

Perioperatív farmakológiai kezelések szerepe a máj iszkémiás-reperfúziós károsodásának mérséklésében

Doktori értekezés

Dr. Stangl Rita

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szijártó Attila egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Jancsó Gábor egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Hauser Balázs egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság

Elnök: Prof. Dr. Weber György intézetvezető egyetemi tanár

Tagok: Dr. Csomós Ákos egyetemi docens, Ph.D.

Dr. Csapó Zsolt osztályvezető főorvos, Ph.D.

Budapest
2013

Tartalom

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
1.1. A máj iszkémiás-reperfúziós károsodása	7
1.1.1. A definitív sejtkárosodás következményei	9
1.1.2. A sejtkárosodás patomechanizmusa	15
1.1.3. Távoli szervi hatások	23
1.2. Az I-R károsodás mérséklésének lehetőségei	25
1.2.1. Direkt károsodás-csökkentő kezelések	25
1.2.2. Az iszkémia-tolerancia javítása: prekondicionálás	27
1.3. Glutamin	30
1.3.1. A glutamin hatásai a szervezetben	31
1.3.2. A glutamin szerepe a táplálásterápiában	34
1.4. Levosimendan	37
1.4.1. A levosimendan farmakológiai hatásai	37
1.4.2. A levosimendan a klinikai tapasztalat tükrében	42
2. Célkitűzések	45
2.1. Hosszú latenciájú glutamin előkezelés	45
2.2. Rövid és hosszú latenciájú levosimendan előkezelés	46
3. Módszerek	47
3.1. Kísérleti elrendezés	47
3.1.1. Törvényi háttér	47
3.1.2. Állatok	47
3.1.3. Altatás és monitorozás	47
3.1.4. Műtéti modell	47
3.1.3. Előkezelések	49
3.1.5. Kísérleti csoportok	50
3.1.6. Mintavétel	52
3.2. Vizsgálóeljárások	52
3.2.1. Hemodinamikai monitorozás	52
3.2.2. A máj mikrokeringésének vizsgálata	52
3.2.3. Áramlási görbék elemzése és értelmezése	53
3.2.4. Szövetteni elemzés	53
3.2.5. Immunhisztokémiai vizsgálatok	54
3.2.6. Szérum nekroenzim mérések	55
3.2.7. Az antioxidáns státusz vizsgálata	55
3.2.8. NADH-tetrazolium enzimhisztokémiai reakció	56
3.2.9. HSP72 expresszió (Western blot analízis)	57
3.2.10. Statisztikai elemzés	58
4. Eredmények	59
4.1. Előkísérlet: Rövid latenciájú glutamin előkezelés	59
4.1.1. Kísérleti elrendezés és előkezelés	59
4.1.2. Eredmények	59
4.1.3. Összefoglalás	61
4.2. Kísérlet I.: Hosszú latenciájú glutamin előkezelés	62
4.2.1. Hemodinamika	62
4.2.2. Mikrocirkulációs változások	62

4.2.3. Szöveti értékelés	63
4.2.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok	64
4.2.5. Nekroenzimek	66
4.2.6. Antioxidáns státusz	67
4.3. Kísérlet II.: Levosimendan előkezelések	68
4.3.1. Hemodinamika	68
4.3.2. Mikrocirkulációs változások	69
4.3.3. Szöveti értékelés	70
4.3.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok	72
4.3.5. Nekroenzimek	75
4.3.6. Antioxidáns státusz	76
4.3.7. NADH-tetrazolium enzimhisztokémiai reakció	77
4.3.8. HSP72 expresszió	78
5. Megbeszélés	79
6. Következtetések	90
6.1. Hosszú latenciájú glutamin előkezelés	90
6.2. Rövid és hosszú latenciájú levosimendan előkezelés	90
7. Összefoglalás	91
8. Summary	92
9. Irodalomjegyzék	93
10. Saját publikációk jegyzéke	112
11. Köszönetnyilvánítás	113

Rövidítések jegyzéke

A szövegben megjelenő rövidítések betűrendbe szedve.

AIF: apoptózisindukáló faktor
AP-1: aktivátor protein-1
ALAT: alanin aminotranszferáz
ARDS: adult respiratory distress syndrome
ASAT: aszpartát aminotranszferáz
ASK: apoptosis signal-regulating kinase
ADP: adenzin-bifoszfát
ASE: aszkorbinsav ekvivalens
ATP: adenzin-trifoszfát
CD(95): cluster of differentiation (95)
COX: ciklooxygenáz
DAMPs: danger-associated molecular patterns
DIC: disseminated intravascular coagulation
DNS: dezoxiribonukleinsav
DPPH: difenil-2-pikril-hidrazil
EGF: epithelial growth factor
ER: endoplazmás retikulum
ERK: extracellular signal-regulated kinase
ET(-R): endotelin(-receptor)
FSAL: Fas-ligand
GAPDH: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
Gln: glutamin
GSH: glutation
GSSG: oxidált glutation
HClO: hypoklórsav
H-donor: hidrogén-donor
HE: hematoxilin-eozin
HEPES: (4-(2-hidroxyethyl)-1-piperazinetáneszulfonsav
H₂O₂: hidrogénperoxid
HO: hemoxigenáz
HMGB: high mobility group box
HSP: heat shock protein
IAP: inhibitor of apoptosis protein
ICAM: intercellular adhesion molecule
IFN- γ : interferon- γ
IL: interleukin
I-R: iszkémiás-reperfúziós
IP: iszkémiás prekondicionálás
JNK: c-Jun-N-terminális kináz
(k)Da: (kilo)Dalton
LDF: laser Doppler flowmeter
L-NAME: L-NG-nitroarginin metil-észter

MAPK: mitogén aktivált protein kináz
(mito) K⁺_{ATP}-csatornák: (mitokondriális) ATP-szenzitív K⁺-csatornák
MPTP: mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórus
MPT-csatornák: mitokondriális permeabilitási tranzíciós-csatornák
MODS: multi organ dysfunction syndrome
MOF: multi organ failure
NAD(P): nikotinamid-adenin-dinukleotid-poszfát
NBT: nitroblue-tetrazolium
NK-sejtek: natural killer-sejtek
NO: nitrogén monoxid
(i/e)NOS: (inducible/endothelial) nitrogen monoxid synthase
NO₂: nitrogén dioxid
N₂O₃: dinitrogén trioxid
NFκ-B: nuclear factor κ-B
O₂⁻: szuperoxid anion
OH•: hidroxilgyökök
ONOO•: peroxinitrit
PAG: phosphate activated glutaminase
PARP: poly(ADP-ribóz) polimeráz
PDE: foszfodiészteráz
PKC: protein-kináz-C
PM: plató maximum
PRRs: pattern recognition receptors
RAGE: receptor for advanced glycation end products
RLU: relative light unit
RNS: ribonukleinsav
ROS: reactive oxigen species
RT: reperfüziós terület
SAPK: stress activated protein kinase
SH-csoport: szulfhidril-csoport
SIRS: systemic inflammatory response syndrome
SOC: store operated Ca²⁺-csatorna
SOD: szuperoxid dizmutáz
STAT: signal transducers and activators of transcription
TNF-α: tumor necrosis factor-α
TNFR: tumor necrosis factor receptor
TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R: TRAIL-receptor
TLR: toll-like receptor
TRIS: Tris(hydroxymetil)-aminometán
TRP-csatornák: tranziens receptor potenciál-csatornák
TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
XAIP: X-linked inhibitor of apoptosis protein
VCAM: vascular adhesion molecule

1. Bevezetés

Kiterjedt májrezekciók során, a vérzés minimalizálása érdekében alkalmazott érkirekesztések (pl. Pringle-manőver) a máj iszkémiás-reperfúziós (I-R) károsodásához vezetnek. A vérzéscsillapítás egyre javuló műszeres lehetőségeinek köszönhetően, napjainkban már jóval kevesebb esetben van szükség a beáramlási pályák teljes lefogására, de nehezen uralható vérzések esetében, valamint traumás sürgősségi helyzetekben továbbra is elkerülhetetlen lehet. A májtranszplantáció bővülő lehetőségei (pl. élő-donoros májtranszplantáció) szintén növelik az iszkémiás-reperfúziós károsodás mérséklésének igényét, mivel a posztoperatív kimenetelt és a graft túlélését meghatározó egyik alapvető tényezőről van szó.¹ Öregedő társadalmunkban folyamatosan emelkedik továbbá a számos komorbiditásban szenvedő, idősebb betegeken végzett műtétek száma, ahol a műtéti stressz iránti nagyobb esendőségre kell számítani. Világszerte növekvő tendenciát mutat a különböző etiológiájú májbetegségek prevalenciája is, ahol a javuló kezelési lehetőségek által biztosított hosszabb túlélés egyben valószínűbbé teszi, hogy idült májbetegségeknél váljanak szükségessé sebészi beavatkozások. Ezen csökkent adaptációs képességű betegcsoportok esetében kirekesztési manőver, illetve jelentősebb hipotenzió nélkül is létrejöhet kisebb mértékű I-R károsodás a májban.

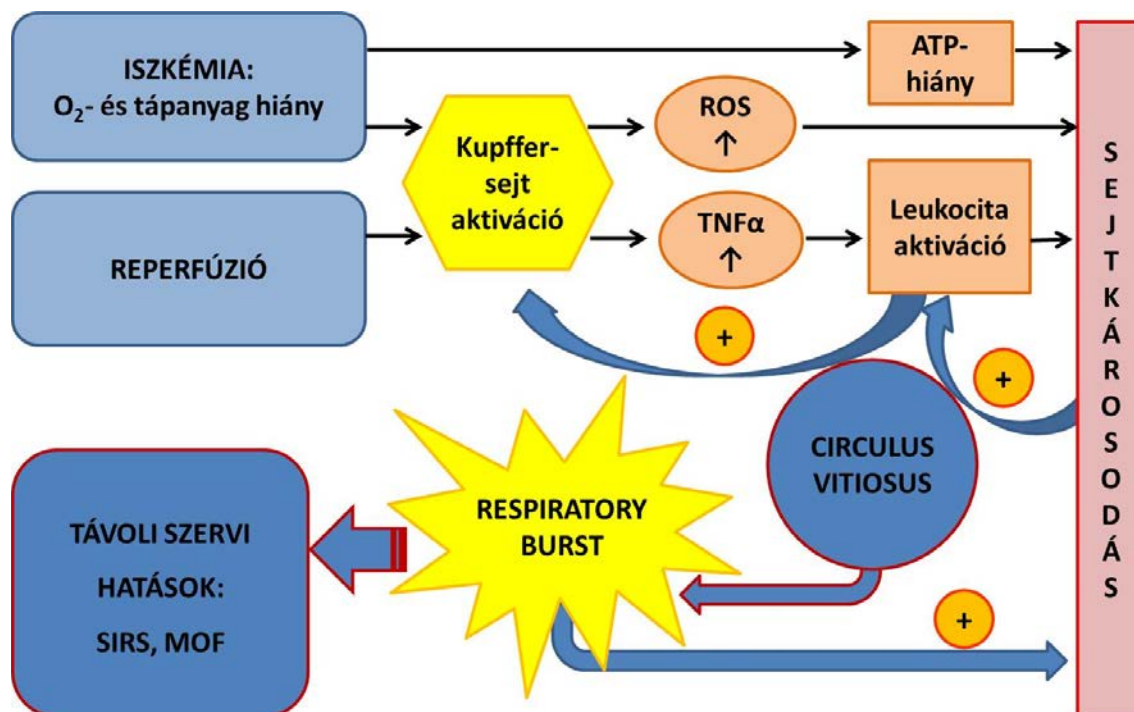
A problémakör jelentőségét tükrözi, hogy számos kísérletes munka foglalkozik az I-R károsodás mérséklésével – illetve a vele szembeni tolerancia növelésével. Példaként említhető a hipotermia,² az iszkémiás prekondicionálás,^{3,4} valamint posztkondicionálás,⁵ különböző farmakológiai módszerek,⁶ továbbá a genetikai moduláció,⁷ illetve az átmeneti gépi perfúzió.⁸ A klinikai gyakorlatban egyelőre csak kevés módszer került kipróbálásra, ezért az evidenciákon alapuló ajánlások megszületéséig hosszú út áll még előttünk.⁹ Mindezen kísérletes eredményeknek köszönhetően, egyre részletesebb kép alakul ki az I-R károsodás folyamatáról, mely új intervenciós technikák – kiváltképp farmakológiai módszerek – kipróbálásának nyit utat. Ezek potenciális előnye a sebészi manőverekkel (úm. iszkémiás pre- és posztkondicionálás) szemben, hogy kevésbé invazívak, illetve olyan szituációban is alkalmazhatóak, amikor a májkapu ereinek manipulációja nem képezi a műtét szerves részét, így ezen manőver alkalmazása további rizikóforrást jelentene.

