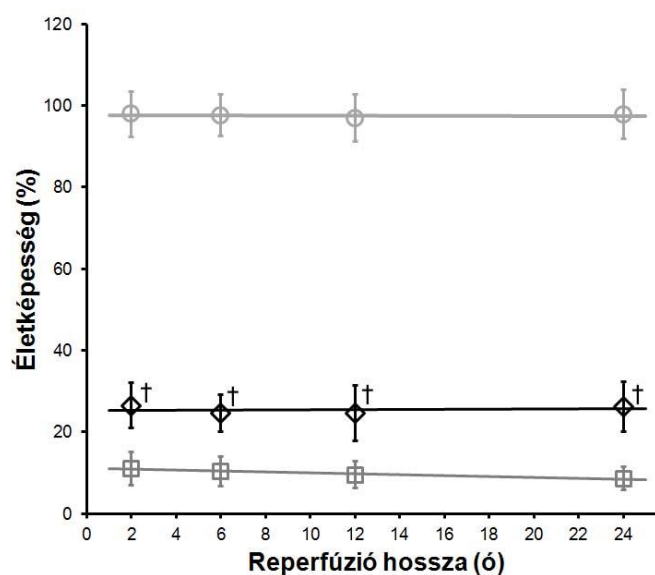


28. ábra Reprezentatív szövettani metszetek. További leírást lásd a szövegben. Festés: hematoxilín-eozin. Bar: 50  $\mu$ m.

A HE festett metszeteken az áloperált csoportokban izomkárosodás jelei nem voltak láthatóak. A két óra hosszúságú reperfúzió a sérült izomrostok számának szignifikáns mértékű megemelkedésével járt mind az IR-kontroll (28/A. ábra), mind a PostC (28/B. ábra) csoportokban az áloperált állatokhoz képest ( $p < 0,05$ ). Hat óra elteltével a károsodott izomrostok mennyisége tovább nőtt mindkét ischaemia-reperfúziót elszenvedett csoportban (28/C-D. ábra;  $p < 0,001$ ), a PostC csoportban (28/D. ábra) azonban szignifikánsan kisebb mértékű izomkárosodás volt detektálható az IR-kontroll csoporthoz képest (28/C. ábra). A károsodás tovább növekedett 12 óra elteltével mindkét csoportban ( $p_{IR} < 0,05$ ;  $p_{PostC} < 0,001$ ); az IR-kontroll csoport metszetein megjelentek az extracelluláris ödéma morfológiai jelei (28/E. ábra), továbbá gyulladásosejtes beszűrődés volt látható (28/E. ábra, beszűrt kép). A PostC ezen időpontban is képes volt a károsodás mértékének mérséklésére, mind az izomrostok számának ( $p < 0,05$ ), mind az ödéma mértékének tekintetében (28/F. ábra). A PostC metszeteken gyulladás nem volt látható. 24 óra elteltével a károsodott izomrostok száma az előző időpillanathoz viszonyítva szignifikáns mértékben nem változott, valamint az IR-kontroll csoportban az ödéma és a gyulladás mértéke sem mutatott eltérést a korábbiakhoz képest (28/G. ábra). A PostC ezen időpillanatban is képes volt a károsodást mérsékelni (28/H. ábra). Gyulladás a metszeteken továbbra sem volt látható.

### 5.6.2. Izomrost életképesség meghatározása

Az izomrostok életképessége az áloperált csoportokban szignifikánsan nem változott a kísérlet alatt. A 8 órás ischaemiát követő 2 órás reperfúzió az izomrostok életképességének jelentős csökkenéséhez vezetett mindkét ischaemia-reperfúziót elszenvedett csoportban ( $p < 0,001$ ) az áloperált csoporthoz képest. Az életképesség ezt követően szignifikáns változást nem



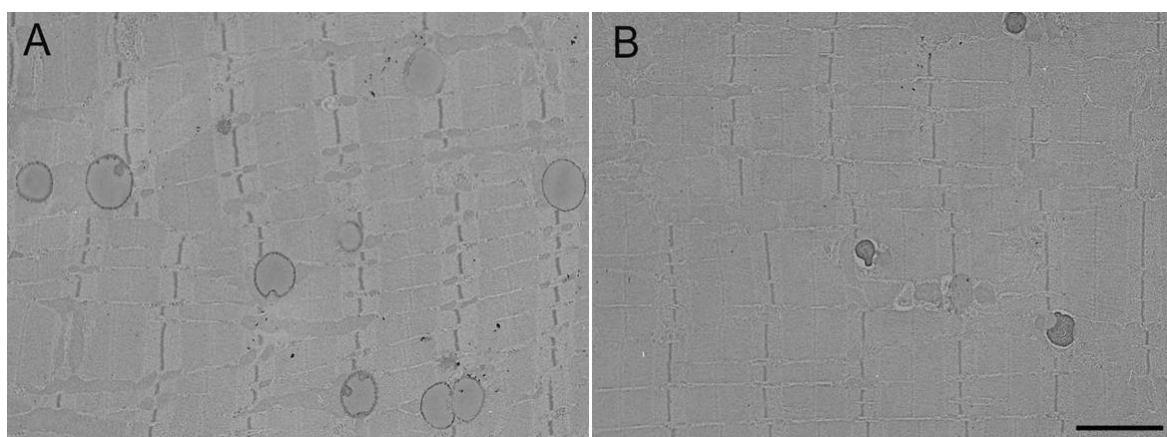
29. ábra Az izomrostok életképességének változása a PostC hatására. (o) áloperált; (□) IR-kontroll; (◇) PostC; †  $p < 0,001$  versus IR-kontroll.

mutatott egyik csoportban sem. PostC hatására azonban az izomrostok életképessége

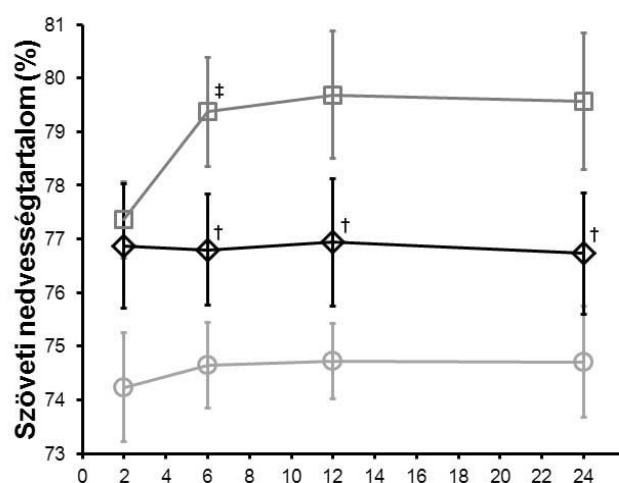
szignifikánsan magasabb értéken stabilizálódott mindegyik vizsgált időpontban (2-, 6-, 12-, 24 óra reperfúzió), a megfelelő IR-kontroll csoporthoz képest (29. ábra;  $p < 0,001$ ).

### 5.6.3. Elektronmikroszkópia

2 óra reperfúziót követően a mitokondriumok jelentős mértékű duzzadása volt megfigyelhető. Az esetek egy részében szétesett mitokondriumok voltak láthatóak. A mitokondriumok helyén gyakran lipid-szerű homogén cseppek jelentek meg. A magok fokozott széli heterokromatinizációt mutattak (30/A. ábra). A PostC csoportban a mitokondriumok kisebb mértékű károsodása volt látható (enyhe fokú duzzadás, szétesett mitokondriumok nem voltak láthatóak), illetve a lipid-szerű cseppek száma is jóval csekélyebb volt (30/B. ábra).



30. ábra A PostC hatása az ultrastrukturális károsodásra. A: az IR-kontroll csoportban jelentős mértékű ultrastrukturális károsodás figyelhető meg; B: a PostC csoportban a károsodás jelentősen enyhébb. Bar: 20  $\mu\text{m}$



31. ábra A szöveti nedvességtartalom. (o) Áloperált; (□) IR-kontroll; (◊) PostC; † $p < 0,05$  versus IR-kontroll; ‡ $p < 0,05$  versus az előző időpont

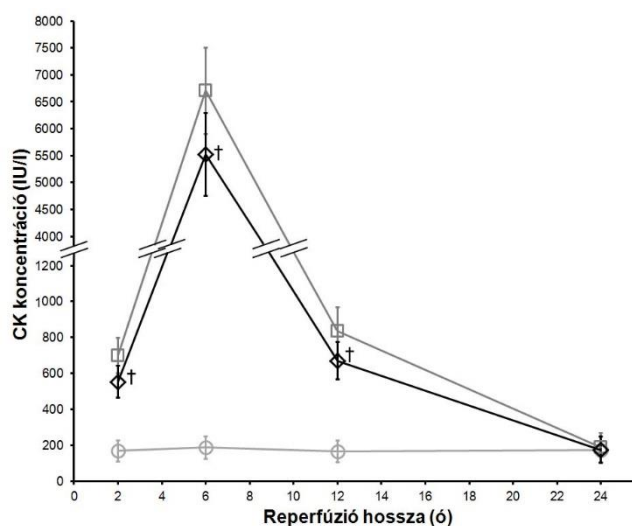
### 5.6.4. Izomszövet nedvességtartalma (W/D arány)

A 8 óra ischaemiát követő reperfúzió a végtagi ödéma mértékének szignifikáns emelkedéséhez vezetett mind az IR-kontroll, mind a PostC csoportokban ( $p < 0,001$ ) az áloperált állatokhoz képest. 6 óra reperfúzió a nedvességtartalom további emelkedését idézte elő az IR-kontroll csoportban ( $p = 0,01$ ), ezt követően az ödéma mértéke

nem változott az idő előrehaladtával. A PostC 2 óra reperfúzió után nem volt képes az ödéma mértékének szignifikáns csökkentésére ( $p>0,05$ ), azonban 6 óra elteltével minden mért időpontban szignifikánsan mérsékelte az izom nedvességtartalmát ( $p<0,001$ ) a megfelelő IR-kontroll csoporthoz képest (31. ábra).

### 5.6.5. Laboratóriumi vizsgálatok

Az áloperált csoportok szérumban kreatin-kináz koncentrációi nem mutattak eltérést a kísérlet alatt. 2 óra reperfúziót követően a szérumban CK szintek szignifikánsan megemelkedtek mindkét csoportban az áloperált csoporthoz képest ( $p<0,001$ ). A CK koncentráció 6 óránál csúcsot ért el, majd fokozatosan visszacsökkent az áloperált csoport szintjére a reperfúzió 24. órájára. A PostC képes



32. ábra Szérumban kreatin-kináz szintek. (o) áloperált; (□) IR-kontroll; (◇) PostC; † $p<0,05$  versus IR-kontroll.

volt a szérumban CK szintjeinek szignifikáns mértékű csökkentésére 2, 6 és 12 óra reperfúziót követően is a megfelelő IR-kontroll csoporthoz képest ( $p<0,05$ ). A 24. posztoperatív órában a CK szintek szignifikánsan nem különböztek egymástól egyik csoportban sem ( $p>0,05$ ; 32. ábra).

## 5.7. Izomrost életképesség meghatározás (NBT) vizsgálata

- 4-, 6-, 8-, 9 óra ischaemia és 0-, 2 óra reperfúzió -

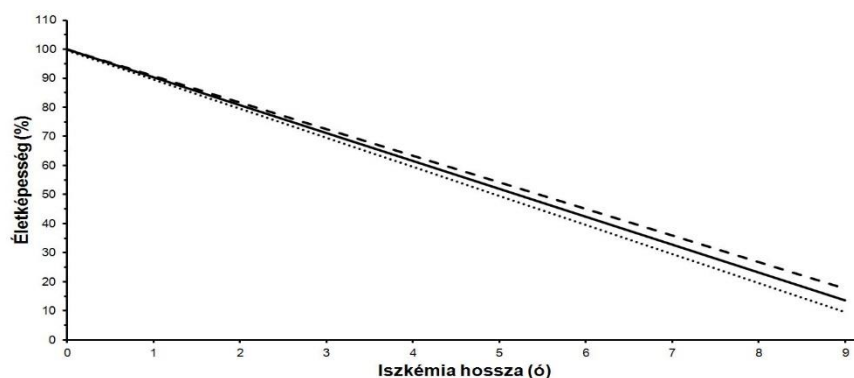
### 5.7.1. Végtagi mikrocirkuláció vizsgálata

A mikrocirkulációs áramlás az ischaemia teljes ideje alatt regisztrációra került. Az okklúzió felhelyezése után az áramlás az alapérték  $17,3\pm 7,3\%$ -ára esett vissza. Az áramlás szignifikáns variációt nem mutatott az ischaemia alatt. A 9. óra ischaemia végén mért értékek ( $16,5\pm 9,2\%$ ) sem tértek el szignifikánsan az ischaemia kezdetén mértektől ( $p>0,05$ ). A csoportok között (4-, 6-, 8-, 9 óra ischaemia) az ischaemia alatti áramlás tekintetében szignifikáns variáció nem volt kimutatható.

## 5.7.2. Ischaemiás károsodás vizsgálata

### 5.7.2.1. Izomrost életképesség meghatározása

Az izomrostok össz-életképessége az ischaemia hosszával lineárisan csökkent. Az I-es és a IIb típusú rostok esetében hasonló karakterisztika volt megfigyelhető (33. ábra). Az I-es típusú rostok nagyobb károsodást szenvedtek a meghatározott életképesség értékek



33. ábra A különböző izomrostok életképessége. Szaggatott vonal: az IIb-es típusú rostok életképessége; pontozott vonal: az I. típusú rostok életképessége; folytonos vonal: az izomrostok össz-életképessége.

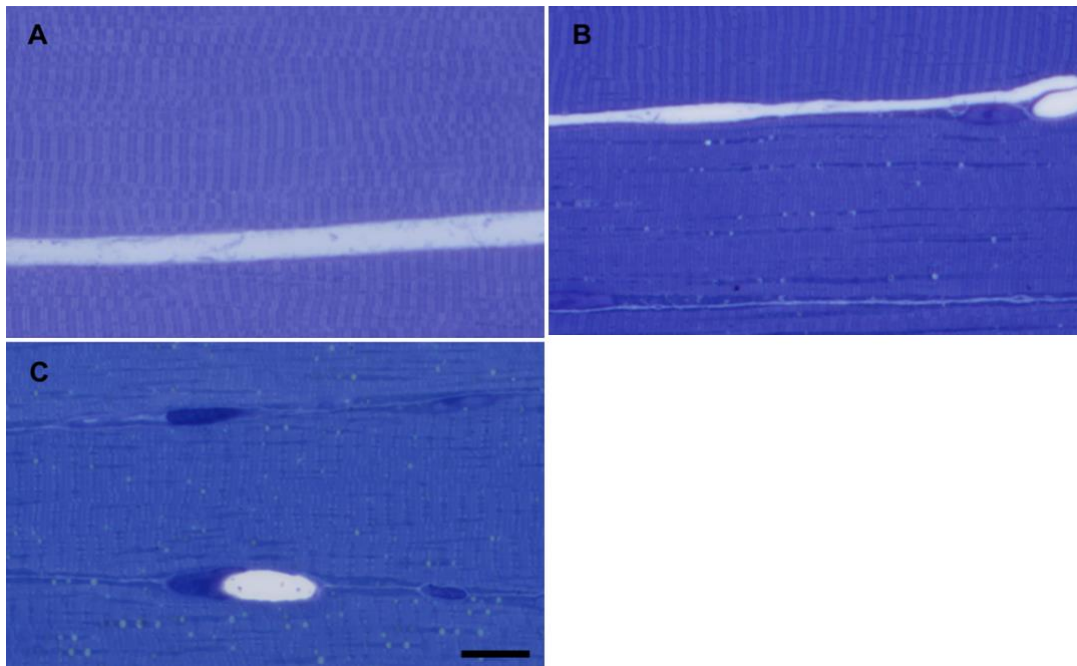
alapján, mint a IIb típusúak, mely különbség 6 óra ischaemia elteltével vált szignifikánssá ( $p_{6\text{ó}} < 0,05$ ;  $p_{8\text{ó}} < 0,01$ ;  $p_{9\text{ó}} < 0,05$ ). Az adatok feldolgozása során erős, szignifikáns

korreláció

igazolódott az ischaemia hossza, valamint a kapott életképesség értékek között mindhárom vizsgált típus esetén (össz-életképesség:  $r = -0,989$ ;  $r^2 = 0,978$ ;  $p < 0,001$ , I-es típusú rostok:  $r = -0,990$ ;  $r^2 = 0,979$ ;  $p < 0,001$ ; IIb típusú rostok:  $r = -0,989$ ;  $r^2 = 0,978$ ;  $p < 0,001$ ).

### 5.7.2.2. Félvékony metszetek fénymikroszkópos vizsgálata

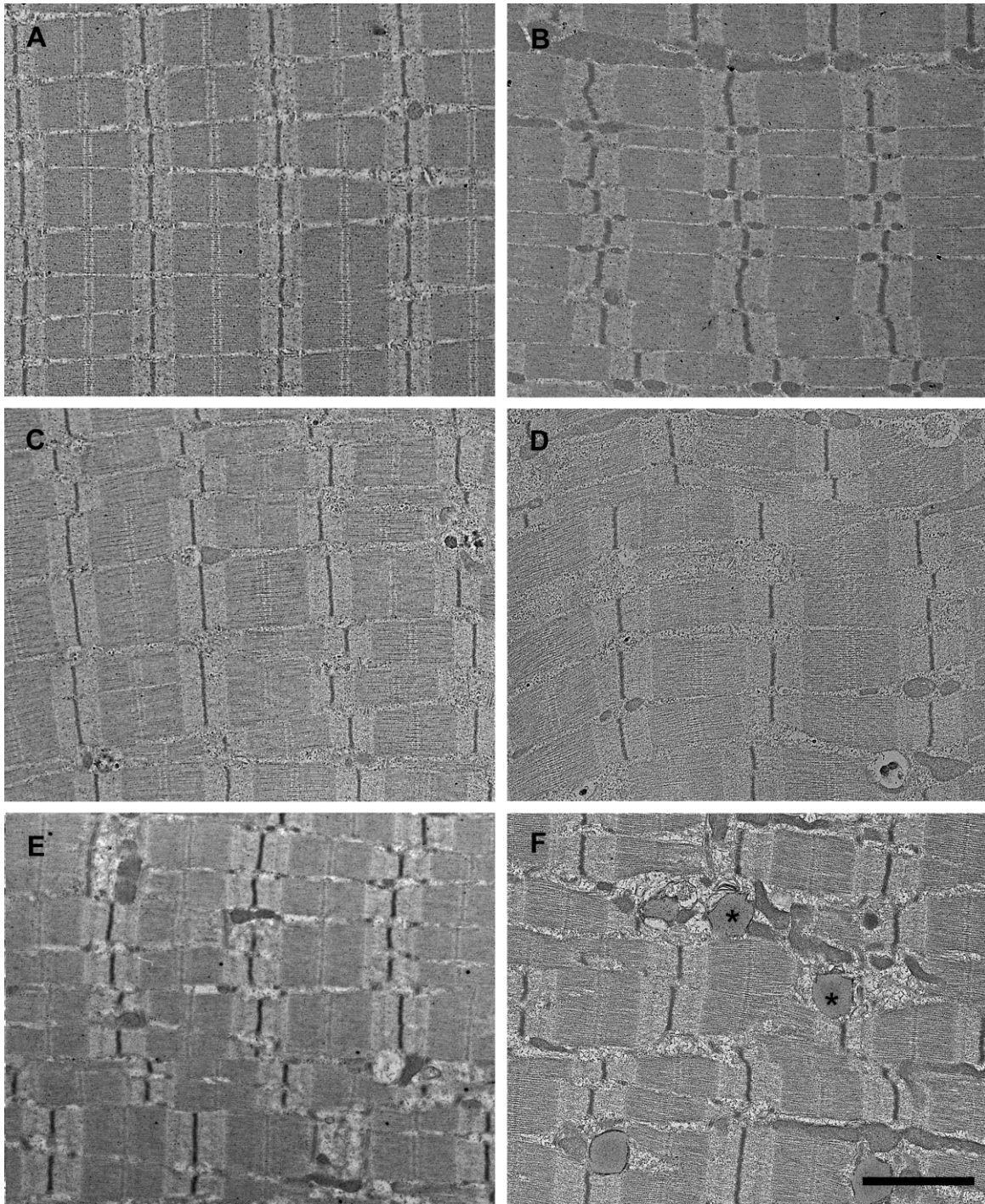
A kezeletlen állatok metszetein izomkárosodás jelei nem voltak megfigyelhetők (34/A. ábra). 4 és 6 órás ischaemia a félvékony metszeten patológiás elváltozást nem okozott. 8 óra hosszúságú ischaemia a rostok festődésének felerősödésével járt. A rostok belsejében, elszórtan, kis homogén bennékű, változó denzitású cseppek jelentek meg, főként a mitokondriumban gazdag – feltehetőleg vörös – izomrostokban (34/B. ábra). 9 órás ischaemiát követően a rostok festődése fokozódott az előző időpillanathoz képest, elszórtan egy-egy hiperkontrakciót mutató izomrost is látható volt. Egyes rostokban a harántcsíkolat festődése megváltozott. A 8 órás ischaemiát követően is jelenlévő homogén cseppek mennyisége növekedett, 9 óra ischaemiát követően már a legtöbb rostban előfordultak (34/C. ábra). A mitokondriumban gazdag rostok azonban sokkal több homogén cseppet tartalmaztak, mint a mitokondriumban szegények.



34. ábra Reprezentatív félvékony metszetek az ischaemiás károsodás vizsgálata során. A: a fiziológias kontroll állatokban károsodás nem látható; B: 8 órás ischaemiát követően a rostok belsejében, elszórtan, kis homogén bennékű, változó denzitású cseppek jelentek meg; C: 9 órás ischaemiát homogén cseppek mennyisége növekedett az előző időpillanathoz képest, valamint elszórtan egy-egy hiperkontrakciót mutató izomrost is látható volt. Festés: toluidin-kék, bar: 20  $\mu$ m

#### 5.7.2.3. Elektronmikroszkópia

A fiziológias kontroll állatok elektronmikroszkópos képe nem mutatott károsodást (35/A-B. ábra). A 8 órás hosszúságú ischaemia a mitokondriumokban közepes mértékű duzzadást okozott. Egyes mitokondriumok helyén lipid-szerű homogén bennékű cseppek voltak megfigyelhetők, főként a mitokondriumban gazdag rostokban, a cseppeket elektrondenz szegély vette körül (35/C-D. ábra). 9 órás ischaemia a mitokondriumok alakjának deformitását idézte elő, a mátrixban néhol flokkulens denzitások voltak megfigyelhetőek. A mitokondriumok nagyobb része a diszrupció jeleit mutatta. A 8 órás ischaemiás csoportban látott lipid-szerű cseppek előfordulása 9 órás ischaemiát követően megsokszorozódott, valamint már a szubsarkolemmális mitokondriumok között is előfordultak. A metszeteken megfigyelhető volt még a szarkoplazmatikus retikulum közepes fokú duzzanata, néhol dezorganizációja. A leírt változások már nemcsak a mitokondriumban gazdag, hanem a mitokondrium-szegény rostokban is láthatóvá váltak, ugyan kisebb mértékben (35/E-F. ábra).



35. ábra A mitokondriumban szegény (A, C, E), illetve a mitokondriumban gazdag (B, D, F) izomrostok elektronmikroszkópos képe változó hosszúságú ischaemiás időket követően. A, B: A fiziológiás kontroll állatok elektronmikroszkópos képe nem mutatott károsodást. C, D: A 8 órás hosszúságú ischaemia a mitokondriumokban közepes mértékű duzzadást okozott. Egyes mitokondriumok helyén lipid-szerű homogén bennéki cseppek voltak megfigyelhetők, főként a mitokondriumban gazdag rostokban (D), a cseppeket elektrondenz szegély vette körül. E, F: 9 órás ischaemia a mitokondriumok alakjának deformitását idézte elő, néhol a mátrixban flokkulens denzitások voltak megfigyelhetőek. A mitokondriumok nagyobb része a diszrupció jeleit mutatta. A lipid-szerű cseppek előfordulása megsokszorozódott a korábbi időpillanathoz képest, valamint már a szubsarkolemmális mitokondriumok között is előfordultak. A metszeten megfigyelhető volt még a szarkoplazmatikus retikulum közepes fokú duzzanata, néhol dezorganizációja. A leírt változások már nemcsak a mitokondriumban gazdag (F), hanem a mitokondrium-szegény rostokban (E) is láthatóvá váltak, ugyan kisebb mértékben. Bar: 2  $\mu$ m.

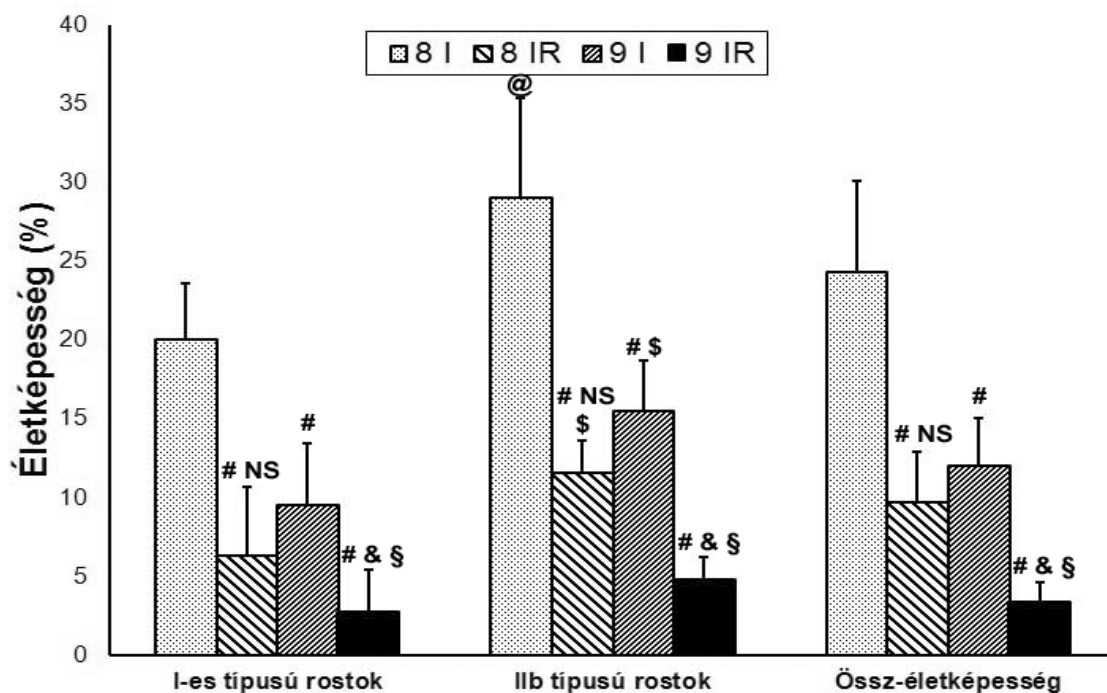


## 5.8. A hosszú idejű ischaemia-reperfúziós károsodás vizsgálata

- 8 óra ischaemia és 2 óra reperfúzió; 9 óra ischaemia és 2 óra reperfúzió -

### 5.8.1. Izomrost életképesség meghatározása

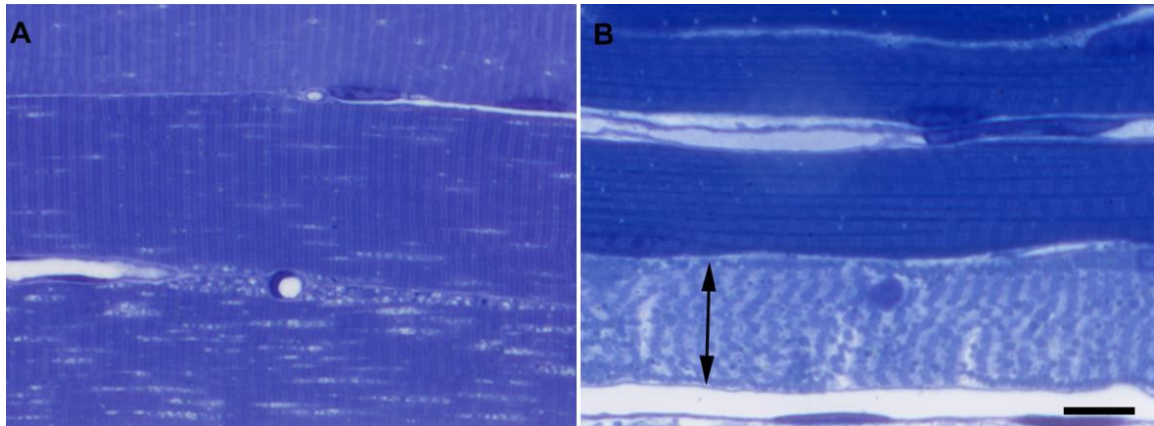
Az izomrost életképesség szignifikánsan lecsökkent 8 óra ischaemiát és 2 óra reperfúziót (8IR) követően a reperfúzió nélküli (8I) csoporthoz képest ( $p < 0,001$ ) mindegyik vizsgált paraméter tekintetében. 9 órás ischaemia esetében hasonló változások voltak megfigyelhetők. ( $p < 0,001$ ; 9I versus 9IR). A 8IR és a 9I csoportok között azonban szignifikáns különbség nem volt kimutatható ( $p > 0,05$ ) egy rosttípus esetében sem, valamint az össz-életképesség tekintetében sem. Az I-es típusú rostok 8 óra ischaemiát és 2 óra reperfúziót követően szignifikánsan nagyobb ( $p < 0,05$ ) életképesség-csökkenést mutattak, a IIb típusú rostokhoz képest (36. ábra).



36. ábra A különböző izomrostok életképessége ischaemia-reperfúziót követően. #  $p < 0,001$  versus 8I csoport; &  $p < 0,05$  versus 8IR csoport; §  $p < 0,001$  versus 9I csoport; NS  $p > 0,05$  versus 9I csoport; §  $p < 0,05$  versus IIb típusú rostok; @  $p < 0,001$  versus IIb típusú rostok.

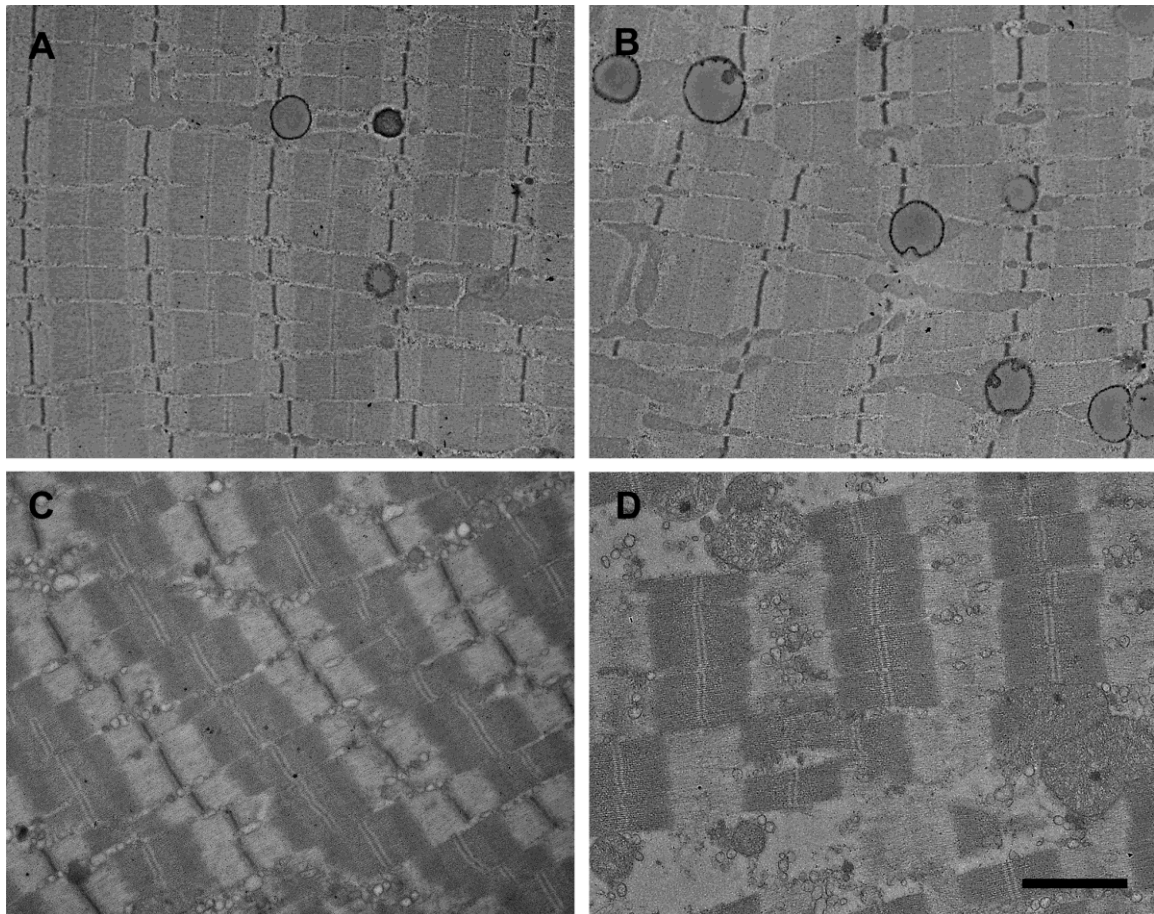
### 5.8.2. Félvékony metszetek fénymikroszkópos vizsgálata

A 8 óra ischaemiát követő 2 óra reperfúzió jelentős morfológiai változásokat okozott az izmokban. A metszeteken a homogén bennékű cseppek a legtöbb izomrostban nagy mennyiségben fordultak elő, valamint az izomrostok szerkezete kissé fellazult (37/A. ábra). 9 óra ischaemiát követő reperfúzió jelentős mértékű necrosist okozott az izomszövetben (37/B. ábra). A rostok több mint a fele elhalt.



37. ábra Reprezentatív félvékony metszetek ischaemia-reperfúziós károsodást követően. A: 8 óra ischaemiát valamint 2 óra reperfúziót követően az izomrostok szerkezetének fellazulását, valamint a homogén bennékkü cseppek mennyiségének jelentős növekedését figyelhetjük meg. 9 órás ischaemiát követő reperfúzió a rostok többségében necrosist idézett elő. Nyíl: necrotikus izomrost. Festés: toluidin-kék, bar: 20  $\mu$ m.

### 5.8.3. Elektronmikroszkópia



38. ábra A mitokondriumban szegény (A, C), illetve a mitokondriumban gazdag (B, D) izomrostok elektronmikroszkópos képe ischaemia-reperfúziós károsodást követően. A, B: 8 órás ischaemiát és 2 órás reperfúziót követően a lipid-szerű cseppek kifejezetten nagy száma, illetve myelin figurák jelenléte volt jellemző, a dezintegrálódott mitokondriumok mellett. A szarkoplazmatikus retikulum súlyos tágulatot mutatott. Az elváltozások a mitokondrium gazdag rostokban (B) nagyobb mértékűek voltak. C, D: A 9 órás kirekesztést követő reperfúzió a rostok többségében necrotikus elváltozásokat idézett elő. A nem necrotikus rostokban a károsodás jelentősebb volt még az előző csoportban a mitokondriumban gazdag rostokban (B) tapasztaltaknál is. A két rosttípus között a károsodás mértékében különbséget ebben az időpont kimutatni nem lehetett. Bar: 2  $\mu$ m.

8 óra ischaemia és 2 óra reperfüziót követően a lipid-szerű cseppek kifejezetten nagy számban voltak jelen a felvételeken. A metszeteiken a mitokondriumok dezintegrációja is gyakran felfedezhető volt. A szarkoplazmatikus retikulum súlyos tágulatot mutatott (38/A-B ábra). Az elváltozások a mitokondriumban gazdag rostokban nagyobb mértékűek voltak (38/B. ábra). A 9 órás kirekesztést követő reperfüzió a rostok többségében necrotikus elváltozásokat idézett elő (38/C-D. ábra).

## 5.9. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - távoli szervi perkondicionálás (I-PerC)

- 1 óra ischaemia, 1-, 6-, 24 óra reperfúzió, perkondicionálással -

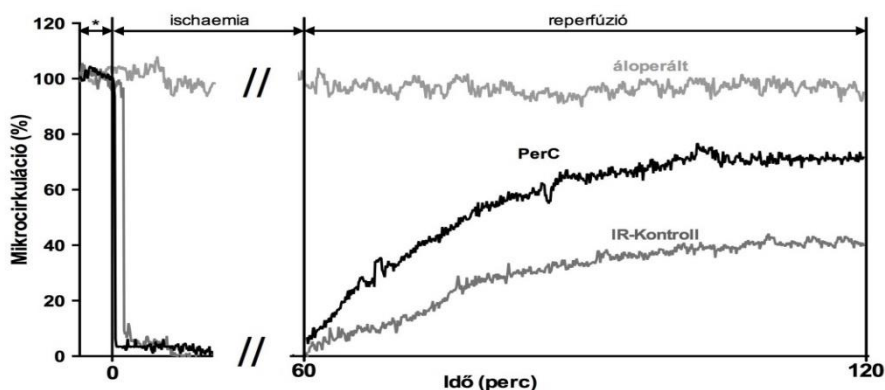
### 5.9.1. Artériás középnyomás meghatározás

Az ischaemiát megelőző artériás középnyomás értékekben nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. A reperfúzió kezdetén mindegyik máj ischaemián átesett csoportban jelentős középnyomás csökkenés volt megfigyelhető. A késői reperfúzió tekintetében szignifikáns különbség volt látható az áloperált, PerC és az IR-kontroll csoportok között (áloperált vs. IR-kontroll:  $80,6 \pm 1,9$  Hgmm vs.  $67,8 \pm 7,6$  Hgmm,  $p=0,026$ ; I-PerC vs. IR-kontroll:  $80,9 \pm 6,2$  Hgmm vs.  $67,8 \pm 7,6$  Hgmm,  $p=0,012$ ).