Az iszkémiás-reperfúziós károsodás kutatásában korszakalkotónak számít az iszkémiás prekondicionálás (IP) felismerése, melyet Murry és munkatársai publikáltak 1986-ban.¹⁰ Ez az egyszerű technika rövid iszkémiás-reperfúziós periódus(ok) pre-iszkémiás alkalmazását jelenti és az adott szerv iszkémiás toleranciájának növelésére képes. A szíven végzett első ígéretes eredmények számos kutatót motiváltak a módszerben rejlő potenciális lehetőségek megismerésére. Az IP hatásosnak bizonyult nem csak a szívizom, hanem a máj, a vese, a vázizom, a vékonybél, valamint a központi idegrendszer esetében is. A májsebészetben való alkalmazásának lehetőségeit az I. sz. Sebészeti Klinika kísérletes kutatócsoportja is kiterjedten vizsgálta.¹¹ Jelen Doktori értekezés anyaga szervesen kapcsolódik ezen korábbi munkákhoz, mintegy azok folytatását képezi. Az első fejezet összefoglalja a máj I-R károsodásának folyamatát, majd a mérséklését célzó fontosabb kezelési lehetőségek rövid ismertetését követően, a kísérletek során alkalmazott farmakológiai módszerekkel foglalkozik, melyek eredményei a dolgozat második felében kerülnek bemutatásra.

1.1. A máj iszkémiás-reperfúziós károsodása

A máj központi szerepet játszik a szervezet anyagcseréjében, valamint fontos helyet foglal el a kiválasztásban, a detoxikálásban és a bioszintézisben egyaránt. Mindezen nagy energiaigényű folyamatok zavartalan működéséhez folyamatos oxigénellátásra van szükség. Az átáramló vérmennyiség 25%-át szállító artéria hepatica fedezi az oxigénigény 50%-át, míg a szplachnikus terület vérét összegyűjtő véna portae jóval kisebb oxigéntartalmú vért szállít. A kettős vérellátás fiziológiás keringési viszonyok mellett fennálló kényes egyensúlya ellenére, a májszövet igen érzékeny minden hipoxiával, illetve perfúzióromlással járó állapottal szemben. Míg a véráramlás megszűnése (pl. érkirekesztés következtében) az egész érintett májszövet iszkémiáját vonja maga után, hypoperfúzió során jellemzően a májlobulusok pericentrális területei károsodnak.¹² Súlyos esetben iszkémiás májgyulladás alakulhat ki, melyet kiterjedt sejtelhalás és drámai szérum nekroenzimszint emelkedés kísér. A máj egyedülállóan jó regenerációs képessége ellenére bizonyos mértékű sejtvesztést már nem tud kompenzálni a proliferáció, májelégtelenség alakul ki. A kritikus akut károsodás küszöbe egyénenként különböző és függ a máj előzetes állapotától, az esetleges idült kompromittáló hatások következtében beszűkült regenerációs képességtől.

A szövetkárosodás kialakulása korai és késői fázisra osztható. A reperfúzió első 6 órájára tehető korai fázis a Kupffer-sejtek aktivációja, szabadgyök- és gyulladáscitokin termelése által jellemzett. A májszöveti redox homeosztázis gyorsan felborul, az oxidatív stressz hatására az energiatermelésükben károsodott máj- és a szinuszoidális endotélsejtekben súlyos ioneloszlási zavar lép fel és elégtelenné válik a szöveti mikrocirkuláció. A késői fázist a károsodott és aktivált sejtekből felszabaduló citokinek és kemokinek lokális koncentrációjának emelkedése vezeti be, melyet keringő leukociták szöveti infiltrációja követ. A kitapadó fehérvérsejtek képesek a lokális gyulladás kiterjedését sokszorosára növelni, mely adott esetben az egész szervezetet érintő, generalizált reakcióvá (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) válhat.¹³ A nagyszámú jelátviteli útból és molekuláris mechanizmusból álló komplex hálózat közös eredője lokálisan a súlyosan károsodott sejtek halála nekrozis, illetve apoptózis formájában.¹⁴ Súlyosságtól függően, klinikailag ilyenkor májenzim emelkedés, epeelfolyási zavar, szervi diszfunkció, illetve májelégtelenség is megjelenhet.¹⁵ A SIRS talaján másodlagosan távoli szervek is károsodnak és azok diszfunkciója, valamint elégtelensége (multiple organ failure, MOF) is színezheti a klinikai képet. (1. ábra)



1. ábra A máj iszkémiás-reperfúziós károsodásának legfontosabb elemei.

1.1.1. A definitív sejtkárosodás következményei

Az irreverzibilis károsodást szenvedett sejtek típusosan két úton semmisülhetnek meg. A sejtelhalás patológiás formája a nekrozis, mely tipikusan heveny anyagcserezavar, vagy toxikus hatás következtében jön létre és a sejtek duzzadásával, majd szétesésével jár. Az apoptózis ezzel szemben egy úgynevezett „halálprogram” véghezvitelét jelenti, a sejtek zsugorodásával jár, és nem engedi a sejtalkotók környezetbe jutását. Ily módon lehetővé teszi a károsodott sejtek célzott eltávolítását anélkül, hogy azok környezetüket is károsítanák gyulladással indukálása által. A sejthalál ezen két formáját sokáig két külön entitásnak tartották, de a közös kiváltó faktorok és jelátviteli utak alapján jelen felfogás szerint inkább egy kontinuum két szélső pontját képviselhetik.¹⁶ Így a nekrozis adott esetben tekinthető ATP-hiány következtében megszakadt apoptózissá, valamint a gyakorta nekrozist okozó hatást primeren túlélő, de irreverzibilisen károsodott sejtek apoptózissal pusztulnak el később. A károsító hatás fennállásának időtartama és annak súlyossága együtt határozzák meg a következményes sejthalál morfológiai megjelenését. Egy alternatív elképzelés egymástól független folyamatoknak tartja őket ugyan, melyek ugyanakkor közös kiváltó szignálokkal és jelátviteli utakkal (is) rendelkeznek.¹⁷ Bármelyik legyen is igaz, a máj patológiás folyamataiban apoptózis és nekrozis – illetve különböző kevert formáik – gyakran egyidejűleg vannak jelen.

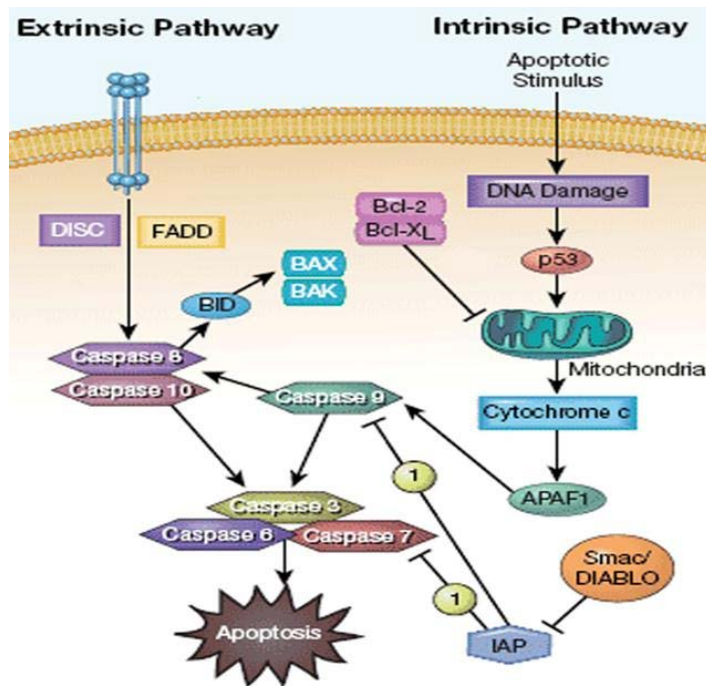
1.1.1.1. Nekrozis

A sejthalál ezen típusának jellemző morfológiai megjelenési formája a sejtduzzadás, mely közvetlenül visszavezethető az ATP-hiányos állapotra egyrészt ioneloszlási zavar létrehozása, másrészt a sejtvázas strukturális változásai következtében. Ez utóbbi a sejtmembrán kitüremkedését, úgynevezett „bleb”-ek képződését vonja maga után, az energiatermelés elégtelenné válását követő percekkel akár órákig terjedő időintervallumban. A sejtduzzadás kritikus pontján úgynevezett metastabil állapot alakul ki, melyre fokozott duzzadás és bleb-képződés jellemző gyors ionvándorlás, mitokondriális depolarizáció és a lizoszómák szétesése mellett. Ez közvetlenül megelőzi a sejt teljes szétesését a plazmamembrán valamely kitüremkedett területének ruptúrája következtében.¹⁸ Ilyenkor a membrán barrier funkciója végérvényesen megszűnik, enzimek és köztes anyagcseretermékek szabadon jutnak a környezetbe, illetve eltűnnek az iongrádiensek. A metastabil állapotra jellemző gyors sejtduzzadás létrehozásában

aspecifikus anioncsatornák megnyílásának tulajdonítanak szerepet, melyek glicinnel gátolhatóak.¹⁹ A reperfüzió első órájában a nekrozis a jellemző sejthalálforma, mivel az apoptózis egyaránt idő- és energiaigényes folyamat.