### 5.9.2. Máj és alsó végtagi mikrocirkuláció vizsgálata

Az áloperált csoport állatainak májmikrocirkulációja a kísérlet teljes időtartama alatt az alapáramlás értéke körül maradt. A reperfúziós terület és plató maximum alapján szignifikáns áramlásjavulás volt tapasztalható az I-PerC csoportban összehasonlítva az IR-kontroll csoporttal (RT:  $p=0,005$ ; PM:  $p=0,0002$ ) (39.ábra). Az áramlási értékek rendre (áloperált, IR, I-PerC) RT:  $97,3 \pm 2,6$ ;  $33,4 \pm 6,4^a$ ;  $62,8 \pm 13,2^{ab}$  és PM:  $98,0 \pm 2,5$ ;  $41,6 \pm 11,2^a$ ;  $71,5 \pm 4,5^{cb}$ , ahol a felsőindexek: a  $p<0,01$  vs áloperált; b  $p<0,05$  vs IR-kontroll; c  $p<0,05$  vs áloperált.

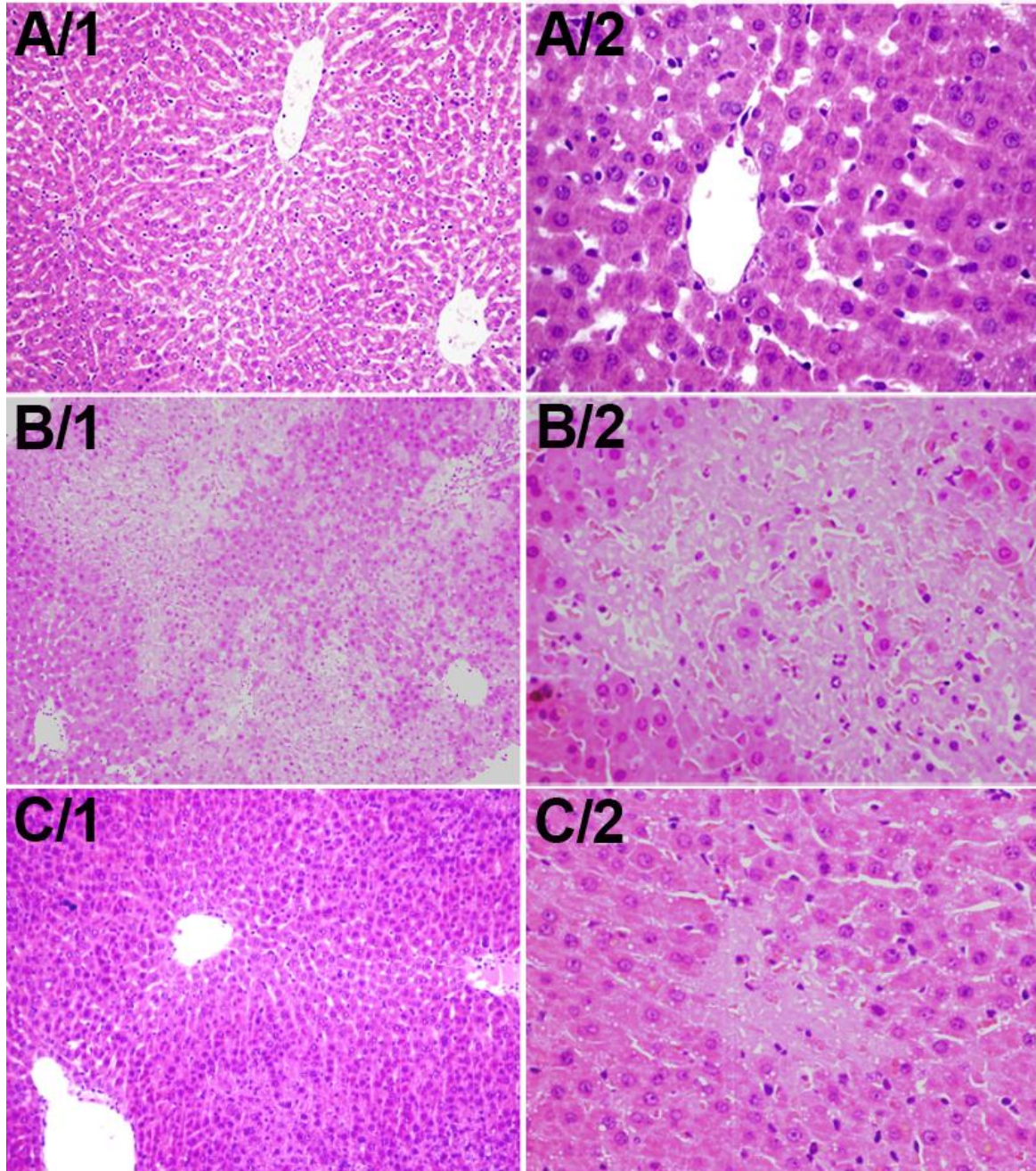
Az alkalmazott perkondicionálás során az alsó végtagi mikrocirkuláció karakterisztikus ingadozását tapasztaltuk (okklúzió során áramlás csökkenés, reperfúziós során áramlás növekedés). A reperfúzió alatt az I-PerC csoport mikrokeringése szignifikánsan magasabb értéken stabilizálódott, mint az IR kontroll csoport értékei ( $p<0,05$ ).



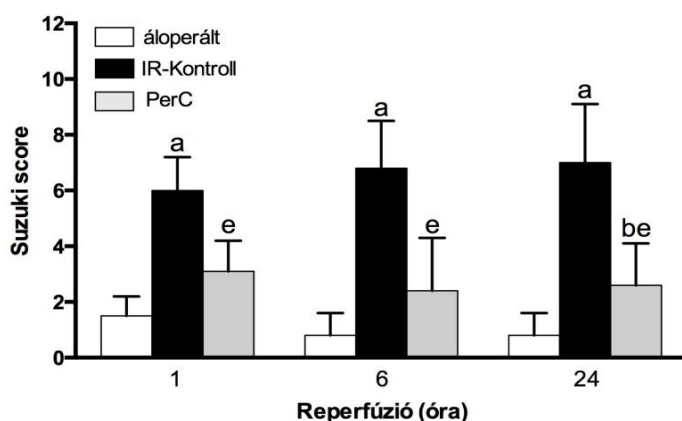
39. ábra A máj mikrocirkulációja a megfelelő kísérleti csoportok tekintetében. Magyarázat a szövegben.

### 5.9.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata

Az áloperált csoport metszetein említésre méltó patológiai elváltozás nem volt fellelhető. Egy óra reperfúziót követően az IR-kontroll csoportban jelentős szinuszoidális pangás volt látható. Ezzel szemben kifejezetten kedvezőbb szövettani képet találtunk az I-PerC csoport állataiban.



40. ábra Reprezentatív szövettani képek 1 óra ischaemiát és 6 óra reperfúziót követően. A. Áloperált csoport - jelentősebb szövettani eltérés nem látható. B. IR-kontroll csoport - kiterjedt centrolobularis nekrozisok figyelhetők meg. C. I-PerC csoport - csupán kisebb kiterjedésű necrotikus léziók láthatók. A/1, B/1, C/1: 200x; A/2, B/2, C/2: 400x.



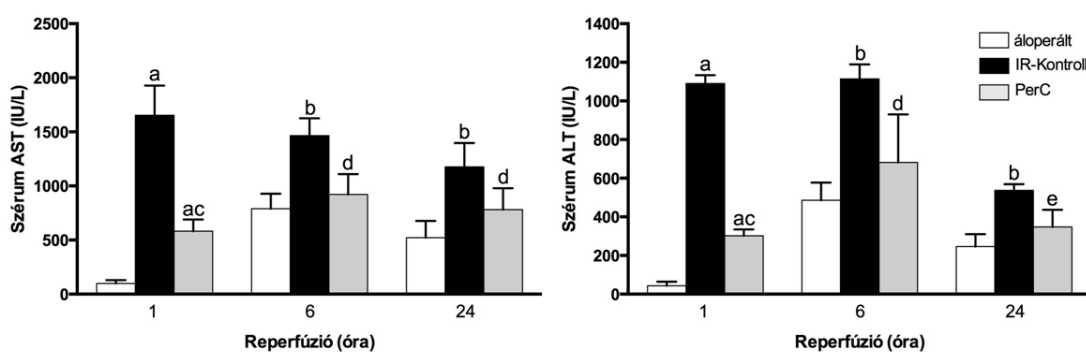
41. ábra Szöveti károsodás mértéke. a:  $p < 0,001$  versus áloperált; b:  $p < 0,01$  versus áloperált; e:  $p < 0,01$  versus IR-kontroll.

necrotikus zónákat detektáltunk az IR-kontroll csoportban. A károsodás mértékének tekintetében az I-PerC csoport elmaradt az IR-kontroll csoportban látottakhoz képest (40.; 41. ábra).

Hat óra reperfüzió jelentős kiterjedésű centrilobuláris necrotikus zónák megjelenését eredményezte az IR-kontroll csoport metszetein, míg az I-PerC csoportban csupán kisebb necrotikus területek voltak megfigyelhetők. A 24 óra reperfüzió után kitett állatok metszetei esetében kifejezett

#### 5.9.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

A mért transzamináz (ASAT, ALAT) értékek minden ischaemián átesett csoportban szignifikáns mértékben megemelkedtek. Ugyanakkor az ASAT, ALAT szintek az I-PerC csoportban szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkoztak az IR-kontroll csoporthoz képest minden vizsgált időtartamot követően (42. ábra).



42. ábra Szérum transzamináz szintek változása. a:  $p < 0,001$  versus áloperált; b:  $p < 0,01$  versus áloperált; c:  $p < 0,01$  versus IR-kontroll; d:  $p < 0,05$  versus IR-kontroll; e:  $p < 0,01$  versus IR-kontroll.

#### 5.9.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet)

Hat és 24 óra reperfüziót követően a májhomogenizátum kemilumineszcens intenzitása szignifikánsan csökkent az I-PerC csoportban az IR-kontroll csoporthoz képest, ugyanakkor az 1 órás reperfüziós csoportban mindez nem volt megfigyelhető. A májszöveti globális antioxidáns kapacitást jellemző redukáló képesség megőrzöttnek bizonyult az I-

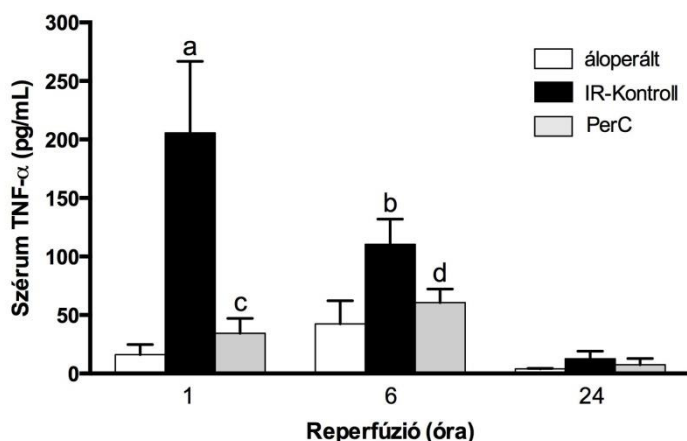
PerC csoportban összehasonlítva az IR-kontroll csoporttal. Az 1 órás reperfúziós időtartam kivételével minden időpontban szignifikánsan magasabb proteinhez kötött (SH-csoportok) és protein független ( $H^+$ -donor kapacitás) antioxidáns kapacitás értékeket mértünk az I-PerC csoportban az IR-kontroll csoporthoz képest (8. táblázat)

9. táblázat Redox homeosztázist jellemző paraméterek.

	Reperfúzió (óra)	Áloperált	IR-kontroll	I-PerC
Szabadgyök (RLU%)	1	0,05±0,02	0,14±0,02 a	0,16±0,05 a
	6	123,8±16,6	162,3±10,9 b	133,5±11,0 c
	24	137,3±23,6	182,0±14,0 a	141,7±18,7 c
Redukálóképes ség (µgAA/ml)	1	144,9±39,0	106,4±14,2 a	116,6±17,5
	6	102,9±5,4	76,4±8,0 a	86,4±4,6 a
	24	90,6±6,8	55,2±11,8 b	76,1±11,9 c
SH-csoportok (µmol/L)	1	815,9±138,2	493,4±100,4 b	622,7±40,4 a
	6	456,1±97,7	249,7±82,6 a	455,1±101,4 c
	24	523,1±25,4	349,2±54,9 a	499,9±112,4 c
H-donor kapacitás (gátlás%)	1	84,6±8,8	68,8±10,3	84,1±11,8
	6	43,6±3,0	29,5±4,8 a	41,8±6,4 c
	24	46,4±19,7	16,4±7,3 a	37,9±5,1 c

RLU: relative light unit; a:  $p < 0,05$  versus áloperált; b:  $p < 0,01$  versus áloperált; c:  $p < 0,05$  versus IR-kontroll.

### 5.9.6. Szérum TNF- $\alpha$ szint meghatározása



43. ábra Szérum TNF- $\alpha$  szint változása. a:  $p < 0,001$  versus áloperált; b:  $p < 0,01$  versus áloperált; c:  $p < 0,01$  versus IR-kontroll; d:  $p < 0,05$  versus IR-kontroll.

Egy óra reperfúziót követően szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a TNF- $\alpha$  szintjében az I-PerC csoportban az IR-kontroll csoporthoz képest ( $p < 0,001$ ). Ugyancsak statisztikai szignifikanciát elérő eltérést láttunk a két IR károsodott csoport értékei között 6 óra reperfúziót követően ( $p < 0,05$ ). Egy nappal a máj reperfúziójának helyreállása

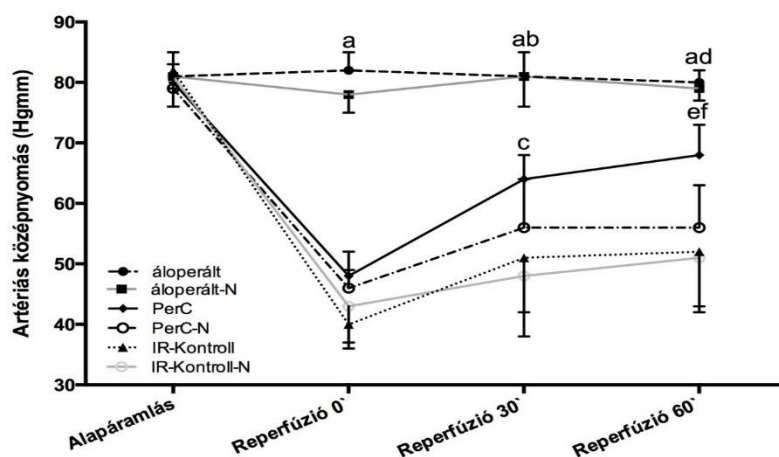
után nagymértékben csökkent TNF- $\alpha$  szinteket mértünk mindegyik kísérleti csoportban (43. ábra).

## 5.10. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata és a távoli szervi perkondicionálás (I-PerC) neurális hatásmechanizmusának tanulmányozása

- 1 óra ischaemia + 24 óra reperfúzió, perkondicionálással -

### 5.10.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az ischaemiát megelőző artériás középnyomás értékek tekintetében nem volt szignifikáns különbség a kísérleti csoportok között. Az ischaemiás szakasz alatt nem



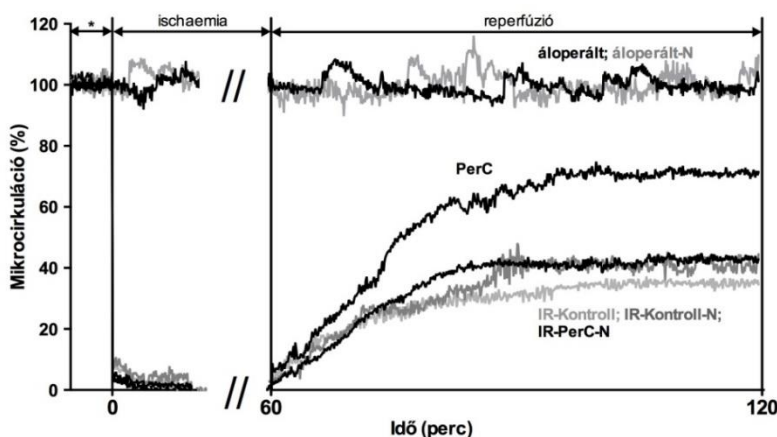
44. ábra Artériás középnyomás alakulása a reperfúzió első órájában. a:  $p < 0,001$  áloperált, áloperált-N versus IR-kontroll, IR-kontroll-N, I-PerC, I-PerC-N; b:  $p < 0,01$  áloperált, áloperált-N versus I-PerC; c:  $p < 0,05$  I-PerC versus IR-kontroll, IR-kontroll-N; d:  $p < 0,05$  001 áloperált, áloperált-N versus I-PerC; e:  $p < 0,01$  I-PerC versus IR-kontroll, IR-kontroll-N; f:  $p < 0,05$  I-PerC versus I-PerC-N.

találtunk érdemi eltéréseket a csoportok között. A reperfúziót követően egy jelentős vérnyomáscsökkenés (~35-40 Hgmm) volt látható mindegyik ischaemia-reperfúziós károsodást elszenvedett csoport esetében. A reperfúzió alatt az artériás középnyomás ugyan emelkedett az IR-kontroll csoportokban, de a 60 perces megfigyelés alatt nem érte el az áloperált csoport értékeit. A reperfúzió kezdete után 30 perccel az I-PerC csoport középnyomás értékei szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) magasabbak voltak az IR-kontroll csoporttal történő összehasonlításban. Egy órával a reperfúziót követően az I-PerC csoport artériás középnyomása szignifikánsan magasabbnak mutatkozott a megfelelő végtagi denervált csoporthoz képest (I-PerC-N) (44. ábra).

### 5.10.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

A kísérletek során nem találtunk szignifikáns különbséget az áloperált csoportok (áloperált, áloperált-N) mikrocirkulációjának tekintetében. A négy IR csoport





45. ábra Máj mikrocirkuláció

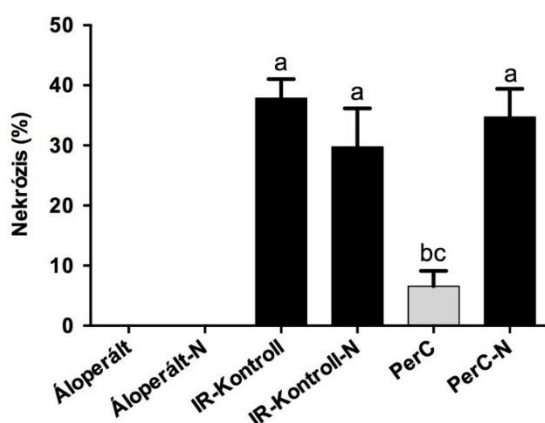
vonatkozásában szignifikánsan csökkent mikroeringési paramétereket detektáltunk az áloperált csoportokhoz képest. Mindazonáltal az I-PerC kezelés képes volt a reperfúziós terület és a plató maximum értékek szignifikáns javítására az IR-kontroll csoporttal történő összehasonlításban. Ezen előnyös változás nem volt megfigyelhető a végtagi denerváción átesett (I-PerC-N) csoportban (45. ábra, 10. táblázat).

10. táblázat Máj mikrocirkuláció

	álop.	álop.-N	IR-kont.	IR-kont.-N	I-PerC	I-PerC -N
<b>RA (%)</b>	100,78 ±1,79	99,45 ±1,32	28,59 ±13,61 a	30,58 ±16,24 a	55,89 ±14,18 bc	32,62 ±12,99 a
<b>MP (%)</b>	97,98 ±4,75	98,83 ±3,43	34,95 ±15,44 a	40,01 ±15,27 a	71,11 ±16,52 bc	42,89 ±8,81 a

a:  $p < 0,001$  versus áloperált, áloperált-N; b:  $p < 0,01$  versus áloperált, áloperált-N; c:  $p < 0,05$  versus IR-kontroll, IR-kontroll-N, I-PerC-N

### 5.10.3. Máj fénymikroszkopos vizsgálata (morfometria)

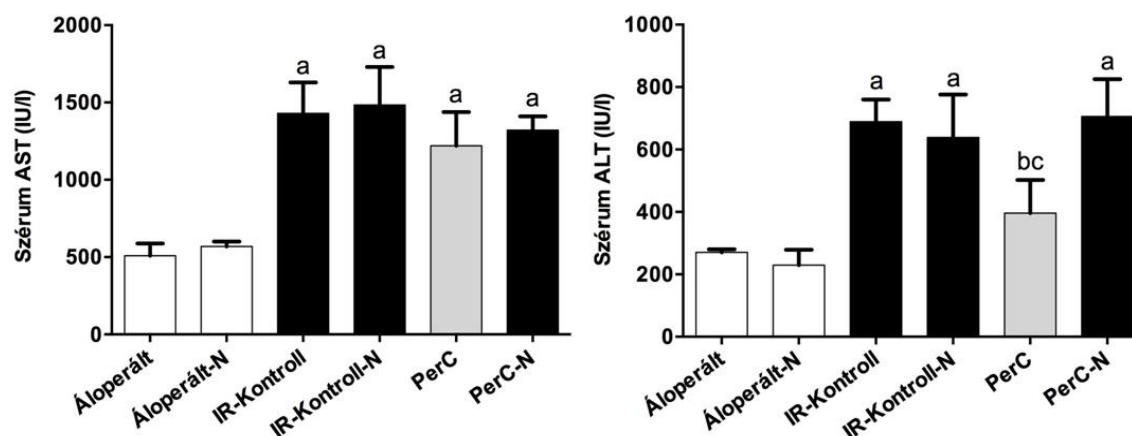


46. ábra a:  $p < 0,01$  versus áloperált áloperált-N; b:  $p < 0,05$  versus áloperált, áloperált-N; c:  $p < 0,05$  versus IR-kontroll, IR-kontroll-N, I-PerC-N.

Feltűnő szövettani eltérések az áloperált csoport (áloperált, áloperált-N) állatainak metszetein nem voltak megfigyelhetőek. A necrosis morfometria vizsgálata szerint a perkondicionálás képes volt csökkenteni a szöveti károsodás mértékét az IR-kontroll csoportokkal összehasonlítva ( $p < 0,01$ ). A kondicionálást megelőző idegátmetszés (I-PerC-N) szignifikánsan magasabb májszöveti károsodást eredményezett az I-PerC csoporttal összehasonlítva ( $p < 0,01$ ) (46. ábra).

#### 5.10.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

Huszonegy óra reperfüziót követően az IR károsodott csoportok szérumszörum transzamináz értékei szignifikánsan emelkedettek voltak. Az ALAT vonatkozásában szignifikánsan magasabb ( $p < 0,01$ ) szinteket mértünk az IR, IR-N, és I-PerC-N csoportban az áloperált és áloperált-N csoportokkal összehasonlítva. Az I-PerC csoport tekintetében a szérumszörum ALAT emelkedése szignifikánsan enyhébb volt, mint a további három IR károsodott csoport esetében. Az ASAT felszabadulási karakterisztikája mindentől eltérőnek bizonyult, egy szignifikáns emelkedés ( $p < 0,01$ ) volt látható mindegyik IR károsodott csoportban az áloperált csoportokhoz képest. Mindazonáltal az I-PerC kezelésnek nem volt hatása az ASAT szintekre (47. ábra).



47. ábra Szérumszörum transzamináz szintek meghatározása. a:  $p < 0,01$  versus áloperált, áloperált-N; b:  $p < 0,05$  versus áloperált, áloperált; c:  $p < 0,05$  versus IR-kontroll, IR-kontroll-N, I-PerC-N.

#### 5.10.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet)

A kemilumineszcens intenzitás és ezzel arányosan a szöveti szabadgyök tartalom 24 óra reperfüziót követően szignifikánsan emelkedettnek bizonyult mindegyik ischaemia-reperfüzióban részesült csoportban az áloperált csoportokhoz képest. Ugyanakkor, az I-PerC kezelés képes volt erőteljes csökkenést elérni a májhomogenizátumban mért szabadgyök szintek tekintetében a további három IR csoporthoz képest ( $p < 0,01$ ). Egy bonyolultabb mintázat volt látható a különböző szöveti antioxidáns kapacitásról tájékoztató paraméterek tekintetében. A globális redukálóképesség értéke szignifikánsan lecsökkent az IR-kontroll, IR-kontroll-N, I-PerC-N csoportokban az áloperált állatok értékeihez képest ( $p < 0,01$ ). Az I-PerC csoportban egy megőrzöttebb globális antioxidáns védelmi vonal volt megfigyelhető a további három IR csoporttal összehasonlítva ( $p < 0,01$ ).

11. táblázat Redox homeosztázist jellemző paraméterek.

	álop.	álop.-N	IR-kont.	IR-kont.-N	I-PerC	I-PerC-N
<b>Szabadgyök (RLU%)</b>	6,4 ±10,5	6,9 ±11,7	229,2 ±16,1 <sup>a</sup>	202,3 ±20,3 <sup>a</sup>	131,8 ±20,8 <sup>ab</sup>	194,9 ±16,7 <sup>ac</sup>
<b>Redukálóképesség (µgAA/ml)</b>	181,3 ±20,3	171,6 ±9,2	128,8 ±11,9 <sup>d</sup>	134,6 ±9,0 <sup>d</sup>	163,4 ±12,8 <sup>ef</sup>	131,3 ±13,6 <sup>d</sup>
<b>SH-csoportok (µmol/L)</b>	964,6 ±108,3	927,9 ±89,7	480,9 ±80,9 <sup>a</sup>	486,8 ±138,5 <sup>a</sup>	768,8 ±92,8 <sup>gh</sup>	594,3 ±74,9 <sup>a</sup>
<b>H<sup>+</sup>-donor kapacitás (gátlás%)</b>	65,7 ±5,2	63,9 ±9,4	47,4 ±6,5 <sup>d</sup>	45,7 ±9,6 <sup>d</sup>	59,8 ±7,5 <sup>f</sup>	56,4 ±6,7

RLU - relative light unit; a:  $p < 0,001$  versus áloperált, áloperált-N; b:  $p < 0,01$  versus IR-kontroll, IR-kontroll-N, I-PerC-N; c:  $p < 0,05$  versus IR-kontroll, d:  $p < 0,01$  versus áloperált, áloperált-N; e:  $p < 0,01$  versus IR-kontroll, I-PerC-N; f:  $p < 0,05$  versus IR-kontroll-N; g:  $p < 0,05$  versus áloperált; h:  $p < 0,01$  versus IR-kontroll, IR-kontroll-N

Megjegyzendő, hogy a szöveti redox-homeosztázisról globálisan tájékoztató paraméterek (luminometria, redukálóképesség) tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget az I-PerC-N és az IR-kontroll, IR-kontroll-N csoportok között. A fehérjétől független antioxidánsok szintjén egy szignifikáns ( $p < 0,01$ ) H<sup>+</sup>-donor kapacitás csökkenés volt látható az IR-kontroll és IR-kontroll-N csoportokban az áloperált csoportokhoz képest. Az I-PerC csoportra jellemző H<sup>+</sup>-donor kapacitás értékek szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) magasabbak voltak az IR-kontroll-N csoporthoz képest, az IR-kontroll csoporttal összevetve viszont nem volt szignifikáns az eltérés ( $p = 0,062$ ). Az I-PerC és I-PerC-N csoportokra jellemző H<sup>+</sup>-donor kapacitás értékek nem különböztek szignifikánsan sem egymástól, sem pedig az áloperált csoportok értékeitől. Részben hasonló mintázat volt látható a thiol-csoportok mérése kapcsán is. A végtagi denerválás nem eredményezett szignifikáns csökkenést a thiol-csoportok értékeiben ( $p = 0,079$ ). Mindazonáltal elmondható, hogy az I-PerC-N csoport értékei nem tértek el jelentősen ( $p > 0,05$ ) az IR-kontroll és IR-kontroll-N csoportra jellemző átlagtól (11. táblázat).

### 5.11. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - Levosimendan előkezelés vizsgálata

- 1 óra ischaemia + 6 óra reperfúzió, levosimendannal -

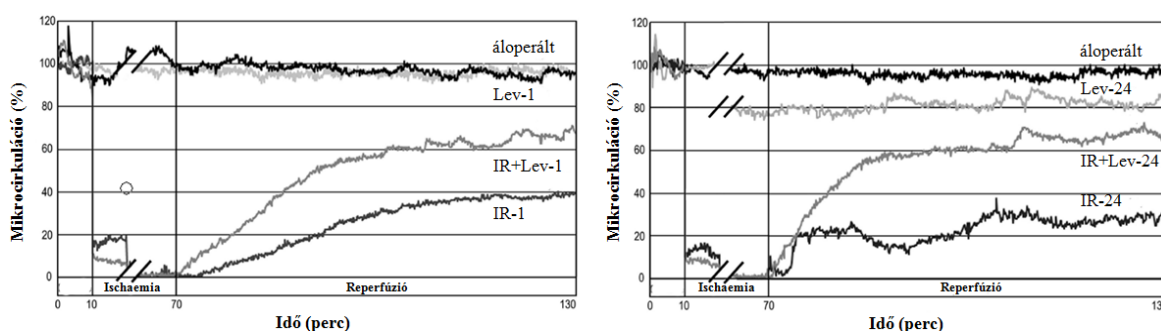
#### 5.11.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az egyszerű áloperált csoportban az artériás középnyomás nem változott számottevően a vizsgált időszakban. Levosimendan adagolás során fokozatos

vérnyomáscsökkenés volt megfigyelhető az áloperált állatokhoz képest. A 60 perces ischaemia alatt a vizsgált hemodinamikai paraméterek egyik csoportban sem változtak szignifikánsan az azt közvetlenül megelőző értékekhez képest. A reperfúzió kezdetén az IR-kontroll csoportokban szignifikáns vérnyomásesés volt megfigyelhető. Ezek mélypontja kb. 5-10 perccel a reperfúzió kezdete utánra tehető, majd a vérnyomás lassú normalizálódásnak indult, de egy órán belül nem érte el teljesen az ischaemia előtti értékeket. A levosimendan kezelt csoportokban a reperfúzió kezdetén tapasztalható vérnyomásesés nem volt szignifikáns az ischaemia előtti értékekhez képest és a reperfúzió első órájának végére ismét elérte azt. A különböző latenciájú előkezelések (IR+Lev-1, IR+Lev-24) tekintetében ezen dinamikát illetően nem mutatkozott különbség.

### 5.11.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

Az áramlási görbéi alapján mind a műtét előtt közvetlenül (IR+Lev-1), mind a 24 órával korábban végzett (IR+Lev-24) levosimendan előkezelés szignifikáns javulást eredményezett a májszövet mikrocirkulációjában a megfelelő IR-kontroll csoporthoz képest (48. ábra).

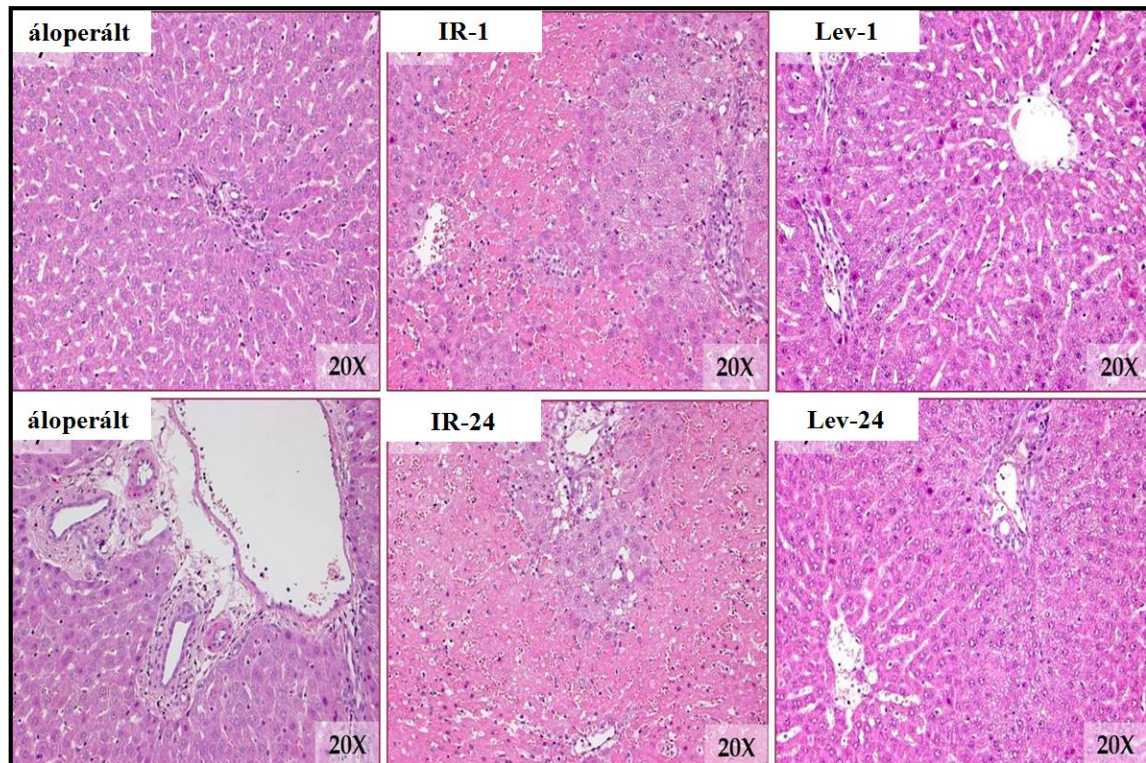


48. ábra Máj mikrocirkuláció 1 órás levosimendan előkezelést követően (bal), illetve 24 órás levosimendan előkezelés után (jobb).

### 5.11.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (HE, Sudan IV, TUNEL, PARP)

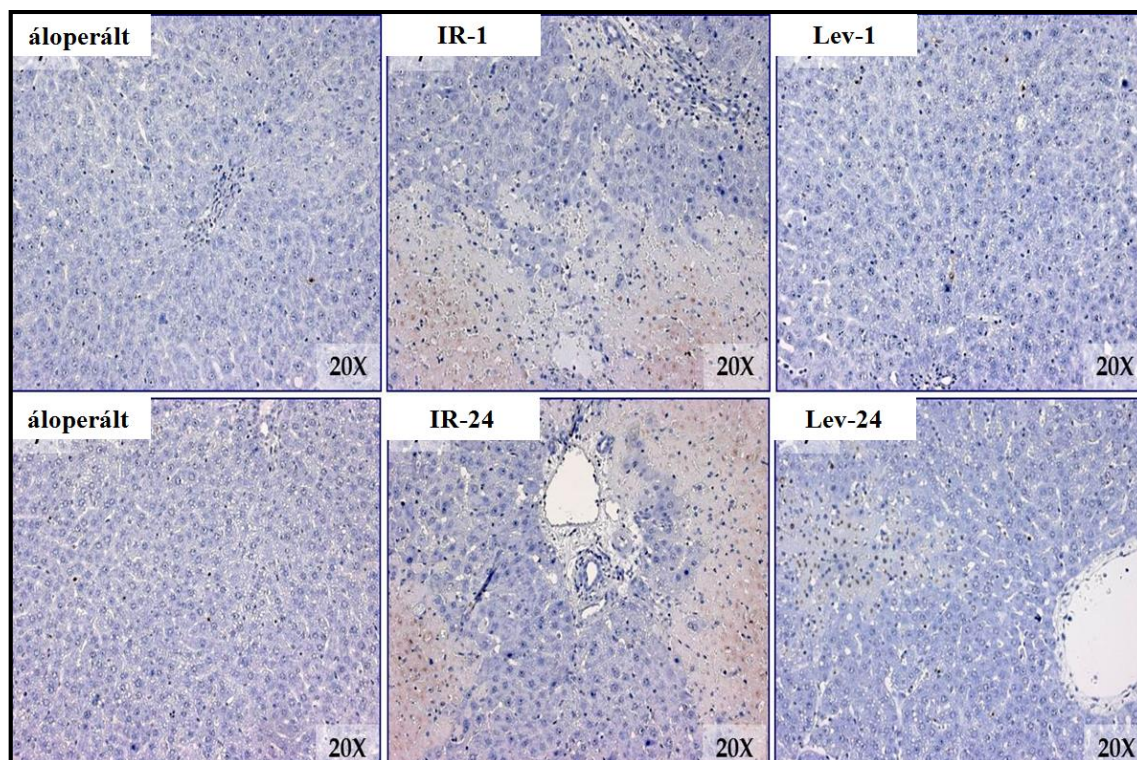
Az áloperált csoportokban normál szöveti kép volt megfigyelhető, helyenként enyhe szinuszoidális tágulattal. Az IR-kontroll csoportban (IR-1) összefüggő területeket érintő, jelentős mértékű necrosis jött létre. Jellemző volt ezen területek kifejezett leukocytás beszűrődése és helyenként bevérzések is mutatkoztak (score: 11,6 pont). A levosimendannal kezelt állatok esetében (IR+Lev-1) ehhez képest látványosan kevesebb, karakterét tekintve inkább fokális necrotikus területek mutatkoztak a reperfúzió 24. órájának végén. Ennek megfelelően szöveti bevérzés nem volt jellemző, és a leukocytás beszűrődés is kisebb mértékű volt (score: 7,8 pont;  $p=0,089$  versus IR-1). Az ischaemiát 24 órával megelőző

előkezelést követően az IR-kontroll csoport (IR-24) metszeteiben nagy, összefüggő területeket érintő, számos helyen bevérzett necrosis mutatkozott, számottevő leukocytás beszűrődés kíséretében (score: 12,3 pont). A 24 órával korábbi levosimendan kezelt (IR+Lev-24) csoportban egy-egy nagyobb kiterjedésű necrotikus terület mellett inkább fokálisan megjelenő sejtelhalás volt jellemző. Az IR-kontroll állatokhoz képest csupán kisebb mértékű szöveti bevérzés és enyhébb gyulladásos beszűrődés alakult ki (score: 7,9 pont;  $p=0,021$  versus IR-24) (49. ábra).



49. ábra Reprezentatív máj szövettani képek (HE, 20x)

Az IR károsodott csoportokban, a HE-festett szövettani metszeteken látható necrotikus zónáknak megfelelően különböző kiterjedésű, diffúz TUNEL-pozitivitású területek ábrázolódtak. Mind az 1 órás, mind a 24 órás levosimendan előkezelést követően megfigyelhető volt ezen demarkálódott területek kiterjedésének szignifikáns csökkenése az adott kategória IR-kontroll csoportjával szemben ( $p<0,05$ ). Az áloperált állatok esetében demarkációra utaló festődést nem találtunk (50. ábra, 12. táblázat).



50. ábra Reprezentatív máj szövettani képek (TUNEL immunfestés, 20x).

Mindkét kezelési időablak esetén a szummációs PAR-pozitivitás szignifikáns csökkenését láttuk a levosimendan kezelt csoportokban ( $p < 0,05$ ) (12. táblázat).

12. táblázat TUNEL és PAR immunfestést jellemző értékek.

	álop.	Lev-1	IR-1	IR+Lev-1	Lev-24	IR-24	IR+Lev-24
<b>TUNEL pozitív területek arány (%)</b>	0	0	5,7±0,9	1,2±0,6*	0	15,7±1,3	1,2±0,7*
<b>PAR pozitív területek arány (%)</b>	-	-	6,3±0,8	1,5±0,3*	-	17,3±1,9	1,6±0,5*

\*  $p < 0,05$  versus IR-kontroll

#### 5.11.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

Az alanin-aminotranszferáz szérumszintje az áloperált csoportok esetében a normál tartományon belül mozgott, míg IR károsodást követően szignifikánsan magasabb értékeket ért el. Levosimendan kezelést követően mind a két kezelési időablakban szignifikánsan csökkent a szérum transzamináz szint a megfelelő IR-kontroll csoportokhoz képest. Az aszpartát-aminotranszferáz szérumszintje minden csoportban meghaladta a normál értéket. Feltűnő, hogy a műtét előtt 24 órával előkezelt IR károsodott csoportokban elért

szérumszintek jóval magasabbnak adódtak a 1 órás előkezelt csoportokhoz képest. A 24 órás levosimendan előkezelést követően kialakuló ASAT-emelkedés ugyanakkor szignifikánsan alacsonyabb a kezelési ablak IR-kontroll csoportjában tapasztalható képest.

### 5.11.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet)

A luminometriás össz-scavenger kapacitás tekintetében mind a szérum, mind májhomogenizátum mintákból végzett vizsgálatok eredményei a szabadgyök koncentráció szignifikáns emelkedésére utalnak az IR károsodott csoportokban az áloperált csoportokhoz képest.

13. táblázat Redox homeosztázist jellemző paraméterek.

		álop.	Lev-1	IR-1	IR+Lev-1	Lev-24	IR-24	IR+Lev-24
luminometria	szérum (RLU)	4,38 ±1,68	4,4 ±2,15	12,07 ±2,77	8,51 ±2,62*	3,77 ±3,03	9,69 ±2,35	6,71 ±3,74
	máj (RLU)	21,25 ±1,95	28,35 ±18,55	82,15 ±13,24	66,73 ±4,63	24,39 ±6,74	75,12 ±17,15	56,34 ±7,34
szabad SH-csoportok (mmol/L)	sz	-	0,043 ±0,018	0,023 ±0,007	0,030 ±0,007	0,045 ±0,006	0,023 ±0,009	0,034 ±0,019
	m	0,077 ±0,02	0,063 ±0,015	0,041 ±0,011	0,061 ±0,018*	0,055 ±0,008	0,043 ±0,016	0,051 ±0,012*
H-donor kapacitás (inhib, %)	sz	-	64,01 ±8,95	40,66 ±9,38	51,28* ±7,03	58,01 ±9,20	38,75 ±8,02	47,83 ±11,05
	m	44,35 ±4,95	40,94 ±6,33	14,77 ±2,61	18,68 ±3,52	45,37 ±6,96	18,74 ±2,49	23,13 ±4,48
redukáló képesség (AAE)	sz	-	0,38 ±0,23	0,54 ±0,13	0,79 ±0,20*	1,13 ±0,53	0,66 ±0,34	1,08 ±0,13*
	m	393,6±45,3	266,4 ±34,0	148,6 ±41,1	220,1 ±22,5*	317,8 ±16,6	207,4 ±27,5	248,7 ±36,4

RLU - relative light unit; sz - szérum; m - máj; \* p<0,05 versus megfelelő IR csoport

Az IR-kontroll csoportokkal összevetve a levosimendan adását követően a májhomogenizátumban kemiluminometriával mérhető szabadgyökök mennyisége mind a

két kezelési időablakban csökkenő tendenciát mutatott. A szérummintákban 24 órás előkezelés esetében szintén csökkenő tendenciát látunk, míg az 1 órás előkezelést követően szignifikánsan jobb antioxidáns kapacitás valószínűsíthető a levosimendan csoportban az IR-kontroll csoporthoz képest ( $p=0,03$ ).

A szérum redukáló képesség értéke mindkét időablakban szignifikánsan javult levosimendan kezelést követően az IR-kontroll csoportokhoz képest. A májhomogenizátum minták vonatkozásában a javulás csak az 1 órás előkezelésre nézve mutatkozott szignifikánsnak ( $p=0,01$ ). A fehérjékhez kötött antioxidáns tulajdonságra utaló szabad SH-csoportok esetében a májhomogenizátum mintákban tapasztaltunk szignifikáns javulást a levosimendan kezelt csoportokban az IR-kontroll csoportokhoz képest, míg a szérummintákban csupán javuló tendencia volt látható. A fehérjétől független antioxidáns kapacitást jelző  $H^+$ -donor aktivitás az 1 órás levosimendan kezelést követően mutatott szignifikáns javulást a szérumban ( $p=0,048$ ), míg a májhomogenizátumban, illetve a 24 órás kezelés esetében csupán javuló tendenciát láttunk (13. táblázat).

#### **5.11.6. HSP-72 szint meghatározása**

Az ischaemia-reperfúzió átesett csoportok mindegyikében a HSP-72 expresszió szignifikáns – áloperált csoportokhoz képest 2-3x-os – emelkedését tapasztaltuk. A levosimendan kezelés sem önmagában, sem IR károsodás előtt alkalmazva nem eredményezett változást a HSP-72 expresszió mértékében.

#### **5.11.7. Életképesség meghatározás (NBT)**

Az NADH-tetrazolium enzimhisztokémiai reakció, azaz NBT-enzimhisztokémia, a szöveti életképességre utal a funkcionáló mitokondriumok kimutatásán keresztül. A „hosszú latenciával” előkezelt áloperált csoportban szignifikánsan alacsonyabb arányban voltak jelen funkcionáló mitokondriumok, mint az egyszerű áloperált állatok esetében ( $p=0,024$ ), míg a „rövid latenciájú” áloperált csoport csak csökkenő tendenciát mutatott ( $p=0,104$ ). Ezen túlmenően, minden „hosszú latenciájú” IR károsodott csoport szignifikánsan alacsonyabb festődést mutatott az azonos kezelésben részesült „rövid latenciájú” csoporthoz képest ( $p<0,05$ ). Ez direkt módon utal a csökkent májszöveti viabilitásra a „hosszú latenciával” kezelt csoportokban. Az IR károsodott csoportokat összehasonlítva azt találtuk, hogy a műtét előtt 24 órával adott levosimendan kezelést követően szignifikánsan nőtt az NBT-pozitív területek aránya ( $p=0,003$ ) az IR kontroll csoporthoz képest, míg a közvetlenül műtét előtt



alkalmazott levosimendan előkezelés esetében javuló tendencia volt megfigyelhető ( $p=0,14$ ).

## 5.12. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - "Rövid latenciájú" glutamin előkezelés (Glu-R) vizsgálata

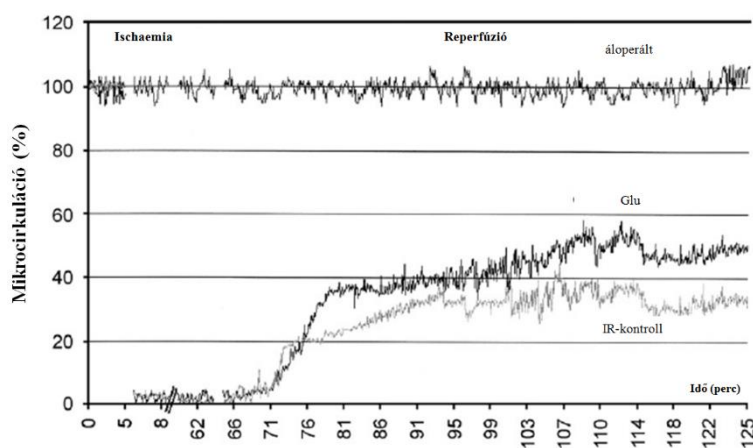
- 1 óra ischaemia + 6 óra reperfúzió, glutaminnal -

### 5.12.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az áloperált csoport esetében az artériás középnyomás nem mutatott számottevő ingadozást a vizsgált időszakban. Az IR-kontroll és a Glu-R csoportban az ischaemia során nem jött létre szignifikáns változás a szisztémás hemodinamikai paraméterekben. A reperfúzió kezdetén azonban mindkét csoportban szignifikáns vérnyomásesés volt tapasztalható.

### 5.12.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

Az áloperált állatok májmikrocirkulációja számottevő mértékben nem változott a kísérlet alatt. Az IR-kontroll csoportban szignifikáns mikrocirkulációs károsodás volt megfigyelhető a reperfúzió alatt az áloperált állatok értékeihez viszonyítva. A glutamin



51. ábra Máj mikrocirkuláció.

( $\pm 2$ ) ; 35 ( $\pm 9$ )\* ; 50 ( $\pm 15$ )# , ahol \*  $p<0,05$  IR vs áloperált; #  $p<0,05$  Glutamin vs IR-kontroll (51. ábra).

előkezelés szignifikáns mértékben képes volt javítani a máj keringését az IR-kontroll csoporthoz képest, mely alapjául a mért eredmények szolgálnak (áloperált, IR-kontroll, Glu-R): Reperfúziós terület: 101,1 ( $\pm 4$ ) ; 30,3 ( $\pm 11$ )\* ; 53 ( $\pm 14$ )# és plató maximum: 99,5

### **5.12.3. Máj metszeteinek fénymikroszkopos vizsgálata (HE, TUNEL, caspase-3)**

A metszetek elemzése alapján az áloperát csoport állatainak májában károsodásra utaló eltérések nem voltak láthatók. Az IR-kontroll csoportban vénatágulat, periportális neutrophyl infiltráció, vacuolas degeneráció és főleg centrilobuláris lokalizációjú fokális necrosis jelei voltak megfigyelhetőek (score: 19 pont). A Glu-R csoportban csökkent a gyulladáshoz vezető sejtes beszűrődés és a szöveti destrukció mértéke. Necrosisra utaló jelek gyakorlatilag nem mutatkoztak a metszeteken, inkább apoptotikus Councilman-testeknek imponáló, zsugorodott sejtek jelentek meg a súlyosabban károsodott területeken (score: 14 pont;  $p < 0,05$  versus IR-kontroll).

TUNEL-immunhisztokémia segítségével az áloperált csoportban tapasztalt 1,6 % pozitív sejt arány megfelel az érintetlen szövetek vizsgálata során detektált adatoknak. Az IR-kontroll csoportban a necrotikus területek kihagyásával a megszámlált sejtek 26,5 %-e mutatott TUNEL-pozitivitást, a Glu-előkezelte csoportban ez az arány valamelyest magasabb: 31,9 %. Szignifikáns különbség nem alakult ki a csoportok között. Ezzel szemben, az apoptosis specifikus markereként használt aktív caspase-3 immunhisztokémia alapján szignifikánsan több apoptotikus sejt valószínűsíthető a glutamin-előkezelte csoportban (28,9 %), az IR-kontroll csoporthoz (15,4 %) képest.

### **5.12.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)**

Az ischaemia-reperfúzió áteső állatokban a szérumban a transzamináz szintek szignifikáns mértékben megemelkedtek az áloperált csoport értékeihez képest. A glutamin előkezelés szignifikáns mértékben képes volt csökkenteni a fenti változást ( $p = 0,045$ ).

### **5.12.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérumban)**

Az antioxidáns státuszról összességében elmondható, hogy glutamin kezelést követően javulás volt tapasztalható az IR-kontroll csoporthoz képest. Ez kiválóan tükröződik a globális májszöveti antioxidáns státuszt vizsgáló luminometriás össz-scavenger kapacitás tekintetében ( $p = 0,03$ ). A Glu-R csoport májhomogenizátum mintáiban szignifikánsan kisebb arányban kimutatott szabadgyökök háttérében elsősorban a szabad SH-csoportok koncentrációjának szignifikáns emelkedése ( $p = 0,039$ ) állhat, míg a  $H^+$ -donor kapacitás és a teljes redukáló képesség tekintetében csupán javuló tendenciát volt látható. A szérumban a teljes antioxidáns kapacitását vizsgáló paraméterek közül a teljes redukáló képesség ( $p = 0,042$ ) és a szabad SH-csoportok ( $p = 0,037$ ) tekintetében szignifikáns javulást tapasztaltunk a glutamin

előkezelt csoportban, míg a H<sup>+</sup>-donor kapacitás esetében javuló tendenciát mutatkozott (14. táblázat).

14. táblázat Redox homeosztázist jellemző paraméterek.

	Áloperált		IR-kontroll		Glu-R	
	Szérum	Máj	Szérum	Máj	Szérum	Máj
<b>luminometriás össz-scavenger kapacitás (RLU)</b>	-	0,476 ±0,065	-	12,765 ±0,768	-	8,147 ±0,960
<b>redukáló képesség (AAE)</b>	1,123 ±0,053	189,2 ±16,23	0,55 ±0,02	93,1 ±14,3	0,98 ±0,026	104,1 ±17,40
<b>H-donor kapacitás (inhib. %)</b>	36,45 ±4,76	53,31 ±3,18	46,21 ±4,63	38,21 ±4,12	50,582 ±7,23	41,94 ±1,12
<b>szabad SH-csoportok (mmol/L)</b>	0,870 ±0,09	3,89 ±0,6	0,321 ±0,045	1,65 ±0,3	1,487 ±0,086	2,275 ±0,084

#### 5.12.6. TNF- $\alpha$ -szint meghatározása

A szérumban detektált TNF- $\alpha$ -szint glutamin kezelést követően (12,3±4,8 pg/ml) alacsonyabbnak bizonyult az IR-kontroll csoport értékeihez (16,78±5,8 pg/ml) képest, szignifikancia nem igazolódott.

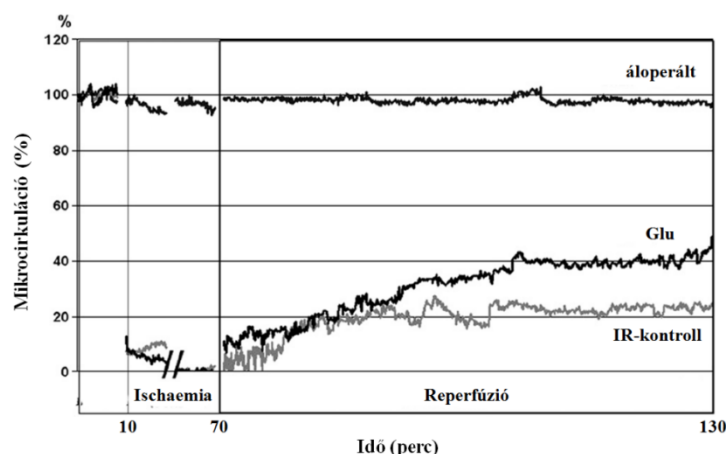
### 5.13. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - "Hosszú latenciájú" glutamin (Glu-H) előkezelés vizsgálata

#### 5.13.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az áloperált csoport esetében az artériás középnyomás nem mutatott számottevő ingadozást a vizsgált időszakban. Az IR-kontroll és a Glu-H csoportban az ischaemia során nem jött létre szignifikáns változás a szisztémás hemodinamikai paraméterek tekintetében. A reperfúzió kezdetén mindkét csoportban szignifikáns vérnyomáscsökkenés volt tapasztalható ( $p_{IR}=0,035$ ;  $p_{Glu-H}=0,039$ ). Később az artériás középnyomás folyamatos lassú emelkedésnek indult. Értéke az első óra végére megközelítette a kiindulási középnyomás értékét. Az IR-kontroll és Glu-H csoport között szignifikáns eltérés nem mutatkozott.

### 5.13.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

Az áloperált állatok májának mikrocirkulációja a vizsgálat egész időtartama alatt konstansnak mutatkozott. Az ischaemia előtti alapáramlás tekintetében nem tapasztaltunk különbséget az egyes csoportok között. Ugyanez mondható el az ischaemiás áramlásról az IR-kontroll és a Glu-H csoportok esetében. Az ischaemia-reperfúzió átesett csoportok mikrocirkulációja a reperfúzió alatt az áloperált csoport értékeihez képest erősen szignifikánsan alacsonyabbnak adódott ( $p < 0,01$ ). Ugyanakkor a reperfúziós görbéket összehasonlítva, a Glu-H csoportban javuló tendenciát láttunk az IR-kontroll csoporthoz

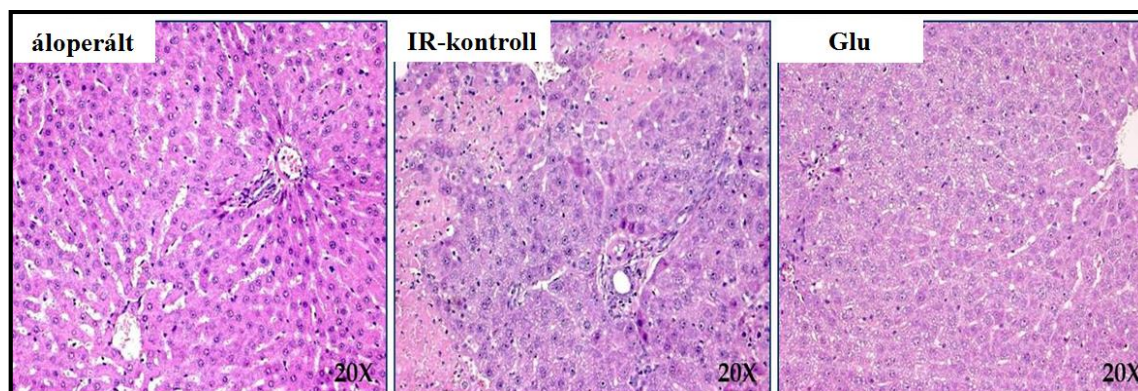


52. ábra Máj mikrocirkuláció.

képest (RT:  $p=0,096$ ;  $PM_{10}$ :  $p=0,084$ ) (49. ábra). Ezen eredmények rendre (áloperált, IR-kontroll, Glu-H): Reperfúziós terület:  $98,2 \pm 3,8$  ;  $19,3 \pm 4,4^*$  ;  $30,8 \pm 19,4\#$  és plató maximum:  $97,4 \pm 5,2$  ;  $23,2 \pm 11,4^*$  ;  $40,9 \pm 27,5\#$ , ahol \*  $p < 0,05$  IR vs áloperált; #  $p < 0,05$  Glutamin vs IR-kontroll (52. ábra).

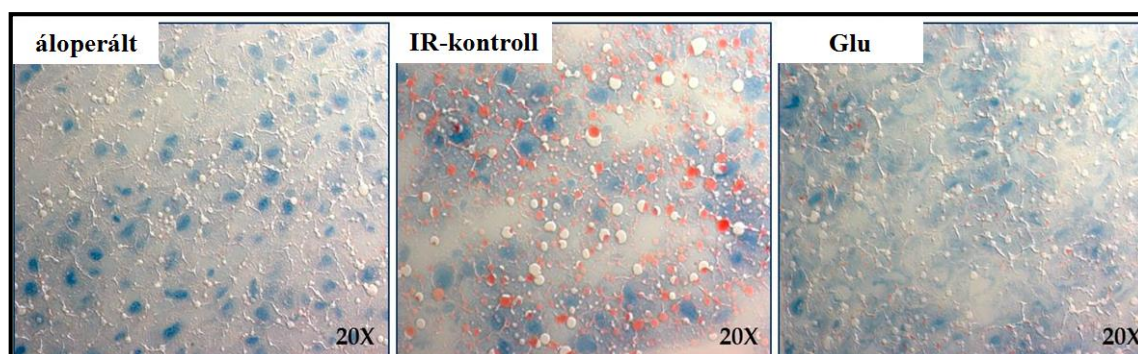
### 5.13.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (HE, Sudan IV, TUNEL, PARP)

Az áloperált csoport szövettani metszetei károsodást nem, vagy csak igen enyhe szinuszoidális tágulat formájában mutattak. Az IR-kontroll csoportban jelentős mértékű szöveti degeneráció volt megfigyelhető, melyek fő jellemzőiként intracelluláris vacuolizáció, periportális neutrophyl infiltráció, szöveti bevézés, valamint necrosis volt megfigyelhető (score: 12,4 pont). A Glu-H csoport esetében a szöveti károsodás szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott az IR-kontroll csoporthoz képest (score: 10,2 pont,  $p = 0,047$ ) (53. ábra).



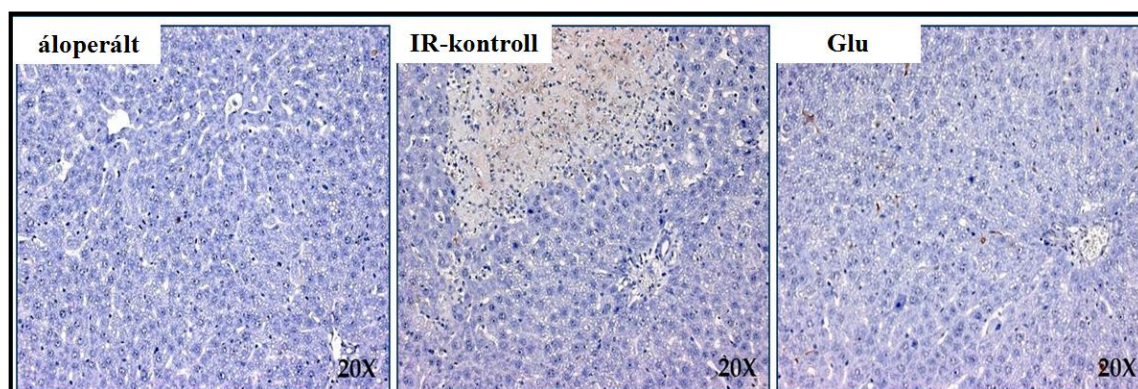
53. ábra Reprezentatív máj szövettani képek (HE, 20x).

A zsíros degeneráció kimutatására Sudan IV festést végeztünk. A Glu-H csoportban jelentősen kisebb területek mutattak érintettséget az IR-kontroll csoporthoz képest, míg az áloperált csoportban pozitív festődés csak elszórtan volt látható (54. ábra).



54. ábra Reprezentatív máj szövettani képek (Sudan IV festés, 20x).

A TUNEL pozitívításnak megfelelően jól elkülönülő, demarkált területek kiterjedése számítógépes analízis segítségével számszerűsíthető: méretüket a vizsgált teljes lebenyterület százalékos arányában fejeztük ki. Míg az áloperált csoportban nem jött létre demarkáció (0%), az IR-kontroll csoportban kiterjedt pozitív festődést mutató területek jelentek meg (14,9%). A Glu-H csoportban a demarkált területek aránya szignifikánsan kisebbnek mutatkozott (4,2%;  $p=0,023$ ) (55. ábra).



55. ábra Reprezentatív máj szövettani képek (TUNEL immunfestés, 20x).

A poly-ADP-ribóz polimeráz (PARP) immunfestés alapján az áloperált csoportban különálló sejtekben igen ritkán jelent meg PAR-pozitivitás (0%), míg az ischaemián átesett csoportokban kiterjedt pozitív területek mutatkoztak. Ugyanakkor a Glu-H csoportban szignifikánsan kisebb volt a demarkálódott területek mérete (IR-kontroll: 16,9%; Glu-H: 4,8%;  $p=0,027$ ). A PAR-pozitív területek mérete jól korrelált a TUNEL reakcióval kapott eredményekkel.

#### **5.13.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)**

Az ALAT szérumaktivitása a glutamin előkezelt és az IR-kontroll csoportban egyaránt erősen szignifikáns emelkedést mutatott az áloperált csoporthoz képest ( $p<0,001$ ), míg a Glu-H csoportban szignifikánsan alacsonyabb értéket ért el, az IR-kontroll csoport értékeihez képest ( $p=0,042$ ). Az ASAT szérumszintje szintén szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott glutamin előkezelést követően, mint az IR-kontroll csoportban ( $p=0,044$ ).

#### **5.13.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum)**

A globális antioxidáns státuszt leíró paraméterek közül a luminometriás össz-scavenger kapacitás a glutamin előkezelés hatására mind a szérum-, mind a májhomogenizátum-mintákban szignifikánsan alacsonyabb volt az IR-kontroll csoporthoz képest. Az RLU értékek közötti különbség mértéke a szérum esetében szignifikánsnak ( $p=0,04$ ), míg a májhomogenizátum esetében erősen szignifikánsnak ( $p<0,001$ ) mutatkozott. A máj antioxidáns státuszának további vizsgálatára a homogenizátum mintákból végeztünk spektrofotometriás méréseket. Összefoglalóan elmondható, hogy glutamin előkezelés hatására szignifikánsan javult a szöveti redox homeosztázis. Az IR-kontroll csoporthoz képest a Glu-H csoportban szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a szabad SH-csoportok koncentrációjában ( $p<0,001$ ). A  $H^+$ -donor kapacitás szintén szignifikánsan magasabb volt a glutamin előkezelt csoportban, mint az IR-kontroll csoport esetében ( $p=0,02$ ). Ugyanakkor a májszöveti redukáló képesség nem mutatott szignifikáns javulást az IR-kontroll csoporthoz képest ( $p=0,08$ ) (15. táblázat).

15. táblázat Redox homeosztázist jellemző paraméterek.

		áloperált	IR-kontroll	Glu
luminometriás össz-scavenger kapacitás	szérum (RLU)	564219,9 ±230552,1	2698404,9 ±1300564,1	1102854,5 ±362887,8*
	máj (RLU)	545082,3 ±258924,5	4806672,5 ±647777,5	1906994,0 ±206511,0*
spektrofotometria	szabad SH- csoportok (mmol/L)	0,069 ±0,013	0,026 ±0,005	0,079 ±0,011*
	H-donor kapacitás (inhib. %)	42,2 ±5,0	34,3 ±4,5	41,4 ±2,1*
	redukáló képesség (AAE)	385,4 ±47,2	320,6 ±55,9	382,1 ±41,9

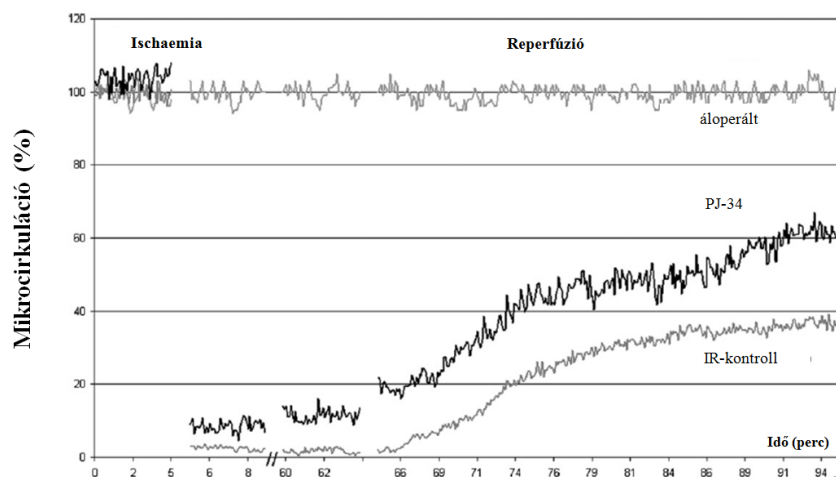
## 5.14. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - PJ-34 előkezelés vizsgálata

### 5.14.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az artériás középnyomás tekintetében az ischaemia előtt nem volt érdembeli különbség a vizsgálati csoportok között. A májkirekesztés szignifikáns középnyomás csökkenést eredményezett az IR-kontroll- és PJ-34 csoportokban. A reperfúzió alatt azonban mindkét csoport esetén helyreállt a kezdeti, ischaemiát megelőző artériás középnyomás.

### 5.14.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

A máj mikrocirkulációt tekintve nem volt számottevő különbség a vizsgálati csoportok között az ischaemiát megelőzően. A reperfúzió kezdetén az ischaemián átesett csoportokban jelentős áramlás csökkenés következett be. Később a máj mikrocirkulációja fokozatosan felépült, mely mértékét a PJ-34 előkezelés szignifikánsan javította az IR-kontroll csoporthoz képest ( $p < 0,05$ ) (56. ábra).

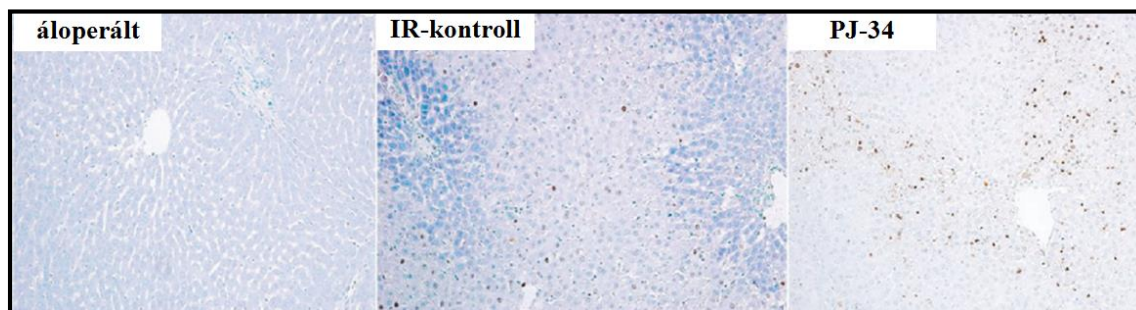


56. ábra. Máj mikrocirkuláció.

### 5.14.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (HE, TUNEL)

A rutin szövettani elemzés (HE festés) során az áloperált állatok metszetein érdemi eltérés nem volt látható. Az IR-kontroll csoportban az ischaemia-reperfúzió jelentős szöveti elváltozások kialakulásához vezetett, úgymint sinusoidalis dilatáció, vacuolizáció, periportalis lymphocytás infiltráció, illetve kisebb-nagyobb kiterjedésű, döntően centrolobularisan elhelyezkedő necrotikus sejtelhalás. A PJ-34 kezelés jelentős mértékben csökkentette a szöveti destrukció és gyulladás mértékét.

TUNEL immunfestés során a sejtek 1,2% mutatott pozitív festődést az áloperált csoport állataiban. Az ischaemia-reperfúzió átesett csoportokban a TUNEL pozitív sejtek száma szignifikáns mértékben megemelkedett az áloperált csoporthoz képest. PJ-34 előkezelés hatására azonban a pozitív festődést mutató sejtek száma szignifikánsan magasabb értéket ért el (46,83%), mint az IR-kontroll csoportban látottak (15,74%) (57. ábra).



57. ábra Reprezentatív máj szövettani képek (TUNEL immunfestés, 20x).



#### 5.14.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

A szérumban a transzamináz szintek szignifikáns mértékben megemelkedtek az IR-kontroll és PJ-34 csoportokban az áloperált csoport értékeihez képest. A szérumban az ALAT és ASAT aktivitása azonban szignifikánsan kisebbnek mutatkozott a PJ-34 csoportban az IR-kontroll csoporthoz viszonyítva ( $p < 0,05$ ).

#### 5.14.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérumban)

A redox homeosztázist jellemző szérumban paraméterek tekintetében nem mutatkozott szignifikáns különbség a vizsgálati csoportok között. A máj homogenizátumból végzett mérések során csupán az luminometriás össz-scavenger kapacitás mutatkozott szignifikánsan alacsonyabbnak az PJ-34 előkezelés hatására az IR-kontroll csoporthoz képest (16. táblázat).

16. táblázat Redox homeosztázist jellemző paraméterek.

	Áloperált		IR-kontroll		Glu	
	Szérumban	Máj	Szérumban	Máj	Szérumban	Máj
<b>luminometriás össz-scavenger kapacitás (RLU)</b>	-	0,588 ±0,085	-	11,659 ±0,176	-	8,547 ±1,160*
<b>redukáló képesség (AAE)</b>	1,212 ±0,062	168,2 ±8,200	1,595 ±0,112	130,1 ±4,300	0,487 ±0,026	147,1 ±4,400
<b>H-donor kapacitás (inhib. %)</b>	32,50 ±4,26	51,31 ±2,38	39,79 ±3,00	42,21 ±2,12	45,82 ±6,23	47,94 ±1,12
<b>szabad SH-csoportok (mmol/L)</b>	0,270 ±0,069	1,389 ±0,043	0,576 ±0,074	1,169 ±0,071	0,487 ±0,026	1,275 ±0,084

\*  $p < 0,05$  versus IR-kontroll

## 6. Megbeszélés

A fenti kísérlet sorozat első részében a szerző az alsó végtagi ischaemiás tolerancia vizsgálata során a kritikus ischaemia meghatározására, illetve ennek befolyásolására alkalmas technikák bemutatására, végül az izomszövetben kialakuló reperfüziós válaszjelenségek leírására fektetett hangsúlyt. Ezen modellek olyan kísérleti szituációknak tekinthetők, ahol az IR károsodás „tisztá, klasszikus” formája látható. Más részről, az alsó végtagi akut verőér-elzáródások egy jelenős része nem műtéti szituációhoz kötött, tehát tervezett folyamat helyett heveny thromboemboliás jelenségek klinikai megjelenése kapcsán lép fel, így befolyásolhatósága elsősorban a reperfüzió kezdetére korlátozódik. Ezzel szemben, a szerző által választott másik kísérleti elrendezésben a májszövet speciális szöveti struktúrából fakadóan, illetve a helyhez kötött macrophagok jelenléte következtében egy komplexebb IR károsodással számolhatunk. Az izomszövettel szemben, a májszöveten létrehozott ischaemiás inzultus az esetek döntő hányadában tervezett műtéti beavatkozás része, ennek megfelelően a kísérletek során az ischaemiás tolerancia perioperatív növelése volt az elsődleges cél.

Jelen fejezetben áttekintésre kerülnek az alsó végtag, illetve a máj ischaemiás károsodásával-, valamint károsodásaik kivédését célzó kondicionálási technikákkal kapcsolatos következtetések.

Az alsó végtagi akut ischaemia a végtagi perfúzió hirtelen csökkenését jelenti, mely a végtag túlélését potenciálisan veszélyezteti. Incidenciája az elfogadott konszenzuskonferencia (Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II)) szerint - több országos regisztert és különböző regionális vizsgálatokat tekintve - összességében körülbelül 140/millió fő/év. [225] Leggyakoribb etiológiai tényezők közé tartozik a végtagi artériák, vagy bypass graft akut trombózisa, szív eredetű, vagy artériás betegség következtében kialakuló thromboembólia, disszekció vagy traumás esemény. A végtagi akut artériás okklúzív betegségek, vagy szövődményeiknem megfelelő időben való felismerése és a szükséges beavatkozás elmaradásának következményei akár fatálisak is lehetnek. A szövődmények közé tartozik a súlyos lokális izomnecrosis következtében kialakuló végtagvesztésen túl akár a többszervi elégtelenség is, tekintve, hogy a keringés újraindulásával a vázizomszövetből lokálisan felszabaduló gyulladáso mediátorok és szabadgyökök szisztémás szövődmények kialakulásához vezethetnek. A szív-, tüdő- és veseelégtelenségként, vagy éppen a koagulációs- és gasztrointesztinális rendszer

komponenseinek súlyos fokú károsodásaként manifesztálódó szövődmények nehezen befolyásolhatóak, így elsődlegesen a kialakulás valószínűségének csökkentése a cél. Ennek megfelelően jelentős klinikai igény áll fenn az ischaemiás károsodás mértékének pontos, megfelelő időben történő megítélésére (életképesség vizsgálat/NBT teszt), illetve a már kialakult ischaemiás károsodás mértékének csökkentésére (PostC).