1.1.1.2. Apoptózis

Az összefüggő sejtcsoportokat érintő nekrozissal ellentétben, az apoptózis során az érintett sejt elkülönül a környezetétől és jellemzően inkább zsugorodik. Ezzel párhuzamosan létrejön a kromatinállomány kondenzációja, a sejtmag lobulációja, majd fragmentációja. Végül az egész sejt úgynevezett apoptotikus testekre „töredezik”, mely töredékeket a környező makrofágok bekebelezik és lebontják. Az apoptózis programját elindító jelzéseket két nagy csoportba sorolják attól függően, hogy hatásuk az intrinzik, (mitokondriális), vagy az extrinzik (halálreceptor) úton keresztül érvényesül.²⁰ Általuk létrejön egy cisztein-proteáz kaszkád, az úgynevezett kaszpáz enzimek aktivációja,



2. ábra Az apoptózis extrinzik és intrinzik útjának sematikus ábrázolása. (Forrás: Tátrai Miklós: Rektori Pályázat, 2008)

melyek további végső effektor enzimeket is aktiválva végül létrehozzák a típusos morfológiai képet. A sejt lebomlása szisztematikusan, mintegy láncreakció-szerű folyamattal megy végbe. A különböző DNázok hatására a DNS 180-200 bázispárból álló multimer szakaszokra fragmentálódik, míg a fehérjék degradációját a különböző proteázok végzik. A

transzglutaminázok

keresztkötéseket létesítenek a

fehérjék között és az így kialakuló stabil apoptotikus testekből nem jutnak immunizáló tulajdonságú makromolekulák a környezetbe. I-R károsodásban az apoptózis mind az extrinzik, mind az intrinzik úton keresztül aktiválódhat.²¹ (2. ábra)

1.1.1.3. A mitokondriumok döntő szerepe

A mitokondriumok az energiatermelésben és a programozott sejthalálban betöltött szerepüknek köszönhetően kulcsfontosságúak a sejtek túlélése szempontjából. Funkciójuk integritása alapvetően meghatározza a sejt életképességét, illetve irreverzibilis károsodás esetén a bekövetkező sejthalál formáját. A sejtek szintjén mintegy az I-R károsodás végső effektorai, ezért e helyen külön bemutatásra kerül a mitokondriális károsodás folyamata és annak következményei.

Feszültség függő nonspecifikus anion-csatornáinak köszönhetően, a mitokondriumok külső membránja 5 kDa-ig terjedő részecskék számára szabadon átjárható, míg a belső membránon keresztül zajló anyagforgalom fiziológias körülmények között szigorúan szabályozott: specifikus transzportereken és csatornákon keresztül valósul meg.

Az I-R károsodáson átesett sejtekben jellemzően megemelkedik az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, mely az ATP-hiányos környezetben a mitokondriális Ca^{2+} -uniporter megnyílása következtében, ezen sejtoranellumokra is áttevődik.²² A mitokondriális Ca^{2+} -koncentráció emelkedése, maga után vonja a transzmembrán-potenciál csökkenését, minek következtében az APT-szintáz működése megfordul, hogy az ATP hidrolízisével energiát biztosítson a membránba ágyazott különböző ionpumpák számára és a membránpotenciált fenntartsa.²³ A Ca^{2+} -terhelés egyrészt kedvez a proapoptotikus Bcl2-asszociált X- (BAX-) fehérje beépülésének a mitokondrium külső membránjába, illetve alapvetően befolyásolja a mitokondriális permeabilitási tranzíciós pórusok (MPTP, mitochondrial permeability transition pore, vagy MPT-csatornák) megnyílását és ezáltal a mitokondriumok duzzadását. Mindkét mechanizmus végső soron a citokróm-c citoplazmába jutásán keresztül az apoptózis intrinzik útját indukálja. A citokróm-c mellett, a külső membrán szakadásain keresztül, további apoptózist indukáló és gátló faktorok is a plazmába jutnak (pl. AIF: apoptosis inducing factor, prokaspázok, IAP: inhibitor of apoptosis protein).

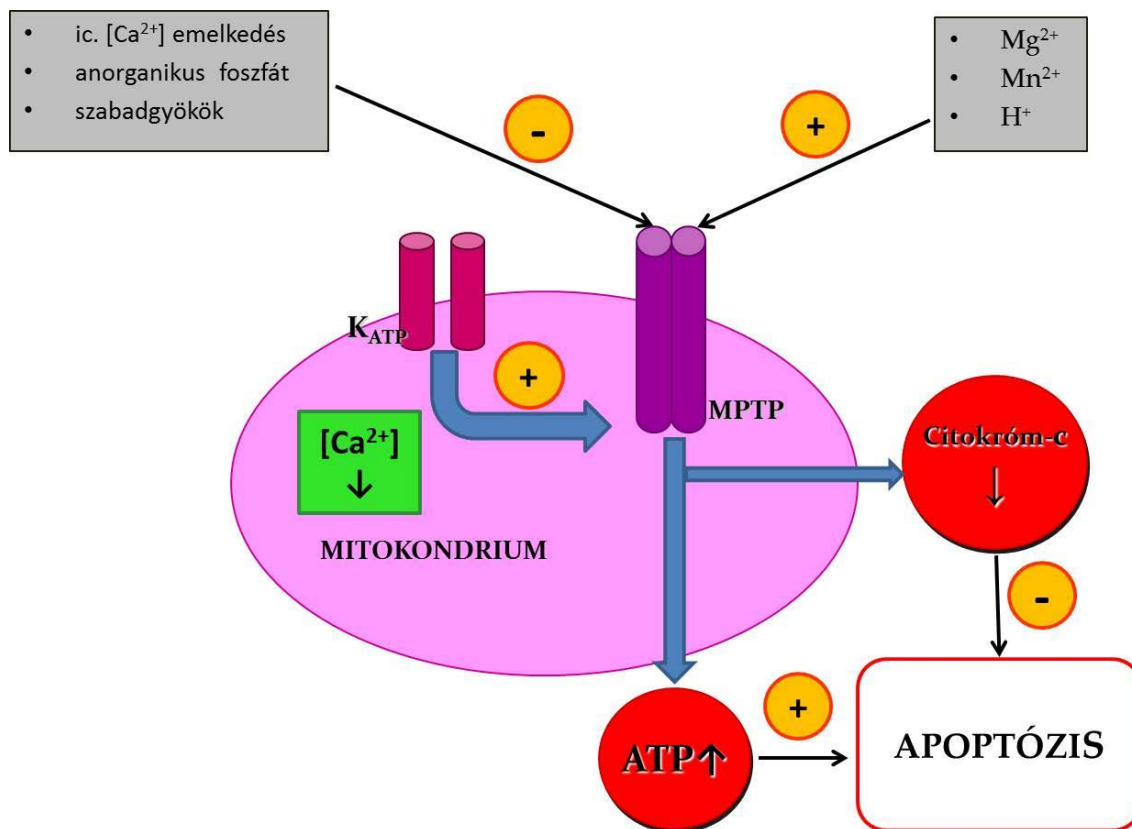
Az MPT-csatornák integráns membránfehérjékből szerveződnek, melyek az oxidatív stresszt következtében szabaddá váló, vagy keletkező hidrofil részeken keresztül létesítenek kapcsolatot és 1500 Da-ig terjedő oldott részecskék szabad áramlását teszik lehetővé a belső membránon keresztül.²⁴ Az MPTP fehérje összetétele nem állandó, hanem a hibás másodlagos szerkezetű fehérjék aktuális

hozzáférhetőségétől függ. Belső oldalukon csaperon-szerű fehérjék (pl. cyclinD) kapcsolódnak hozzájuk, melyek elsődlegesen zárva tartják őket. Mindaddig csak az intramitokondriális Ca^{2+} -koncentráció emelkedése következtében nyílnak meg, amíg számuk meg nem haladja a rendelkezésre álló csaperonok mennyiségét. Ezen kritikus szintet meghaladva szabadon megnyílhatnak és a mitokondriumok duzzadnak, mely a külső membrán integritásának megbomlását vonja maga után, továbbá az energiatermelés megszűnéséhez vezet az adott mitokondriumban.²⁵

Az MPTP-n keresztül számos molekula befolyásolja a mitokondriumok állapotát. Bivalens kationok, mint a Mg^{2+} , vagy a Mn^{2+} , a Ca^{2+} -mal ellentétben gátolják az MPTP megnyílását. Szintén gátló hatással bírnak a H^+ -ionok, míg az anorganikus foszfát a körülményektől függően gátolhatja, illetve meg is nyithatja a csatornát.²⁶ A szabadgyökök egyértelműen a csatornák nyitását vonják maguk után. A membrán depolarizációja következtében maga a károsodott mitokondrium is a reaktív oxigéngyök (ROS: reactive oxygen species) termelés forrásává válik és a felszabaduló szabadgyökök a környező mitokondriumokat is károsítják. Amennyiben kis mennyiségű károsodott mitokondrium van jelen egy sejtben, ezek autofagoszómákba kerülnek felvételre, majd a lizoszómákban lebomlanak. Nagyobb számú mitokondrium károsodása esetén apoptózis indukálódik a sejtben az intrinzik úton keresztül. Amennyiben az ehhez szükséges energia biztosításához sem elegendő a funkcióképes mitokondriumok száma, nekrozissal pusztul el a sejt.²⁷ Az MPT-csatornák számos májkárosító folyamat közös végső találkozási pontját képezik és meghatározóak a sejt túlélése, vagy halála, illetve a sejthalál formája szempontjából. Ezen szoros kapcsolat következtében, tipikusnak mondható a két sejthalálforma együttes megjelenése májkárosodás esetén.

A mitokondriális volumen-regulációban – és ezen keresztül a funkció szabályozásában – a K^+ _{ATP}-csatornák fontos szerepet töltenek be.²⁸ Gátlásukkal az iszkémiás prekondicionálás (IP) védő hatása felfüggeszthető, míg a csatornát nyitó vegyületek ezzel összhangban az IP-hez hasonlóan védelmet biztosítanak az I-R károsodással szemben. Három fő mechanizmust feltételeznek a mitokondriális K^+ _{ATP}-csatornák (mito- K^+ _{ATP}-csatornák) nyitása által létrehozott védelem hátterében, melyek mindegyike részt vesz a mitokondriális permeabilitási pórusok tartós nyitásának megakadályozásában, tehát a mitokondriumok integritásának megőrzésében és a sejt

kedvezőbb energetikai állapotának biztosításában. A K^+ -beáramlás a mitokondriális membrán depolarizációján keresztül csökkenti a Ca^{2+} -belépés elektromechanikai gradiensét – csökken a Ca^{2+} -túlterhelés. A mitokondriális mátrix mérsékelt duzzadását előidézve segítik a külső és belső membrán közti kapcsolódási helyek megtartását, tehát magtartott marad az elektron transzport. Az irreverzibilisen károsodott sejtek ilyen körülmények között nagyobb százalékban terelődnek apoptózis irányába és kisebb gyulladáshoz vezet az I-R károsodott szövetben. Amennyiben a mito- K^+ ATP-csatornák nyitása az I-R károsodást megelőzően következik be, mérsékelt ROS termelés jön létre, mely a protein-kináz C kaskád aktiválásán keresztül az endogén védelmi rendszer aktiválását, azaz prekondicionálást eredményez. Ezen mechanizmus kémiai indukciója az IP alternatívája lehet és a farmakológiai prekondicionálás egyik ígéretes támadási pontja.²⁹ (3. ábra)



3. ábra A mitokondriumok szerepe a sejthalálban.

A mitokondriális K^+ ATP-csatornák nyitása a Ca^{2+} -szint csökkentésén és a két membrán közti kapcsolat fenntartásán keresztül kedvez az MPTP-csatornák zárt állapotának. A kevésbé károsodott mitokondriumból csökken a citokró-m-c felszabadulása, valamint megtartottabb ez esetben az energiatermelés. Mindezek aránya határozza meg végső soron a sejt túlélését, vagy halálát, illetve a sejthalál formáját.