Vizsgálatainkat a rövid ideig tartó (180 perc), esetlegesen tervezett műtéti szituációban is előforduló (az alsóvégtagi kirekesztéssel járó hasi nagyér-műtétek átlagos hossza megközelítheti a 120-150 percet), alsó végtagi izom ischaemia-reperfúziós jelenségek, illetve azok befolyásolhatóságának vizsgálatával kezdtük. [226, 227] Kísérleti modellünk felállításakor egy olyan műtéti szituációt kerestünk, melyben a reperfúziós szindróma veszélye potenciálisan fennállt. Ezért előkísérleteinkben (nem publikált adatok) 3 kirekesztési időt vizsgáltunk. A 90, 120 és 180 perces kirekesztési időtartamok közül egyedül a 180 perces infrarenalis aortaokklúzió volt képes patkány modellben számottevő hemodinamikai változásokat létrehozni. Közvetlenül a reperfúzió után szignifikáns szívfrekvencia növekedés, illetve vérnyomás csökkenés volt detektálható, melyek átlagosan csupán 50 perc után normalizálódtak. A szignifikáns keringésmegingás miatt választottuk kísérleteink folytatására a 180 perces kirekesztési modellt, feltételezve, hogy ebben az elrendezésben számíthatunk a szisztémás és távoli szervi szövődmények megjelenésére is. Ennek megfelelően kísérletünkben az infrarenalis aortára felhelyezett mikroklippel létrehozott 3 óra ischaemia és 4-, 12-, illetve 24 óra reperfúziót követően elsőként a lokális vázizom szövődményeket vizsgáltuk a vázizom károsodásra specifikus markerek és paraméterek segítségével. A károsodás mérséklésére az egyik csoportban poszt kondicionálást végeztünk összesen 6 ciklusban, 10 másodperces, alternáló reperfúziós- és reokklúziós ciklusok

Vizsgálataink során 4 óra reperfúziót követően jelentős **izomkárosodásra** jellemző fénymikroszkópos morfológiai eltérés nem jelentkezett sem az IR, sem a PostC csoportban. A kapott eredmények látszólag ellentmondanak azon korábbi kísérletes megfigyeléseknek, miszerint 3 órás artériás érkirekesztés már figyelemre méltó izomsejt károsodás kialakulásához vezet. Wang és mtsainak patkány kísérletei során a tourniquet alkalmazásával létrehozott 3 óra alsó végtagi ischaemia [228] ödéma, necrosis, intersticiális bevérzések és neutrophil infiltráció megjelenését eredményezte. Fontos különbség az említett és az általunk felállított kísérleti modellek között a kirekesztési technika. A jelen kísérletben bemutatott infrarenális aorta kirekesztés során a jelenlévő kollaterális keringés

és következetes végtagi reziduális perfúzió nagy szerepet játszhat az izomrostok életképességének megtartásában, illetve a mérsékelt szöveti károsodás kialakulásában. A két kísérletes modell (infrarenális aorta vs. tournique okozta kirekesztés) összehasonlítására és a kollaterális hálózat jelentőségének kimutatására a szerző munkacsoportja külön vizsgálatot is végzett, bizonyítva a tourniquet által létrehozott jelentősebb izom károsodást. [229] A reziduális perfúzió megléte, valamint a végtagi vázizomzat jelentős ischaemia toleranciájának köszönhetően tehát, a jelen elrendezésben alkalmazott 180 perces infrarenális kirekesztés nem tűnt elegendő mértékűnek nagyfokú, konvencionális szövettani vizsgálatokkal is kimutatható izomkárosodás létrehozásához a reperfúzió 4. órában. Ismert tény azonban, hogy a szövettani eltérések időben később, egyes szerzők szerint legalább 5 óra reperfúziót követően válnak megfigyelhetővé. [230, 231] A fentiekkel egybevágóan a későbbi reperfúziós időpontokban végzett szövettani vizsgálatok során, 24 órát követően jelentős gyulladásos infiltráció volt megfigyelhető az IR kontroll csoportban, mely csupán a 72. órára normalizálódott. Ugyanakkor e lokális gyulladásos folyamatok kivédhetőnek bizonyultak posztkondicionálás alkalmazásával. Megfigyeléseink egybevágóan más kísérletes eredményekkel is, melyek igazolták, hogy a posztkondicionálás okozta gyulladás mérséklése a megőrzött endothel integritás és funkció következménye. [22, 232] A kevésbé markáns szövettani változások ellenére az ischaemiás inzultuson átesett csoportokban az izomkárosodást jelző szérumban paraméterek, mint LDH és CK tekintetében szignifikáns emelkedés volt kimutatható az áloperált csoporthoz képest a reperfúzió 4. órájában, mely változások a 24-72. órára normalizálódtak. Az IR és PostC csoport között e paraméterek tekintetében azonban szignifikáns különbséget nem sikerült igazolni. Feltételezhetően a szövettani vizsgálatok során látott enyhe fokú összkárosodás nem volt elégséges a protektív hatás csoportok közti különbség fomájában történő megjelenéséhez.

Annak ellenére ugyan, hogy a rövid reperfúziós időt (4 óra) nézve nem sikerült jelentős hisztopatológiai elváltozásokat kimutatni, a végtagi mikrocirkuláció tekintetében már érdemi különbségek voltak megfigyelhetők az egyes kísérleti csoportok között. Mind az IR, mind a PostC csoportban a reperfúzió első perceiben egy igen rövid, hyperaemiás majd hypoperfúziós epizód mutatkozott, melynek feltételezhető magyarázatát a keringés hirtelen megindulását követő autoregulációs mechanizmusokban, illetve mikrocirkulációs diszfunkcióban kereshetjük. E kezdeti változásokat követően azonban a posztkondicionálás hatására az alsó végtagi keringés hyperaemiás áramlással stabilizálódott, míg az IR kontroll csoportban hypoperfusio volt látható. A kontroll csoportban megfigyelt perfúziózavar

hátterében a korábban ismertetett no-reflow jelenség állhat, mely az ischaemia prolongálásával jelentős mértékben képes hozzájárulni a szöveti károsodások létrejöttéhez. A poszt kondicionálás - feltehetőleg a lokális gyulladás és endothel diszfunkció mérséklésével - ezt az állapotot kivédhette, lehetőséget teremtve a végtagi vázizomzat szabad reperfüziójának.

Klinikailag is igen fontos tény, hogy alsó végtagi kirekesztést követően a nagy tömegű végtagizomzat IR károsodása kezdetben lokális károsodásokat, majd egy kontrollját veszített, generalizált gyulladással válaszreakciót okozhat (SIRS). Ennek során testszerte neutrophil aktiváció és következetes szabadgyök termelés, citokinek kaszkádszerű felszabadulása, endothel diszfunkció, a kapilláris-permeabilitás növekedése figyelhető meg. A fenti szisztémás gyulladással járó folyamatok vizsgálatára a szérumban TNF- $\alpha$  és IL-6 szintjeiben bekövetkező változások, és a plazma szabadgyök koncentrációjának követését választottuk. A TNF- $\alpha$  és az IL-6 a szisztémás gyulladással járó válaszreakció két legfontosabb citokin markere, melyek a gyulladással járó kaszkád beindításában kulcsszerepet játszanak a szisztémás károsodások létrehozásában. [161] A fenti citokinek termelésében elsősorban a fehérvérsejtek és endothel sejtek vesznek részt. [233, 234] Míg az IL-6 többnyire a szubakut fázisban jelenik meg, addig a TNF- $\alpha$  már a gyulladás akut fázisában felszabadul. [58] A TNF- $\alpha$  endothelsejt membránváltozásokat okoz, melynek eredménye a kapilláris átteresztőképesség növekedése, valamint megnöveli az IL-6, IL-8 és az MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) citokinek expresszióját. [150] Korábbi kísérletek kimutatták, hogy a poszt kondicionálás képes csökkenteni mind a TNF- $\alpha$ , mind az IL-6 szinteket az IR károsodás korai reperfüziós fázisában. [228] E megfigyelést saját eredményeink csak részben igazolják. Kísérletünk során a poszt kondicionálás képes volt csökkenteni az IR során kialakuló, korai gyulladással járó válaszreakciót jellemző TNF- $\alpha$  szintet, ugyanakkor az IL-6 szintben nem történt érdemi változás. A jelenség hátterében a vizsgált reperfüziós periódus (4 óra) rövidege állhat, mely feltehetően nem volt elegendő az IL-6 expresszió fokozódásához.

A megnövekedett reaktív szabadgyök képződés ugyancsak kiemelt szerepet játszik a fenti generalizált gyulladással járó válasz létrejöttében. Az oxigén szabadgyököknek direkt károsító hatásukon túl génapaktiváló szerepet is tulajdonítanak, melynek eredményeként a gyulladással járó citokinek termelődése tovább fokozódik. A keringésben megjelenő gyulladással járó mediátorok a PMN sejtek aktivációjával további szabadgyök képződést indukálnak, létrehozva a gyulladással járó kaszkád és szabadgyök képződés ördögi körét. Ezzel összhangban

saját kísérletes eredményeink alapján mind az IR, mind a PostC csoportokban megemelkedett a szabadgyökök szérum koncentrációja, azonban a fenti változásokat a posztkondicionálás szignifikáns mértékben képes volt mérsékelni. Hasonló eredményről számoltak be Park és mtsai., akik kimutatták, hogy a posztkondicionálás hatására csökkent a PMN leukocita akkumuláció és következményesen mérséklődött a reaktív oxigén- és nitrogén származékok termelődése. [235] A posztkondicionálás hatásmechanizmusát alapul véve, az adenzin fontos szereppel bír a fenti folyamatban, mivel csökkenti az NF- $\kappa$ B aktivitását, ezáltal a legfontosabb gyulladási citokin, a TNF- $\alpha$  expresszióját. [236, 237] Az alacsonyabb mértékű gyulladási mediátor képződés pedig mérsékli a neutrophil leukocytákból felszabaduló szabadgyökök mennyiségét. [238] Továbbá, az adenzin, receptorain hatva aktiválja a protein-kináz C-t, mely a mitokondriális membránra transzlokálódva az ATP-szenzitív K<sup>+</sup> csatornák nyitását idézi elő, így képes csökkenteni a mitokondriumokból felszabaduló szabadgyök mennyiségét, illetve az intramitokondriális Ca<sup>2+</sup>-koncentrációt is. [239]

A fentiek alapján megállapítható, hogy: (1) a posztkondicionálás alsó végtagi nagyrérműtétek során való alkalmazása során az alsó végtagi keringés a reperfüzió alatt hyperaemiás áramlással stabilizálódik. (2) A 3 órás kirekesztés ugyan az izomsejtekben nem eredményez klasszikus szövettani (HE festés) vizsgálati eljárásokkal detektálható, érdemi morfológiai elváltozásokat, ugyanakkor a posztkondicionálás képes a kialakuló lokális gyulladási válaszreakció mérséklésére, mely a reaktív szabadgyök alacsonyabb intenzitású képződésben, valamint a korai gyulladási válaszban szerepet játszó TNF- $\alpha$  felszabadulásának a csökkenésében nyilvánul meg. A fentiekkel összhangban korábban Charles [240], Guo [241], Liang [242], Mansour [243] és Sínay [234] is igazolták a posztkondicionálás alsó végtagi IR károsodás lokális szövődésére kifejtett jótékony hatását. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a posztkondicionálás alkalmas módszer lehet a nagytömegű alsó végtagi vázizomzatot érintő IR károsodást követően fellépő távoli szervi szövődések mérséklésére is.

A fenti megállapításoknak megfelelően kísérlet sorozatunk következő lépésében a posztkondicionálás **távoli szervi szövődésekre** kifejtett hatását értékeltük.

A nagyobb verőereken végzett érsebészeti műtétek után igen gyakran észlelhető a **vesefunkció** különböző mértékű beszűkülése. [244] Nyitott, hasi aorta-rekonstrukciós műtéten átesett betegek 1-28%-ánál alakul ki átmeneti, vagy akár tartós vesekárosodás, 1-

5%-uknál akut veseelégtelenség. [66, 67, 245] A perioperatív veseelégtelenség patomechanizmusa multifaktoriális, oka lehet a vese ischaemiás károsodása, keringési elégtelenség, valamint a végtagi izomszövet IR károsodása során elszenvedett rhabdomyolysis következtében a keringésbe került myoglobin okozta nephrotoxicitás.

Jelen kísérletünkben minden végtagi ischaemián átesett állatnál valamilyen fokú vesefunkciós eltérés volt észlelhető a posztoperatív időszakban. A vesekárosodás számszerű jellemzéséhez és eredetének megismeréséhez többféle funkciós tesztet végeztünk. A vesekárosodás legszembetűnőbb markere a szérum kreatinin szint, mely az IR csoportban tapasztalt kiugró értékhez képest a PostC csoportban szignifikáns mértékben csökkent, amely a vesefunkció kedvezőbb alakulására utal a reperfüzió első 4 órájában. Ugyanakkor a kreatinin-szint nem alkalmas a vesefunkció további, időbeli követésére, tekintve, hogy ezen állatok a posztoperatív időszakban egészséges társaiknál lényegesen kevesebbet mozognak és táplálkoznak, így a szérum kreatinin-szintje a kiválasztástól függetlenül is csökkenhet. További, „globális” vesefunkciót jelző, számított érték a renal failure index (RFI). Ennek alapján a vesefunkció romlása az első posztoperatív napon volt a legjelentősebb mértékű, ugyanakkor a műtétet követő 72. órára bizonyos mértékű javulás mutatkozott. A PostC csoportban ezen számított paraméter valamennyi vizsgált időpontban kedvezőbbnek mutatkozott az IR kontroll csoport értékeihez viszonyítva. Az etiológia megértéséhez közelebb jutunk a karbamid/kreatinin hányados kiszámításával. Ezen arányszám hozzávetőlegesen jelzi a vesekárosodás prerenalis vagy renalis eredetét. Kísérletünkben a reperfüzió 4. órájában az áloperált csoporthoz viszonyítva mindkét végtagi ischaemián átesett csoportban alacsonyabb volt a karbamid/kreatinin hányados értéke, de a posztkondicionált csoportban ez az érték kedvezőbbnek bizonyult az IR kontroll csoporthoz képest. Statisztikai szignifikancia ugyan nem mutatkozott, mindazonáltal a tendencia szembetűnő. A magasabb érték nem kizárólag az emelkedett szérum kreatinin-koncentrációnak köszönhető, hanem a magasabb karbamid-értéknek is. A karbamid glomeruláris excretio után tubuláris reabszorpcióra kerül, mely nem történik meg, ha a tubulus sejtek károsodottak/elhaltak. Tehát a magasabb karbamid/kreatinin szint a posztkondicionált állatok kisebb mértékű tubuláris károsodására enged következtetni. A tubuláris károsodás megítélésére még alkalmasabb, és a gyakorlatban könnyen mérhető paraméter a frakcionált  $\text{Na}^+$ -exkréció. Az  $[\text{U}_{\text{Na}^+} \times \text{V}_{\text{Na}^+} \times \text{P}_{\text{kreatin}} / \text{U}_{\text{kreatin}} \times \text{V}_{\text{creat}} \times \text{P}_{\text{Na}^+}]$  képlet alapján - a  $\text{Na}^+$ - és a kreatinin-clearance hányadosként - számítható a frakcionált  $\text{Na}^+$ -exkréció. A  $\text{Na}^+$  tubuláris resorpcióra kerül, mégpedig igen nagy hányadban. Ezáltal

tubuláris károsodásnál plazmaszintje csökken, így alkalmas a renalis (tubularis) és prerenalis veseelégtelenséget elkülönítésére. Definíció szerint a frakcionált  $\text{Na}^+$ -exkréció 2% fölötti értékénél akut tubuláris veseelégtelenség áll fenn, 1% alatti értékénél pedig prerenalis azotaemia. Kísérletünkben a 4 óra reperfüziót túlélő állatok IR csoportjában  $2,19 \pm 1,31\%$ , a posztkondicionált csoportjában  $0,75 \pm 0,5\%$  volt a frakcionált  $\text{Na}^+$ -exkréció. Mivel a két csoport csak a posztkondicionálás alkalmazásában tért el, ezért csak egyféle veseelégtelenség fokozatai valószínűsíthetők a két csoport közötti különbség háttérében, így feltételezhető, hogy a posztkondicionálás hatására a tubulus sejtek károsodása volt mérsékelhető. A túlélő (24 és 72h) állatok vizeletének  $\text{Na}^+$  koncentrációja és a  $[\text{kreatinin}]_{\text{vizelet}}/[\text{kreatinin}]_{\text{szérum}}$  értékei arra utalnak, hogy a vesekárosodás a reperfüziós idő hosszával tovább mélyül. Azonban a PostC és a kontroll csoport között fennmaradó különbségek arra utalnak, hogy a posztkondicionálás hosszú távon is képes megakadályozni a vesekárosodás létrejöttét, progresszióját.

A fenti, feltehetően tubuláris vesekárosodás háttérében - a kezdetben még a klasszikus szövettani vizsgálatokkal jelentősnek nem, de a távoli szervi hatások szempontjából mégis szignifikánsnak mutakozó - izomkárosodást követő myoglobinuriát feltételeztük. A myoglobin vesében való akkumulációjának kimutatására immunhisztokémiai módszerrel megvizsgáltuk a tubulus sejteket és a lumenben kicsapódott hialincilindereket. A 4 óra reperfüziót túlélő állatok közül néhány esetben a tubulus lumenben jelenlévő myoglobin csapadék, valamint a sejtek apicalis részében myoglobint tartalmazó vacuolumok voltak megfigyelhetők. Az IR csoportban azonban a pozitív festődést mutató fehérjék szignifikánsan nagyobb mértékben voltak jelen a PostC csoporthoz képest. A 24. illetve a 72. órát túlélő állatokban az immunfestés eredménye már negatívnak mutakozott valamennyi vizsgálati csoportban, feltehetően a lebomlott myoglobin epitópok következtében. A PostC csoportban tapasztalt, vese tubularis myoglobin akkumuláció csökkenés háttérében feltehetően az IR-nek alávetett alsó végtagi izomzatból történő csökkent kimosódása áll, mely a repetitív reokklúziók eredményeként jön létre. A myoglobin multifaktoriális mechanizmussal hoz létre vesekárosodást. [246] A myocytákból való felszabadulását követően a vizeletben interakcióba kerül a Tamm-Horsfall proteinnel és így csapadéka tubuláris obstrukciót okoz. [247] Továbbá a myoglobin lebontás és metabolizmus (kiváltképp a proximális tubulusokban) szabadgyök képződéshez, ezáltal lipidperoxidációhoz vezet. [248, 249] A szövettani változások mellett kísérleteink igazolták, hogy a négy óra reperfüziót követően a vese homogenizátumban detektált konjugált dién



tartalom (lipidperoxidáció) mind az IR-kontroll, mind a PostC csoportban szignifikánsan megemelkedett az áloperált csoporthoz képest. Az érték szignifikánsan magasabbnak mutatkozott az IR-kontroll csoportban a PostC csoporthoz képest, mely szintén a poszt kondicionálás kedvező hatását erősíti. Az energiaigényes intraluminalis precipitáció, illetve a myoglobin metabolizmusa okozta károsodásokat a savas vizelet tovább erősíti. [250, 251] Korábbi vizsgálataink alapján az alsó végtagból nyert vénás vérben (és egyben a szisztémás keringésből nyert artériás vérben is) a pH normalizálódása elhúzódóbb volt poszt kondicionálás hatására (nem publikált adatok). Ez a kezelés lokális hatásainak szempontjából kedvező, hiszen a poszt kondicionálás „pH hipotézise” alapján a sejtek életképessége megőrzött marad, továbbá a szisztémás hatások tekintetében is jótékony hatású, mivel a vizelet pH-ja ennek megfelelően lassabban billen a kedvezőtlen savas tartomány felé. [139]

A myoglobinhoz köthető tubuláris károsodás mellett nem elhanyagolható a veseelégtelenség prerenalis (keringési) eredete sem. [252] Kísérletünkben a vese mikrocirkulációját a vese felszínén, a cortexet reprezentáló régióban lézer Doppler áramlásmérővel regisztráltuk. Amíg a nem kezelt, IR csoportban jelentős keringéscsökkenés volt igazolható, addig a PostC csoportban a mikrokeringés szinte zavartalan maradt. A kialakult veseperfúzió-zavar hátterében az ischaemizált, károsodott autoregulációval bíró izomszövet szuprafiziológiás reaktív hyperaemiája, reperfúziója állhat, ami további szisztémás keringési zavarok kialakulásához vezethet, részben toxikus metabolitok kimosódásával, részben pedig az izomszövetben kialakult posztischaemiás ödéma megjelenésével. [226] A vese komplex károsodásához hozzájárul a szisztémás gyulladással válaszreakcióban leírt kaszkádok aktivációja is. Ezt a felvetést támaszthatja alá az első kísérletünk során tapasztalt, a poszt kondicionálás hatására erősen szignifikáns mértékben csökkenő szérum TNF- $\alpha$  szint is. A jelenség kedvező volta abban vélhető, hogy az emelkedett TNF- $\alpha$  szint mind glomeruláris károsodásokat, mind morfológiai változásokat képes előidézni, illetve a mezangiális sejtekre is citotoxikus hatással bír. [253, 254] A TNF- $\alpha$  károsító hatását erősíti meg Shulman és munkatársainak kísérlete, ahol mesterségesen indukált akut veseelégtelenségben TNF- $\alpha$ -ellenes antitest beadásával megelőzhető volt a veseelégtelenség kialakulása. [255]

A lokális gyulladás részeként megjelenő védőfaktorok közül kiemelendők a hősokk fehérjék [256], melyek közül a HSP-72 emelkedett szintje kedvezőnek bizonyult alsó végtagi IR követő veseelégtelenségben. [257] Kísérletes eredményeink alapján mindkét

végtagi ischaemián átesett csoportban emelkedett HSP-72 szint volt észlelhető, ugyanakkor a változás mértéke egyik csoportban sem volt szignifikáns mértékű az áloperált csoport értékeihez képest. Ezen eredmény önmagában véve tehát nem igazolta a károsodás korai szakának a HSP-72 szinttel való összefüggését.

Fentiek alapján eredményeink meggyőző bizonyítékkal rendelkeznek a posztkondicionálás alsó végtagi IR károsodást követő vesekomplikációkat csökkentő hatásairól, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy egyes közlemények a módszer tényleges hatékonyságát bizonyos társbetegségek (pl.: cukorbetegség, magas vérnyomás, hypercholesterinaemia, idős kor) fennállása esetén megkérdőjelezzik, illetve a módszer korlátainak tartják. [109, 258] Ezen krónikus elváltozások nagy valószínűséggel képesek a szervezet endogén védelmi mechanizmusait molekuláris szinten „tompítani”, így a félépülő rendszer kevésbé reakcióképes.

A távoli szervi károsodások másik kiemelt szerve a **tüdő**. A tüdőkárosodás megítélésére szövettani vizsgálatokat végeztünk. Az irodalomban nem található egységesen elfogadott szövettani pontrendszer, mely a károsodás mértéket kellően jelzi, így egy, a kísérleti modellünkhöz hasonló, korábbi modellben alkalmazott pontrendszert vettünk alapul. [259] Eredményeink alapján elmondható, hogy a posztkondicionálás képes volt csökkenteni a tüdő morfológiai károsodását alsó végtagi IR után 4, 24, valamint 72 órával a reperfüziót követően. A kezelés hatására a parciális atelectasia mértéke csökkent, az alveolusok tágabbak maradtak, illetve csökkent az alveolusfalak ödémás megvastagodása is.

A háttér folyamatok tisztázásának első lépéseként myeloperoxidáz méréssel kívántunk továbblépni. A szöveti MPO aktivitás érzékeny markere a gyulladással szövetben szekvesztrálódott, aktivált PMN sejteknek. [259] Ismert, hogy az ischaemiásan károsodott vázizomszövetből felszabaduló mediátorok szisztémás disszeminciójukat követően megnövelik az aktivált PMN leukocyták mennyiségét, amelyek akkumulálódhatnak a távoli szervek mikroereiben, így a tüdőben, annak morfológiai és funkcionális károsodásához vezetve. [260] Kísérletünkben a tüdő MPO aktivitása 4 óra reperfüziót követően mindkét végtagi ischaemián átesett csoport esetében megnövekedett, a PostC csoportban azonban a növekmény - bár csupán nem szignifikáns mértékben - alacsonyabbnak bizonyult az IR csoporthoz képest. A fenti megfigyelés megerősíti a posztkondicionálás korai gyulladással szövődményekre gyakorolt kedvező hatását, ugyanakkor más szerzők eredményeivel

szemben (Tsubota és mtsai. [150], Takhtfooladi és mtsai. [261]) egyértelmű szignifikáns hatást nem sikerült kimutatni.

Alsó végtagi ischaemiát követően fellépő, generalizált gyulladós folyamatok velejárója a tüdő intersticiumban megjelenő folyadék felszaporodása [262, 263], mely érzékeny markere az infrarenalis aortaműtétek tüdőszövődményeinek. [264] Kísérleti modellünkben az intersticiális ödéma mennyisége (W/D arány) posztkondicionálás hatására mérséklődött az IR-en átesett, kezeletlen állatok értékeihez képest. Ez a javulás valamennyi vizsgált reperfúziós időpillanatban szignifikánsnak bizonyult. Más, hasonló végpontokkal bíró vizsgálatok (bilateralis patkány alsó végtagi IR modellben a  $MgSO_4$  kedvező hatásainak vizsgálata tüdőszöveten [265], vagy a tüdő IR-t követő posztkondicionálás alkalmazása [266]) is megerősítették, hogy a W/D arány használata érzékeny indikátora a tüdőben lezajló gyulladós eseményeknek. Mindazonáltal megjegyzendő, hogy a szerző legjobb tudása szerint alsó végtagi posztkondicionálást követően ilyen irányú, pozitív kimenetelű vizsgálat a jelen kísérleten kívül nem található az irodalomban.

A fent részletezett szöveti károsodások és az intersticiális ödéma megléte jelentősen megváltoztatja a gázcsere effektivitását. A gázcsere vizsgálata során a mintavétel a szokásostól eltérő módon, a reperfúzió kezdeti óráiban történt, melyet arra a klinikai tényre alapoztunk, hogy a tüdő funkcionális károsodása klinikailag korábban észlelhető, mint az egyéb szervek - hosszú órák, vagy napok alatt kialakuló - funkciócsökkenése. [267] Kísérletünkben a posztkondicionált állatok artériás vér oxigenizációja szignifikánsan magasabb értéket mutatott az IR csoport értékeihez képest a reperfúzió második és negyedik órájának a végén. Az IR csoporttal összehasonlítva, az artériás  $pCO_2$  értéke - nem szignifikáns mértékben - csökkent a posztkondicionált állatokban. Mivel az artériás  $pO_2$  a pulmonális oxigénfelvételtől, és az artériás  $pCO_2$  az alveolaris ventilációról ad információt, így megállapítható, hogy posztkondicionálás hatására a mind az oxigénfelvétel, mind az alveolaris ventiláció javult. Hasonló eredményre jutottak Yasa és mtsai. [268] is, akik nyúl alsó végtagi IR modellben 60 perc ischaemiát és 4 óra reperfúziót hoztak létre, melyet kémiai posztkondicionálással (levosimendan) egészítettek ki.

A fentiek alapján elmondható, hogy a (1) tüdő szöveti károsodása korai markere az alsó végtagi IR folyamatok szisztémás hatásainak, (2) a posztkondicionálás a szöveti szerkezetet képes megóvni, ebből következően a tüdő funkcionális állapotát is képes javítani.

A távoli szervi szövődmények között kiemelt jelentőséggel bír a **vékonybél** működési elégtelenségéből fakadó további szövődmények sora. Közel két évtizede ismert, hogy az alsó végtagi IR inzultusok gasztrointesztinális szövődményekhez vezethetnek. [269] Ezen úttörő publikáció óta számos közlemény igazolta, hogy az alsó végtag IR károsodása után az intestinalis permeabilitás megnő [269-273], emelkedik a proinflammatorikus mediátorok szintje [274], és a szisztémás endotoxin koncentráció is megugrik. [269, 275-278] Szintén igazolást nyert, hogy a végtagi IR károsodásokat követően megváltozik a vékonybél mikrokeringése, csökken a PMN sejtek áramlási sebessége, illetve nő a venulákban észlelhető kitapadásuk [274], valamint fokozódnak a leukocytá-endothel interakciók. [279] A fent említett korábbi tanulmányok viszont nem nyilatkoznak a mikrokeringés változásai mellett az arteria mesenterica superior (AMS) egyidejű áramlásváltozásáról, illetve nem említik azok összefüggését az intestinalis károsodások mértékével. A jelen kísérleti elrendezés ezeket a kérdéseket kívánta megválaszolni.

Kísérleti tapasztalataink szerint az artériás középnyomás szignifikáns módon megemelkedett az infrarenalis aorta kirekesztést követően, mellyel párhuzamosan az AMS áramlása is fokozódott. Az alsó végtagi reperfúzió kezdetekor hirtelen, szignifikáns áramláscsökkenés volt észlelhető az AMS-ban, míg - meglepő módon - ezt nem követte a szisztémás középnyomás csökkenése. A jelenség részben a mesenterialis keringészavarok non-okklúzív formái közé sorolható, mely háttérben a keringési redisztribúció és a következményes mesenterialis vazokonstrikció állhat. [280] A mikrocirkulációs vizsgálataink során a jejunum és az ileum mucosalis keringése párhuzamosan változott az AMS áramlással: az ischaemia alatt szignifikánsan emelkedett, míg az alsó végtagi reperfúzió kezdetekor egy nagyon markáns áramláscsökkenés volt megfigyelhető. A jejunum mikrokeringésének változása kevésbé kifejezettnek bizonyult az ileumhoz képest, mely talán az anatómiailag leírt kollaterálisoknak is köszönhető. Ehhez hasonló okoknál fogva a duodenum mikrokeringése is kedvezőbbnek mutatkozott. A jelen megfigyelésekkel hasonló közlemények már korábban napvilágot láttak [271, 272, 281], de ezen vizsgálatok makrohemodinamikai paramétereiket nem vizsgálták, illetve nem tüntették fel a hemodinamikai változások és szöveti károsodások közti összefüggéseket. Kísérletünkben a szöveti szintű változások közel azonos módon követték a mikrokeringési változásokat. A legjelentősebb szövettani károsodás az ileum területén volt detektálható, míg a legenyhébb eltérések a duodenumban voltak láthatóak. Erős pozitív korreláció volt kimutatható a

reperfúzió ideje alatt rögzített mikrokeringési zavarok valamint a szövettani - pontrendszer alapján kapott - károsodások között.

A vékonybelet érintő távoli szervi károsodások eredményeként akár halálos kimenetelű szövődmények is felléphetnek [282], így a fent leírt károsodások csökkentése létfontosságú. Egy korábbi közlemény szerint a poszt kondicionálás képes a távoli szervi - vékonybeleket magába foglaló - károsodások csökkentésére alsó végtagi IR modellben, habár ezen vizsgálat leíró jellege mellett a mesenterialis makro- és mikrocirkulációs változásokat nem vizsgálata. Jelen kísérletben a poszt kondicionálás érdemben nem befolyásolta az artériás középnyomást, de szignifikáns javulást eredményezett AMS áramlásában csakúgy, mint a mikrokeringési paraméterekben, mindhárom vizsgált bélszakaszon. Igazoltuk továbbá, hogy a poszt kondicionálás csökkentette a szöveti károsodás mértékét is. A háttérben álló mechanizmusok részleteiben még nem tisztáztak. Ismeretes, hogy az izmon végzett poszt kondicionálás javítja a lokális (izom) mikrokeringési paramétereket [226], illetve képes a leukocytá-endothelialis interakciók csökkentésére. [283] Ezen kedvező hatások eredményeként a szisztémás vazokonstrikció csökkenhet. Az is feltételezhető, hogy mindez nem csupán helyileg, de egyben szisztémásan is megmutatkozik. A háttérben a poszt kondicionálás által indukált neurális válaszeljenségek szerepe is feltételezhető, mely képes befolyásolni a szisztémás vazokonstrikció mértékét. [284]

A fentiek alapján az alábbi következtetéseket összegezhetjük: (1) a jelen vizsgálatban a makro-, mikrohemodinamikai vizsgálatokkal egy időben detektáltuk a szöveti változásokat, melyek szerint (2) az AMS áramlásváltozása nem azonos módon követi a szisztémás keringésváltozást. (3) A mikrocirkulációs változások a belek anatómiai lokalizációjától függően más-más képet mutattak. (4) A belek mikrocirkulációs állapota és a fellépő szöveti károsodás között erős negatív korreláció mutatható ki. (5) A poszt kondicionálás kedvező hatással volt a mikrokeringési eltérésekre, illetve az AMS áramlására, de vélhetően nem ezek egyedüli befolyásolásán át fejt ki távoli szervi védőhatását.

A fentiekben bemutatott kísérletes modell (3 óra ischaemia, 4 óra reperfúzió) azon műtéti helyzetet hivatott leképezni, amikor az ischaemia ideje a szerv várható ischaemiás toleranciáján belül van, de a szövetet ért károsodások potenciálisan szisztémás szövődmények generálására is képesek. Eredményeink alapján a kialakuló károsodások

megelőzésére tett sebésztechnikai manőver (posztkondicionálás) hatékony módszere lehet a fenti kórállapotok mérséklésének. Ugyanakkor a mindennapi gyakorlat számára nem elhanyagolhatóak azon akut klinikai esetek, ahol az ischaemia ideje nem tervezhető. A főként thromboembóliás háttérű verőér-elzáródások esetén a terápiás algoritmus egyik legfontosabb kulcslépése az izom életképességének, a károsodás mértékének, illetve reverzibilitásának/irreverzibilitásának meghatározása. Alapvető a kezelési különbség ugyanis az irreverzibilis és a súlyos, de még reverzibilis károsodások között. Míg utóbbi esetben revaszkularizáció révén a végtag még megmenthető, addig előbbinél a súlyosan károsodott végtag reperfüziója eredménytelen, sőt, potenciálisan végzetes szisztémás szövődmények kialakulásához vezethet, így egyetlen lehetőség a végtag primer amputációja. Éppen ezért a **kritikus ischaemiás** időnek, illetve az izomkárosodás súlyosságának pontos ismerete elengedhetetlen. A károsodás mértékének pontos meghatározása azonban ma még nem megoldott. Az egyetlen rendelkezésre álló score-rendszert Rutherford és mtsai. dolgozták ki, de ez is inkább a revaszkularizációs beavatkozás sürgősségének, mintsem a károsodás mértékének megítélésére alkalmas. [285] Ennek következtében előfordulhat, hogy egy irreverzibilisen károsodott végtag revaszkularizációs műtetre kerül, melynek azonban terápiás értéke nincs, csupán a korábban már részletezett súlyos, szisztémás szövődmények kialakulási valószínűségét növeli. Az ilyen esetben kialakuló többszervi elégtelenség folyamatos intenzív terápiás ellátást igényelő kórállapot, mortalitása még kezelés mellett is nagyon magas. Mi sem tükrözi ez szemléletesebben, mint a bevezetésben bemutatott esettanulmány, mely esetében a klinikai jelek ugyan enyhe károsodást sugalltak, azonban a valóságban egy visszafordíthatatlan izomkárosodás volt jelen, melynek reperfüzióját követően jelentős lokális és szisztémás károsodások alakultak ki, rapid fatális kimenetellel. A fentiekre való tekintettel további kísérleteinkben célunk volt egy olyan módszer kidolgozása mellyel a károsodás mértékét klinikailag releváns időablakon belül képesek vagyunk pontosan meghatározni.

A bevezetésben leírtaknak megfelelően a legalkalmasabb eljárások erre a célra a -szervi- és szöveti funkció, illetve viabilitás szempontjából kulcsfontosságú -mitokondriumok épségéről reflektáló tesztek, úgymint a tetrazólium sókkal, azon belül is az általunk használt nitro-tetrazólium blue (NBT) segítségével végzett funkcionális próbák. [230] Az ép mitokondriális funkció alapvető szerepe bír a sejtek energiaháztartásának fenntartásában. Károsodásuk esetén az celluláris energiaszint (ATP tartalom) lecsökken, [11] mely közvetlen kiváltója lehet a sejthalálnak. [10] Irodalmi adatok alapján az ATP-szint

szorosan korrelál az izomkárosodás mértékével: 20% alatti ATP szint esetén teljes izomsejt necrosis következik be. [286] Így feltételezhető, hogy az ATP termelésért felelős mitokondriumok funkciója szintén szorosan korrelál a sejtek épségével, így ezen organellumok vizsgálata megoldást jelenthet a felvetett problémára. Egy, a sérülés kiterjedésének meghatározására képes, ideális technika kidolgozása során meghatározó szempont a számszerűsíthető eredmények megfelelő időablakon belüli biztosítása. Az irodalomban alkalmazott, a bevezetésben részletezett technikák (spektrofotometriás [19, 267, 287-290] és planimetriás [22, 150, 291-294] módszerek) ugyan adekvátan jelzik az izomkárosodás mértékét [295], ugyanakkor a mintafeldolgozásban rejlő hátrányok akadályozzák ezen módszerek klinikai alkalmazását: a spektrofotometriás módszer esetében a minta előkészítési idő jelentős, míg a planimetria esetében a nagy mennyiséget igénylő minta jelent akadályt. Korábban Carmo-Araujo és mtsai. igazolták, hogy az ischaemia hatására a tetrazólium redukció mértéke csökken, mely reakció fagyasztott metszetek segítségével egyszerűen, gyorsan, elenyésző mennyiségű szövetmintából is kimutatható. [296] Ezen, a klinikai felhasználás szempontjából optimális kiindulási ponton elindulva az általunk kifejlesztett új eljárás lényege, hogy a tetrazólium reakciót fagyasztott metszeten alkalmazzuk, majd a keletkezett reakció mennyiségét egy számítógépes program segítségével meghatározzuk. Az eljárás nagy előnye a gyorsasága, mely a minta előkészítés (5-10 perc), festési eljárás (40 perc), illetve a poszt-processzálás (10-15 perc) sebességétől függően 55-65 perc alatt elvégezhető. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy bár a mi technikánk számottevően gyorsabb, mint az eddig rendelkezésre álló eljárások, a közel 1 órás mintafeldolgozás idő feltehetően még nem kellően rövid. Mivel azonban a festési eljárás kivitelezése igényli a legtöbb időt, ezen szakasz hosszának minimálisra csökkentésével egy klinikailag elfogadhatóbb minta feldolgozási idő a jövőben elérhető lehet. Annak a minimális festési időnek a meghatározására, amely mellett még hasonlóan pontos eredmények nyerhetők azonban még további vizsgálatok szükségesek a rutin klinikai alkalmazást megelőzően.

Kísérletsorozatunk első fázisában növekvő ischaemiás idők (4-, 6-, 8-, 9 óra) alkalmazásával vizsgáltuk a módszer hatékonyságát. Eredményeink alapján, az ischaemiás idők hosszával az izomrostok életképessége, azaz a tetrazólium reakció intenzitása fokozatosan csökkent mind a rostok össz-életképessége, mind az I-es, illetve IIb típusú rostok szelektív életképessége tekintetében. Az ischaemia hossza, illetve a mért életképesség értékek között erős, negatív korreláció volt kimutatható. Fokozatosan növekvő ischaemiás

idők tekintetében hasonló, progresszív életképesség-csökkenést figyeltek meg Blebea és mtsai. planimetriás eljárás alkalmazásával, azonban a szerzők hasonló, szoros korrelációt nem igazoltak. [297] Az általunk kapott életképesség értékek további validálásához a rutin HE festés mellett elektronmikroszkópos (EM) vizsgálatokat végeztünk, tekintve, hogy az EM által mutatott ultrastrukturális változások időben jóval korábban detektálhatók, mint a klasszikus szövettani eltérések. [9] Az ultrastrukturális vizsgálatok az ischaemia idejének előrehaladtával növekvő mértékű károsodást igazoltak, mely alátámasztja az izomrost-életképesség teszt hatékonyságát. Elmondható továbbá, hogy az elektron mikroszkópban látható, mitokondriumban gazdag rostok (melyek nagy valószínűséggel megfeleltethetők az I-es típusú rostoknak) nagyobb ultrastrukturális károsodást szenvedtek, mint a mitokondriumban szegény (nagy valószínűséggel a IIb típusú) rostok, mely eredmények szintén egybevágóak az új módszerünk által biztosított adatokkal. A fenti eredmények alapján a kapott életképesség értékek az ischaemia hossza mellett jól korrelálnak a létrejött morfológiai, valamint ultrastrukturális károsodások mértékével is.