1.1.1.4. Endogén halálutak

A halál-receptorok minden eukarióta sejtben expresszáldó, a tumor nekrozis faktor receptorok szupercsaládjába tartozó transzmembrán glikoproteinek, melyek homotriméreké szerveződnek a sejtmembránban. Ligandjaik ugyanakkor csak olyan sejtekben expresszáldódnak (pl. leukociták), melyeknek feladata az apoptózis extrinzik útjának elindítása károsodott sejtek felismerése esetén. Az I-R során a folyamat patológiássá válik, mivel egyre nagyobb számban aktiválódó fehérvérsejtből jelentős mennyiségű halálligand szabadul fel, mely immár nem célzottan irányul a károsodott sejtek ellen, ezért kiterjedt szövetkárosító hatással bír.³⁰

A májban fontos szerepet játszik többek között a tumor nekrozis faktor receptor-1 (TNFR1), a Fas (CD95/Apo-1), valamint a TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) receptor-1 és -2. Az intracelluláris haláldomént tartalmazó „valódi” halál-receptorok mellett vannak haláldomént nem tartalmazó formák (TRAIL-R3, TRAIL-R4), melyek csökkentik az apoptózist indukáló stimulus erősségét és a folyamat fimon hangolását szolgálják. Ligandjukat megkötve, a halál-receptorok oligomerizálódnak, aktiválódnak és adaptor fehérjéken keresztül az aktív iniciátor kaspáz-8 kialakulását teszik lehetővé inaktív előalakjából. Bizonyos sejtekben a kaspáz-8 aktivitása elegendő az effektor kaspáz-3 közvetlen aktivációjához, mely az apoptózis elkötelező lépése. Az extrinzik út ezen direkt formája, az úgynevezett I-es típusú sejtekre jellemző.³¹

A májsejtekben (II-es típusú sejtek) a kaspáz-3 aktivációjának egy közvetett útja dominál, ahol a mitokondriális út aktiválódására is szükség van. Ilyenkor a kaspáz-8 a Bid fehérje hasításával annak mitokondriumba transzlokálódni képes formáját hozza létre, mely segíti az MPTP kialakulását. Ha a károsodás következtében adottak az MPTP nyitás feltételei, a duzzadó mitokondriumok membránközi teréből citokróm-c válik szabaddá, mely az Apaf-1-hez kapcsolódva aktiválja az apoptozómákat. Ezek ATP jelenlétében képesek az intrinzik út iniciátor kaspáza, a kaspáz-9 proteolitikus aktivációjára, amely szintén a kaspáz-3 aktiválására képes.³²

A TNFR1 valamelyest különbözik a Fas-tól és a TRAIL-től azáltal, hogy először a nukleáris faktor kappa-B (NFκ-B) és a c-Jun N-terminális kinázok (JNK) aktiválást végzi. Csak ezt követően kerülhet a sejt belsejébe, ahol a többi halál-receptorhoz hasonlóan indukál apoptózist.³³ Iszkémia alatt a kaspáz-3 aktivációját gátló XAIP (X-

linked inhibitor of apoptosis protein) koncentrációja folyamatosan csökken, így a sejtek egyre esendőbbé válnak a proapoptotikus – különösen a reperfúzió késői szakaszát meghatározó gyulladásoz – folyamatokkal szemben. Minél alacsonyabb koncentrációban van jelen az XAIP a reperfúzió kezdetén, annál kifejezettebb a citokróm-c függő kaszpáz aktiváció is ebben a szakaszban. TNF- α jelenlétében, az extrinzik út indukciója miatt könnyen a kaszpáz-kaszád aktivációja kerül túlsúlyba.³⁴

1.1.2. A sejtkárosodás patomechanizmusa

A máj I-R károsodásának korai fázisában jelennek meg az iszkémia és az ezt követő reperfúzió közvetlen sejtszintű következményei, míg a késői fázisban az immunrendszer aktiválódása válik meghatározóvá. A két fázis alapvetően egymásra épül és szoros kapcsolatban áll egymással a már korán aktiválódó rezidens szöveti makrofágokon, valamint a szabadgyökökön keresztül.³⁵

1.1.2.1. Reperfúziós pH-paradoxon

Az iszkémia során a sejtek idővel irreverzibilis károsodást szenvednek az oxidatív foszforiláció hiányából eredő elégtelen ATP-termelés következtében. Az anaerob anyagcsere során kialakuló szöveti acidózis ugyanakkor, akár órákkal is képes késleltetni a nekrozis kialakulását az MPTP nyitás akadályozásán keresztül. Reperfúziót követően a pH viszonylag gyorsan normalizálódik és megszűnik az acidózis védőhatása. Így a reperfúzió paradox módon a sejthalál elindítója – még ha nem is okozója.³⁶ Az intracelluláris pH emelését szolgáló Na⁺/H⁺-antiporter és Na⁺/HCO₃⁻-kotranszporter gátlása egyaránt véd a sejtkárosodással szemben. Az acidózis elhúzódó jelenléte mellett, az intracelluláris Na⁺-koncentráció emelkedésének megakadályozása a citoprotektív hatás szintén igen fontos eleme. Erre utal az is, hogy az iszkémiás prekondicionálás védőhatásának egyik elemeként a vakuoláris H⁺-ATPáz aktiválódik, mely csökkenti ugyan az intracelluláris H⁺-koncentrációt, viszont mérsékli a sejt Na⁺-felvételét is az előbb említett kompenzáló mechanizmusok aktivitásának visszaszorítása által.³⁷

Az iszkémiás posztkondicionálás ezzel szemben pontosan a pH emelkedés késleltetésén keresztül fejt ki protektív hatást.³⁸ A H⁺-ionok az MPTP fehérjéinek hisztidil láncvégeihez kapcsolódnak reverzibilis módon, ami gátolja a csatornanyitást. A károsodás enyhítésében emellett az intracelluláris Na⁺-koncentráció elmékedésének

visszaszorítása is szerepet játszik. Az intracelluláris Na^+ -koncentráció emelkedés és a sejthalál kapcsolata elfogadott ugyan, de a pontos mechanizmus nem kellően tisztázott.

1.1.2.2. Felborult Ca^{2+} -homeosztázis

A Na^+ - és H^+ -ionok megváltozott intracelluláris koncentrációja mellett az Ca^{2+} sejten belüli felszaporodása szintén kiemelkedően fontos szerepet játszik a sejtkárosodás kialakulásában. A Ca^{2+} alapvetően három kompartmentben: a citoplazmában, a mitokondriumokban és az endoplazmás retikulumban (ER) oszlik meg a sejtekben. Az egyes kompartmentek közti koncentrációkülönbségek szabályozása és fenntartása különböző Ca^{2+} -csatornákon keresztül történik, melyek fiziológias működése I-R következtében zavart szenved.

A citoplazmatikus Ca^{2+} -koncentráció emelkedése egyrészt az extracelluláris Ca^{2+} fokozott felvétele, másrészt az ER-ből történő fokozott Ca^{2+} -kibocsátás következtében jön létre. Az előbbi a plazmamembrán non-szelektív kationcsatornáit, az úgynevezett transziens receptor potenciál (TRP) csatornákon keresztül valósul meg, az utóbbi hátterében az ER membránjában található ryanodin-receptorok ROS általi aktivációja áll. Az ER Ca^{2+} -koncentrációjának csökkenése továbbá, úgynevezett store operated Ca^{2+} -csatornákat (SOC) nyit meg a plazmamembránban, mely tovább fokozza a Ca^{2+} -beáramlást.³⁹ Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt tovább emeli, hogy a csökkentés irányába ható plazmamembrán és ER Ca^{2+} -ATPáz működése az I-R károsodott sejtekben – különösképpen transzplantációs hideg iszkémia után – a károsodott ATP-termelés következtében elégtelenné válik.⁴⁰

A magas intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, eddig nem pontosan tisztázott módon – az aktiváló és gátló szignálok előbbi irányába való eltolódásán keresztül – a mitokondriális Ca^{2+} -uniporter megnyílásához vezet. Ezáltal a Ca^{2+} -koncentráció emelkedése a mitokondriumokra is áttevődik, csökkenti azok membránpotenciálját, melynek helyreállítása érdekében energiaigényes iontranszporterek lépnek működésbe, ami további ATP-t von el a sejtől. A károsodott mitokondriumokban MPT-csatornák szerveződnek és a korábban említett módon sejthalál elindítóivá válhatnak.⁴¹

1.1.2.3. Szabadgyökök és az oxidatív stressz

Már mindössze néhány perces reperfüziót követően mérhető különböző reaktív oxigén vegyületek (ROS), úgymint szuperoxid anionok (O_2^-), hidrogénperoxid (H_2O_2),

hypoklórsav (HClO), valamint hidroxilgyökök (OH[•]) lokális koncentrációjának emelkedése. Forrásuk a reperfúzió korai időszakában a májsejtekben található xantin-oxidáz, a mitokondriális légzési lánc, valamint a Kupffer-sejtekben és a sinusoidális endotélsejtekben található nikotinamid adenin dinukleotid-fosztát (NADPH)-oxidáz.⁴²

A fiziológias körülmények között vazóaktív mediátor szerepét betöltő nitrogén-monoxid (NO), a gyulladáshoz vezető mediátorok hatására indukálódó nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) működése következtében, később szintén toxikus koncentrációt érhet el a szövetben. Szuperoxiddal és molekuláris oxigénnel reagálva nitrózatív gyökök (nitrogén-dioxid: NO₂, dinitrogén-trioxid: N₂O₃, peroxinitrit: ONOO⁻) forrásává válik, melyek makromolekulák további károsodását idézik elő.⁴³

Az oxidatív stressz a reperfúziós károsodás egyik központi eleme, a májszövet valamennyi sejt típusát károsítja és különböző mértékben további szabadgyök termelés forrásává teszi, valamint több útvonalon keresztül is sejthalált indukálhat. A ROS kiterjedten károsítja a plazmamembrán, a sejtmag és a különböző sejtorganellek membránjának lipidmolekuláit, mely strukturális károsodás kedvez az ioneloszlási zavar kialakulásának. Károsodnak továbbá a különböző enzimfehérjék, köztük a légzési lánc enzimek és a proteázok gátlásáért felelős antiproteáz aktivitású molekulák. Az előbbi elégtelen ATP-termeléshez, míg az utóbbi kontrollálatlan fehérjebontáshoz vezet. A sejtmagba jutva az örökítőanyag oxidatív károsodását is előidézik, így a további fehérjés szintézis lehetősége is korlátozottá válik.⁴¹

Egy kritikus szintet elérő szabadgyök terhelés hatására, a környező mitokondriumokban megnyílik a belső membrán anion csatornája, valamint az MPTP, mely a légzési lánc szétkapcsolódása következtében további mitokondriális ROS-termeléshez vezet. Ezen mechanizmuson keresztül a ROS-képződés öngerjesztő folyamata jön létre, mely a sejtet energetikai krízisbe is sodorja. Az oxidatív stressz hatására különböző redox-szenzitív transzkripciós faktorok is indukálódnak. Az NF-κB a gyulladáshoz vezető válaszcéljában játszik fontos szerepet különböző citokinek (TNF-α), gyulladáshoz vezető mediátorok és enzimek transzkripciójának fokozása által. Az AP-1 (activating protein-1) az említett mitokondriális károsodás mellett szintén apoptózist indukál az intrinzik úton keresztül.⁴⁴

1.1.2.4. Mikrocirkulációs károsodás

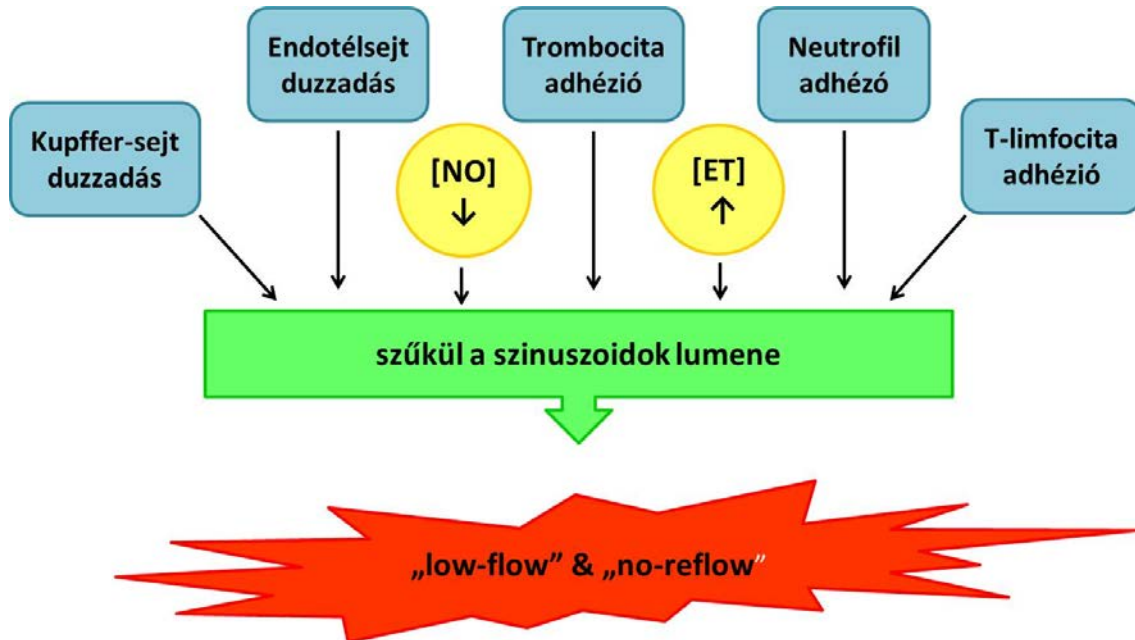
A reperfúzió kezdetén megjelenő mikrocirkulációs elégtelenség mértéke meghatározó az I-R károsodás végső kiterjedése szempontjából, ezért a kialakulásában szerepet játszó mechanizmusok e helyen külön kerülnek bemutatásra. Az iszkémia során jellemző anaerob anyagcsere következtében, számottevően csökken mind a parenchimális, mind a nem-parenchimális sejtek ATP-termelése. Következésképpen a plazmamembrán ATP-szenzitív Na^+/K^+ -pumpájának funkciója károsodik, mely az intracelluláris Na^+ -koncentráció emelkedésén keresztül a sejtek duzzadásához vezet. Ennek következtében a szinuszoidok lumene beszűkül, mely a későbbiekben a mikrocirkuláció helyreállítását késleltető mechanikai akadállyá válik.⁴⁵

A reperfúzió kezdetén a ROS koncentrációjának emelkedésével párhuzamosan a NO koncentrációja a szinuszoidális endotélsejtekben található konstitutív NO-szintáz (eNOS) elégtelen működése következtében csökken. Ezáltal hiányt szenved egy lényeges vazodilatátor hatás, mely ellensúlyozhatná a szinuszoidok átmérőjét csökkentő mechanizmusokat.⁴⁶ A NO-t, mint szignálmolekulát számos tanulmány vizsgálta. Ismert, hogy vazodilatátor hatásának köszönhetően növeli a szinuszoidok lumenének átmérőjét és a jobb oxigénellátás biztosításán keresztül közvetetten fokozza a májsejtek ATP-termelését. Az jobb energetikai állapotban lévő szövetben csökken a sejtkárosodás mértéke és másodlagosan a gyulladáshoz vezető sejtes beszűródés is. A NO termelésében szerepet játszó NOS izoformák pontos szerepe mindazonáltal nem teljesen tisztázott. Míg az endotélsejtekben konstitutív formában jelen lévő eNOS-ról elmondható, hogy a reperfúzió kezdetén megtartott(abb) működése képes az I-R károsodás mérséklésére, az indukálható forma szerepe már sokkal kérdésesebb. A reperfúzió késői fázisában részben protektív szerepet is tulajdonítanak neki, de korai gyulladáshoz vezető gének között expresszállódva a fokozott NO-termelésen keresztül az oxidatív-nitrozatív stressz súlyosbodását idézi elő.⁴⁷

A sejtduzzadás és az alacsony korai NO-koncentráció mellett, a reperfúzió kezdetén manifesztálódó áramlási akadály harmadik eleme a vazokonstriktor hatású endothelin (ET) és tromboxán- A_2 molekulák koncentrációjának emelkedése.⁴⁸

A reperfúzió során továbbá jelentősen fokozódik a trombociták kitapadása. A neutrofil granulociták kezdetben a mechanikus akadály következtében akadnak meg a szinuszoidokban, majd adhéziós molekulákon keresztül is kapcsolatot létesítenek az

endotélsejtekkel (lásd alább). A sejtes elemekből képződő „dugók” helyenként teljes áramlási akadályt képeznek, tovább késleltetve a reperfúziót és súlyosbítva a szöveti hipoxiát. A jelenség „no-reflow”-ként vált ismertté az irodalomban.⁴⁹ (4. ábra)



4. ábra A reperfúziós mikrocirkulációs károsodást létrehozó legfontosabb tényezők.
(NO: nitrogén monoxid, ET: endotelin)

1.1.2.5. Molekuláris „vészjelző” rendszer

A molekuláris vészjelző rendszer több jelátviteli út komplex hálózata, mely széteső, vagy stressz hatásnak kitett sejtekből felszabaduló molekulák következtében aktiválódik, független magától az immunrendszertől, de fontos szerepet játszik annak kezdeti aktivációjában bármely károsodott szövetben. Az I-R következtében hamar hozzáférhetővé válnak különböző struktúrálisan jelenlévő intra- és extracelluláris „vészjelző” molekulák (danger-associated molecular patterns, DAMPs). Példaként említhető a high mobility group box-1 (HMGB-1) nukleáris transzkripciós faktor, az S100 citoplazmatikus Ca^{2+} -szabályozó fehérje, az ATP, különböző DNS-fragmentek, vagy a hialuronsav.⁵⁰

Mindezeket egy specifikus receptor család molekulái (pattern recognition receptors, PRRs) kötik meg intra-, vagy extracellulárisan, melyek minden emlős sejtben megtalálhatók. A májsejtek ugyanakkor nem ezeken a receptorokon keresztül szenvednek direkt károsodást, hanem a DAMP által aktivált nem-parenchimális sejtekből felszabaduló gyulladáshoz vezető mediátorok következtében.²¹ A májszövet I-R károsodásában két receptor típus, a TLR (toll-like receptorok) és a RAGE (receptor for

advanced glycation end products) bír kiemelkedő jelentőséggel. A TLR-4 – és újabb ismeretek szerint a TLR-9 – fontos kapcsolódási pontot jelent a májkárosodás és az immunrendszer aktivációja között.

A Kupffer-sejtek és dendritikus sejtek felszínén is megtalálható TLR-4 különböző intracelluláris adaptor molekulákhoz kapcsolódhat. Attól függően, hogy egy adott sejttípusban melyik jelátviteli út áll rendelkezésre, fokozhatja gyulladásoos citokinek, kemokinek és a szabadgyökök termelését (pl. Kupffer-sejtekben), vagy serkentheti a leukociták vándorlását segítő IP-10 megjelenését (pl. endotélsejtek). Az előbbi útvonalban szerepet kap a gyulladásoos citokinek jeltovábbítását is biztosító transzkripciós faktorok (NF- κ B, AP-1, STAT) és kináz-kaszkádoók (MAPK, p38, JNK, ERK) aktivációja. Hogy pontosan mely szignáltranszdukcioos kaszkádoók indukálódnak egy adott receptor ligandkötése következtében, részben attól is függ, hogy milyen mechanizmussal jött létre az I-R károsodás (közvetlen érkirekesztés, vagy low-flow állapot).²¹ A kemoattraktáns tulajdonságú IP-10 szintén képes az ERK aktiválására, így kapcsolatot létesít a két jelátviteli rendszer között.⁵¹

A legjobban ismert DAMP a májszövet minden magvas sejtjében expresszálódoó HMGB-1, mely nekrozis és apoptozis során szabadul fel a károsodott sejtekből. A RAGE-hez is kötödoe, a JNK-t és más kinázokat is érintő jelátviteli kaszkádoót indít el, mely az early growth response-1 transzkripciós faktor indukciójához vezet. Ennek következtében számos géncsalád átírása fokozódoik, melyek a gyulladásoos sejtek szöveti migrációjában játszanak szerepet. A RAGE főleg a dendritikus sejtek felszínén van jelen és csak kisebb arányban található a Kupffer-sejtek felszínén,⁵² ami az előbbieik fontos, ám ezidáig tisztázatlan szerepére utal a májszövet I-R károsodása során.

1.1.2.6. Sejtes interakciók és gyulladásoos válasz

A májsejtek és a szinuszoidális endotélsejtek további károsodását az iszkémia és a reperfüzió kezdeti hatásai által indukált és később öngerjesztő folyamatként egyre erősödoó steril gyulladásoos reakció idézi elő, melyben az immunrendszer celluláris és humorális faktorai egyaránt részt vesznek. A kezdeti sejtkárosodás mértékétől függően, a folyamat magában hordozza távoli szervek károsodásának veszélyét is, szisztémás gyulladásoos válaszreakció (SIRS) formájában. A lokális gyulladásoos válasz első lépéseiben a májszövet rezidens makrofágjai, a Kupffer-sejtek játszanak kiemelkedően fontos szerepet.⁵³

A Kupffer-sejtek részben már az iszkémia során aktiválódnak, majd a reperfúzió kezdetén megjelenő szabadgyökök által nem csak károsodnak, hanem aktivitásuk is tovább fokozódik. Ennek következtében maguk is szabadgyökök, illetve gyulladásozó citokin (TNF- α , IL1- β) termelésbe kezdenek, így a környező sejtek további aktivációja és károsítása által egy öngerjesztő folyamatot tartanak fenn, illetve immunválaszt indukálnak. Hatásukra a májsejtek és a szinuszoidális endotélsejtek ROS termelése fokozódik, illetve nagy számban expresszálnak adhéziós molekulákat, melyek a membránban megjelenve a fehérvérsejtek célpontjává teszik őket.⁵⁴