Ismert tény, hogy a különböző izomrostok eltérően reagálnak az ischaemiára. [298] Irodalmi adatok alapján a IIb típusú rostokat érzékenyebbek az ischaemiás inzultusra. [299-302] Ezzel ellentétben, az általunk kapott értékek az I-es típusú rostok fokozottabb érzékenységet jelezték. Ennek az ellentmondásnak a feloldása valószínűleg a különböző ischaemiás modellek alkalmazásában keresendő: azon közlemények, melyek a IIb típusú rostok fokozott érzékenységét igazolták, komplett ischaemiát (tourniquet, amputációs modellek) használnak. Ezzel ellentétben jelen kísérletben alkalmazott infrarenális aorta kirekesztés a korábban ismertetett kollaterális keringés révén bizonyos mértékű reziduális perfúziót tett lehetővé, mely mellett az I-es típusú rostok fokozottabb károsodását tapasztaltuk. Mindez azt feltételezi, hogy a reziduális perfúzió megléte, vagy hiánya nagymértékben befolyásolja az egyes izomrostok ischaemia toleranciáját. Míg a komplett ischaemia főként a IIb típusú rostok fokozott károsodását okozza, addig a reziduális perfúziós modellek az I-es típusú rostok kifejezettebb sérülésével járnak.

A fenti, klinikailag releváns életképesség meghatározására alkalmas metodika (NBT) vizsgálata mellett a szerző további célja volt az izomszövet számára kritikusnak mondható időintervallum meghatározása. Kísérleteink során, 8 órás ischaemiás időtartamot követően irreverzibilisnek tűnő károsodások szövettani jelei voltak megfigyelhetőek, azonban a kétséget kizáró sejtmagszintű eltérések nem mutatkoztak, szemben az irodalomban korábban leírtakkal. [303] Fagyasztott metszeteken történt enzim-hisztokémiai vizsgálataink



alátámasztották a rutin szövettani elemzés során tapasztaltakat: a 8 óra ischaemia az izomrostok életképességének kifejezett csökkenésével járt. A fenti eredmények alapján feltételezhető, hogy a 8 óra ischaemia jelen rágszáló modellben már kritikusnak mondható, mely esetén irreverzibilis károsodások felléptével is számolni lehet.

Az irreverzibilitás kérdésének további igazolására, valamint a reperfüziós károsodás akut hatásainak vizsgálatára kísérletsorozatunk következő lépésében a 8 és 9 órás ischaemiás időket rövid, 2 órás reperfüzióval egészítettük ki. Továbbá megvizsgáltuk, hogy a poszt kondicionálás szintén képes-e protektív hatás kifejtésére, még ezen kritikusnak vélt károsodások esetén is. Az izomrostok életképessége 2 óra reperfüziót követően mind a 8, mind a 9 órás ischaemiás csoportban szignifikánsan lecsökkent a megfelelő tisztán ischaemiás csoporthoz képest. A 9 órás ischaemiát követő 2 óra reperfüziós csoportban az életképesség szinte teljesen megszűnt. A morfológiai és ultrastrukturális változások alátámasztották az izomrost-életképesség vizsgálatával kapott eredményeket. A 9 órás ischaemiát követő reperfüzió során a sejtek nagy részének necrosis volt megfigyelhető. A 8 órás ischaemiát követő reperfüzió során a rostok közötti különbség még detektálható volt ultrastrukturálisan: ismét az I-es típusú rostok nagyobb károsodását találtuk, melyet a mért életképesség értékek is megerősítettek. A 9 órás ischaemiát követő reperfüzió azonban olyan mértékű károsodásokat okozott, hogy a különbség a rostok között elmosódott.

A fentiek tanulságát leszűrve, a kísérleti elrendezést továbbgondolva, olyan ischaemiás időt választottunk, mely végül az ischaemia tolerancia küszöbét jelenti, de egyben alkalmas a kedvező kimenettel járó, hosszú távú revaszkularizációra is. A fent bemutatott eredmények alapján a 8 óra hosszúságú ischaemia bizonyult a klinikailag is releváns időtartamnak. A reperfüziós idők hosszabbtávú (2-, 6-, 12-, 24 óra) vizsgálatával az esetleges klinikai következményeket szeretnénk volna megismerni poszt kondicionálás alkalmazása mellett. Ez különös jelentőséggel rendelkezik, mivel ezen sebésztechnikai eljárás izomszövettel kapcsolatos hatása irodalmi adatok alapján ezidáig nem került vizsgálatra akut klinikai szituációt modellező, hosszú ischaemiás idők mellett. Korábbi, fent említett megfigyeléseink mellett a 2 órás reperfüzió, ugyan a szövettani károsodás mértékét enyhén növelte, azonban súlyos, végtagot veszélyeztető elváltozások ezen időpillanatban nem voltak megfigyelhetőek. Ismeretes - ahogy az fentebb már említésre került -, hogy a necrotikus rostok megjelenése a rutin szövettani metszeteken akár öt órát is igénybe vehet. [231] Ezen megállapításnak megfelelően, jelen kísérletben a klasszikus necrotikus rostok megjelenését először 6 óra reperfüziót követően észleltük. A károsodás mértéke a

posztoperatív 12. óráig fokozatosan növekedett, majd a necrotikus rostok mennyisége a posztoperatív első napig azonos maradt. Ezen karakterisztika megfeleltethető korábbi tanulmányok eredményeinek [22, 37], melyek a szövettanilag detektálható károsodás maximális mértékének elérését szintén a posztoperatív 12. órára teszik. A poszt kondicionálás izomszövet károsodást csökkentő hatása korábbról ismert, azonban ezen tanulmányok csupán rövidebb ischaemiás idők alkalmazása mellett vizsgálták a protektív hatások meglétét. [294, 304] Jelen kísérletünk elsőként igazolta, hogy a poszt kondicionálás hosszú idejű végtagi kirekesztést követően is képes csökkenteni a szövettani károsodás mértékét. A poszt kondicionálás izomszöveti károsodásra kifejtett jótékony hatását az elvégzett életképesség vizsgálatok is igazolták.

Revaszkularizációt követően az izomkárosodás fokának egy jól használható klinikai paramétere a szérumban a CK szintje. [305] Jelen kísérletünkben a szérumban a CK szintjei már a posztoperatív második órában megemelkedtek, a reperfüziót követő hatodik órában tetőzve, majd az első nap végére az áloperált csoport értékeinek szintjére csökkentek vissza. Habár a szérumban a CK szintjeinek megemelkedése a reperfüzió korai fázisában ismert [305, 306], az általunk tapasztalt felszabadulási-kiürülési dinamika eltér a korábbi tanulmányok által leírtaktól. Az irodalomban fellelhető adatok szerint a szérumban a CK koncentrációja maximumát általában az inzultust követő 12. órában éri el [307], majd emelkedett szinten marad az első néhány napon. [305, 308] A fenti ellentmondás magyarázata feltehetőleg az eltérő ischaemiás időkben keresendő. Az általunk alkalmazott hosszú idejű ischaemia olyan súlyos fokú, irreverzibilis károsodásokat okozhatott, mely az izomrostok nagy részének hirtelen halálához vezetett. A nagy mennyiségű elhalt izomrostból ezt követően olyan nagy mennyiségű CK szabadul fel, melyet követően a rendelkezésre álló enzim hiányában további jelentős mértékű enzimszint emelkedés már nem valószínű. Ezzel ellentétben, az említett vizsgálatok során egy kisebb mértékű izomkárosodás volt jelen, mely kapcsán a rostok a reperfüzió során feltehetőleg fokozatosan pusztultak el, így a CK felszabadulás is elnyújtott lehetett. A poszt kondicionálás szérumban a CK szintjeire kifejtett kedvező hatása ismert volt rövidebb ischaemiás idők tekintetében. [242] Hosszú idejű ischaemiás idők esetén azonban jelen tanulmány az első, mely igazolja az eljárás szérumban a CK szint csökkentő hatását.

A reperfüzió során, a bevezetésben ismertetett módon gyulladási folyamatok is kialakulhatnak, melyek főként a lokális károsodás direkt következményei. [5] Izomszövet ischaemiás károsodása kapcsán a gyulladási sejtek általában a reperfüziót követő 6-12. órában jelennek meg. [22, 309, 310] A gyulladási folyamat a posztoperatív 3. nap után

kezd el mérséklődni, [296] ugyanakkor általában az első hét végéig fennmarad. [22, 310, 311] Jelen kísérletünk során - a korábban említetteknek megfelelően - a gyulladásos sejtek megjelenése a posztoperatív 12. órában volt megfigyelhető, mely a vizsgált periódus végéig csupán keveset változott. Kísérletünk során a posztkondicionálás képes volt a gyulladásos reakció mérséklésére, mely összecseng a korábbiakban, rövidebb ischaemiás idők alkalmazása mellett tapasztaltakkal. [235, 294, 304]

A szövet nedvességtartalmának változása szorosan összefügg a reperfúziót követő gyulladásos ödémával. IR károsodást követően a szöveti nedvességtartalom már 30 perc után megemelkedhet, [231] majd akár 2 héten keresztül is magas maradhat. [312] Ezen irodalmi adatoknak megfelelően, jelen kísérletünkben a szöveti nedvességtartalom kismértékű növekedését tapasztaltuk már 2 óra reperfúziót követően. A szöveti ödéma csúcspontját a reperfúzió 6. órájának végére érte el, majd azonos szinten maradt a kísérlet végéig. A posztkondicionálás ugyan a kezdeti fázisban (2 óra reperfúziót követően) nem volt képes a kialakuló ödéma mértékét mérsékelni, azonban a posztoperatív 6. óra után az ödéma-képződés dinamikájának megváltoztatásával már képes volt a szöveti nedvességtartalmat csökkenteni. Ugyan korábban a posztkondicionálás szöveti ödéma csökkentő hatását már igazolták rövidebb ischaemiás idők tekintetében [235, 241, 304], a posztkondicionálás szöveti ödéma keletkezésének időbeli dinamikáját megváltoztató hatását jelen kísérletünk fedte fel elsőként.

Összefoglalva elmondható, hogy a jelen kísérletsorozatban igazolást nyert, hogy (1) az iszkémiás időtartam növekedésével az elektronmikroszkópiával megfigyelhető ultrastrukturális változások egyre súlyosabb iszkémiás károsodást jeleznek. Kilenc órás iszkémiát követően már súlyos, irreverzibilis károsodások észlelhetőek; (2) az I-es típusú (lassú összehúzódásra képes, oxidatív) rostok fokozottabb érzékenységét találtuk, melyre az alkalmazott kísérleti modell adhat magyarázatot; (3) a posztkondicionálás 8 órás iszkémiás időtartamot követően is képes volt a fénymikroszkóposan detektálható szövettani károsodás mérséklésére a posztoperatív hatodik órát követően; (4) a dolgozat ezen fejezet egy új, klinikailag is hasznos eljárást (NBT) mutatott be, mely a kapott eredmények alapján megfelelő érzékenységgel képes megállapítani az ischaemiás károsodás mértékét. A módszer segítségével a károsodás foka pontosan meghatározható, így a betegek életminősége javítható, a súlyos szövődmények előfordulási valószínűsége, illetve a mortalitás pedig potenciálisan csökkenthető. Ugyan az eljárás jelen stádiumában még kevésbé alkalmas a betegágy melletti gyors diagnózis felállítására, azonban a megfelelő

technikai módosítások elvégzését követően nagy segítséget nyújthat a megfelelő terápiás döntéshez. A pontos diagnózison túl a károsodás mértékét csökkenteni képes eljárások is nagy szerepet kaphatnak a jövőben. Az általunk részletesen vizsgált posztkondicionálás egy egyszerűen alkalmazható sebésztechnikai eljárás, mely hosszú idejű verőér-elzáródások esetén is hatékony eszköz lehet az ischaemia-reperfüziós károsodások mértékének mérséklése. A fenti megállapítások klinikai jelentősége vitathatatlan.

A fentiekből levonható következtetések után a szerző az IR károsodásokat egy másik aspektusból, egy kórélettani és klinikai szempontokat tekintve jelentősen különböző rendszerben is szeretne volna megvizsgálni. E tekintetben kézenfekvőnek tűnt a **máj és IR károsodásának** vizsgálata. Mint az korábban említésre került, az alsó végtagi ischaemiával szemben a máj speciális vérellátásából, szöveti felépítéséből, valamint a rezidens Kuppfer-sejtek jelenlétéből fakadóan az IR károsodás egy valamelyest komplexebb formáját mutatja. Ezen felül a klinikum, illetve a terápiás lehetőségek tekintetében is jelentős a különbség. Míg végtagi ischaemia során többnyire a vértelenség nem tervezetten lép fel (thrombembolia és egyéb kórképek kapcsán), addig a máj esetében az esetek jelentős részében az ischaemia tervezetten, a műtéti beavatkozás részeként jelentkezik. Így a „védő” beavatkozásoknak elsődlegesen nem a reperfüziós károsodásokat kell kivédeniük, hanem a szerv ischaemiás toleranciát kell növelniük, mintegy felkészítve azt egy későbbi jelentős inzultusra. Ezáltal jelen esetben nem az "utó" (posztkondicionálás), hanem a különféle "elő" kezelések bírnak létjogosultsággal.

A klinikai gyakorlatban mindennaposak a kirekesztésekkel járó májműtétek (májtranszplantációk, májresectiók), melyek törvénytörően a máj bizonyos fokú ischaemia-reperfüziós károsodását okozzák. A károsodás mértéke meghatározó a szerv életképessége és a posztoperatív túlélés szempontjából. A műtéti és az azt követő halálozás, illetve az operációt követő szövődmények megjelenése szoros összefüggést mutat az ischaemiás idővel, a vérvesztés mértékével, illetve a beavatkozás alatti, és az azt követő transzfúziók mennyiségével. A posztoperatív halálozás major májresectiót követően, egészséges máj esetén 3,27%, mely akár 20% fölé is emelkedhet cirrhosis és egyéb, parenchyma károsodással járó kórképek kapcsán. [313] Mindezek következtében az ischaemia mechanizmusainak tanulmányozására és a máj ischaemia toleranciájának megnövelésére képes módszerek kifejlesztésére nagy a klinikai igény.

Tekintve, hogy a szerző korábbi munkája (Az ischaemia tolerancia növelésének lehetőségei a májsebészetben - Ph.D. Doktori munka) a jelen kísérletsorozat kapcsán ismertett kutatások alapját képezte, így a következőkben röviden ezen "előkísérletek" eredményeinek összefoglalása olvasható. [53] Megállapítható, hogy (1) a patkány máj a 30 perces ischaemiát jól tolerálja, míg a 45 és 60 perces kirekesztés már jelentős mikrocirkulációs károsodást eredményez. 90 perces ischaemiát követően pedig a máj mikrokeringése oly mértékben károsodik, hogy spontán javulása, rendeződése már nem következik be a megfigyelt reperfúziós idő alatt. (2) A laser Doppler áramlásmérő alkalmas a máj mikrocirkulációjának mérésére, meghatározott körülmények, standardizált feltételek mellett. Az állandó hőmérséklet, a légzőmozgások minimalizálása, a mérőfej állandó nyomóereje, a pontosan megválasztott mérési hely és külső környezet standardizálása elengedhetetlen feltétele a mérés reprodukálhatóságának, illetve a vizsgálat sikerének. A LDF használata során kapott áramlási görbék helyes interpretációja mellett (a kutató csoport által bevezetett számolt paraméterek által) az egyedi áramlási görbék összehasonlíthatóvá válnak. (3) Az IR folyamatában központi szerepet kap a TNF- $\alpha$  hatása és az antioxidáns raktárak állapota. (4) Az egy ciklusban alkalmazott **ischaemiás prekondicionálás (I-PreC)** (5 perc ischaemia - 10 perc reperfúzió) szignifikáns áramlásjavulást okoz a 45 és 60 perces ischaemiában részesített májszöveten. A 30 perces ischaemia alatt még nem, a 90 perces ischaemiát követően már nem jelentkezik az I-PreC protektív hatása. A szövettani elváltozások, illetve egy hetes túlélés tekintetében kismértékű javulás látható I-PreC hatására, mely nem szignifikáns mértékű egyik csoportban sem. A korai gyulladáshoz vezető választ, illetve részint a Kupffer-sejt érintettségét is reprezentáló szérumban TNF- $\alpha$  szintek szignifikáns módon javulnak I-PreC hatására 45 és 60 perc ischaemia után. Hasonló változások észlelhetők a rutin laboratóriumi paraméterekben (ASAT, ALAT, ALP, szérumban bilirubin). A májszöveti és szérumban antioxidáns paramétereket az I-PreC szintén javította. A fentiek alapján elmondható, hogy az I-PreC protektív hatását 45 és 60 perces ischaemiás periódusok előtt alkalmazva képes létrehozni. A máj számára ezen ischaemiás időtartam, különösen a 60 perces kirekesztés kritikusnak mondható.

Jelen vizsgálat sorozat kapcsán a szerző célja további - egyéb szervek kapcsán már sikerrel alkalmazott - sebészi és farmakológiai kondicionálási technikák máj protektív hatásának vizsgálata volt. Első lépésében a szerző a kondicionálási technikák legújabb vívmányával, a **távoli szervi kondicionálási** technikákkal kapcsolatos megfigyeléseit ismerteti.

Murry és Vinten-Johansen úttörő munkásságát követően a sebészi kondicionáló eljárások (lokális ischaemia pre-, és poszt-kondicionálás) széles körben elterjedtek. [78, 169] E tanulmányokból kiindulva Przyklenk és munkatársai dolgozták ki a távoli szervi ischaemiás kondicionálás technikáját, ami azon feltételezésen alapult, hogy a kondicionálás hatásos abban az esetben is, ha távoli szerv vaszkulaturájában idézünk elő rövid ideig tartó ischaemiás periódusokat. [142] A **távoli szervi ischaemiás perkondicionálást (R-IPer)** először 2007-ben Schmidt és munkatársai mutatták be. [147] A módszer lényege, hogy rövid ideig tartó ischaemiás periódusokat hozunk létre egy távoli szervben a célszervben fennálló ischaemia ideje alatt, de még közvetlenül a reperfüzió előtt. Mint ahogy azt a szerző távoli szervi perkondicionálás témában megjelent review közleménye is részleteiben taglalja, a R-IPer-t korábbiakban szinte kizárólag a kardiovaszkuláris rendszer IR károsodásainak vonatkozásában vizsgálták, így a következőkben a módszer máj IR modellünkben történő alkalmazását tűztük ki célul.

A korábban ismertetett előkísérletek tapasztalatait alapul véve a károsodás szempontjából már kiritikusnak tekinthető 60 perces máj ischaemiát alkalmaztuk alapmodellként. Vizsgálatainkat egy egyszerűen megvalósítható R-IPer protokoll kidolgozásával kezdtük. Tekintve, hogy tanulmányaink tervezésekor csupán 16 publikáció volt elérhető a témában, melyek döntő többségében (94%) vázizomzatban (alsó végtag) létrehozott ischaemiás periódusokat alkalmaztak kondicionálás céljára, így vizsgálataink során mi is ezen protokoll mellett döntöttünk. Az alsó végtagi vaszkuláris kirekesztés elérhető noninvazív (tourniquet, felfújható mandzsetta stb.) vagy invazív módon (infrarenális aorta kirekesztés, femorális arteria lefogása stb.). Mivel az általunk alkalmazott modell kapcsán a máj ischaemia létrehozásához medián laparotómia szükséges, így az aorta infrarenális szakaszának kirekesztése tűnt a perkondicionáló hatás előidézésének legegyszerűbb, könnyen standardizálható módjának. Az optimális ciklusszám és az ischaemia-reperfüziós periódusok hossza tekintetében más szerzők által közölt adatokra támaszkodtunk. Xin és munkatársainak tanulmányából ismert, hogy a túl kevés (1-2x5 perc IR) ismétlésszám vagy a túl rövid ciklusidő (4x1-3 perc IR) alkalmazásával nem váltható ki megfelelő protektív hatás patkány myocardialis infarktusz modelljében. [155] A leghatásosabb R-IPer protokollnak a 3-4 cikluson keresztül alkalmazott 5-5 perces IR bizonyult. Ezen megoldás hatásosságát (4x5 perc végtag IR) más szerzők is bizonyították. [76, 147, 314-320]

2012-ben Basalyay és munkatársai patkány myocardialis infarktus modelljükben bilaterális alsó végtagi ischaemiás perkondicionálás alkalmazása során szignifikáns necrosis csökkenésről (56%-os infarktus méret csökkenés a nem kezelt állatokhoz képest) számoltak be. [321] Ezen eredményekre alapozva kívántuk meghatározni a távoli szervi perkondicionálás eddig felfedetlen hepatoprotektív hatásait. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a R-IPer szignifikáns mértékben képes csökkenteni az szövettani károsodások mértékét, ami megtartottabb szöveti szerkezetben és alacsonyabb szérum transzamináz szintekben is megnyilvánult.

Tekintve, hogy a mikrokeringés károsodása és a következményes - a bevezetésben részleteiben tárgyalt – „no-reflow” jelenség az ischaemia prolongálása következtében sarkalatos pont a szöveti sérülés létrejöttében [40, 322], így vizsgálatainkat a máj mikrocirkulációjának meghatározásával folytattuk. Eredményeink alapján a R-IPer hatására szignifikáns javulás figyelhető meg a máj reperfúzió alatti mikrocirkulációjában az IR csoporthoz viszonyítva. Ezen adatok összhangban vannak azon kutatók megfigyeléseivel, akik távoli szervi perkondicionálás myocardialis keringésre gyakorolt hatásait vizsgálták. Zhao és munkatársai sertés myocardialis ischaemia modelljében igazolták a távoli szervi perkondicionálás infarktusméret csökkentő hatását, mely részben a no-reflow jelenség mérséklődésének az eredménye volt. [315] Loukogeorgakis és munkatársai szerint a mikrokeringésre gyakorolt pozitív hatás háttérében a megőrzött endothel funkció állhat. [323] Vizsgálataink során a máj (célszerv) mikrocirkulációja mellett az izomzat kapilláris keringését is nyomon követtük. Érdekes megfigyelés, hogy a kezeletlen csoportban, a máj reperfúziójának kezdeti szakaszában jelentősen csökkent a végtagi vázizomzat mikrocirkulációja. Mindazonáltal a R-IPer csoport esetében a vázizom keringése megtartottabbnak bizonyult az IR csoporthoz képest. A máj reperfúziójának elején tapasztalt alsó végtagi mikrocirkulációs áramlás-csökkenés feltételezhetően a keringési redisztribúció hatására jön létre. Ezt támasztja alá, hogy a máj IR károsodása kapcsán romló szisztémás hemodinamikai hatásokról, myocardialis funkcióromlásról, és enzimmarker emelkedésről is beszámoltak. [324-327] Számos magyarázat létezhet arra vonatkozóan, hogy mi okozza a R-IPer és IR csoportok között tapasztalt az alsó végtag keringésében létrejövő szembetűnő különbséget. Elképzelésünk szerint, mivel a modellünkben alkalmazott távoli szervi kondicionálás mérsékelte a máj károsodását, ennek eredményeként feltételezhető, hogy a szisztémás keringésbe jutó, máj eredetű metabolitok (citokinek, szabad gyökök stb.) mennyisége és így az általuk kifejtett kardiodepresszív és endotheliális diszfunkciót előidéző

hatás is csökkent, és ezzel párhuzamosan javult vázizomzat keringése is. Ezt támasztják alá hemodinamikai vizsgálataink eredményei, melyek igazolták, hogy R-IPer hatására szignifikánsan javult a reperfúzió alatti artériás középnyomás. Másfelől, feltételezhetjük, hogy a távoli szervi perkondicionálás - amelyet az infrarenális aorta kirekesztésével értünk el - a vázizomra lokális perkondicionáló hatással bír, mintegy védve a máj IR károsodásának káros hatásaitól.

2011-ben, Wei és munkatársai felvetették, hogy a perkondicionálás szignifikáns hatást gyakorol a gyulladásoz folyamatokra: myocardialis infarktus modellező rágsaló kísérletükben R-IPer hatására csökkent a PMN leukocita infiltráció, valamint csökkent a monocita chemoattraktáns protein-1 expressziója. [318] Mindazonáltal a fent említett kutatócsoport nem tudta bizonyítani a perkondicionálás TNF- $\alpha$  expressziójára kifejtett, „elvárt” jótékony hatásait. Kísérletünkben meghatároztuk a szérumb TNF- $\alpha$  koncentrációban bekövetkező változásokat 1, 6 és 24 óra reperfúziót követően. A perkondicionálás képes volt a szérumb TNF- $\alpha$  szintek szignifikáns mérséklésére 1 és 6 órával a reperfúziót követően az IR csoporthoz képest. Eredményeink szorosán korrelálnak a Wang és munkatársai által tapasztaltakkal, miszerint a távoli szervi ischaemiás perkondicionálás jótékony hatást gyakorol a pro-, és anti-inflammatórikus citokinek (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-10, ICAM-1, stb.) szérumb szintjére myocardialis ischaemiát követően. [328]

A pro-inflammatórikus citokin képződés mellett a reperfúzió kiterjedt oxidatív stresszel is együtt jár. Kísérletünkben az R-IPer kedvező irányba toltá el a májszövet szabadgyök terhelését, illetve az antioxidáns kapacitását. A fenti eredmények összhangban állnak Tang és munkatársainak megfigyeléseivel, akik a protektív hatású szuperoxid dizmutáz (SOD) aktivitásnövekedéséről, valamint ezzel párhuzamosan csökkent lipidperoxidációról számolnak be nyúl R-IPer modellben. [329] Újabban Costa és munkatársai vizsgálták R-IPer protektív hatásait a jelen tanulmányban ismertetthez hasonló kísérleti elrendezésben. Eredményeik alátámasztják a vizsgálataink során tapasztaltakat, igazolva, hogy a R-IPer képes a májszövet malondialdehid szintjeinek mérséklésére, valamint a szöveti antioxidáns kapacitás megőrzésére. [330] Összegezve, a perkondicionálás képes lehet az intenzív szabadgyök felszabadulás megakadályozására, amelyet feltehetőleg a mikrovaszkuláris károsodás mérséklésével [315], a gyulladásoz válasz [318, 328] és a leukocita funkciók visszafogásával [331], valamint a szabadgyök elimináló folyamatok beindításával idéz elő. [329]



Figyelembe véve a fenti eredményeket, kísérleteink rámutattak a távoli szervi perkondicionálás protektív célszervi hatásaira, mely megfigyelést később alátámasztották más kutatócsoportok által (Costa és munkatársai valamint Sedaghat és munkatársai) közölt megfigyelések is. [330, 332]

A távoli szervi kondicionálással szerzett kezdeti tapasztalataink után a figyelmünk a R-IPer hepatoprotektív mechanizmusainak tanulmányozására összpontosult. Ahogyan az a fentiekben tárgyalásra került számos tanulmány alátámasztja a távoli szervi perkondicionálás protektív hatásait szív [333], agy [334], vázizom [150], illetve kutatócsoportunk által máj esetében is. Ugyanakkor ezen ígéretesnek mutakozó technikai megoldás háttérében álló mechanizmusokkal kapcsolatos tudásunk ma még számos helyen hiányos. Habár jelentős mértékű hasonlóságok és átfedések vannak az egyes ischaemiás kondicionáló eljárások mechanizmusában, ugyanakkor számolnunk kell kisebb különbségekkel. A célszerv vonatkozásában az egyes eljárások időzítése (pre, per vagy poszt-kondicionálás), illetve az egyes résztvevő elemek aktiváltsága és koncentrációja nem megegyező, mely így megváltoztathatja a megfigyelt protektív válaszreakciót. Hausenloy és munkatársainak kimutatták, hogy ilyen apróbb eltérések állnak a lehetséges különbségek háttérében egyes protektív jelpályák aktiválódás kapcsán. [314] Ezt azzal igazolták, hogy míg a wortmannin PI3-kináz inhibitor megszüntetheti a távoli szervi perkondicionálás (RIPC) protektív hatásait, addig a R-IPer hatásaira nincs befolyással.

Széles körben elterjedt elmélet szerint, a cél- és kondicionált szerv közötti kapcsolat vérrel keringő faktorok és/vagy szisztémás, idegi elemek útján valósul meg. Úgy tűnik, hogy ezen kapcsoló mechanizmusok protektív szignálokat közvetítenek a célszerv felé, ezzel komplex szubcelluláris védőmechanizmusokat indítva be. [76] Gho és munkatársai elsőként alkalmazták a ganglionblokkoló hexamethoniumot, amely teljes mértékben megszüntette a mesenterialis erekben végzett perkondicionálás infarktusz méret csökkentő hatását. [143] Ezt követően további tanulmányok is megerősítették az autonóm idegrendszer szerepét a távoli szervi perkondicionálás hatásmechanizmusában. Bizonyítást nyert, hogy direkt nervus vagus izgalom hatására csökkenhet a myocardium IR károsodásának mértéke [335, 336], továbbá bilaterális cervicalis vagotómia segítségével a RIPC potens protektív hatásai felfüggeszthetők. [321] Matitskaya és munkatársainak közlése szerint a kolinerg vagális preganglionális neuronok szelektív blokkolásával ugyancsak hatásosan megszüntethető a RIPC protektív hatása, míg azok szelektív izgatásával erős RIPC-t leképező hatás érhető el. [337] Feltehetően különféle, távoli szervből felszabaduló mediátorok (adenozin, bradykinin,

stb.), valamint a helyi idegi elemek felelősek ezen komplex idegi mechanizmusok beindításáért. Felvetődött továbbá annak lehetősége is, hogy ezen mediátorok aktiválhatják a capsaicin-szenzitív érző neuronokat, amelyek így calcitonin gene related protein (CGRP) felszabadításával képesek a védőmechanizmusok indukálására. [338]

A R-IPer mechanizmusairól szóló előzetes eredmények főleg kardiovaszkuláris kutatásokból származnak. Szignifikánsan kevesebb adat áll rendelkezésre olyan parenchymás szervek ischaemiás eseményeit illetően, mint a máj. [339] Neurális komponensek szerepét a R-IPer hepatoprotektív hatásai kapcsán eddig munkacsoportunkon kívül nem publikálták. Lim és munkatársainak közléséből kiderül, hogy a hátsó (azaz alsó) végtagon alkalmazott távoli szervi prekondicionálással kiváltott myocardialis védőhatás teljes mértékben felfüggeszthető ipszilaterális nervus femoralis és nervus ischiadicus átvágásával. [340] Ezen adatokra alapozva további tanulmányunk során az alsó végtagi idegátmetszés hatásait vizsgálatuk perkondicionálás alkalmazása mellett. Modellünkben a távoli szervi perkondicionálást a bal femoralis artérián hoztuk létre, a bal femoralis és ülőideg kipreparálását követően. Így ugyan előző vizsgálatainkkal összevetve a kondicionálást egy – ellátási területét tekintve - szignifikánsan kisebb vaszkuláris régióban alkalmaztuk, ugyanakkor könnyű szerrel kivitelezhattuk a kondicionált terület szelektív denervációját.

Eredményeink alapján az IR károsodás következtében a máj reperfüziós mikrocirkulációja, valamint az átlagos artériás nyomás szignifikáns mértékben lecsökkent az ischaemián átesett csoportokban. Ugyanakkor a R-IPer jelentős mértékben képes volt mérsékelni ezen hemodinamikai megingást. A femoralis és ülőideg átvágása azonban tompította a R-IPer protektív hatását. A célszervi károsodás (necrosis) számszerűsítésre automatizált képanalízist alkalmaztunk (Fraunhofer MEVIS). A szövetkárosodás kiterjedtsége kifejezett volt az ischaemia-reperfüziós sérült csoportokban (IR, IR-N). A perkondicionálás jelentős mértékben csökkentette a necrotikus területek kiterjedését, ugyanakkor hasonló protektív hatás nem volt megfigyelhető az idegátvágott csoportban. A szövettani eredményeket alátámasztják a szérum ALAT szintek párhuzamos változásai. Ezzel szemben ASAT szintek mind a négy IR károsodott csoportban emelkedettek voltak, csoportok közötti szignifikáns eltérés nélkül. Ennek hátterében a két paraméter eltérő specificitása állhat: ALAT-t többnyire májkárosodásra specifikus enzimnek tartjuk, míg az ASAT számos egyéb szövet, mint a myocardium vagy vázizom sérülésekor is felszabadul. [341] A teljes szérum bilirubin koncentráció meghatározását a májfunkció megközelítő

becslése céljából végeztük el (felvétel és exkréció). Enyhén, mégis szignifikánsan emelkedett bilirubin szintek voltak megfigyelhetők az IR, IR-N és IR+R-IPer-N csoportok esetében, míg az IR-R-IPer csoportban a bilirubin szint normál tartományban maradt. A májszövet szabadgyök tartalma alapján megállapítható, hogy a R-IPer képes volt a reperfüzió alatti szöveti szabadgyök terhelést csökkenteni. Idegkiirtást követően ez a védőhatás nem volt megfigyelhető. Ez a jelenség kevésbé volt nyilvánvaló a proteinfüggő antioxidáns (SH-csoportok) és H<sup>+</sup>-donor aktivitás tekintetében.

Eredményeink egybevágóak Lim és munkatársainak megfigyeléseivel, akik egér myocardialis ischaemia-reperfüzió modelljük segítségével igazolták, hogy a végtag denerválása teljes mértékben felfüggesztheti a femorális artérián alkalmazott kondicionálás infarktusméretre kifejtett pozitív hatásait. [340] Egy újabb tanulmányban, Wang és munkatársai vagális stimulációval előidézett perkondicionálás pozitív hatásait vizsgálták. A szerzők felvetették, hogy az elektromos vagális stimuláció a cholinerg anti-inflammatórikus útvonalak aktiválódása révén fejti ki hatásukat. [328] Az infarktusméretre és gyulladásos válaszra kifejtett pozitív változások ezen módszer alkalmazásával összehasonlíthatóak voltak azokkal az eredményekkel, amelyeket a standard ischaemiás perkondicionálási modelljükből nyertek. Mindez alátámasztja az egyes idegi összetevők szerepét a R-IPer indukálta szervvédelemben.

Összefoglalásként (1) a szerző munkacsoportja elsőként számolt be azokról a komplex rövid és középtávú tapasztalatokról, amelyben alsó végtagi R-IPer-t alkalmaztak patkány máj IR károsodásának csökkentésére. (2) A jelen vizsgálatokban igazolást nyert, hogy a távoli szervi kondicionálás képes hepatoprotektív hatást kifejteni, mely azonban majdnem teljes mértékben felfüggeszthető a kondicionáló szerv denervációjával. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a perkondicionálás által előidézett hepatoprotektív hatások közvetítésében bizonyos neurális elemek szerepet játszanak. Összegezve, a R-IPer egy elérhető, jól alkalmazható, alacsony kockázatú módszer, amely értékes klinikai megközelítést biztosíthat számos, súlyos IR károsodással járó elektív és akut klinikai szituációban.

Kísérletsorozatunk folytatásának alapját a sebészi, ischaemiás kondicionálási eljárások pathomechanizmusának mélyebb megértése képezte. Intenzív kutatásoknak köszönhetően az utóbbi évtizedben számos szignálút vonal ismertté vált, melyek befolyásolása az ún. farmakológiai kondicionálások széles palettájának nyitott utat. Ezen

kémia előkezelések közé sorolható a **levosimendan** alkalmazása, amelynek antiischaemiás hatását kutatócsoportunk vizsgálta elsőként parenchymas szerv esetén. A levosimendanról ismert, hogy kedvező, „inodilatátor” kardiológiai hatásai mellett a mitokondriális  $K^+$ ATP-csatornák nyitására keresztül képes a mitokondriumok stabilizálására és ez által a sebészi kondicionálási technikákhoz hasonlóan az ischaemiás károsodások mérséklésére. [175]

Jelen vizsgálatban a levosimendan protektív hatásának igazolására meghatároztuk a máj IR károsodásban kulcsfontosságú szerepet betöltő mikrocirkulációs változásokat. A mikrokeringés vizsgálata során látható volt, hogy mind a műtét előtt közvetlenül, mind a 24 órával korábban végzett levosimendan előkezelés szignifikáns javulást eredményezett a májszövet mikrocirkulációjában a megfelelő IR kontroll csoportokhoz képest. Ez a jelenség egyrészt lehet a szer hemodinamikai hatásának következménye, de megjelenhet farmakológiai prekondicionálás eredményeként is. Az előbbire utalhat, hogy a levosimendan máj véráramlásra gyakorolt pozitív hatását más szerzők is leírták szeptikus sertésmodellben, ahol a pulmonális vaszkuláris ellenállás csökkenése mellett a portális áramlás és muosalis oxigénellátás javulását figyelték meg a szer adagolását követően. [179] A levosimendan farmakológiai prekondicionáló hatásához hozzájárul, hogy egyes kísérletes megfigyelések alapján különböző szignálok aktiválva fokozza az endotheliális NO-termelést a koronáriákban. [342] Az eNOS indukciója pedig következményesen csökkentheti az IR során kialakuló NO/ET-aránytalanság mértékét és jelentősen javíthatja a máj szöveti mikrocirkulációját. [343, 344]

A kedvező mikrocirkulációs hatások mellett a levosimendannal végzett előkezelés jelentős mértékben mérsékelte a máj IR károsodásának mértékét. A szöveti károsodás megítélésére és értékelésre használt pontrendszer alapján a tisztán IR károsodáson átesett csoportban közepes intenzitású a destrukció mértéke: nagy, sokszor összefüggő területeken megjelenő necrosis, szöveti bevérzés és gyulladásos válasz. Ezzel szemben a levosimendannal előkezelt csoportokban látványosan kevesebb, karakterét tekintve inkább fokális sejtelhalás mutatkozott. A klasszikus szövettani vizsgálatokkal összehangban TUNEL immunfestéssel minden IR károsodott csoportban megjelentek diffúz pozitívítást mutató területek, melyek a hematoxilin-eozin festéssel is detektálható necrotikus szövetrészeknek voltak megfeleltethetők. Levosimendan kezelést követően, mind a „rövid”, mind a „hosszú latenciájú” időkategória esetében szignifikáns csökkenés mutatkozott a demarkálódott területek méretében. Az összefüggő területeket érintő károsodás aránya PARP-immunhisztokémiával vizsgálva is igen hasonlóan alakult, szignifikánsan kisebb mértékű

sejt, illetve DNS-károsodást jelezve. A levosimendan kezelt csoportok kisebb mértékű májsejt károsodását támasztja alá továbbá a szérum ALAT aktivitásának mindkét kezelési időablakban megfigyelhető szignifikáns csökkenése is. Mindemellett megjegyzendő, hogy a szöveti leukocytás beszűrődés is kisebb mértékűnek bizonyult levosimendan alkalmazása mellett. Ez a megfigyelés összecseng a gyulladáshoz való válasz mérséklődését igazoló korábbi vizsgálatok eredményeivel, melyek alapján a levosimendan idő- és dóziszfüggő módon képes csökkenteni a TNF- $\alpha$ , az IL-1 és IL-6 termelést és gátolni az ödéma képződést. [345] Ezzel párhuzamosan egyes kutatók igazolták, hogy a szer hatására fokozódik a szuperoxid-dizmutáz aktivitása és a glutation szintje is, mely a csökkent gyulladáshoz való reakcióval együttesen a redox-homeosztázis kedvező alakulását eredményezi. [346] Kísérletünkben ez utóbbit a luminometriával mért szabadgyök-szint csökkenés, valamint a spektrofotometriás mérések alapján javuló tendenciát mutató antioxidáns státusz tükrözte.

A levosimendan máj mikrocirkulációra és szöveti károsodásra kifejtett pozitív hatásainak háttérében álló mechanizmusok feltérképezésére elvégeztük a HSP-72 expresszió meghatározását. Ennek emelkedő szintje ischaemiás prekondicionálás során bizonyítottan hozzájárul a sejtprotektív hatás kialakításához. [347] Ebben a vonatkozásban azonban a levosimendannal kezelt csoportok nem mutattak különbséget az IR kontroll csoportokhoz képest. Tekintve, hogy a folyamat egy kiragadott eleméről van szó, elhamarkodott lenne kimondani, hogy a prekondicionálás ismert útvonalai egyáltalán nem játszanak szerepet a májkárosodás csökkentésében. Felmerül ugyanakkor, hogy a máj esetében egyéb mechanizmusokra, mint például a javuló szisztémás keringési változásokra visszavezethető hatásról is szó van.

Jelen kísérlet hemodinamikai mérési adatai azonban nem nyújtanak elegendő információt a szisztémás keringési hatásokra vonatkozóan. A vérnyomás- és szívfrekvencia regisztrátumok alapján csak annyi mondható ki, hogy a levosimendan jelen adagolási formájával a típusos kardiális hatás indukálható. Az infúzió alatt és azt követően is fennmaradó szívfrekvencia emelkedés, illetve vérnyomás csökkenés jól korrelál az irodalmi adatokkal. [181] A szervi keringés szempontjából azonban sokkal fontosabb paraméterek, mint például a perctérfogat, illetve a pulzustérfogat, valamint a belőlük származtatott paraméterek meghatározására lenne szükség. Fontos lenne továbbá lokális gasztrointesztinális keringési paraméterek, úm. a mucosalis pH meghatározása is. Annak alapján, hogy a reperfüziós vérnyomásesés kisebb mértékű volt levosimendan kezelést követően, illetve hogy ezen csoportokban jobb hatásokkal rendeződtek a

vérnyomásértékek, arra lehet következtetni, hogy a célzott hemodinamikai vizsgálat további kísérletek számára ígéretes lehet.

További vizsgálatot igényel a funkcionáló mitokondriumok nagyobb arányú jelenléte is, mely az alsóvégtagi kísérletek során ismertetett NBT-enzimhisztokémiával vizsgálva a levosimendannal kezelt csoportokban megfigyelhető, és a „hosszú latenciájú” előkezelés esetében szignifikáns mértékű. Ennek hátterében egyrészt a mitokondriális  $K^+$ ATP-csatornákra kifejtett közvetlen hatás állhat, másrészt megjelenhet másodlagosan a károsodás mérséklésének következtében is. A mito- $K^+$ ATP-csatornák direkt nyitása irodalmilag is dokumentált a levosimendannal kapcsolatban, és mint más, hasonló hatást kifejtő molekulák esetében, itt is prekondicionálásszerű anti-ischaemiás hatással hozható összefüggésbe, mely a csatornák specifikus gátlószerevével felfüggeszthető. [348, 349] Az NBT-enzimhisztokémiával levosimendan kezelést követően tapasztalt jobb szöveti viabilitás tehát elképzelhető, hogy a farmakológiai prekondicionálás eredménye is, melyre vonatkozóan ugyanakkor jelen kísérlet nem szolgáltat elegendő bizonyítékot.

A kezelés két időablakban történő vizsgálata elsődlegesen az ischaemiás prekondicionálással kapcsolatban leírt két fázis (I-PreC korai és késő hatásai) modellezésére szolgált. A kísérleti eredmények alapján azonban ismételten felmerült, hogy a „hosszú latenciával” végzett kezelés esetén súlyosabb károsodás jelent meg, mint a „rövid latenciával” kezelt és operált állatok azonos vizsgálati csoportjában. E tekintetben egyaránt korrelálnak egymással a szövettani és az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei, valamint a mikrocirkulációs áramlási paraméterek. A „rövid latenciával” kezelt csoportokhoz képest megjelenő, szignifikáns ASAT-szint emelkedés és az NBT-pozitivitás szignifikáns csökkenése szintén ezt támasztják alá. A jelenség hátterében az a "hosszú latenciával" előkezelt állatokat ért nagyobb perioperatív stressz állhat, mely a két fázisban történő kezelés, illetve műtét velejárója és rágcválók esetében jelentős lehet. Érdekes kiemelni azonban, hogy a levosimendan kezelés ebben a "hosszú latenciával" előkezelt kategóriában még kifejezettebb javulást eredményezett az IR kontroll csoporthoz képest. Magyarozatként szolgálhat erre, hogy a levosimendan kezelést követő maximális perctérfovat emelkedés és hemodinamikai válasz a kezelést követő első és második napra tehető. [350]

Összegezve a fenti eredményeket kutatócsoportunk elsőként igazolta, hogy a levosimendan előkezelés jelentős mértékben képes mérsékelni a máj, mint parenchymás

szerv IR károsodását, mely háttérében a javuló szöveti keringés mellett a mitokondriális funkcióra kifejtett pozitív hatás is állhat.

Kísérleteink továbbgondolása során a klasszikus ischaemiás keringésmóduló eljárások és azok jelátviteli pályáján ható ágensek felől az érdeklődésünk egyéb gyógyszeres előkezelések felé fordult. E tekintetben kézenfekvőnek tűnt a reperfüziós károsodások kapcsán észlelt oxidatív stressz állapot befolyásolása, mivel ez a máj esetében kiemelkedő szerephez jut a reperfüziós során történő masszív szabadgyök (ROS) termelésréven. A ROS-ek termelése a korai szakban inkább a Kupffer-sejtek, míg a későbbiekben dominánsan a PMN-k aktivációja révén jön létre, és ezzel egy ponton túl meghaladja az endogén antioxidáns rendszerek kapacitását. [351] A folyamat eredőjeként jelentős mennyiségű proinflammatorikus citokin (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8) szabadul fel. [352] A szabadgyökök, citokinek, valamint proteázok túltermelődése és felszabadulása a parenchymális és egyéb sejteket egyaránt károsítja, mely végül a májfunkció romlásához vezet. Emellett mindezen parakrin mediátorok olyan nagy mennyiségben kerülhetnek a keringésbe, hogy számos esetben káros szisztémás hatások megjelenésére is számítani lehet.

Az elmúlt 15-20 év kísérletes eredményei és számos kisebb klinikai vizsgálat alátámasztotta, hogy a **glutamin** mellékhatások nélkül képes a posztoperatív kimenetel javítására kritikus állapotú betegek esetén. [353] A glutamin számos olyan molekuláris, valamint gén expresszióra kifejtett hatással (pl.: hősokk fehérjék aktiválása) bír, mely pozitívan befolyásolhatja az IR károsodás kórlefolyását. Több kísérletes eredmény is alátámasztja a glutamin anti-inflammatorikus tulajdonságát, [197, 354] melyet kiegészít az antioxidáns státuszra gyakorolt szupportív hatása. [355] Mindezek alapján - az IR károsodás patomechanizmusát figyelembe véve - érdemesnek tartottuk megvizsgálni, hogy rejlik-e protektív potenciál parenterális glutamin preoperatív – mintegy profilaktikus – adásában.

A preoperatív glutamin kezeléssel végzett első kísérlet során (rövid latenciájú előkezelés), a közvetlenül műtét előtt infundált Dipeptiven® oldat segítségével javuló reperfüziós mikrocirkulációt, kedvezőbb szöveti antioxidáns státuszt és szignifikánsan kisebb arányú necrosist tapasztaltunk. A kezelt állatok esetében – a kisebb szöveti károsodás és valószínűsíthetően jobb energetikai státusz következtében – az apoptózis vált domináns sejthalálformává. Mindezek eredőjeként csökkent a lokális és szisztémás gyulladással válaszreakció mértéke. Kísérletünk folytatásaként - tekintettel a glutamin alkalmazásával

kapcsolatos klinikai ajánlások változására - a hosszú távú előkezelés okozta protektív hatások vizsgálatára összpontosítottunk.

A korábbiakhoz hasonló módon a máj mikorkeringésének vizsgálatát végeztük. Glutamin kezelés hatására javuló tendenciát tapasztaltunk a májszövet korai reperfüziós áramlásában. Ezzel összefüggésben Schauer és munkatársai glutamin posztischaemiás adása mellett intravitális mikroszkópiás vizsgálattal a szinuszoideális áramlás majdnem teljes rendeződését találták. [356] Ezzel párhuzamosan a fehérvérsejtek kitapadásának csökkenését figyelték meg a májszinuszoidok és a posztszinuszoidális venulák területén. A mikrocirkuláció javulása részben visszavezethető a lokális gyulladásos válaszreakció és a leukocyta-kitapadás csökkenésére, ezért elviekben kapcsolatba hozható a glutamin gyulladáscsökkentő és az antioxidáns státuszt javító hatásaival.

Rutin szövettani metszeteket vizsgálva a glutamin kezelt csoportban nem lépett fel szöveti bevérzés, valamint általában megfigyelhető volt a szövetkárosodás és a gyulladásos sejtes beszűrődés mérséklődése, mely jól korrelált a szöveti mikrocirkuláció fent említett javulásával. Kihhasználva a 24 órás reperfüzió alatti, egyértelműen demarkálódó szövetkárosodás nyújtotta lehetőséget, TUNEL-reakcióval vizsgáltuk ezen területek méretét, tekintve, hogy a TUNEL reagens a necrosisra jellemző, masszív ischaemiás DNS töréseket is megfesti az apoptózis mellett. A glutamin kezelt csoportban szignifikánsan csökkent az összefüggő TUNEL-pozitivitást mutató területek aránya az IR kontroll csoporthoz képest, ami számszerűen is alátámasztja a szignifikánsan kisebb mértékű necrosis jelenlétét. A necrotikus területek méretének csökkenése tükröződik a PAR-immunhisztokémát követően kimutatható szignifikánsan alacsonyabb szöveti PARP-aktivitásban is. A Sudan IV festéssel igazolt, ugyancsak súlyos sejtkárosodásra utaló zsíros degeneráció előfordulása () glutamin kezelés hatására szintén csökkent. A glutamin kezelés szövet-, illetve sejtkárosodást csökkentő hatását a szérummintákban mért necroenzim aktivitások szignifikánsan alacsonyabb szintje is alátámasztotta.

A fenti kedvező hatások hátterében a glutamin szöveti gyulladásra és redox homeosztázisra gyakorolt kedvező hatása feltételezhető, melyet jelen kísérlet eredményei is alátámasztanak: a májhomogenizátum minták luminometriás össz-scavenger kapacitása szignifikánsan javult a glutamin előkezelt csoportban. Ennek hátterében a szabad SH-csoportok szöveti koncentrációjában tapasztalt szignifikáns emelkedés állhatott, mely indirekt módon nagyobb mennyiségben hozzáférhető glutation jelenlétére utalt. A szöveti



H<sup>+</sup>-donor kapacitás és redukáló képesség áloperált csoportét közelítő értékei kiegyensúlyozott lokális redox homeosztázisra utaltak. Mindezek az eredmények összhangban vannak a közvetlenül műtét előtt adott glutamin kezelés során tapasztaltakkal. Elmondható továbbá, hogy 24 órás reperfúziót követően a kezelt és az IR kontroll csoport közötti különbségek még inkább markánsá váltak. A luminometriás össz-scavenger kapacitás plazma mintákban detektált, szignifikáns javulása elvben magyarázható lehet a kisebb lokális károsodásra visszavezethető, alacsonyabb szisztémás gyulladással, ugyanakkor ezen hipotézis igazolása célzott vizsgálatot igényel. A rövid latenciájú kísérletben szintén tapasztaltuk a plazma antioxidáns kapacitásának javulását, valamint a TNF- $\alpha$  szint csökkenését a reperfúzió egy korábbi időpontjában, ami szintén támogatja az esetleges anti-inflammatórikus hatás részletes vizsgálatának megalapozottságát.

Összességében a fenti eredmények igazolták az antioxidáns potenciállal bíró glutamin kedvező hatásait a máj IR károsodásával szemben, mely védő hatások az ischaemiás inzultust mind közvetlenül, mind pedig 24 órával megelőzően az történt alkalmazás mellett megjelennek.

Mint az a bevezető fejezetben olvasható, az IR alatt képződött szabad gyökök, illetve az ezek hatására meginduló citotoxikus reakciók a DNS-lánc károsodását idézik elő. Az ennek folyamánként aktiválódó **poly(ADP-ribóz)-polimeráz**, egy energiaigényes folyamat révén a NAD<sup>+</sup>-ból, mint szubsztrátjából ADP-ribózt és nikotinamidot hasít le, mely előbbieket különböző proteinekhez csatolja, ezáltal poly(ADP-ribóz) egységeket épít fel. Ezen folyamat súlyos károsodások esetén a magas energiatartalmú foszfátok sejten belüli deplációjához, majd további mitokondriális funkciózavarokhoz vezet, jelentősen hozzájárulva a súlyos szöveti károsodás kialakulásához. Mindezek alapján logikusnak tűnik a folyamat korai gátlása, és így a késői károsodások kivédése. Bizonyított tény, hogy a PARP gyógyszeres gátlása csökkenti a szervezetben kialakuló necrosis nagyságát, és ezáltal megőrzi azok funkcióját. [205, 207] A jelenség hátterében a PARP-inhibitorok okozta ATP prezerváció áll, mely eredményeként a sejt acnecrosis helyett a gyulladással nem kísért apoptózis felé indul. Ennek alapján feltételeztük, hogy a PARP1 enzim szelektív gátlása (PJ-34), az enzim túlaktiválódásának megelőzésével alkalmas lehet máj ischaemia-reperfúziós modellben is a késői károsodások csökkentésére.

Eredményeink szerint az előkezelés szignifikánsan javította a máj mikrocirkulációs paramétereit az IR kontroll csoporthoz képest. A szövettani mintákkal történt

összehasonlítás során látható volt, hogy a szerrel történt kezelés csökkentette a gyulladási jeleket a májszövetben. Kiterjedt necrosist a kezelt csoportokban nem láttunk. TUNEL assayt végeztünk a sejtelhalás, apoptózis igazolására. Eredményül részben összefüggő pozitív festődésű területeket (II-III zóna határa, pericentralis területek) kaptunk, melyeket az IR károsodásból eredő DNS töredezettségnek tartottunk. Az apoptózis detektálására aktív caspase-3 kimutatást használtunk, mely ilyen körülmények közt is specifikus. Az itt látott pozitív festődés megerősítette feltételezésünket, hogy a TUNEL pozitívításhoz (IR károsodás + apoptózis) képest kisebb számban, de jelen van apoptózis. Az apoptózis a PJ-34 csoportban szignifikánsan nagyobb számban fordult elő, mint az IR csoportban, ahol a necrosis jelei is láthatóvá váltak. Fontos megemlíteni azon irodalmi adatot is, amely szerint a PARP inhibitoroknak létezik direkt caspase-3 aktiváló hatásuk is. [42, 357] Kézenfekvőnek tűnik a feltevés, miszerint a csökkent mértékű oxidatív stressz is a PARP-inhibitorok közvetlen hatása lenne. A jelenség inkább az apoptózis eredményeként létrejött, csökkent gyulladási válaszjelenséggel állhat összefüggésben, [205] melyre kísérletünk során elvégzett antioxidáns vizsgálatok is rámutatnak: a globális antioxidáns státusz jellemzésére használt össz-scavenger kapacitás luminometriás mérése csökkent oxidatív stresszt igazolt, de a többi paraméter (szabad SH-csoport, H<sup>+</sup>-donor aktivitás, redukálóképesség) sem a szérumban, sem a májszöveti homogenizátumban nem mutatott szignifikáns javulást. Az előzőekkel összevág, hogy az előkezelések hatására csökkent TNF- $\alpha$  szint volt mérhető, mely a necrosis hiányára és a kisebb fokú gyulladási reakcióra is utalhat. Hasonlóképpen, a PJ-34 előkezelt csoportban az ALAT és ASAT szintek csökkenését detektálhattunk.

Összességében elmondható, hogy a szerző által vizsgált kémia előkezelések (PARP inhibitor) bizonyos aspektusokat tekintve (mikrokeringés, gyulladáscsökkentés, stb.) alkalmasnak tűntek a máj IR károsodásának kivédésére.

Fentiekből kitűnik, hogy mind az alsó végtagi, mind a májszöveti ischaemia-reperfüziós jelenségek életveszélyes kórállapotokat hozhatnak létre. A károsodás csökkentésére tett törekvéseink alapja, hogy - az IR károsodásnak kitett szervekre adaptált specifikus - kezelési technikákat és azok hatásmechanizmusait részleteiben megismerjük. A kritikus ischaemia meghatározására, illetve azok befolyásolására tett kísérletes eredményeink - az irodalmi tények ismeretében is - biztató jövőképet festenek le a későbbi klinikai alkalmazások tekintetében. Ezen ígertesnek tűnő sebészi és farmakológiai

kondicionáló eljárások háttérmechanizmusainak felderítésében, illetve a szöveti válaszjelenségek leírásában a jelen dolgozatban feltüntetett kísérletek egyes eredményei - és az ezekből született közlemények - úttörő szerepet játszottak.

## 7. Következtetések

1. Az aorta infrarenális szakaszának 3 órás kirekesztését követően - klasszikus szövettani módszerekkel - nehezen detektálható az izomkárosodás megjelenése, ugyanakkor ezen ischaemiás idő is jelentős szöveti és funkcionális eltéréseket idéz elő a távoli szervekben (vese, tüdő, bél).
2. Az alsó végtagon alkalmazott posztkondicionálás hatékonyan képes csökkenteni a reperfúziós periódusban fellépő vese-, bél-, és tüdőszövődményeket.
3. Az alsó végtag tekintetében a 8 órás ischaemiás inzultus már olyan fokú maradandó celluláris és subcelluláris károsodásokhoz vezet, melyek megalapozzák a kritikus ischaemia terminológiájának használatát patkány alsó végtagi ischaemiás modellben.
4. Az általunk kifejlesztett - enzimhisztokémiai eljárás (NBT) alapuló - kiértékelési módszer magas érzékenységgel képes a kialakult ischaemiás károsodások mértékét meghatározni, hiszen a módszer által kapott értékek jól korrelálnak mind az ischaemia hosszával, mind az elektronmikroszkópos vizsgálatok során látott változásokkal.
5. A posztkondicionálás a kritikusnak vélt, 8 órás ischaemias időtartamot követően is képes volt a fénymikroszkóposan detektálható szövettani károsodás mérséklésére. A megfigyelés időtartama alatt a kezelés mind a lokális gyulladást, mind az ennek következtében fellépő szöveti ödéma kialakulását mérsékelte.
6. Hatvan perc 70%-os, részleges májischamiás modellben a távoli ischaemiás perkondicionálás mérsékelte a máj ischaemia-reperfúziós sérülését. A módszer használatával szignifikáns javulás volt elérhető a szisztémás hemodinamikai, a mikrocirkulációs (máj és az alsó végtag) paraméterekben; valamint szignifikánsan alacsonyabb szöveti szabadgyök-szint és javuló antioxidáns kapacitás volt megfigyelhető a csökkenő gyulladáshoz való válaszként.

7. A perkondicionálással kiváltott májszövetet védő mechanizmusok felfüggeszthetők a távoli szerv (alsó végtag) denervációjával, így a neurális integritás megléte alapvető feltétele a távoli szervi perkondicionálás létrejöttének.
8. A levosimendan kezelés mindkét (rövid és hosszú latenciájú) formája markánsan képes csökkenteni az ischaemia-reperfúzió talaján kialakuló májkárosodás mértékét. A műtét előtt 24 órával alkalmazott levosimendan előkezelés összességében kifejezettebb védőhatást képes létrehozni, mint a közvetlen műtét előtt végzett kezelés. Ugyanakkor a jelenlegi kísérleti elrendezésben a szer direkt májszöveti citoprotektív hatása mellett a hemodinamikai eredetű kedvező hatások sem elhanyagolhatóak.
9. A műtét előtt (24 órával) adagolt L-alanil-L-glutamin előkezelés képes a máj ischaemia-reperfúziós károsodásának csökkentésére. A glutamin kezelt csoportban a májszöveti antioxidáns státusz szignifikáns javulása volt tapasztalható, minek alapján valószínű, hogy elsősorban ezen hatás vezet a szövetkárosodás csökkenéséhez.
10. A PJ-34 PARP inhibitor kezelés az ischaemiás inzultus hatásra necroptózisba sodródott májsejteket az apoptózis felé tereli, így a reperfúziót követő gyulladáshoz vezető reakciók mérséklésével javítja a szöveti túlélést.

## 8. Új megállapítások

A fentiek alapján az alábbi, új megállapítások tehetők:

1. A posztkondicionálás hatékony módszer az alsó végtagi ischaemia-reperfúzió helyi és távoli szervi károsodásainak mérséklésére.
2. A nitro-blue tetrazólium enzimhisztokémiai színreakción alapuló, szoftveres feldolgozással kiegészített vizsgálati eljárás alkalmas a kritikus ischaemiás károsodások detektálására. Továbbfejlesztését követően a módszer használatával az ischaemiás kórállapotok ellátása egyszerűbbé válhat, illetve az empirikus alapú terápiás döntéseinket objektív paraméterekkel erősíthetjük meg.
3. A távoli szervi perkondicionálás és a kémiai kondicionáló szerként használt levosimendan csökkenti a máj ischaemia-reperfúziós károsodását, melyet a szerző és munkacsoportja elsőként igazolt az irodalomban. A perkondicionálás hátterében álló, májszövetre vonatkozó neurális mechanizmusok szintén első leírásnak számítanak, melyek újabb utat nyithatnak a mindennapi klinikai alkalmazáshoz szükséges további vizsgálatok felé.

## 9. Összefoglalás

A szervkeringési zavarok következményeinek mérséklésére mai napig nagy a klinikai igény. Az ischaemia-reperfúziós (IR) károsodásokból eredő szervi, lokális és a gyulladásos válaszreakcióval generalizálódó folyamat eredményeként a távoli szervi károsodások életveszélyes szövődményekkel járnak. Jelen dolgozat célja, hogy két klinikai esetismertetésen keresztül felhívja a figyelmet a jelenség fontosságára, illetve a védekező mechanizmusok kidolgozásának igényére. A dolgozatban két szerv, szövet (izom és máj) egymástól eltérő IR válaszjelensége és a tervezett védekezés igényének különbözősége kerül bemutatásra. Az alsó végtagi IR károsodások csökkentésére felállított modellben egy rövidebb és egy hosszabb, a kritikus ischaemiás időt megcélzó modell került felállításra. A vizsgálatok során igazoltuk, hogy az aorta infrarenális szakaszának 3 órás kirekesztése jelentős és korai szöveti és funkcionális eltéréseket idéz elő a távoli szervekben, melyek mérsékelhetőek poszt kondicionálással (PostC). Az alsó végtagok tekintetében a 8 órás ischaemiás inzultus kritikusnak mondható, de itt még a PostC hatásosnak bizonyult. Az általunk kifejlesztett - enzimhisztokémiai eljárás alapuló - új kiértékelési módszer magas érzékenységgel képes a kialakult ischaemiás károsodás mértékét meghatározni.

A májszöveten létrehozott IR károsodások megelőzésére elsőként alkalmaztunk távoli szervi kondicionálási technikát (R-IPer), mely mérsékelte máj ischaemia-reperfúziós sérülését, csökkenő gyulladásos válaszreakció mellett. Elsőként nyert igazolást, hogy a perkondicionálással kiváltott májszövetet védő mechanizmusok felfüggeszthetőek a távoli szerv (alsó végtag) denervációjával, így a neurális integritás megléte alapvető feltétele a távoli szervi perkondicionálás létrejöttének. Kísérleteinket a farmakológiai előkezelésekkel folytattuk, mely közül a mitochondrialis ATP szenzitív  $K^+$ -csatornán ható levosimendan kezelés kapcsán markánsan javulás volt észlelhető máj IR modellben. Bizonyítottuk, hogy a jelenlegi kísérleti elrendezésben a szer direkt májszöveti citoprotektív hatása mellett a hemodinamikai eredetű kedvező hatások sem elhanyagolhatóak. Továbbá, előkezelésként használt preoperatív glutamin képes volt a máj IR károsodásának csökkentésére, melynek hátterében elsősorban a javuló antioxidáns státusz állhat. A PJ-34 PARP inhibitor kezelés az ischaemiás inzultus hatásra necroapoptóziába sodródott májsejteket az apoptosis felé juttatja tovább, így a reperfúziót követő gyulladásos reakciók mérséklésével javítja a szöveti túlélést.

## 10. Summary

Secondary to ischemia-reperfusion (IR), local organ injury and the subsequently developing systemic inflammatory response may often lead to distant organ dysfunction, which induces a set of life-threatening complications. The aim of the current study is to raise awareness on the critical importance of the pathological sequence, as well as the need for the verification of protective mechanisms against it, through two clinical case reports. The present overview focuses on two organs which are distinctively divergent in their reaction to ischemia-reperfusion, and the difference of the required mechanisms for conveying protection for the respective organs. In the experimental model designed for the attenuation of lower limb IR injuries, two models are set forth: a shorter, and a longer one, which mimics critical ischemia to the lower limb. It has been emphasized in our experiments, that the clamping of the infrarenal aorta for 3 hours leads to development of solid, early tissue injury and dysfunction of the distant organs, which may be ameliorated by the application of postconditioning (PostC). With respect to the lower limbs, an ischemic insult as long as 8 hours can be considered critical, however, even then, postconditioning is still capable of conferring protection. Based on enzyme histochemistry, the new diagnostic tool invented by our workgroup is highly sensitive in predicting the intensity of the ischemic insult. For the prevention of ongoing IR injury to the liver, we have, for the first time in literature, performed remote preconditioning (R-IPer), which attenuated the ischemic-reperfusion injury of the liver and parallelly dampened the inflammatory response. It has been proven for the first time, that the hepatoprotective effects of remote preconditioning are abolished by the denervation of the distant organ (lower limb), therefore neural integrity is essential in conferring the protective effects of R-IPer. Afterwards, our experiments focused on pharmacological pretreatments, of which levosimendan, an agonist of the mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, led to a significant bettering in terms of the experimental model of liver IR injury. We provided evidence, that in the described experimental setting, besides the direct hepatic cytoprotective effect of the drug, the hemodynamical effects are also not to be ignored. Furthermore, preoperative glutamine supplementation was also capable of reducing liver IR injury, which could be primarily attributed to its antioxidant state improving effect. Finally, treatment with the PJ-34 PARP inhibitor improves tissue survival by dampening the inflammatory reaction during reperfusion, since it induces necroapoptotic cells secondary to the ischemic insult to progress into the sequence of apoptosis.



## 11. Irodalomjegyzék

1. Hunter, J., *Lectures on the Principles of Surgery*. 1839: Haswell, Barrington, and Haswell.
2. Fulop, A., et al., *Demonstration of metabolic and cellular effects of portal vein ligation using multi-modal PET/MRI measurements in healthy rat liver*. PLoS One, 2014. 9(3): p. e90760.
3. Picard-Ami, L.A., Jr., J.G. Thomson, and C.L. Kerrigan, *Critical ischemia times and survival patterns of experimental pig flaps*. Plast Reconstr Surg, 1990. 86(4): p. 739-43; discussion 744-5.
4. Szijártó, A., et al., *A reperfüziós szindróma és a postcondicionálás sejtszintű mechanizmusa. Irodalmi áttekintés*. Érbetegségek, 2010. 17(1): p. 11-18.
5. Blaisdell, F.W., *The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review*. Cardiovasc Surg, 2002. 10(6): p. 620-30.
6. Szijarto, A., et al., *[Acute and critical ischemia of the lower limb]*. Orv Hetil, 2010. 151(50): p. 2057-66.
7. Szijártó, A., et al., *Ischaemiás-reperfüziós károsodás csökkentésének gyakorlati és elvi lehetőségei az érsebészetben*. Érbetegségek, 2009. 16(4): p. 113-120.
8. Anaya-Prado, R. and L.H. Toledo-Pereyra, *The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury*. Transplant Proc, 2002. 34(7): p. 2518-9.
9. Jennings, R.B. and K.A. Reimer, *Lethal myocardial ischemic injury*. Am J Pathol, 1981. 102(2): p. 241-55.
10. Jennings, R.B., et al., *Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog*. Am J Pathol, 1978. 92(1): p. 187-214.
11. Harris, K., et al., *Metabolic response of skeletal muscle to ischemia*. Am J Physiol, 1986. 250(2 Pt 2): p. H213-20.
12. Newman, R.J., *Metabolic effects of tourniquet ischaemia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. J Bone Joint Surg Br, 1984. 66(3): p. 434-40.
13. Kloner, R.A., et al., *Effect of a transient period of ischemia on myocardial cells. II. Fine structure during the first few minutes of reflow*. Am J Pathol, 1974. 74(3): p. 399-422.
14. Harris, K., et al., *Metabolic response of skeletal muscle to ischemia*. Am J Physiol, 1986. 250(2): p. H213-H220.
15. Farber, J.L., K.R. Chien, and S. Mitnacht, *The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia*. Am J Pathol, 1981. 102(2): p. 271-281.
16. Novikoff, A.B., W.Y. Shin, and J. Drucker, *Mitochondrial localization of oxidative enzymes: staining results with two tetrazolium salts*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. 9: p. 47-61.
17. Knight, K.R., et al., *Ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N-omega-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone*. Eur J Pharmacol, 1997. 332(3): p. 273-278.
18. Labbe, R., et al., *Quantitation of postischemic skeletal muscle necrosis: histochemical and radioisotope techniques*. J Surg Res, 1988. 44(1): p. 45-53.
19. Belkin, M., et al., *A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle*. Am J Surg, 1988. 156(2): p. 83-6.
20. Powell, R.J., et al., *Quantitating intestinal ischemia with nitroblue tetrazolium salts*. J Surg Res, 1995. 58(4): p. 359-366.

21. Madesh, M., L. Bhaskar, and K.A. Balasubramanian, *Enterocyte viability and mitochondrial function after graded intestinal ischemia and reperfusion in rats*. Mol Cell Biochem, 1997. 167(1-2): p. 81-7.
22. Hickey, M.J., et al., *The response of the rabbit rectus femoris muscle to ischemia and reperfusion*. J Surg Res, 1992. 53(4): p. 369-77.
23. Grisotto, P.C., et al., *Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion*. J Surg Res, 2000. 92(1): p. 1-6.
24. Babior, B.M. and W.A. Peters, *The O<sub>2</sub>--producing enzyme of human neutrophils. Further properties*. J Biol Chem, 1981. 256(5): p. 2321-3.
25. Arato, E., et al., *Reperfusion injury and inflammatory responses following acute lower limb revascularization surgery*. Clin Hemorheol Microcirc, 2008. 39(1-4): p. 79-85.
26. Dykens, J.A., *Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup>: implications for neurodegeneration*. J Neurochem, 1994. 63(2): p. 584-91.
27. Maciel, E.N., A.E. Vercesi, and R.F. Castilho, *Oxidative stress in Ca<sup>2+</sup>-induced membrane permeability transition in brain mitochondria*. J Neurochem, 2001. 79(6): p. 1237-45.
28. Fehér, J. and A. Vereckei, *Szabadgyök reakciók jelentősége az orvostudományban*. 1985, Budapest: Medicina.
29. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. Biochem J, 1999. 341 ( Pt 2): p. 233-49.
30. Rodrigues, S.F. and D.N. Granger, *Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure*. Cardiovasc Res, 2010. 87(2): p. 291-9.
31. Davies, M.G., T.T.T. Juynh, and H.P. O., *Endothelial physiology*, in *Ischemia-reperfusion injury*, P.A. Grace and R.T. Mathie, Editors. 1999, Blackwell Science: London. p. 157-179.
32. Cave, A.C., et al., *NADPH oxidases in cardiovascular health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2006. 8(5-6): p. 691-728.
33. Carden, D.L. and D.N. Granger, *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury*. The Journal of pathology, 2000. 190(3): p. 255-266.
34. Banda, M.A., D.J. Lefer, and D.N. Granger, *Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule-deficient mice*. Am J Physiol, 1997. 273(6 Pt 2): p. H2721-5.
35. Lenz, A., G.A. Franklin, and W.G. Cheadle, *Systemic inflammation after trauma*. Injury, 2007. 38(12): p. 1336-45.
36. Loria, V., et al., *Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes*. Mediators Inflamm, 2008. 2008: p. 135625.
37. Olivas, T.P., et al., *Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion*. Plast Reconstr Surg, 2001. 107(3): p. 785-8.
38. Vrints, C.J., *Pathophysiology of the no-reflow phenomenon*. Acute Card Care, 2009. 11(2): p. 69-76.
39. Kloner, R.A., C.E. Ganote, and R.B. Jennings, *The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog*. J Clin Invest, 1974. 54(6): p. 1496-508.
40. Vollmar, B. and M.D. Menger, *The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair*. Physiol Rev, 2009. 89(4): p. 1269-339.

41. Abe, Y., et al., *Mouse model of liver ischemia and reperfusion injury: method for studying reactive oxygen and nitrogen metabolites in vivo*. Free Radic Biol Med, 2009. 46(1): p. 1-7.
42. Jaeschke, H. and J.J. Lemasters, *Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury*. Gastroenterology, 2003. 125(4): p. 1246-57.
43. Lemasters, J.J., V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. Am J Physiol, 1999. 276(1 Pt 1): p. G1-6.
44. Formigli, L., et al., *Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis*. J Cell Physiol, 2000. 182(1): p. 41-9.
45. Szijarto, A., et al., *Effect of PJ-34 PARP-inhibitor on rat liver microcirculation and antioxidant status*. J Surg Res, 2007. 142(1): p. 72-80.
46. Garbaisz, D., et al., *Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811*. PLoS One, 2014. 9(6): p. e101067.
47. Matsen, F.A., 3rd, R.A. Winqvist, and R.B. Krugmire, Jr., *Diagnosis and management of compartmental syndromes*. J Bone Joint Surg Am, 1980. 62(2): p. 286-91.
48. Matsen, F.A., R.A. Winqvist, and R.B. Krugmire, *Diagnosis and management of compartmental syndromes*. Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume, 1980. 62(2): p. 286-291.
49. Haimovici, H., *Myopathic-nephrotic-metabolic syndrome and massive acute arterial occlusions*. Arch Surg, 1973. 106(5): p. 628-9.
50. Tiwari, A., et al., *Acute compartment syndromes*. Br J Surg, 2002. 89(4): p. 397-412.
51. Curry, S.C., D. Chang, and D. Connor, *Drug- and toxin-induced rhabdomyolysis*. Ann Emerg Med, 1989. 18(10): p. 1068-84.
52. Rappaport, A., *Hepatic blood flow: morphologic aspects and physiologic regulation*. International review of physiology, 1979. 21: p. 1-63.
53. Szijarto, A., *Az ischaemiatolerancia növelésének lehetőségei a májsebészetben*. Magy Seb, 2008. 61(3): p. 128-35.
54. Clark, I.A., *The advent of the cytokine storm*. Immunol Cell Biol, 2007. 85(4): p. 271-3.
55. Brasier, A.R., *The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation*. Cardiovasc Res, 2010. 86(2): p. 211-8.
56. De Caterina, R., et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest, 1995. 96(1): p. 60-8.
57. Montgomery, R.A., A.C. Venbrux, and G.B. Bulkley, *Mesenteric vascular insufficiency*. Curr Probl Surg, 1997. 34(12): p. 941-1025.
58. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. 118(2): p. 503-8.
59. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide*. FASEB J, 1995. 9(13): p. 1319-30.
60. Heagy, W., et al., *Lower levels of whole blood LPS-stimulated cytokine release are associated with poorer clinical outcomes in surgical ICU patients*. Surg Infect (Larchmt), 2003. 4(2): p. 171-80.
61. Giannoudis, P.V., F. Hildebrand, and H.C. Pape, *Inflammatory serum markers in patients with multiple trauma. Can they predict outcome?* J Bone Joint Surg Br, 2004. 86(3): p. 313-23.