A felszíni adhéziós molekulák közül kiemelt jelentőséggel bír az ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) és a VCAM-1 (vascular adhesion molecule-1), melyek megteremtik a neutrofil granulociták későbbi szöveti migrációjának feltételét. Kezdetben a gyulladásozó mediátorok által odavonzott, szintén adhéziós molekulákat (L-szelektin, β_2 -integrin) expresszáló aktivált neutrofilek inkább az ödémás endotélsejtek és kitapadó trombociták által képzett mechanikai akadály következtében akadnak meg a szinuszoidokban. A károsodott szöveti sejtekből felszabaduló kemokinek hatására kilépnek az érpályából és a parenchimába migrálnak. Eközben a NADPH-oxidáz indukciója következtében ROS-termelésük jelentősen fokozódik, valamint degranuláció útján destruktív enzimeket is felszabadítanak, az extracelluláris mátrix és a környező májsejtek további károsodását idézve elő ezáltal.⁴⁷

Az I-R késői fázisában az odavándorló aktivált neutrofilek a szöveti destrukció fenntartói és propagációjának okozói. Őket megelőzi a T-limfociták (CD4+, és natural killer sejtek, NK) szintén gyulladásozó mediátorok és az extracelluláris mátrix szabaddá váló elemei által bekövetkező szöveti migrációja, mely már a reperfúzió első órájában létrejön. A CD4+ limfocitákból felszabaduló interferon- γ (IFN- γ) további Kupffer-sejt és májsejt aktivációt von maga után, így a gyulladásozó válasz felerősítésének fontos eleme. Továbbá az IL-17 termelésen keresztül közvetlenül is elősegítik a neutrofil granulociták szöveti migrációját. Az említett kemokinek részt vesznek az NK-sejtek (természetes öló T-sejtek) aktiválásában is, melyek direkt módon képesek a májszövet további károsítására, valamint IFN- γ -n keresztül az öngerjesztő folyamat pozitív visszacsatolásához is hozzájárulnak.⁵⁵

A kölcsönös aktivációs lánc eredőjeként a májsejtek és a szinuszoidális endotélsejtek kiterjedt károsodása jön létre. A károsodott májsejtekből felszabaduló

mediátorok hatására az immunrendszer humorális effektor kaszkádja, a komplement rendszer is aktiválódik. Ezt követően részt vesz a Kupffer-sejtek és a neutrofil granulociták további aktiválásában, valamint a májsejtek plazmamembránjában az úgynevezett membrane attack komplex szerveződését segíti, mely direkt sejtlízist indukál.⁵⁶ Lokális hatásain túlmenően, a komplement rendszer távoli szervek (pl. tüdő, vékonybél) másodlagos károsodásának mediálásában is részt vesz.⁵⁷

A sejtek közti kommunikációban és a gyulladásos válasz szabályozásában szerepet játszó másik humorális rendszer a jelátvivő funkcióval rendelkező citokin kaszkád. Parakrin és endokrin hatással egyaránt rendelkező pro- és antiinflammatorikus tulajdonságú molekulákat tartalmaz, melyek mindenkori aránya a gyulladásos folyamat komplex szabályozását teszi lehetővé. Az I-R károsodás mediálásában szerepet kapó összes citokin bemutatása egyértelműen meghaladja ezen dolgozat kereteit, ezért a következőkben csak néhány elem kerül említésre.

A TNF- α az I-R károsodás egyik legfontosabb szignálmolekulája, melynek fő forrásai az aktivált Kupffer-sejtek. Számos más citokin fejt ki hatását azáltal, hogy a TNF- α termelését serkenti, vagy mérsékli. A májsejtek felszínén specifikus receptoraihoz (TNF-R család tagjai) kötődik, melyek a halálreceptorok közé tartoznak és a korábban bemutatott módon az apoptózis extrinzik útjának aktiválására képesek. A TNF-R ugyanakkor speciális helyet foglalnak el a halálreceptorok között, mivel az apoptózison kívül komplex módon modulálják a májsejtek génexpresszióját és megteremtik a direkt sejt-károsodás lehetőségét is.⁴⁴ A TNF-R által aktivált jelátviteli utak között szerepel az NF- κ B, a MAPK- és a JNK-kaszkád. Ezek valamelyikének modulálásán keresztül fejt ki hatását a többi gyulladásos citokin is a sejtek fehérjeszintézisére. A szabályozott gének között szerepelnek különböző transzkripciósfaktorok, hősokk fehérjék, az AP-1 és STATs molekulák, antioxidáns molekulák (SOD, glutation), gyulladásos enzimek (pl. COX-2, iNOS, HO-1), adhéziós molekulák (ICAM-1, E-szelektin), antiapoptotikus fehérjék (Bcl-2, Bcl-x), valamint további szignálmolekulák.²¹

Az I-R károsodás által indukált gyulladásos lánreakció végigterjed az egész sejten és több ponton magában hordozza a pozitív visszacsatolás lehetőségét. A proinflammatorikus citokinek a komplement rendszerhez hasonlóan az érpályába jutva távoli szervekben is képesek másodlagos károsodás indukálására.

1.1.3. Távoli szervi hatások

A reperfüzió végzetes következménye lehet a kezdeti iszkémia által nem érintett távoli szervek másodlagos károsodása. Vékonybél,⁵⁸ máj⁵⁹ és vázizom⁶⁰ I-R-károsodása következtében egyaránt kialakulhat SIRS (systemic inflammatory response syndrome), ami többszervi diszfunkcióhoz (MODS, multi organ dysfunction syndrome), majd elégtelenséghez (MOF, multi organ failure) vezethet, mely számos egyéb károsító hatás végső állomása is lehet.

Ezekben a kórképekben a vitális szervek perfúzióját fenntartó keringési adaptációs válasz jelenti a közös nevezőt. Ilyenkor a szplachnikus területen létrejövő vazokonstriktió és relatív mezenteriális iszkémia árán rendeződik át a keringés. A súlyos szplachnikus iszkémia következtében, a bélrendszer nyálkahártya barrierje elégtelenné válik, megteremtve az alapot a SIRS kialakulásához. A mukóza integritásának megbomlásához már rövid iszkémiás periódusok is elegendőek. Ilyenkor bakteriális transzlokáció következik be, minek következtében a mezenteriális nyirokcsomók és a véna porté vére egyaránt lipopoliszacharidokkal, valamint bélflórával kontaminálódik és aktiválódnak a bélrendszeri makrofágok.⁶¹ A bélrendszeri makrofágokat stimulálhatják olyan mediátorok is, melyek más szervek I-R károsodása során kerülnek a keringésbe. Aktiválásukat követően nagy mennyiségben szabadítanak fel gyulladáscitokineket (pl.: TNF- α), melyek ekkora koncentrációban gyakorlatilag bármely szervben képesek az endotél sejtek adhéziós képességének fokozására. A vékonybél ílymódon mintegy a „MOF motorjává” válhat, amikor az elsődlegesen károsodott szervből felszabaduló gyulladáscitokinek mennyiségének sokszorosát juttatja a keringésbe.⁶² Ilyenkor a keringő fehérvérsejtek is aktiválódhatnak és hatásaik szisztémásan is érvényesülnek.

A SIRS elméletileg bármely szerv károsodásához vezethet a fenti mechanizmus alapján. A legérzékenyebb ezekre a hatásokra a tüdő, ezért az első 24-72 órában általában légzési elégtelenség alakul ki. A tüdőkárosodás mértéke az enyhe diszfunkciótól az akut légzési elégtelenségig (ARDS) terjedő skálán bármilyen súlyosságú lehet. A károsodás meghatározó eleme a kisért permeabilitás fokozódása, ami neutrofil granulocitákban gazdag alveoláris folyadék kialakulásához vezet.⁶³ Progresszió esetén a légzési elégtelenséget máj-, vese- és emésztőrendszeri-működési zavar, illetve elégtelenség követi, majd a központi idegrendszer is érintetté válhat,

valamint szívelégtelenség alakulhat ki. Ilyenkor az alvadási kaszkád és az immunrendszer funkciója is károsodik, minek eredményeképpen disszeminált intravaszkuláris koaguláció (DIC), trombózis és immundeficiencia is társul a MOF-hoz.

A vékonybél-asszociált immunrendszer közvetítő szerepe mellett, az I-R károsodás súlyosságától, kiterjedésétől, illetve az érintett szerv immunogenitásától függő mértékben, a lokálisan felszabaduló mediátorok is szerepet játszanak a távoli szervi diszfunkció létrehozásában. Máj esetében ez a mechanizmus az elsődleges, a mezenterialis immunrendszer inkább a szisztémás károsodás súlyosításában válhat jelentőssé. Az I-R károsodás szisztémás hatásainak mediálásában számos faktor játszik közre. A SIRS során a keringésbe kerülő gyulladáscitokinek általánosan hoznak létre fehérvérsejt aktivációt és adhéziót, valamint vaszkuláris diszfunkciót.

Állatkísérletek és emberi mérések alapján is, a TNF- α -t tartják az egyik központi jelátvivő molekulának ebben a folyamatban.⁶⁴ Kísérletes eredmények és klinikai megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a trombocita aktiváló faktor (PAF: platelet activating factor) is fontos endogén mediátora a MODS során kialakuló szervi diszfunkcióknak:⁶⁵ hozzájárul a neutrofilek aktivációjához és adhéziójához, fontos szerepet játszik az endotélsejt aktiváció és a trombocita aggregáció kialakulásában a mikrocirkuláció területén, közvetítő szerepet tölt be a miokardiális depresszió kialakulásában és fokozza a gyulladáscitokinek (pl.: TNF- α) termelődését. Szintén mediátor szerepet töltenek be a károsodott sejtekből felszabaduló „vészjelző” molekulák (DAMPs), melyek a gyulladáscitokinek általános termelésében és az elsődlegesen károsodott szervtől távol eső szövetekben apoptózis indukálásában egyaránt szerepet játszhatnak.⁶⁶

A lokális oxidatív stressz egy bizonyos mértéket meghaladva, szisztémás károsító hatásokkal is bír. Máj I-R károsodását követően a xantin-oxidáz keringésbe jutása is további alapot teremt a szabadgyökök távoli szervekben való termelődésének.⁶⁰ A keringő xantin-oxidáz képes az endotélsejtek glukóz-amino-glikán molekuláihoz kitapadni, miáltal plazma-féléletideje, valamint toxicitása is megnő. A mikrocirkulációs károsodással kapcsolatban említett NO/ET aránytalanság, illetve a NO relatív hiánya, távoli szervek károsodásának kialakulásában is szerepet kap. NO-donor vegyületek adásával csökkenthető a humorális gyulladáscitokinek mennyisége, enyhül az endotél diszfunkció, csökken a leukocita adhézió és a ROS-termelés mértéke.⁶⁷ Az

iszkémiás szövetrel kapcsolatba került és aktivált fehérvérsejtek a reperfúzió során újra beléphetnek a szisztémás keringésbe. Távoli szervekben való kitapadásukat segíti a gyulladáshoz vezető mediátorok következtében az általánosan fokozódó ICAM-1 és VCAM-1 expresszió. A fent említettek alapján később a keringő fehérvérsejtek másodlagos aktiválódása is súlyosbítja a szisztémás károsodást. A humorális immunválasz részeként indukálódó komplement rendszer elemei szintén hamar eljuthatnak bármely távoli szervbe a reperfúzió során, ahol direkt és másodlagos sejtkárosodás létrehozásában egyaránt részt vesznek.⁵⁷ A gyulladáshoz vezető válasz tehát egy kritikus mértéket meghaladva az egész szervezeten végigterjedhet.

1.2. Az I-R károsodás mérséklésének lehetőségei

Az iszkémiás-reperfúziós károsodás mérséklésére két alapgondolatában eltérő stratégia létezik: az egyik a károsodás direkt csökkentését célozza meg különböző támadási pontokon a reperfúzió során, míg a másik az iszkémiával szembeni tolerancia fokozására törekszik a sejtekben kódolt endogén védelmi mechanizmus indukálása által. A különböző technikák kombinálási lehetőségeit illetően egyelőre nagyon kevés tapasztalat áll rendelkezésre. Az I-R patomechanizmusának összetettségéből adódik, hogy a „kezelés” illetve a „megelőzés” nem minden esetben különíthető el élesen egymástól. A következőkben mégis a két megközelítési stratégia néhány fontosabb aspektusa kerül bemutatásra egy-egy fejezetben.

1.2.1. Direkt károsodás-csökkentő kezelések

Az előző fejezetből kitűnik, hogy a károsodás létrehozásában számos sejt- és szervezetszintű jelátviteli kaskád bonyolult hálózata vesz részt, mely több ponton rendelkezik öngerjesztő és önfékező mechanizmusokkal. Megfelelő időben alkalmazott különböző vegyületekkel a rendszer gátlás irányába tolható el, mindazonáltal egy-egy farmakon hatásának teljes körű megismerése a folyamat összetettsége miatt majdnem hogy lehetetlen. Ebből adódóan a legtöbb elfogadottan hatásos molekula esetében léteznek ennek ellentmondó irodalmi adatok is.

A reperfúzió korai szakaszában hatásosak mindazon kezelések, melyek az MPT-csatornák megnyílását akadályozzák. A legismertebb ilyen gátló molekula a ciklosporin-A.⁶⁸ A mitokondriumok jelentik ugyanakkor a legfontosabb kapcsolódási

pontot az endogén védelmi mechanizmus indukálása felé, ezért a prekondicionálás folyamatát indukálni képes vegyületek is nagyjából az MPT-csatornák szabályozásán keresztül hatnak. Ide sorolható továbbá, a reperfüziós pH-emelkedés lassítására irányuló kezelés is, melynek legtöbbet vizsgált és igen hatékony formája a poszt-kondicionálás.³⁸

A nekrozisra jellemző sejtduzzadást és sejtszétesést képes megakadályozni a glicin a sejtmembrán aspecifikus („halál”) anion csatornáinak gátlásával, melyek a membránkiboltosulások átszakadását közvetlenül megelőző gyors térfogat növekedést idézik elő.⁶⁹ Az adott sejtre nézve eközben ugyan nem javul a metabolikus állapot, ugyanakkor kisebb másodlagos károsodás indukálódik. Az apoptózis direkt gátlása elvben a kaspáz-kaskád gátlásán keresztül megvalósítható, de nem jár számottevő haszonnal az I-R károsodás végső kimenetele szempontjából.⁷⁰

Számos ponton nyújt lehetőséget beavatkozásra az I-R károsodás korai szakaszában is fontos szerepet játszó, majd a késői szakasz súlyosságát alapvetően meghatározó immunválasz. Gátolható egyrészt a sejtek közti kommunikációban fontos szerepet játszó szignálmolekulák, a citokinek termelődése, vagy funkciója. TNF- α ellenes antitestekkel például kísérletesen csökkenthető az I-R károsodás.⁷¹ Ehhez hasonló hatás származik a reperfüzió korai szakában a TNF- α -termelődés legfontosabb forrását jelentő Kupffer-sejtek pentoxifillinnel történő gátlásából is.⁷² Állatkísérletes modellekben a károsodás mérséklésére képes továbbá különböző interleukin- (pl.: IL-1, IL-12) ellenes antitestek adása is.^{73,74} A gyulladási folyamatok ilyen gátlása maga után vonja a neutrofil granulociták mikrocirkulációs kitapadásának és aktivációjának csökkent mértékét, így az általuk létrehozott másodlagos károsodás is kisebb mértékű. A fehérvérsejtek szöveti migrációja ezen kívül direkt módon is gátolható, az adhézióban résztvevő molekulák ellen képzett antitestek beadásával.⁷⁵ Szintén az immunrendszer kisebb mértékű indukciója miatt lehet jótékony hatású elsősorban a komplement rendszer gátlása is.⁵⁷ Mindezen támadási pontok esetében jelentkezik továbbá bizonyos mértékű direkt sejtkárosodást, illetve távoli szervi károsodást mérséklő hatás is.

A reperfüziós oxidatív stressz csökkentésének szintén igen szerteágazó irodalma van. Eredetileg ebbe a csoportba sorolták a glutamint is, bár ma már tudjuk, hogy több ponton is képes interferálni az I-R károsodás patomechanizmusával és nem kizárólag a szabadgyökök toxicitását mérsékelve fejt ki protektív hatást.⁷⁶

A máj esetében kiemelkedő jelentőséggel bír továbbá a korai reperfúziós mikrocirkulációs elégtelenség, mely egyaránt mérsékelhető endothelin-receptor (ET-R) antagonistával (bosentan), vagy ET-ellenes antitestekkel, valamint a NO termelődését fokozó (L-arginin), vagy direkt NO-donor molekulák (L-NAME) által. Tekintve, hogy a NO szignálfunkcióval is rendelkezik, hozzáférhetőségének fokozása a reperfúzió kezdetén kifejezettebb károsodáscsökkenést eredményez, mint az endotelingátlás.⁴⁸

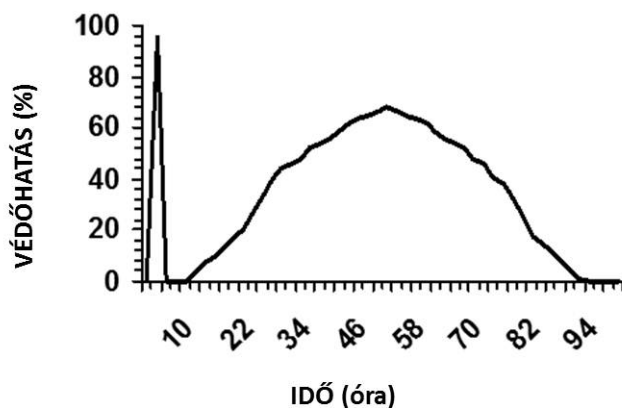
1.2.2. Az iszkémia-tolerancia javítása: prekondicionálás

Prekondicionálás alatt az iszkémiás eseményt megelőzően alkalmazott kezelést értjük, mely mintegy felkészíti a sejtet az ezt követően fellépő I-R károsodásra. Murry és munkatársai kutyák szívének iszkémiás toleranciáját vizsgálva, lényegében nem várt eredményként figyeltek fel az infarktusméret csökkentésének ezen egyszerű módjára. Azóta híressé vált kísérletükben a bal körbefutó koronária ág 5 perces leszorítását végezték négy ciklusban, majd 40 percig tartó iszkémiát hoztak létre ezen ér ellátási területén.⁷⁷ A rendkívül hatékonynak ígérkező eljárásban rejlő lehetőségek sokak fantáziáját megmozgatták, és azóta számos vizsgálat foglalkozott a jelenség hátterében feltételezett endogén védelmi mechanizmus lépéseinek részletes feltérképezésével. Tradicionálisan rövid iszkémiás-reperfúziós epizódokat alkalmaztak triggerként. Lehetséges azonban ezen adaptációs útvonal aktiválása bizonyos farmakonok által is, ami az oxidatív stresszt, illetve a gyulladással válasz mérséklését célzó gyógyszeres kezelések mellett, szintén alkalmas lehet az I-R károsodás csökkentésére bizonyos klinikai szituációkban.

1.2.2.1. A prekondicionálásról általában

Az iszkémiás prekondicionálás (IP) ma is a leghatékonyabb ismert prekondicionálási módszer. Ez annak köszönhető, hogy a sejtek komplex válaszmechanizmusait aktiválja, és nem csak bizonyos kiragadott útvonalakon keresztül hat. Az elmúlt 20 év széleskörű kísérletei során a módszer jelátviteli mechanizmusának egyre több apró részletére derült fény. Ezek az ismeretek teremtenek alapot az összes többi prekondicionálási technikához. Az IP csak meghatározott rövid iszkémiás-reperfúziós ciklusok által hozható létre, melyet az adenzin és a xantin szöveti koncentrációja határoz meg. Az iszkémiának egyrészt elég hosszúnak kell lenni (5-10 perc), hogy a termelődő adenzin indukálhassa a NO-szintézist, mely ugyanakkor nem

haladhatja meg az eliminálásához szükséges xantin szöveti koncentrációját (15 perc).⁷⁸ Másik fontos szempont a kinetikát illetően, hogy csak bizonyos időablakon belül bekövetkező I-R károsodással szemben érvényesül a protektív hatás. Az IP első, úgynevezett „korai” időablaka azonnal aktiválódó adaptációs mechanizmuson keresztül nyújt védelmet az egy órán belül következő hosszabb iszkémiás periódus károsító



5. ábra Az iszkémiás prekondicionálás két időablaka. (Van Winkle, Coron Artery Dis, 1991 alapján)

Az IP-t követő néhány órában jelenik meg a maximálisan elérhető védőhatás, melynek a mintegy 24 órával később kialakuló elhúzódó védelem körülbelül 70%-át teszi ki.

1.2.2.2. Az IP folyamata

Az IP által létrehozott „jelzésnek” el kell jutnia bizonyos sejtalkotó(k)hoz és mintegy raktározódnia kell ahhoz, hogy az iszkémia során „előhívható” legyen. A vérrellátás tartós megszűnése „idézi fel” a jelzést, mely az effektor(ok) aktiválásán keresztül csökkenteni képes az I-R károsodást. A folyamat azonban korántsem ennyire egyszerű. A sejtben számos jelátviteli útvonal bonyolult kapcsolata szükséges az információ feldolgozásához és raktározásához, valamint a protekcióhoz transzkripciós és translációs módosulásokra is szükség van. Ez az egyszerűsített séma lényegében arra szolgál, hogy rendszerezze és átláthatóbbá tegye az IP által indukált molekuláris mechanizmusokat.^{81,82}

Az egyes lépések máig sem pontosan tisztázottak, és az ismereteink állandóan bővülnek a részleteket illetően. A szívizomban, ahol a prekondicionálás tiszta formáját látjuk, nagy vonalakban a következő folyamat megy végbe: az iszkémiás stimulus

hatásával szemben.⁷⁹ A második, úgynevezett késői időablak 24 órával az IP után kezdődik és jelen van még mintegy két napon keresztül. A védőmechanizmus ekkor az IP következtében módosult fehérje-expresszió

keresztül valósul meg és hatásossága valamelyest elmarad a korai időablak hatása mögött.⁸⁰ (5. ábra)

hatására stressz-mediátorok (adenozin, bradykinin, opioidok, noradrenalin, ROS) szabadulnak fel a sejtekből, mely molekuláknak iniciátor szerepe van. Intracelluláris szignáltranszdukciós útvonalakat aktiválnak G-fehérjéken és más receptorokon keresztül. A protein-kináz-C (PKC) aktiválódása fontos kereszteződési pont a folyamatban, melynek egyik feltételezett végpontja a mito- K^+ _{ATP}-csatornák nyitása. Kísérletesen bizonyított, hogy az IP protektív hatásának kialakulásához szükség van a mitogén-aktivált protein kináz- (MAPK-) kaskád aktiválódására, mely feltételezetten a PKC-től „disztálisan” vesz részt a folyamatban, de a kapcsolódási pontok nem kellően tisztázottak.⁸³