62. Pagani, F.D., et al., *Left ventricular systolic and diastolic dysfunction after infusion of tumor necrosis factor-alpha in conscious dogs*. J Clin Invest, 1992. 90(2): p. 389-98.
63. Kelly, R.A. and T.W. Smith, *Cytokines and cardiac contractile function*. Circulation, 1997. 95(4): p. 778-81.
64. Kale, I.T., et al., *The presence of hemorrhagic shock increases the rate of bacterial translocation in blunt abdominal trauma*. J Trauma, 1998. 44(1): p. 171-4.
65. Kunkel, S.L. and R.M. Strieter, *Cytokine networking in lung inflammation*. Hosp Pract (Off Ed), 1990. 25(10): p. 63-6, 69, 73-6.
66. Ryckwaert, F., et al., *Incidence and circumstances of serum creatinine increase after abdominal aortic surgery*. Intensive Care Med, 2003. 29(10): p. 1821-4.
67. Hertzner, N.R., et al., *Open infrarenal abdominal aortic aneurysm repair: the Cleveland Clinic experience from 1989 to 1998*. J Vasc Surg, 2002. 35(6): p. 1145-54.
68. Haimovici, H., *Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myoneuropathic-metabolic syndrome*. Surgery, 1979. 85(4): p. 461-8.
69. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. 70: p. 68-78.
70. Okamoto, F., et al., *Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1986. 92(3 Pt 2): p. 613-20.
71. Sato, H., et al., *Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation*. Ann Thorac Surg, 1997. 64(4): p. 1099-107.
72. Schlensak, C., et al., *Controlled limb reperfusion with a simplified perfusion system*. Thorac Cardiovasc Surg, 2000. 48(5): p. 274-8.
73. Allen, B.S., et al., *Superiority of controlled surgical reperfusion versus percutaneous transluminal coronary angioplasty in acute coronary occlusion*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1993. 105(5): p. 864-79; discussion 879-84.
74. Mitrev, Z., et al., *Reperfusion injury in skeletal muscle: controlled limb reperfusion reduces local and systemic complications after prolonged ischaemia*. Cardiovasc Surg, 1994. 2(6): p. 737-48.
75. Szijártó, A., et al., *Ischaemiás-reperfúziós károsodás csökkentésének elvi és gyakorlati lehetőségei az érsebészetben. Irodalmi áttekintés. Érbetegségek*, 2009. 16(4): p. 113-120.
76. Szijártó, A., et al., *Remote ischemic preconditioning--a simple, low-risk method to decrease ischemic reperfusion injury: models, protocols and mechanistic background. A review*. J Surg Res, 2012. 178(2): p. 797-806.
77. Szijártó, A., et al., *Iszkémiás per kondicionálás – Alternatív adaptív technika a miokardiális iszkémia-tolerancia növelésére. Összefoglaló Közlemény*. Cardiológica Hungarica, 2011. 41(5): p. 344-353.
78. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. 74(5): p. 1124-36.
79. Yellon, D.M., A.M. Alkhulaifi, and W.B. Pugsley, *Preconditioning the human myocardium*. Lancet, 1993. 342(8866): p. 276-7.
80. Mounsey, R.A., C.Y. Pang, and C. Forrest, *Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival*. Otolaryngol Head Neck Surg, 1992. 107(4): p. 549-52.

81. Liu, Y., et al., *Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus*. Neuroscience, 1993. 56(4): p. 921-7.
82. Turman, M.A. and C.M. Bates, *Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells*. Ren Fail, 1997. 19(1): p. 47-60.
83. Lloris-Carsí, J.M., et al., *Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia*. Transplant Proc, 1993. 25(6): p. 3303-4.
84. Tsuruma, T., et al., *Induction of warm ischemic tolerance following preconditioning of the small intestine*. Transplant Proc, 1996. 28(3): p. 1298-9.
85. Ferencz, A., et al., *Mitigation of oxidative injury by classic and delayed ischemic preconditioning prior to small bowel autotransplantation*. Transplant Proc, 2004. 36(2): p. 286-8.
86. Ferencz, A., et al., *[Effects of ischemic preconditioning on the oxidative stress in small bowel autotransplantation]*. Magy Seb, 2002. 55(5): p. 331-6.
87. Ferencz, A., et al., *The effects of preconditioning on the oxidative stress in small-bowel autotransplantation*. Surgery, 2002. 132(5): p. 877-84.
88. Ferencz, A., et al., *Threshold level of NF-kB activation in small bowel ischemic preconditioning procedure*. Transplant Proc, 2006. 38(6): p. 1800-2.
89. Ferencz, A., et al., *Intestinal ischemic preconditioning in rats and NF-kappaB activation*. Microsurgery, 2006. 26(1): p. 54-7.
90. Ferencz, A., et al., *[The effects of classic and delayed ischemic preconditioning on the oxidative stress in small bowel autotransplantation model]*. Magy Seb, 2005. 58(4): p. 245-9.
91. Yang, X.M., et al., *Infarct limitation of the second window of protection in a conscious rabbit model*. Cardiovasc Res, 1996. 31(5): p. 777-83.
92. Peralta, C., et al., *Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat*. Hepatology, 2001. 33(1): p. 100-113.
93. Peralta, C., et al., *Hepatic preconditioning preserves energy metabolism during sustained ischemia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. 279(1): p. G163-71.
94. Carini, R., et al., *Ischemic preconditioning reduces Na(+) accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia*. Hepatology, 2000. 31(1): p. 166-72.
95. Arai, K., et al., *Purification and characterization of lysosomal H(+)-ATPase. An anion-sensitive v-type H(+)-ATPase from rat liver lysosomes*. J Biol Chem, 1993. 268(8): p. 5649-60.
96. Carini, R., et al., *Stimulation of p38 MAP kinase reduces acidosis and Na(+) overload in preconditioned hepatocytes*. FEBS Lett, 2001. 491(3): p. 180-3.
97. Yadav, S.S., et al., *Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway*. Hepatology, 1999. 30(5): p. 1223-31.
98. Brazil, D.P., J. Park, and B.A. Hemmings, *PKB binding proteins. Getting in on the Akt*. Cell, 2002. 111(3): p. 293-303.
99. Hatano, E. and D.A. Brenner, *Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis through NK-kappa B activation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. 281(6): p. G1357-68.
100. Howell, J.G., et al., *Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions*. Transplantation, 2000. 69(2): p. 300-3.

101. Nandagopal, K., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. 297(2): p. 474-8.
102. Peralta, C., et al., *Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat*. Hepatology, 1999. 30(6): p. 1481-9.
103. Jiang, Y.F., et al., *Protein kinase C (PKC) phosphorylation of the Ca<sup>2+</sup> o-sensing receptor (CaR) modulates functional interaction of G proteins with the CaR cytoplasmic tail*. J Biol Chem, 2002. 277(52): p. 50543-9.
104. Garrido, C., et al., *Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 286(3): p. 433-42.
105. Huot, J., et al., *HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress*. Cancer Res, 1996. 56(2): p. 273-9.
106. Redaelli, C.A., et al., *Extended preservation of rat liver graft by induction of heme oxygenase-1*. Hepatology, 2002. 35(5): p. 1082-92.
107. Katori, M., R.W. Busuttil, and J.W. Kupiec-Weglinski, *Heme oxygenase-1 system in organ transplantation*. Transplantation, 2002. 74(7): p. 905-12.
108. Amersi, F., et al., *Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway*. Hepatology, 2002. 35(4): p. 815-23.
109. Przyklenk, K., *Reduction of myocardial infarct size with ischemic "conditioning": physiologic and technical considerations*. Anesth Analg, 2013. 117(4): p. 891-901.
110. Clavien, P.A., et al., *Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans*. Ann Surg, 2000. 232(2): p. 155-62.
111. Heizmann, O., et al., *Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study*. Eur J Med Res, 2008. 13(2): p. 79-86.
112. Li, S.Q., et al., *Ischemic preconditioning protects liver from hepatectomy under hepatic inflow occlusion for hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis*. World J Gastroenterol, 2004. 10(17): p. 2580-4.
113. Szijártó, A., et al., *Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser Doppler flowmetry*. J Surg Res, 2006. 131(1): p. 150-7.
114. Clavien, P.A., et al., *A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning*. Ann Surg, 2003. 238(6): p. 843-50; discussion 851-2.
115. Hahn, O., et al., *The effect of ischemic preconditioning on redox status during liver resections--randomized controlled trial*. J Surg Oncol, 2011. 104(6): p. 647-53.
116. Zhao, Z.Q., et al., *Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 285(2): p. H579-88.
117. Kin, H., et al., *Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion*. Cardiovasc Res, 2004. 62(1): p. 74-85.
118. Kin, H., et al., *Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine*. Cardiovasc Res, 2005. 67(1): p. 124-33.
119. Halkos, M.E., et al., *Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning*. Ann Thorac Surg, 2004. 78(3): p. 961-9; discussion 969.

120. Philipp SD, D.J., Cohen MV., *Postconditioning must be initiated in less than 1 minute following reperfusion and is dependent on adenosine receptors and P13-kinase*. *Circulation*, 2004. 110: p. III-168.
121. Tsang, A., et al., *Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. *Circ Res*, 2004. 95(3): p. 230-2.
122. Kin H, L.M., Amerson BS, Zatta AJ, Kerendi F, Halkos ME, Zhao Z-Q, Headrick JP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. , *Cardioprotection by "postconditioning" is mediated by increased retention of endogenous intravascular adenosine and activation of A2a receptors during reperfusion*. *Circulation*, 2004. 110: p. III-168.
123. Rosero, O., et al., *Postconditioning of the small intestine: which is the most effective algorithm in a rat model?* *J Surg Res*, 2014. 187(2): p. 427-37.
124. Prunier, F., et al., *The RIPOST-MI study, assessing remote ischemic preconditioning alone or in combination with local ischemic postconditioning in ST-segment elevation myocardial infarction*. *Basic Res Cardiol*, 2014. 109(2): p. 400.
125. Hahn, J.Y., et al., *Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial*. *Circulation*, 2013. 128(17): p. 1889-96.
126. Mewton, N., et al., *Postconditioning attenuates no-reflow in STEMI patients*. *Basic Res Cardiol*, 2013. 108(6): p. 383.
127. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. *Cardiovasc Res*, 2004. 61(3): p. 448-60.
128. Inagaki, K., E. Churchill, and D. Mochly-Rosen, *Epsilon protein kinase C as a potential therapeutic target for the ischemic heart*. *Cardiovasc Res*, 2006. 70(2): p. 222-30.
129. Sanada, S., et al., *Role of mitochondrial and sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic preconditioning of the canine heart*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. 280(1): p. H256-63.
130. Steenbergen, C., et al., *Mechanism of preconditioning. Ionic alterations*. *Circ Res*, 1993. 72(1): p. 112-25.
131. Yang, X.M., et al., *Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2004. 44(5): p. 1103-1110.
132. Penna, C., et al., *The paradigm of postconditioning to protect the heart*. *J Cell Mol Med*, 2008. 12(2): p. 435-58.
133. Kim, S.O., et al., *Ischemia induced activation of heat shock protein 27 kinases and casein kinase 2 in the preconditioned rabbit heart*. *Biochem Cell Biol*, 1999. 77(6): p. 559-67.
134. Yang, X.M., et al., *Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation*. *Basic Res Cardiol*, 2005. 100(1): p. 57-63.
135. Kin, H., et al., *Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine*. *Cardiovascular Research*, 2005. 67(1): p. 124-33.
136. Darling, C.E., et al., *Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 289(4): p. H1618-26.

137. Sun, H.Y., et al., *Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> overload*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. 288(4): p. H1900-8.
138. Argaud, L., et al., *Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition*. Circulation, 2005. 111(2): p. 194-197.
139. Cohen, M.V., X.M. Yang, and J.M. Downey, *The pH hypothesis of postconditioning: staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis*. Circulation, 2007. 115(14): p. 1895-903.
140. Birnbaum, Y., S.L. Hale, and R.A. Kloner, *Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit*. Circulation, 1997. 96(5): p. 1641-6.
141. Oxman, T., et al., *Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia*. Am J Physiol, 1997. 273(4 Pt 2): p. H1707-12.
142. Przyklenk, K., et al., *Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion*. Circulation, 1993. 87(3): p. 893-9.
143. Gho, B.C., et al., *Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue*. Circulation, 1996. 94(9): p. 2193-200.
144. Pell, T.J., et al., *Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1998. 275(5): p. H1542-H1547.
145. Andreka, G., et al., *Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs*. Heart, 2007. 93(6): p. 749-52.
146. Kerendi, F., et al., *Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors*. Basic Res Cardiol, 2005. 100(5): p. 404-12.
147. Schmidt, M.R., et al., *Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 292(4): p. H1883-90.
148. Li, S.J., et al., *Noninvasive limb ischemic preconditioning protects against myocardial I/R injury in rats*. J Surg Res, 2010. 164(1): p. 162-8.
149. Rentoukas, I., et al., *Cardioprotective role of remote ischemic preconditioning in primary percutaneous coronary intervention: enhancement by opioid action*. JACC Cardiovasc Interv, 2010. 3(1): p. 49-55.
150. Tsubota, H., et al., *Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2010. 40(6): p. 804-9.
151. Schoemaker, R.G. and C.L. van Heijningen, *Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. 278(5): p. H1571-6.
152. Kristiansen, S.B., et al., *Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a K-ATP channel-dependent mechanism*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2005. 288(3): p. H1252-H1256.
153. Tang, Z.L., et al., *Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 1999. 359(3): p. 243-247.



154. Ren, C.C., et al., *Limb remote ischemic postconditioning protects against focal ischemia in rats*. Brain Research, 2009. 1288: p. 88-94.
155. Xin, P., et al., *Combined local ischemic postconditioning and remote preconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010. 298(6): p. H1819-31.
156. Khalil, A.A., F.A. Aziz, and J.C. Hall, *Reperfusion injury*. Plast Reconstr Surg, 2006. 117(3): p. 1024-33.
157. Simpson, P.J., et al., *Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion*. J Clin Invest, 1988. 81(2): p. 624-9.
158. Bozkurt, A.K., *Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury*. J Cardiovasc Surg (Torino), 2002. 43(5): p. 693-6.
159. Bilgin-Karabulut, A., et al., *Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury*. J Reconstr Microsurg, 2001. 17(6): p. 425-9.
160. Rees, R., et al., *The role of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase in skin ischemia*. J Surg Res, 1994. 56(2): p. 162-7.
161. Welbourn, C.R., et al., *Neutrophil elastase and oxygen radicals: synergism in lung injury after hindlimb ischemia*. Am J Physiol, 1991. 260(6 Pt 2): p. H1852-6.
162. Emanuel, M.B. and J.A. Will, *Cinnarizine in the treatment of peripheral vascular disease: mechanisms related to its clinical action*. Proc R Soc Med, 1977. 70(Suppl 8): p. 7-12.
163. Sako, H., et al., *Effect of prostaglandin E1 on ischemia-reperfusion injury during abdominal aortic aneurysm surgery*. Surg Today, 2006. 36(2): p. 140-6.
164. Smith, F.B., A.W. Bradbury, and F.G. Fowkes, *Intravenous naftidrofuryl for critical limb ischaemia*. Cochrane Database Syst Rev, 2000(2): p. CD002070.
165. Bieroń, K., et al., *Thrombolytic and antiplatelet action of xanthinol nicotinate (Sadamin): possible mechanisms*. J Physiol Pharmacol, 1998. 49(2): p. 241-9.
166. Hausteil, K.O., *State of the art--treatment of peripheral occlusive arterial disease (POAD) with drugs vs. vascular reconstruction or amputation*. Int J Clin Pharmacol Ther, 1997. 35(7): p. 266-74.
167. Morin, D., et al., *Mitochondria as target for antiischemic drugs*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. 49(1-2): p. 151-74.
168. Kloner, R.A. and S.H. Rezkalla, *Preconditioning, postconditioning and their application to clinical cardiology*. Cardiovasc Res, 2006. 70(2): p. 297-307.
169. Vinten-Johansen, J. and Z.Q. Zhao, *Cardioprotection from ischemic-reperfusion injury by adenosine, in Purines and myocardial protection*. 1996, Springer. p. 315-344.
170. Fournier, N., G. Ducet, and A. Crevat, *Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes*. J Bioenerg Biomembr, 1987. 19(3): p. 297-303.
171. Hausenloy, D.J., M.R. Duchon, and D.M. Yellon, *Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2003. 60(3): p. 617-25.
172. Gomez, L., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. 293(3): p. H1654-61.

173. Kersten, J.R., et al., *Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase*. *Anesthesiology*, 1997. 87(2): p. 361-70.
174. Lotz, C. and F. Kehl, *Volatile Anesthetic-Induced Cardiac Protection: Molecular Mechanisms, Clinical Aspects, and Interactions With Nonvolatile Agents*. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2015. 29(3): p. 749-760.
175. Kopustinskiene, D.M., P. Pollesello, and N.E. Saris, *Levosimendan is a mitochondrial K(ATP) channel opener*. *Eur J Pharmacol*, 2001. 428(3): p. 311-4.
176. Pollesello, P. and Z. Papp, *The cardioprotective effects of levosimendan: preclinical and clinical evidence*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007. 50(3): p. 257-63.
177. Woolsey, C.A. and C.M. Coopersmith, *Vasoactive drugs and the gut: is there anything new?* *Curr Opin Crit Care*, 2006. 12(2): p. 155-9.
178. Pagel, P.S., D.A. Hettrick, and D.C. Warltier, *Influence of levosimendan, pimobendan, and milrinone on the regional distribution of cardiac output in anaesthetized dogs*. *Br J Pharmacol*, 1996. 119(3): p. 609-15.
179. Garcia-Septien, J., et al., *Levosimendan increases portal blood flow and attenuates intestinal intramucosal acidosis in experimental septic shock*. *Shock*, 2010. 34(3): p. 275-80.
180. Zager, R.A., et al., *Levosimendan protects against experimental endotoxemic acute renal failure*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006. 290(6): p. F1453-62.
181. Lilleberg, J., et al., *Duration of the haemodynamic action of a 24-h infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure*. *Eur J Heart Fail*, 2007. 9(1): p. 75-82.
182. Haikala, H. and P. Pollesello, *Calcium sensitivity enhancers*. *IDrugs*, 2000. 3(10): p. 1199-205.
183. Pagel, P.S., et al., *Levosimendan (OR-1259), a myofilament calcium sensitizer, enhances myocardial contractility but does not alter isovolumic relaxation in conscious and anesthetized dogs*. *Anesthesiology*, 1994. 81(4): p. 974-87.
184. Kopustinskiene, D.M., P. Pollesello, and N.E. Saris, *Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria*. *Biochem Pharmacol*, 2004. 68(5): p. 807-12.
185. Morel, Y. and R. Barouki, *Repression of gene expression by oxidative stress*. *Biochem J*, 1999. 342 Pt 3: p. 481-96.
186. Griffiths, R.D., C. Jones, and T.E. Palmer, *Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition*. *Nutrition*, 1997. 13(4): p. 295-302.
187. Tapiero, H., et al., *II. Glutamine and glutamate*. *Biomed Pharmacother*, 2002. 56(9): p. 446-57.
188. Kvamme, E., B. Roberg, and I.A. Torgner, *Glutamine transport in brain mitochondria*. *Neurochem Int*, 2000. 37(2-3): p. 131-8.
189. Boza, J.J., et al., *Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells*. *Eur J Nutr*, 2000. 39(1): p. 38-46.
190. Darmaun, D., *Role of glutamine depletion in severe illness*. *Diabetes Nutr Metab*, 2000. 13(1): p. 25-30.
191. Rhoads, J.M., et al., *L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases*. *Am J Physiol*, 1997. 272(5 Pt 1): p. G943-53.
192. Papaconstantinou, H.T., et al., *Glutamine deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells*. *Surgery*, 1998. 124(2): p. 152-9; discussion 159-60.

193. Oehler, R. and E. Roth, *Regulative capacity of glutamine*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003. 6(3): p. 277-82.
194. Babu, R., et al., *Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes*. *J Pediatr Surg*, 2001. 36(2): p. 282-6.
195. Singleton, K.D., V.E. Beckey, and P.E. Wischmeyer, *GLUTAMINE PREVENTS ACTIVATION OF NF-kappaB AND STRESS KINASE PATHWAYS, ATTENUATES INFLAMMATORY CYTOKINE RELEASE, AND PREVENTS ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME (ARDS) FOLLOWING SEPSIS*. *Shock*, 2005. 24(6): p. 583-9.
196. Khogali, S.E., et al., *Effects of L-glutamine on post-ischaemic cardiac function: protection and rescue*. *J Mol Cell Cardiol*, 1998. 30(4): p. 819-27.
197. Yang, R., et al., *Alanine-glutamine dipeptide (AGD) inhibits expression of inflammation-related genes in hemorrhagic shock*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2007. 31(1): p. 32-6.
198. Passos de Jesus Mazza, R., et al., *Effect of glutamine dipeptide on hepatic regeneration in partially hepatectomized malnourished rats*. *Nutrition*, 2003. 19(11-12): p. 930-5.
199. Jia, C.J., et al., *Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats*. *World J Gastroenterol*, 2006. 12(9): p. 1373-8.
200. Noh, J., et al., *Glutamine does not protect against hepatic warm ischemia/reperfusion injury in rats*. *J Gastrointest Surg*, 2006. 10(2): p. 234-9.
201. Fukatsu, K., et al., *Glutamine infusion during ischemia is detrimental in a murine gut ischemia/reperfusion model*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2003. 27(3): p. 187-92; discussion 192.
202. Fürst, P., *A thirty-year odyssey in nitrogen metabolism: from ammonium to dipeptides*. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2000. 24(4): p. 197-209.
203. Bai, P., *Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance*. *Mol Cell*, 2015. 58(6): p. 947-58.
204. de Murcia, J.M., et al., *Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(14): p. 7303-7.
205. Jagtap, P. and C. Szabo, *Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. 4(5): p. 421-40.
206. Nakajima, H., et al., *Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells*. *J Biol Chem*, 2004. 279(41): p. 42774-86.
207. Virag, L. and C. Szabo, *The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. *Pharmacol Rev*, 2002. 54(3): p. 375-429.
208. Szijarto, A., et al., *Rapidly progressing fatal reperfusion syndrome caused by acute critical ischemia of the lower limb*. *Cardiovasc Pathol*, 2013. 22(6): p. 493-500.
209. Goldfischer, S., *The cytochemical localization of myoglobin in striated muscle of man and walrus*. *J Cell Biol*, 1967. 34(1): p. 398-403.
210. Schindl, M.J., et al., *The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection*. *Gut*, 2005. 54(2): p. 289-96.
211. Kupcsulik, P. and P. Kokas, *Ischemic damage of the liver. Part I: In vitro investigation of the prevention of the ischemic lesion of the liver*. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)*, 1979. 26(4): p. 279-83.

212. Kupcsulik, P. and P. Kokas, *Ischemic damage of the liver. Part II: In vivo investigation of the prevention of the ischemic lesion of the liver.* Acta Hepatogastroenterol (Stuttg), 1979. 26(4): p. 284-9.
213. McCormack, M.C., et al., *Development of reproducible histologic injury severity scores: skeletal muscle reperfusion injury.* Surgery, 2008. 143(1): p. 126-33.
214. Blázovics, A., et al., *Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: a chemiluminescent study.* Clin Chem, 1999. 45(6 Pt 1): p. 895-6.
215. Li, W., et al., *Macrophages are involved in the protective role of human umbilical cord-derived stromal cells in renal ischemia-reperfusion injury.* Stem Cell Res, 2013. 10(3): p. 405-16.
216. Huie, R.E. and S. Padmaja, *The reaction of no with superoxide.* Free Radic Res Commun, 1993. 18(4): p. 195-9.
217. Yang, C.H., et al., *Dexmedetomidine-ketamine combination mitigates acute lung injury in haemorrhagic shock rats.* Resuscitation, 2009. 80(10): p. 1204-10.
218. Kuebler, W.M., et al., *Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay.* Int J Microcirc Clin Exp, 1996. 16(2): p. 89-97.
219. Chiu, C.J., et al., *Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal.* Arch Surg, 1970. 101(4): p. 478-83.
220. Homeyer, A., et al., *Practical quantification of necrosis in histological whole-slide images.* Comput Med Imaging Graph, 2013. 37(4): p. 313-22.
221. M., O., *Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine.* Jpn J Nutr 1987. 44: p. 307.
222. Sedlak, J. and R.H. Lindsay, *Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent.* Anal Biochem, 1968. 25(1): p. 192-205.
223. Blois, M.S., *Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical.* Nature, 1958. 181(4617): p. 1199-1200.
224. Hatano, T., et al., *Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects.* Chem Pharm Bull (Tokyo), 1988. 36(6): p. 2090-7.
225. Norgren, L., et al., *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II).* J Vasc Surg, 2007. 45 Suppl S: p. S5-67.
226. Gyurkovics, E., et al., *Postconditioning of the lower limb--protection against the reperfusion syndrome.* J Surg Res, 2011. 169(1): p. 139-47.
227. Gyurkovics, E., et al., *Postconditioning attenuates remote organ injury after lower limb arterial occlusion.* Interventional Medicine and Applied Science, 2010. 2 (4): p. 169-177.
228. Wang, T., et al., *Putative role of ischemic postconditioning in a rat model of limb ischemia and reperfusion: involvement of hypoxia-inducible factor-1alpha expression.* Braz J Med Biol Res, 2014. 47(9): p. 738-45.
229. Rosero, O., et al., *Collateral circulation of the rat lower limb and its significance in ischemia-reperfusion studies.* Surg Today, 2014. 44(12): p. 2345-53.
230. Jennings, R.B., *Early phase of myocardial ischemic injury and infarction.* Am J Cardiol, 1969. 24(6): p. 753-65.
231. Strock, P.E. and G. Majno, *Vascular responses to experimental tourniquet ischemia.* Surg Gynecol Obstet, 1969. 129(2): p. 309-18.

232. Jung, C., et al., *Effects of myocardial postconditioning on the recruitment of endothelial progenitor cells*. J Interv Cardiol, 2012. 25(2): p. 103-10.
233. Cain, B.S., A.H. Harken, and D.R. Meldrum, *Therapeutic strategies to reduce TNF-alpha mediated cardiac contractile depression following ischemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 1999. 31(5): p. 931-47.
234. Sínay, L., et al., *Ischaemic postconditioning reduces peroxide formation, cytokine expression and leukocyte activation in reperfusion injury after abdominal aortic surgery in rat model*. Clin Hemorheol Microcirc, 2008. 40(2): p. 133-42.
235. Park, J.W., et al., *Postconditioning protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury*. Microsurgery, 2010. 30(3): p. 223-9.
236. Cain, B.S., et al., *Adenosine reduces cardiac TNF-alpha production and human myocardial injury following ischemia-reperfusion*. J Surg Res, 1998. 76(2): p. 117-23.
237. Ke, J.J., et al., *Adenosine postconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury though modulate production of TNF-alpha and prevents activation of transcription factor NF-kappaB*. Mol Biol Rep, 2011. 38(1): p. 531-8.
238. Zsembery, A., T. Thalhammer, and J. Graf, *Bile Formation: a Concerted Action of Membrane Transporters in Hepatocytes and Cholangiocytes*. News Physiol Sci, 2000. 15: p. 6-11.
239. Salie, R., J.A. Moolman, and A. Lochner, *The mechanism of beta-adrenergic preconditioning: roles for adenosine and ROS during triggering and mediation*. Basic Res Cardiol, 2012. 107(5): p. 281.
240. Charles, A.L., et al., *Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping*. Br J Surg, 2011. 98(4): p. 511-6.
241. Guo, X.S., et al., *Calcineurin mediates the protective effect of postconditioning on skeletal muscle*. Shock, 2011. 36(3): p. 312-6.
242. Liang, H., et al., *Effect of ischemia post-conditioning on skeletal muscle oxidative injury, mTOR, Bax, Bcl-2 proteins expression, and HIF-1 $\alpha$ / $\beta$ -actin mRNA, IL-6/ $\beta$ -actin mRNA and caveolin-3/ $\beta$ -actin mRNA expression in ischemia-reperfusion rabbits*. Mol Biol Rep, 2013. 40(1): p. 507-14.
243. Mansour, Z., et al., *Remote and local ischemic postconditioning further impaired skeletal muscle mitochondrial function after ischemia-reperfusion*. J Vasc Surg, 2012. 56(3): p. 774-82.e1.
244. Sear, J.W., *Kidney dysfunction in the postoperative period*. Br J Anaesth, 2005. 95(1): p. 20-32.
245. Powell, R.J., et al., *Effect of renal insufficiency on outcome following infrarenal aortic surgery*. Am J Surg, 1997. 174(2): p. 126-30.
246. Holt, S. and K. Moore, *Pathogenesis of renal failure in rhabdomyolysis: the role of myoglobin*. Exp Nephrol, 2000. 8(2): p. 72-6.
247. Zager, R.A., *Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal injury*. Lab Invest, 1989. 60(5): p. 619-29.
248. Salahudeen, A.K., et al., *Synergistic renal protection by combining alkaline-diuresis with lipid peroxidation inhibitors in rhabdomyolysis: possible interaction between oxidant and non-oxidant mechanisms*. Nephrol Dial Transplant, 1996. 11(4): p. 635-42.
249. Zager, R.A., *Mitochondrial free radical production induces lipid peroxidation during myohemoglobinuria*. Kidney Int, 1996. 49(3): p. 741-51.

250. Moore, K.P., et al., *A causative role for redox cycling of myoglobin and its inhibition by alkalization in the pathogenesis and treatment of rhabdomyolysis-induced renal failure.* J Biol Chem, 1998. 273(48): p. 31731-7.
251. Heyman, S.N., et al., *Myoglobinuric acute renal failure in the rat: a role for acidosis?* Exp Nephrol, 1997. 5(3): p. 210-6.
252. Blantz, R.C., *Pathophysiology of pre-renal azotemia.* Kidney Int, 1998. 53(2): p. 512-23.
253. Camussi, G., et al., *Tumor necrosis factor induces contraction of mesangial cells and alters their cytoskeletons.* Kidney Int, 1990. 38(5): p. 795-802.
254. Bertani, T., et al., *Tumor necrosis factor induces glomerular damage in the rabbit.* Am J Pathol, 1989. 134(2): p. 419-30.
255. Shulman, L.M., et al., *Glycerol induced ARF in rats is mediated by tumor necrosis factor-alpha.* Kidney Int, 1993. 43(6): p. 1397-401.
256. Marber, M.S., et al., *Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury.* J Clin Invest, 1995. 95(4): p. 1446-56.
257. Hatoko, M., et al., *Stress response of systemic organs to ischemia-reperfusion of rat hind limb – study of induction of 72-kD stress protein (HSP72).* European Journal of Plastic Surgery, 2002. 25(3): p. 143-148.
258. Wu, N., et al., *Hypercholesterolemia abrogates the cardioprotection of ischemic postconditioning in isolated rat heart: roles of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and the mitochondrial permeability transition pore.* Cell Biochem Biophys, 2014. 69(1): p. 123-30.
259. Olguner, C., et al., *Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion.* Acta Anaesthesiol Scand, 2006. 50(2): p. 150-5.
260. Harkin, D.W., et al., *Ischemic preconditioning before lower limb ischemia--reperfusion protects against acute lung injury.* J Vasc Surg, 2002. 35(6): p. 1264-73.
261. Takhtfooladi, H., et al., *Melatonin attenuates lung injury in a hind limb ischemia-reperfusion rat model.* Rev Port Pneumol (2006), 2015. 21(1): p. 30-5.
262. Sun, X.F., et al., *Effects of simvastatin on lung injury induced by ischaemia-reperfusion of the hind limbs in rats.* J Int Med Res, 2007. 35(4): p. 523-33.
263. Boutros, C.N., et al., *Pulmonary expression of inducible heme-oxygenase after ischemia/reperfusion of the lower extremities in rats.* J Surg Res, 2005. 129(2): p. 306-12.
264. Groeneveld, A.B., et al., *The inflammatory response to vascular surgery-associated ischaemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997. 14(5): p. 351-9.
265. Kao, M.C., et al., *Magnesium sulfate mitigates lung injury induced by bilateral lower limb ischemia-reperfusion in rats.* J Surg Res, 2011. 171(1): p. e97-106.
266. Xu, B., et al., *Ischemic postconditioning attenuates lung reperfusion injury and reduces systemic proinflammatory cytokine release via heme oxygenase 1.* J Surg Res, 2011. 166(2): p. e157-64.
267. Merrick, M.A., et al., *A preliminary examination of cryotherapy and secondary injury in skeletal muscle.* Med Sci Sports Exerc, 1999. 31(11): p. 1516-21.
268. Yasa, H., et al., *Protective effects of levosimendan and iloprost on lung injury induced by limb ischemia-reperfusion: a rabbit model.* J Surg Res, 2008. 147(1): p. 138-42.

269. Corson, R.J., et al., *Lower limb ischaemia and reperfusion alters gut permeability*. Eur J Vasc Surg, 1992. 6(2): p. 158-63.
270. Edrees, W.K., et al., *The effect of lower limb ischaemia-reperfusion on intestinal permeability and the systemic inflammatory response*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2003. 25(4): p. 330-5.
271. Harkin, D.W., et al., *Bactericidal/permeability-increasing protein attenuates systemic inflammation and acute lung injury in porcine lower limb ischemia-reperfusion injury*. Ann Surg, 2001. 234(2): p. 233-44.
272. Harkin, D.W., R. Arnold, and M. Hoper, *Anti-endotoxin hyperimmune globulin attenuates portal cytokinaemia, phagocytic cell priming, and acute lung injury after lower limb ischaemia-reperfusion injury*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2007. 33(3): p. 330-9.
273. Yassin, M.M., et al., *Lower limb ischaemia-reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function*. Br J Surg, 1997. 84(10): p. 1425-9.
274. Scott, J.R., et al., *Low-dose inhaled carbon monoxide attenuates the remote intestinal inflammatory response elicited by hindlimb ischemia-reperfusion*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. 296(1): p. G9-G14.
275. Cabiè, A., et al., *High levels of portal TNF-alpha during abdominal aortic surgery in man*. Cytokine, 1993. 5(5): p. 448-53.
276. Foulds, S., et al., *Endotoxin related early neutrophil activation is associated with outcome after thoracoabdominal aortic aneurysm repair*. Br J Surg, 1997. 84(2): p. 172-7.
277. Lau, L.L., et al., *Intestinal manipulation during elective aortic aneurysm surgery leads to portal endotoxaemia and mucosal barrier dysfunction*. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2000. 19(6): p. 619-24.
278. Yassin, M.M., et al., *Mortality following lower limb ischemia-reperfusion: a systemic inflammatory response?* World J Surg, 1996. 20(8): p. 961-6; discussion 966-7.
279. Sobral do Rosário, H., C. Saldanha, and J. Martins e Silva, *Increased leukocyte-endothelial interaction in the mesenteric microcirculation following remote ischemia-reperfusion*. Microvasc Res, 1999. 57(2): p. 199-202.
280. Kologlu, M., et al., *Effect of local and remote ischemia-reperfusion injury on healing of colonic anastomoses*. Surgery, 2000. 128(1): p. 99-104.
281. Soong, C.V., et al., *Intramucosal acidosis and systemic host responses in abdominal aortic aneurysm surgery*. Crit Care Med, 1997. 25(9): p. 1472-9.
282. Keel, M. and O. Trentz, *Pathophysiology of polytrauma*. Injury, 2005. 36(6): p. 691-709.
283. Widgerow, A.D., *Ischemia-reperfusion injury: influencing the microcirculatory and cellular environment*. Ann Plast Surg, 2014. 72(2): p. 253-60.
284. Vinten-Johansen, J. and W. Shi, *The science and clinical translation of remote postconditioning*. J Cardiovasc Med (Hagerstown), 2013. 14(3): p. 206-13.
285. Rutherford, R.B., *Clinical staging of acute limb ischemia as the basis for choice of revascularization method: when and how to intervene*. Semin Vasc Surg, 2009. 22(1): p. 5-9.
286. Hayes, G., et al., *Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis*. Surgical Forum, 1988. 39: p. 306-308.
287. Colburn, M.D., et al., *Standardization of skeletal muscle ischemic injury*. J Surg Res, 1992. 52(4): p. 309-13.

288. Wang, J.X., et al., *Taurine inhibits ischemia/reperfusion-induced compartment syndrome in rabbits*. Acta Pharmacol Sin, 2005. 26(7): p. 821-7.
289. Troitzsch, D., et al., *Effects of cyclosporine pretreatment on tissue oxygen levels and cytochrome oxidase in skeletal muscle ischemia and reperfusion*. Shock, 2013. 39(2): p. 220-6.
290. Troitzsch, D., R. Moosdorf, and S. Vogt, *Importance of real-time tissue oximetry: relationship to muscle oxygenation and tissue viability*. J Surg Res, 2011. 169(1): p. 156-61.
291. Herbert, K.J., et al., *Effects of the endothelin receptor antagonist Bosentan on ischaemia/reperfusion injury in rat skeletal muscle*. Eur J Pharmacol, 2001. 424(1): p. 59-67.
292. Walters, T.J., et al., *Poloxamer-188 reduces muscular edema after tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury in rats*. J Trauma, 2011. 70(5): p. 1192-7.
293. Cahoon, N.J., et al., *Pharmacologic prophylactic treatment for perioperative protection of skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury in reconstructive surgery*. Plast Reconstr Surg, 2013. 131(3): p. 473-85.
294. McAllister, S.E., et al., *Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. 295(2): p. R681-9.
295. Knight, K.R., et al., *Ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N omega-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone*. Eur J Pharmacol, 1997. 332(3): p. 273-8.
296. Carmo-Araújo, E.M., et al., *Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies*. Int J Exp Pathol, 2007. 88(3): p. 147-54.
297. Blebea, J., et al., *Quantitative histochemical evaluation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury*. J Surg Res, 1987. 43(4): p. 311-21.
298. Barie, P.S. and R.J. Mullins, *Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia*. J Surg Res, 1988. 44(3): p. 284-307.
299. Chan, R.K., et al., *Reperfusion injury to skeletal muscle affects primarily type II muscle fibers*. J Surg Res, 2004. 122(1): p. 54-60.
300. Jennische, E., *Ischaemia-induced injury in glycogen-depleted skeletal muscle. Selective vulnerability of FG-fibres*. Acta Physiol Scand, 1985. 125(4): p. 727-34.
301. Idström, J.P., et al., *Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle*. Am J Physiol, 1990. 258(6 Pt 2): p. H1668-73.
302. Gillani, S., et al., *The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle*. Injury, 2012. 43(6): p. 670-5.
303. Scully, R.E., J.M. Shannon, and G.R. Dickersin, *Factors Involved in Recovery from Experimental Skeletal Muscle Ischemia Produced in Dogs: I. Histologic and Histochemical Pattern of Ischemic Muscle*. Am J Pathol, 1961. 39(6): p. 721-37.
304. Yan, H., et al., *The effect of postconditioning on the muscle flap survival after ischemia-reperfusion injury in rats*. J Invest Surg, 2010. 23(5): p. 249-56.
305. Rubin, B.B., et al., *Prolonged adenine nucleotide resynthesis and reperfusion injury in postischemic skeletal muscle*. Am J Physiol, 1992. 262(5 Pt 2): p. H1538-47.
306. Nanobashvili, J., et al., *Ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle: plasma taurine as a measure of tissue damage*. Surgery, 2003. 133(1): p. 91-100.
307. Presta, M. and G. Ragnotti, *Quantification of damage to striated muscle after normothermic or hypothermic ischemia*. Clin Chem, 1981. 27(2): p. 297-302.



308. Sapega, A.A., et al., *Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. A biochemical and ultrastructural study.* J Bone Joint Surg Am, 1985. 67(2): p. 303-14.
309. Dahlbäck, L.O. and O. Rais, *Morphologic changes in striated muscle following ischemia. Immediate postischemic phase.* Acta Chir Scand, 1966. 131(6): p. 430-40.
310. Allbrook, D., W.e.C. Baker, and W.H. Kirkaldy-Willis, *Muscle regeneration in experimental animals and in man. The cycle of tissue change that follows trauma in the injured limb syndrome.* J Bone Joint Surg Br, 1966. 48(1): p. 153-69.
311. Mäkitie, J. and H. Teräväinen, *Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat.* Acta Neuropathol, 1977. 37(2): p. 101-9.
312. Swartz, W.M., et al., *The effect of prolonged ischemia on high energy phosphate metabolism in skeletal muscle.* Surg Gynecol Obstet, 1978. 147(6): p. 872-6.
313. Mullen, J.T., et al., *Hepatic insufficiency and mortality in 1,059 noncirrhotic patients undergoing major hepatectomy.* J Am Coll Surg, 2007. 204(5): p. 854-62; discussion 862-4.
314. Hausenloy, D.J., et al., *Investigating the signal transduction pathways underlying remote ischemic conditioning in the porcine heart.* Cardiovasc Drugs Ther, 2012. 26(2): p. 87-93.
315. Zhao, J.L., et al., *Remote perconditioning reduces myocardial no-reflow by the activation of K ATP channel via inhibition of Rho-kinase.* Int J Cardiol, 2009. 133(2): p. 179-84.
316. Hahn, C.D., et al., *Remote ischemic per-conditioning: a novel therapy for acute stroke?* Stroke, 2011. 42(10): p. 2960-2.
317. Hougaard, K.D., et al., *Remote ischemic perconditioning as an adjunct therapy to thrombolysis in patients with acute ischemic stroke: a randomized trial.* Stroke, 2014. 45(1): p. 159-67.
318. Wei, M., et al., *Repeated remote ischemic postconditioning protects against adverse left ventricular remodeling and improves survival in a rat model of myocardial infarction.* Circ Res, 2011. 108(10): p. 1220-5.
319. Bøtker, H.E., et al., *Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial.* Lancet, 2010. 375(9716): p. 727-34.
320. Munk, K., et al., *Remote Ischemic Conditioning in Patients With Myocardial Infarction Treated With Primary Angioplasty: Impact on Left Ventricular Function Assessed by Comprehensive Echocardiography and Gated Single-Photon Emission CT.* Circ Cardiovasc Imaging, 2010. 3(6): p. 656-62.
321. Basalay, M., et al., *Remote ischaemic pre- and delayed postconditioning - similar degree of cardioprotection but distinct mechanisms.* Exp Physiol, 2012. 97(8): p. 908-17.
322. Ramalho, F.S., et al., *Hepatic microcirculatory failure.* Acta Cir Bras, 2006. 21 Suppl 1: p. 48-53.
323. Loukogeorgakis, S.P., et al., *Transient limb ischemia induces remote preconditioning and remote postconditioning in humans by a K(ATP)-channel dependent mechanism.* Circulation, 2007. 116(12): p. 1386-95.
324. Nastos, C., et al., *Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury.* Oxid Med Cell Longev, 2014. 2014: p. 906965.
325. Glanemann, M., et al., *Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state.* J Hepatol, 2003. 38(1): p. 59-66.

326. Hsu, C.C. and J.J. Wang, *L-ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuates liver ischemia-reperfusion induced of cardiac function impairment*. *Transplant Proc*, 2012. 44(4): p. 933-6.
327. Chen, T.H., K.H. Chen, and J.J. Wang, *Preischemic treatment with melatonin attenuates liver reperfusion-induced impairment of cardiac function*. *Transplant Proc*, 2012. 44(4): p. 970-3.
328. Wang, Q., et al., *Combined Vagal Stimulation and Limb Remote Ischemic Preconditioning Enhances Cardioprotection via an Anti-inflammatory Pathway*. *Inflammation*, 2015.
329. Tang, Y.H., et al., *Remote postconditioning induced by brief pulmonary ischemia and reperfusion attenuates myocardial reperfusion injury in rabbits*. *Chin Med J (Engl)*, 2011. 124(11): p. 1683-8.
330. Costa, F.L., et al., *Combined remote ischemic preconditioning and local postconditioning on liver ischemia-reperfusion injury*. *J Surg Res*, 2014. 192(1): p. 98-102.
331. Konstantinov, I.E., et al., *The remote ischemic preconditioning stimulus modifies inflammatory gene expression in humans*. *Physiol Genomics*, 2004. 19(1): p. 143-50.
332. Sedaghat, Z., et al., *Hepatoprotective effects of remote preconditioning during renal ischemia*. *Bratisl Lek Listy*, 2014. 115(11): p. 675-9.
333. Tamarelle, S., et al., *RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning*. *Basic Res Cardiol*, 2011. 106(6): p. 1329-39.
334. Hoda, M.N., et al., *Remote ischemic preconditioning is effective after embolic stroke in ovariectomized female mice*. *Transl Stroke Res*, 2014. 5(4): p. 484-90.
335. Katare, R.G., et al., *Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. 137(1): p. 223-31.
336. Calvillo, L., et al., *Vagal stimulation, through its nicotinic action, limits infarct size and the inflammatory response to myocardial ischemia and reperfusion*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011. 58(5): p. 500-7.
337. Mastitskaya, S., et al., *Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones*. *Cardiovasc Res*, 2012. 95(4): p. 487-94.
338. Wolfrum, S., et al., *Calcitonin gene related peptide mediates cardioprotection by remote preconditioning*. *Regul Pept*, 2005. 127(1-3): p. 217-24.
339. Selzner, N., M. Boehnert, and M. Selzner, *Preconditioning, postconditioning, and remote conditioning in solid organ transplantation: basic mechanisms and translational applications*. *Transplant Rev (Orlando)*, 2012. 26(2): p. 115-24.
340. Lim, S.Y., D.M. Yellon, and D.J. Hausenloy, *The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning*. *Basic Res Cardiol*, 2010. 105(5): p. 651-5.
341. Giannini, E.G., R. Testa, and V. Savarino, *Liver enzyme alteration: a guide for clinicians*. *CMAJ*, 2005. 172(3): p. 367-79.
342. Grossini, E., et al., *Levosimendan induces NO production through p38 MAPK, ERK and Akt in porcine coronary endothelial cells: role for mitochondrial K(ATP) channel*. *Br J Pharmacol*, 2009. 156(2): p. 250-61.
343. Abu-Amara, M., et al., *The nitric oxide pathway--evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury*. *Liver Int*, 2012. 32(4): p. 531-43.

344. Phillips, L., et al., *Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury*. J Invest Surg, 2009. 22(1): p. 46-55.
345. Karakus, E., et al., *Beneficial pharmacological effects of levosimendan on antioxidant status of acute inflammation induced in paw of rat: involvement in inflammatory mediators*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2013. 112(3): p. 156-63.
346. Avgeropoulou, C., et al., *The Ca<sup>2+</sup>-sensitizer levosimendan improves oxidative damage, BNP and pro-inflammatory cytokine levels in patients with advanced decompensated heart failure in comparison to dobutamine*. Eur J Heart Fail, 2005. 7(5): p. 882-7.
347. Kume, M., et al., *Ischemic preconditioning of the liver in rats: implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury*. J Lab Clin Med, 1996. 128(3): p. 251-8.
348. du Toit, E.F., et al., *A role for the RISK pathway and K(ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart*. Br J Pharmacol, 2008. 154(1): p. 41-50.
349. Das, B. and C. Sarkar, *Pharmacological preconditioning by levosimendan is mediated by inducible nitric oxide synthase and mitochondrial KATP channel activation in the in vivo anesthetized rabbit heart model*. Vascul Pharmacol, 2007. 47(4): p. 248-56.
350. Grossini, E., et al., *Levosimendan protection against kidney ischemia/reperfusion injuries in anesthetized pigs*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. 342(2): p. 376-88.
351. Jaeschke, H., *Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning*. J Invest Surg, 2003. 16(3): p. 127-40.
352. Lentsch, A.B., et al., *Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury*. Hepatology, 2000. 32(2): p. 169-73.
353. Novak, F., et al., *Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence*. Crit Care Med, 2002. 30(9): p. 2022-9.
354. Calder, P.C., *Glutamine and the immune system*. Clin Nutr, 1994. 13(1): p. 2-8.
355. Wischmeyer, P.E., et al., *Single dose of glutamine enhances myocardial tissue metabolism, glutathione content, and improves myocardial function after ischemia-reperfusion injury*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2003. 27(6): p. 396-403.
356. Schauer, R.J., et al., *Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia*. Ann Surg, 2004. 239(2): p. 220-31.
357. Virág, L., A.L. Salzman, and C. Szabó, *Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death*. J Immunol, 1998. 161(7): p. 3753-9.

## 12. Közleményjegyzék

### 12.1. Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai közlemények időrendben ( $\Sigma$ IF: 38,411 IF)

**1. Szijártó A.,** Hahn O., Batmunkh E., Stangl R., Kiss A., Lotz G., Schaff Zs., Váli L., Blázovics A., Gerő D., Szabó Cs., Kupcsulik P., Harsányi L.:  
Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia-reperfusion model: effects on microcirculation and antioxidant status in rats  
Clinical Nutrition 2007 (26) 640-48 p.  
IF: 2.878

**2. Szijártó A.,** Batmunkh E., Hahn O., Mihály Z., Kreiss Á., Kiss A., Lotz G., Schaff Zs., Váli L., Blázovics A., Gerő D., Szabó Cs., Kupcsulik P.:  
Effect of PJ-34 PARP-inhibitor on rat liver microcirculation and antioxidant status  
Journal of Surgical Research 2007 142 (1) 72-80 p.  
IF: 1.836

**3. Gyurkovics E.,** Arányi P., Stangl R., Ónody P., Ferreira G., Lotz G., Kupcsulik P.,  
**Szijártó A.:**  
Postconditioning of the Lower Limb-Protection Against the Reperfusion Syndrome  
Journal of Surgical Research 2011 169: 139–147  
IF: 2.176

**4. Gyurkovics E.,** Arányi P., Turóczy Zs., Garbaisz D., Varga M., Hegedűs V., Lotz G., Kupcsulik P., **Szijártó A.:**  
Postconditioning attenuates remote organ injury after lower limb arterial occlusion  
Interventional Medicine and Applied Science 2010 2 (4) 169-77 p.  
IF: 0

**5. Stangl R\*., Szijártó A\*.,** Ónody P., Tamás J., Tátrai M., Hegedűs V., Blázovics A., Lotz, G., Kiss A., Módos K., Gerő D., Szabó C., Kupcsulik P., Harsányi L.:  
Reduction of Liver Ischemia-Reperfusion Injury Via Glutamine Pretreatment  
Journal of Surgical Research 2011 166 (1) 95-103 p.  
IF: 2.247 (\*megosztott elsőszervezők)

**6. Szijártó A.,** Turóczy Zs, Czigány Z., Harsányi L.:  
Remote ischemic preconditioning: simple, low risk method to decrease ischemic-reperfusion injury. Review article.  
Journal of Surgical Research 2012 178 (2) 797-806 p.  
IF: 2.018

**7. Szijarto A.,** Turoczy Zs., Szabo J., Kaliszky P., Gyurkovics E., Aranyi P., Regali L., Harsanyi L., Lotz G.:  
Rapidly progressing, fatal reperfusion syndrome caused by acute critical ischemia of the lower limb  
Cardiovascular Pathology 2013 Nov-Dec;22(6):493-500  
IF: 2.336

- 8.** Garbaisz D., Turoczi Zs, Fulop A., Rosero O., Aranyi P., Onody P., Lotz G., Rakonczay Z., Balla Zs.; Harsanyi L., **Szijarto A.:**  
Therapeutic option for managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping  
Journal of Surgical Research 2013 185 469-476  
IF: 2.121
- 9.** Czigány Z., Turóczi Zs., Ónody P., Harsányi L., Lotz G., Hegedüs V., **Szijártó A.:**  
Remote ischemic preconditioning protects the liver from ischemia-reperfusion injury.  
Journal of Surgical Research 2013 185:605-13  
IF: 2.121
- 10.** Onody P., Stangl R., Fulop A., Rosero O., Garbaisz G., Turoczi Zs., Lotz G., Rakonczay Zs., Balla Zs., Hegedus V., Harsanyi L., **Szijarto A.:**  
Levosimendan: a cardiovascular drug to prevent liver ischemia-reperfusion injury?  
PLoS One. 2013 8(9): e73758. doi: 10.1371/journal.pone.0073758  
IF: 3.534
- 11.** Turóczi Zs., Arányi P., Lukáts A., Garbaisz D., Lotz G., Harsányi L., **Szijártó A.:**  
Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats.  
PLoS One. 2014 13;9(1):e84783. doi: 10.1371/journal.pone.0084783.  
IF: 3.234
- 12.** Rosero O., Németh K., Turóczi Zs., Fülöp A., Garbaisz D., Gyórfy A., Szuák A., Dorogi B., Kiss M., Nemeskéri Á., Harsányi L, **Szijártó A.:**  
Collateral circulation of rat lower limb and its significance in ischemia-reperfusion studies  
Surgery Today 2014 44(12): 2345-53  
IF: 1.526
- 13.** Turóczi Zs., Fülöp A., Lukáts A., Garbaisz D., Lotz G., Harsányi L., **Szijártó A.:**  
Postconditioning protects skeletal muscle against a long-lasting vascular occlusion.  
Journal of Investigative Surgery 2014 27 (5):282-90  
IF: 1.158
- 14.** Garbaisz D., Turoczi Zs., Aranyi P, Fulop A.; Rosero O., Hermes E., Ferencz A., Lotz G., Harsanyi L., **Szijarto A.:**  
Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811  
PLoS ONE 2014 9(6): e101067. doi:10.1371/journal.pone.0101067  
IF: 3.234
- 15.** Czigány Z., Turóczi Zs., Kleiner D., Lotz G., Homeyer A., Harsányi L., **Szijártó A.:**  
Neural elements behind the hepatoprotection of remote preconditioning.  
Journal of Surgical Research 2015 193: pp. 642-651  
IF: 1.936 (2014)
- 16.** Aranyi P., Turoczi Zs., Garbaisz D., Lotz G., Geleji J., Hegedus V., Rakonczay Z., Balla Zs., Harsanyi L., **Szijarto A.:**  
Postconditioning in major vascular surgery: Prevention of renal failure  
Journal of Translational Medicine 2015 13:21 DOI: 10.1186/s12967-014-0379-7

IF: 3.930 (2014)

**17. Turóczy Zs., Fülöp A., Czigány Z., Varga G., Rosero O., Tökés T., Kaszaki J., Lotz G., Harsányi L., Szijártó A.:**

Improvement of small intestinal microcirculation by postconditioning after lower limb ischemia

Microvascular Research 2015 98:119-125

IF: 2.126 (2014)

**18. Stangl R., Szijártó A., Ónody P., Tamás J., Tátrai M., Hegedűs V., Blázovics A., Lotz G., Szász M., Kiss A., Gerő D., Szabó Cs., Kupcsulik P., Darvas K., Harsányi L.:**  
Hosszú latenciájú preoperatív glutamin előkezelés vizsgálata patkány ischaemia-reperfúziós modellben

Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2008 38 (4) 179-87 p.

**19. Szijártó A.:**

Az ischaemiatolerancia növelésének lehetőségei a májsebészetben (Doktori munka)

Magyar Sebészet 2008 61 (3) 128-35 p.

**20. Szijártó A., Gyurkovics E., Arányi P., Ónody P., Stangl R., Tátrai M., Lotz G., Mihály Z., Hegedűs V., Blázovics A., Kupcsulik P.:**

Posztkondicionálás kísérletes alkalmazása aortakirekesztés kapcsán

Magyar Sebészet 2009 62 (4) 180-87 p.

**21. Szijártó A., Arányi P., Turóczy Zs., Kupcsulik P., Gyurkovics E.:**

Ischaemiás-reperfúziós károsodás csökkentésének elvi és gyakorlati lehetőségei az érsebészetben. Irodalmi áttekintés

Érbetegségek 2009 16 (4) 113-120 p.

**22. Szijártó A., Arányi P., Turóczy Zs., Kupcsulik P., Gyurkovics E.:**

A reperfúziós szindróma és a postcondicionálás sejtszintű mechanizmusa. Irodalmi áttekintés

Érbetegségek 2010 17 (1) 11-18 p.

**23. Szijártó A., Turóczy Zs., Arányi P., Nagy Z., Gyurkovics E.:**

Akut kritikus ischaemia az alsó végtagon. Irodalmi összefoglaló

Orvosi Hetilap 2010 151 (50) 2057-66 p.

**24. Szijártó A., Turóczy Zs., Arányi P., Garbaisz D., Varga M., Stangl R., Lotz G., Kupcsulik P.:**

Hosszú idejű végtagi verőér-elzáródás és izomszövet-életképesség vizsgálata kísérletes állatmodellben

Magyar Sebészet 2010 63 (6) 374-79 p.

**25. Arányi P., Turóczy Zs., Garbaisz D., Varga M., Dr. Lotz G., Kupcsulik P., Szijártó A.:**

Posztkondicionálás: érsebészeti technika posztoperatív veseelégtelenség megelőzésére.

Állatkísérletes modell.

Hypertonia és Nephrologia 2011;15(3):117-124.

**26. Szijártó A., Czigány Z., Turóczy Zs., Harsányi L.:**

Iszkémiás perkondicionálás – Alternatív adaptív technika a miokardiális iszkémia-tolerancia növelésére. Összefoglaló Közlemény.  
Cardiologica Hungarica 2011; 41(5):344-353.

**27. Czigány Z., Turóczi Zs., Bulhardt O., Hegedüs V., Lotz G., Rakonczay Z., Balla Zs., Harsányi L., Szijártó A.:**

Távoli szervi kondicionálás: rövid távú hepatoprotektív hatások patkánymodellben.  
Orvosi Hetilap 2012; 153(40):1578–1586

**28. Garbaisz D., Turóczi Zs., Fülöp A., Rosero O., Arányi P., Ónody P., Lotz G., Rakonczay Z., Balla Zs., Harsányi L., Szijártó A.:**

Alsó végtagi ischaemiás-reperfüziós károsodás hosszú távú tüdőszövődményeinek megelőzése posztkondicionálással  
Magyar Sebészet 2013; 66 (3): 146–154

## **12.2. A Ph.D. fokozat megszerzését megelőző vagy követő időszak egyéb nemzetközi és hazai közleményei időrendben ( $\Sigma$ IF: 37,362 IF)**

**1. Gyurkovics E., Tihanyi B., Szijártó A., Kaliszky P., Temesi V., Sas H., Kupcsulik P.:**  
Fatal outcome from extreme acute gastric dilation after an eating binge  
International Journal of Eating Disorders 2006 39 (7) 602-605 p.  
IF: 1.839

**2. Lódi Cs., Szabó E., Holczbauer Á., Batmunkh E., Szijártó A., Kupcsulik P., Kovalszky I., Paku S., Illyés Gy., Kiss A., Schaff Zs.:**  
Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas  
Modern Pathology 2006 (19) 460-69 p.  
IF: 3.753

**3. Hahn O., Szijártó A., Lotz G., Schaff Zs., Vígváry Z., Váli L., Kupcsulik P.:**  
The effect of ischemic preconditioning prior to intraoperative radiotherapy on ischemic and on reperfused rat liver  
Journal of Surgical Research 2007 142 (1) 32-44 p.  
IF: 1.836

**4. Németh Zs., Szász AM., Tátrai P., Németh J., Győrffy H., Somorác Á., Szijártó A., Kupcsulik P., Kiss A., Schaff Zs.:**  
Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers  
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2009 57 (2) 113-121 p.  
IF: 2.372

**5. Szijártó A., Hargitai B., Fischer S., Darvas K., Kupcsulik P.:**  
Two-staged procedure of portal ligation and hepatectomy monitored by ICG clearance  
Journal of Investigative Surgery 2009 22 (1) 63-8 p.  
IF: 1.035

**6. Németh Z., Szász A.M., Somorác A., Tátrai P., Németh J., Győrffy H., Szijártó A., Kupcsulik, P., Kiss, A., Schaff, Z.:**

Zonula occludens-1, occludin, and E-cadherin protein expression in biliary tract cancers  
Pathology and Oncology Research 2009 15 (3) 533-539 p.

IF 1.152

**7. Módis K., Gerő D., Stangl R., Rosero O., Szijártó A., Lotz G., Mohácsik P., Szoleczky P., Coletta C., Szabó Cs.:**

Adenosine and inosine exert cytoprotective effects in an in vitro model of liver ischemia-reperfusion injury.

International Journal Of Molecular Medicine 2013 31 (2) 437-446 p.

IF: 1.88

**8. Fülöp A., Turóczy Zs., Garbaisz D., Harsányi L., Szijártó A.:**

Experimental models of hemorrhagic shock. Review.

European Surgical Research 2013 50 57–70 p.

IF: 1.4

**9. Holczbauer A., Gyöngyösi B., Lotz G., Szijártó A., Kupcsulik P., Schaff Zs., Kiss A.:**  
Distinct claudin expression profiles of hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal and pancreatic carcinomas.

Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2013 61 (4): 294-305

IF: 2.403

**10. Szijártó A., Lévay B., Kupcsulik P.:**

Postoperative complications of spilled gallstones: A report on two cases

European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2014 26:(3) pp. 357-360

IF: 2.253

**11. Rosero O., Ónody P., Stangl R., Turóczy Zs., Fülöp A., Garbaisz D., Lotz G., Harsányi L., Szijártó A.:**

Postconditioning of the small intestine: which is the most effective algorithm in a rat model?

Journal of Surgical Research 2014 187:427-37

IF: 1.936

**12. Fulop A.\*, Szijarto A\*., Harsanyi L., Budai A., Pekli D., Korsos D., Horvath I., Kovacs N., Karlinger K., Mathe D., Szigeti K.:**

Demonstration of metabolic and cellular effects of portal vein ligation using multi-modal PET/MRI measurements in healthy rat liver

PLoS One 2014 9(3): e90760. doi:10.1371/journal.pone.0090760

IF: 3.234 (\*megosztott elsőszervezők)

**13. Rosero O., Ónody P., Kovács T., Molnár D., Lotz G., Tóth Sz., Turóczy Zs., Fülöp A., Garbaisz ., Harsányi L., Szijártó A.:**

Impaired Intestinal Mucosal Barrier Upon Ischemia-Reperfusion: “Patching Holes In The Shield With A Simple Surgical Method”

BioMed Research International 2014 Article ID 210901, 11 pages

IF: 1.579

**14. Gyórfy A., Szijártó A.:**

A new operative technique for aural haematoma in dogs: A retrospective clinical study.



Acta Veterinaria Hungarica 2014 19:1-8  
IF: 0.646

**15. Holczbauer A., Gyongyosi B., Lotz G., Torzsok P., Kaposi-Novak P., Szijarto A., Tatrai P., Kupcsulik P., Schaff Z., Kiss A.:**  
Increased Expression of Claudin-1 and Claudin-7 in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma.  
Pathology And Oncology Research 2014 20:(3) pp. 493-502  
IF: 1.855

**16. Szijarto A., Fulop A.:**  
Triggered liver regeneration: from experimental model to clinical implications - Invited review  
European Surgical Research 2015 54:148-161  
IF: 2.474 (2014)

**17. Fülöp A., Budai A., Czigány Z., Lotz G., Paku S., Dezső K., Harsányi L., Szijártó A.:**  
Alterations in Hepatic Lobar Function in Regenerating Rat Liver  
Journal of Surgical Research 2015 197: 307-317  
IF: 1.936 (2014)

**18. Nagy Z., Gyurkovics E., Pajor P., Tarjányi M., Szijártó A., Vari SG.:**  
New method for treatment of inferior vena cava tumor thrombus - case study.  
Croatian Medical Journal 2015 56 (2):139-44.  
IF: 1.305 (2014)

**19. Czigány Z., Iwasaki J., Yagi S., Nagai K., Szijártó A., Uemoto S., Tolba RH.:**  
Improving research practice in rat orthotopic and partial orthotopic liver transplantation: a review, recommendation, and publication guide  
European Surgical Research 2015 Eur Surg Res 55:119–138  
IF: 2.474 (2014)

**20. Váli L., Szijártó A., Hahn O., Fehér J., Kupcsulik P.:**  
A benignus májdaganatok és szabadgyökök kapcsolata  
Orvosi Hetilap 2004 145 (40) 2043-50 p.

**21. Wacha J., Szijártó A., Kupcsulik P.:**  
Prebiotikumok, probiotikumok, szinbiotikumok. Irodalmi áttekintés kontrollált klinikai vizsgálatok elemzése alapján  
Metabolizmus 2006 4 (1) 62-67 p.

**22. Wacha J., Szijártó A., Kupcsulik P.:**  
Prebiotikumok, probiotikumok, szinbiotikumok. Irodalmi áttekintés kontrollált klinikai vizsgálatok elemzése alapján  
Gyógyszerész Továbbképzés 2007 1 (4) 15-20 p.

**23. Rosero O., Ónódy P., Stangl R., Hegedűs V., Lotz G., Blázovics A., Kupcsulik P., Szijártó A.:**  
Pozitkondicionálás kísérletes vizsgálata vékonybél ischaemiás-reperfúziós modelljében

Magyar Sebészet 2011 64 (1) 28-36 p.

**24. Wacha J., Szijártó A.:**

Probiotikumok és a terhesség – összefoglaló referátum

Orvosi Hetilap 2011 152. (11) 448–454 p

**25. Szijártó A., Fülöp A, Turóczi Zs, Garbaisz D, Dudás E, Szabó J, Nánási R, Kupcsulik P.:**

Rupturált hasi aorta aneurysma kísérletes modellje. A folyadék reszuszcitáció technikai megfontolása.

Aneszteziológia és Intenzív Terápia 2011; 41 (2):61-70

**26. Hegedüs V., Gerő D., Mihály Z., Szijártó A., Zelles T., Sárdi E.:**

Alimentáris eredetű kísérletes zsírmáj és adjuváns kezelése természetes eredetű bioaktív hatóanyagokkal - Alimentary induced fatty liver and adjuvant therapy with effective natural bioactive molecules.

Orvosi Hetilap 2011; 152, 1035-1042 (2011)

**27. Ónody P., Rosero O., Kovács T., Garbaisz D., Hegedüs V., Lotz G., Harsányi L., Szijártó A.:**

Posztkondicionálás. A távoli szervi diszfunkciók ellenszere?

Magyar Sebészet 2012; 65(4): 220–227

**28. Szijártó A., Ónody P., Rosero O., Harsányi L.:**

Kritikus mesenterialis ischaemia. Adaptív mechanizmusok. Távoli szervi diszfunkciók.

Magyar Belorvosi Archivum 2013; 66 (1): 13-20

**29. Szijártó A., Fujimoto Y., Kirino I., Uemoto S.:**

Az élődonoros májtranszplantáció speciális kérdései

Orvosi Hetilap 2013; 154 (36): 1417 - 1425

**30. Lévy B., Szabó Gy., Szijártó A., Gamal EM:**

Epekövekben levő baktériumok előfordulásának gyakorisága

Magyar Sebészet 2013; 66 (6): 353–356

**31. Rosero O., Kovacs T., Onody P., Harsanyi L., Szijarto A.:**

Bakteriális transzlokáció: rés a pajzson - Összefoglaló közlemény

Orvosi Hetilap 2014, 155 (8): 304–312

**32. Rosero O., Harsanyi L., Szijarto A.:**

Akut mezenterialis iszkémia: biomarker egyenlő diagnózis? - Összefoglaló közlemény

Orvosi Hetilap 2014, 155 (41): 1615–1623

**33. Kupcsulik P., Hahn O., Szijártó A., Zsirka A., Winternitz T., Lukovich P., Fekete K.:**

Benignus májdagantok laparoszkópos rezekciója

Magyar sebészet 2015; 68 (1): 3-7

**Könyvfejezet**

**1. Szijártó A.:**

A kísérleti műtő története, 1950-2009. In: Az Üllői úti Sebészeti Klinika, 1909-2009 : Jubileumi kiadvány / szerk. Kupcsulik P. - Bp. Semmelweis K., 2009. -105-08 p.

**2. Harsányi L., Szijártó A.:**

Orvostudományi kutatás sebészeti szakterületeken. In: Klinikai vizsgálatok kézikönyve / szerk. Lakner G., Renczes G., Antal J. - Bp. : SpringMed K., 2009. - 82-86 p.

**3. Zoltán Czigány, Pramod Kadaba Srinivasan, Junji Iwasaki, Attila Szijártó, René H. Tolba:** Small molecules in solid organ transplantation with cytostatic-antiproliferative effects. In: Chen H, Qian S (editors), Current Immunosuppressive Therapy in Organ Transplantation. Nova Science Publishers, New York. 2015: in press.

**4. Rosero Olivér, Kovács Tibor, Garbaisz Dávid, Turóczi Zsolt, Fülöp András, Harsányi László, Szijártó Attila:**

Vékonybél ischaemias károsodásának kivédése adaptív sebészi technikákkal.

Algoritmusok. In: szerk. Blázovics Anna, Mézes Miklós, Róth Erzsébet - Oxidatív stressz és betegségek. Szent István Egyetemi Kiadó. 2015: 121-124 oldal

### 12.3. A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények

**1. Szijártó A., Hahn O., Lotz G., Schaff Z., Madarász E., Kupcsulik P.:**

Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser doppler flowmetry

Journal of Surgical Research 2006 131 (1) 150-57 p.

IF: 2.038

**2. Szijártó A., Batmunkh E., Hahn O., Mihály Z., Kreiss Á., Kiss A., Lotz G., Schaff Zs., Váli L., Blázovics A., Gerő D., Szabó Cs., Kupcsulik P.:**

Effect of PJ-34 PARP-inhibitor on rat liver microcirculation and antioxidant status

Journal of Surgical Research 2007 142 (1) 72-80 p.

IF: 1.836

## 13. Szcientometria

Sziujártó Attila tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása  
MTA V. Orvostudományi Osztály (2015.10.07.)

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	61	---	---	---
szakcikk, összefoglaló nemzetközi folyóiratban	---	32	210	282
szakcikk, összefoglaló, hazai idegen nyelvű	---	2	0	2
szakcikk, összefoglaló, magyar nyelvű	---	24	18	29
rövid közlemény	---	3	27	27
<b>II. Könyv</b>	0	---	---	---
<b>a) Szakkönyv, kézikönyv</b>	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
<b>b) Szakkönyv, tankönyv szerkesztőként</b>	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
<b>III. Könyvrészlet</b>	3	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	0	0
magyar nyelvű	---	2	0	0
Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	0	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>3</sup></b>	1	---	0	0
<b>Oktatási közlemények összesen (II.-III.)</b>		0	0	0
<b>Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)<sup>4</sup></b>	65	---	255	340
<b>V. További tudományos művek</b>	3	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkekét és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkekét is	---	3	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	0	0	0
Jelentés, guideline	---	0	0	0
<b>VI. Idézett absztraktok<sup>6</sup></b>	2	---	2	2
<b>Összesített impakt faktor<sup>4</sup></b>	77,9	---	---	---
<b>Idézetttség száma<sup>1,4</sup></b>	---	---	257	342
<b>Hirsch index<sup>1</sup></b>	9	---	---	---

VII. Sokszerzős vagy csoportos (multicentrikus) közlemény	0	---	---	---
a) Szerző <sup>4</sup>	---	0	0	0
b) Kollaborációs közreműködő <sup>4</sup>	---	0	0	0

Speciális tudományometriai adatok	Adat
Első szerzős folyóiratcikkek száma	18
Utolsó szerzős folyóiratcikkek száma	25
Első és utolsó szerzőségű folyóiratcikkek impakt faktor összege	51,6
Az utolsó tudományos fokozat/cím (PhD) elnyerése utáni (2007 - ) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	53
impakt faktor összege	63,7
Magyar nyelven megjelent tudományos teljes folyóiratcikkek száma	24
Az utolsó 10 év (2005-2015) tudományos, teljes, lektorált folyóiratcikkeinek száma	60
impakt faktor összeg	77,9
idézések száma	339
A legmagasabb idézettségű közlemény idézettsége (az összes idézettség százalékában)	55 (16,08%)
WOS/Scopus azonosítóval idézettség	299
Sokszerzős és/vagy csoportos közlemények impakt faktor összege	0
idézettsége	0
Folyóiratcikkek, 15-29 szerzővel	1

**Megjegyzések:**

Az MTMT nem tudja szolgáltatni a kérelmezőnek kizárólag külföldi intézményből publikált folyóiratcikkeinek számát, összesített impaktfaktorát és független hivatkozásainak számát, valamint az ilyen közlemények első és utolsó szerzőre vonatkozó impaktfaktor összeget. Ezeket az adatokat a pályázónak kell összegyűjtenie és feltöltenie a Doktori Tanács elektronikus rendszerébe.

<sup>1</sup> a disszertáció és egyéb típusú idézők nélkül

<sup>2</sup> lektorált, tudományos folyóiratban

<sup>3</sup> konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben, egyéb konferenciakötetben

<sup>4</sup> a sokszerzős és/vagy csoportos szerzőségű közlemények impakt faktora és idézettsége nem számítható be az összes értékekbe, ezeket a speciális tudományometriai adatok között tünteti fel az összesítés

<sup>5</sup> Nem idézett absztrakt itt nem kerül be az összesítésbe.

## 14. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönet illeti Feleségemet, Kolos fiamat, akik végtelen türelmükkel és kitartó szeretetükkel és az így megteremtett családi biztonsággal járultak hozzá ahhoz, hogy az elmúlt másfél évtized munkája egységgé kovacsolódjon és formálódhasson bennem. Köszönöm *Ágikának*, hogy a nehéz percekben vigasztalást, bátorítást kaptam, míg a boldog pillanatokban az örömök közös megélése mellett a mérsékletesség óvatos intelemé is mindig elkísért utamon.

Köszönöm *Tanáraitmnak*, akik felismerték bennem a lelkes tudásvágyat. Köszönöm *Kupcsulik Péter Professzor Úrnak*, aki amellet, hogy sebészi pályafutásomon elindított, tanított, úgy örökösen kérdéseket tett fel nekem és így ébresztett fel bennem vágyat a tudományos munka iránt is, bízva abban, hogy a kérdésekre egyszer megtalálom a választ. Egyidős kapcsolat fűz *Darvas Katalin Professzor Asszonyhoz*, aki mindig támogatólag állt mellettem és olykor anyai tanácsaival intett mérsékletességre vagy bátorított ezen a nehéz úton.

Köszönetemet szeretném kifejezni *Harsányi László Professzor Úrnak*, akinek támogatásával az utóbbi évek szakmai és tudományos fejlődésével elérhetővé vált egy régen megálmodott cél.

Köszönöm hallgatóimnak, akik közül később - büszkén mondhatom - sokan PhD hallgatóim lettek és megőrizték a "Kísérleti Műtő" szellemiségét, formálták és formálják azt napról-napra. Hálával tartozom nekik az együtt töltött hosszú, inspiráló kutatói, szakmai majd később klinikai munkánk mellett kialakult életre szóló barátságok miatt is. Név szerint - kronológiai sorba állítva - hálával tartozom *Dr. Ónody Péternek*, *Dr. Stangl Ritának*, *Dr. Gyurkovics Endrének*, *Dr. Arányi Péternek*, *Dr. Garbaisz Dávidnak*, *Dr. Rosero Olivérnek*, *Dr. Turóczy Zsoltnak*, *Dr. Czígány Zoltánnak*, *Dr. Kovács Tibornak* és *Dr. Budai Andrásnak*. Nélkülük ez a munka nem jött volna létre. Külön köszönetemet szeretném kifejezni *Dr. Fülöp Andrásnak*, aki elkötelezetten segített ezen dolgozat megszületésében, hasznos tanácsaival, javaslataival tette teljessé a mű egészét.

Köszönöm a segítséget a kutatásban velem együtt dolgozó laboratóriumok minden lelkes munkatársának. Kiemelendő köszönet illeti patológus barátaimat: *Dr. Kiss Andrást* és *Dr. Lotz Gábort*, akik amellet, hogy megtanítottak egy sebészt a patológia alapfogásaira, úgy egyben emberként, barátként is mellettem álltak minden viszontagságos időben, melyből kijutott olykor. Köszönetemet szeretném kifejezni *Blázovics Anna Professzor Asszonynak*, aki a kezdeti botladozásaim alatt is látott fantáziát kutatásainkban. Köszönöm *Dr. Rakonczay Zoltán* barátomnak a támogatást és biztatást, melyet tett az elmúlt évek hosszú sora alatt tett.

Köszönöm *klinikai munkatársaimnak* a rugalmas hozzáállást, amellyel a mindennapokban felmerülő szervezési gondokból fakadó helyzeteket kezelték és tették könnyebbé ezek megoldását. Külön köszönet *Dr. Szücs Ákos* és *Dr. Hahn Oszkár* barátaimnak, akik megértéssel fogadták mindazt a terhet, melyet hol szervezési, hol lelki értelemben jelentettem nekik a mindennapokban.

Köszönöm *barátaimnak és szeretteimnek* - akiknek felsorolása egy újabb disszertációnyi terjedelmet töltene ki -, hogy az elmúlt sok-sok évben támogattak, biztattak és a jelen munka megszületéséhez kellő miliőt teremtettek. Köszönet illeti *szüleimet, családomat*, akik végtelen támogatásukkal álltak mellettem a kezdetektől. *Édesanyámnak* külön hálával tartozom, biztos most nagyon büszke lenne rám...

**Köszönöm.**

Budapest, 2015. szeptember 27.