A legvitatottabb kérdés az egész elméletben a mito- K^+ _{ATP}-csatornák nyitásának szerepe: újabban pozitív visszacsatolási pontnak és végső effektornak tartják őket, míg egyes szerzők megkérdőjelezzik központi helyzetüket. A mitokondriális K^+ _{ATP}-csatornák nyitásához kapcsolódó antiiszkémiás védelem háttérében több mechanizmust feltételeznek: a mitokondriális mátrix mérsékelt duzzadását előidézve segítik a külső és belső membrán közti kapcsolódási helyek és ezáltal az elektrontranszport integritásának megtartását.⁸⁴ Továbbá az I-R károsodást megelőző csatornanyitás mérsékelt ROS termelést hoz létre, ami a protein-kináz C kaskádon keresztül az endogén védelmi rendszert aktiválja, mely mintegy felkészíti a sejtet a következő iszkémiás periódusra megelőzve ezáltal a nagy mennyiségű reperfüziós ROS-képződését. Ezen utóbbi mechanizmus tekinthető a valódi prekondicionálásnak. A szarkolemmális K^+ _{ATP}-csatornák szintén hozzájárulnak a citoprotektív hatáshoz a K^+ -kiáramlás fokozása által. Ennek következtében csökkentik az akciós potenciál idejét és a feszültség-függő Ca^{2+} -csatornákon beáramló Ca^{2+} mennyiségét,⁸⁵ mely az alacsonyabb intracelluláris Ca^{2+} -szinten keresztül csökkentheti az iszkémiás károsodást. Végül mindhárom hatás részt vesz a mitokondriális permeabilitási pórusok tartós nyitásának megakadályozásában, tehát a mitokondriumok integritásának megőrzésében és a sejt kedvezőbb energetikai állapotának biztosításában.

Az IP tervezett sebészi kirekesztést megelőzően indukálható az adott szervben, illetve létrehozható indirekt úton, úgynevezett távoli prekondicionálás formájában, ahol például valamely végtag véráramlásának intermittáló leszorításának segítségével szisztémás hatást is kiváltó mediátorok felszabadulását idézzük elő, vagy bél iszkémiás prekondicionálása révén a szívizomban hozunk létre protekciót.⁸⁶

1.2.2.3. Farmakológiai prekondicionálás

Az IP jelátviteli kaszkádja különböző pontokon gátolható és stimulálható farmakonok segítségével, mely megteremti a lehetőségét a nem csak operatív szituációban használható gyógyszeres beavatkozásnak és új távlatokat nyit a farmakoterápiában.

A legtöbb esetben olyan gyógyszerekről van szó, melyek képesek a mito- K^+ _{ATP}-csatornák nyitását létrehozni és a fent említett mechanizmuson keresztül citoprotektív hatást fejtenek ki. Példaként említhetők az inhalációs anesztetikumok, valamint az opioidok, melyek szívizom I-R károsodását csökkentő hatása számos vizsgálatban igazolást nyert klinikailag releváns dózistartományban is.^{87,88,89} Ugyanakkor máig sem pontosan tisztázott, hogy szükség van-e a klinikai gyakorlattól eltérő adagolási séma alkalmazására (és ha igen, milyen formában) ahhoz, hogy optimális protektív hatás alakulhasson ki. Ez a kérdés minden potenciálisan alkalmas vegyülettel kapcsolatban felmerül és számos további vizsgálatot tesz szükségessé.

1.3. Glutamin

Egyre több klinikai vizsgálat támasztja alá, hogy intenzív osztályon kezelt, kritikus állapotú betegekben, amikor a glutamin konstitucionálisan esszenciális aminosavvá válik, pótlásával a morbiditás és mortalitás javítható. Pozitív korrelációt mutattak ki ugyanis a glutamin hiány mértéke és az intenzív osztályos mortalitás között septicus és traumás betegeknél egyaránt. A felsorolt kórképekre jellemző, hogy a mortalitás fő forrása a generalizált gyulladásos válaszreakció talaján kialakuló sokszervi elégtelenség. A glutamin több molekuláris mechanizmus együttes hatásának köszönhetően, antiinflammatorikus és citoprotektív hatást fejt ki, csökkenti a vékonybélben lezajló bakteriális transzlokációt és javítja az anyagcsere állapotát az inzulinrezisztencia mérséklése által. A szervezet antioxidáns rendszerét támogató hatása szintén hozzájárul a létrehozott protekcióhoz. Mindezen tulajdonságai révén a glutamin az immunmoduláló nutriensek közé sorolható, melyekkel jelenleg is több multicentrikus vizsgálat foglalkozik annak érdekében, hogy elfoglalhassák méltó helyüket a súlyos állapotú betegek kezelési palettáján.⁹⁰ Ennek potenciálisan részét képezheti iszkémiás-reperfüziós kórképek terápiája is, ahol tervezett műtétek esetében, akár súlyosabb károsodás megelőzésére is lehetőség nyílhat.

1.3.1. A glutamin hatásai a szervezetben

A glutamin (Gln) a nem esszenciális aminosavak közé tartozik, szervezetünkben az L-Gln konformációban hasznosul és megtalálható minden emberi fehérjében. A legtöbb sejtünk képes tápanyagforrásként is hasznosítani és bár önmaga nem rendelkezik antioxidáns potenciállal, a szervezet antioxidáns rendszerének kulcsfontosságú molekulája.

Katabolikus állapotokban – mint amilyen a műtéti stressz is – csökken a szervezet Gln szintje.⁹¹ 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.⁹² Ennek következménye lehet az a tény, mely szerint a vénásan alkalmazott glutamin szupplementáció mérsékli a posztoperatív szövődmények számát.

1.3.1.1. A glutamin élettani és biokémiai vonatkozásai

A glutamin a szervezetünk legnagyobb mennyiségben előforduló szabad aminosava és főként a 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 limfociták és az enterociták növekedésében, illetve a szervezet nitrogén-egyensúlyának fenntartásában.⁹³ Glutaminhoz kötött az ammónia-, és az ureaszintézis, a vesében és a májban lejátszódó glukoneogenezis, a glutation-szintézis és a központi idegrendszer neurotranszmitter-szintézise.⁹⁴ Szükséges továbbá a nukleotid szintézishez is, főleg a gyorsan proliferáló sejtekben,⁹⁵ mely ténnyel magyarázható az immunrendszer sejteinek 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.⁹⁶

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.⁹⁶

A glutation bioszintézis alapanyagaként hatással van az antioxidáns védekezési rendszer működésére és kapacitására, sőt mi több esszenciális szerepe van a sejtek

redox homeosztázisának fenntartásában.⁹⁷ A redox státusz befolyásolásán keresztül képes közvetett módon hatást gyakorolni a sejtek szignáltranszdukciós útjaira, valamint a sejtproliferációra.

A glutation az egyik legfontosabb antioxidáns molekula a szervezetben. Szabadgyökök hatására két redukált glutation (GSH) molekula kovalens kénhídon keresztül (S-S-híd) létesít kapcsolatot, oxidált glutationt (GSSG) hozva létre. A GSH oxidációja során a glutation-peroxidáz hidrogén-peroxidot és egyéb organikus peroxidokat bont el, amelyek egyébként potenciális veszélyt jelentenek a sejt fehérjéi és lipidjei számára. Oxidatív stressz nélkül, a GSH/GSSG egyensúly a redukált forma irányába van eltolva 500:1 arányban. A GSH fiziológiás körülmények között meglehetősen magas koncentrációban van jelen a sejtekben és a szabadgyökökkel szembeni védelem első lépcsőjét képezi. A glutation oxidációjából származó antioxidáns kapacitás megóvja az érzékeny proteineket az oxidatív károsodástól, megőrizve ezáltal az intracelluláris enzimszisztemek megfelelő működését.⁹⁸

1.3.1.2. A glutamin szerepe a sejt működés szabályozásában

A) Sejtproliferációra gyakorolt hatás

A glutamin közvetett vagy közvetlen módon befolyást gyakorol a sejtproliferációra, a sejt differenciációra, és a sejthalálra. Főbb hatásaira vonatkozó ismereteink nagyrészt transzformált sejtvonalak vizsgálatából származnak: elsősorban apoptózist moduláló effektusairól számolnak be a nemzetközi irodalomban.

A legtöbb sejtnak szüksége van növekedéséhez glutaminra, valamint a proliferáció képessége is függ a glutamin-felvételtől, amely effektust a Gln glutationná alakulásával és purin szintézisben való részvételével magyarázzák (lásd fenn). Meghatározó szerepét indirekt módon bizonyítja, hogy *in vitro* a glutamin-szintetáz enzim metionin-szulfoximinnel történő gátlása, jelentős proliferáció csökkenést idéz elő a sejtenyészetben. Párhuzam vonható továbbá a glutamin sejtekbe való felvételét biztosító enzim aktivitása és transzlációja, valamint a tumor sejtek proliferációjának mértéke között.⁹⁹ Az exogén glutamin szupplementáció a különféle sejtvonalakban proliferációt serkentő hatással bír, míg a glutamin megvonás differenciáltabb fenotípusú sejteket eredményez.¹⁰⁰

Az intracelluláris Gln koncentráció egy bizonyos kritikus szint alá csökkenése apoptózist indukálhat,¹⁰¹ 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.¹⁰²

B) Szignáltranszdukcióra gyakorolt hatás

A glutamin-kezelés extracelluláris kinázokat és Jun típusú nukleáris kinázokat aktiválva hozza lendületbe a celluláris proliferációs kaszkádot. Az említett kináz utak indukciója ugyanis felerősíti az activating protein-1 (AP-1) által modulált géntranszkripciót és a fontos növekedési faktorként megismert EGF (epidermal growth factor) hatását is.¹⁰³ A csak részben ismert, összetett jelátviteli utakat a glutamin több metabolikus formában és több szabályozási ponton is befolyásolhatja. Glutamát alakjában stimulálja a Ca²⁺-influxot és elősegíti a protein kináz c transzlokációját, mely aktiválja a PKC-kapcsolt foszforilációs kaszkádot.¹⁰⁴ A MAPK-kaszkád alterálásával elősegíti a sejtek túlélését glukóz-deplecióra visszavezethető sejthalál esetén, továbbá fruktóz-6-foszfáttal kapcsolódva, glukózamin formájában a c-Jun-N-terminális kináz (JNK) aktivitást serkenti. Mindkét utóbbi útvonal részt vesz az intesztinális sejtek proliferációjának serkentésében.¹⁰⁵

Glutamin hiányában az apoptózis Fas által mediált extrinzik útja indukálódik. A Fas-ligáció az ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) és JNK/SAPK (c-Jun-N-terminális kináz/ stress activated protein kinase) kinázokat aktiválja, mely útvonalak programozott sejthalált hoznak létre a sejtben. A glutamin transzlációja során működő glutaminil-tRNS-szintetáz ugyanakkor gátló hatással van az ASK-1-re, ezáltal végeredményben antiapoptotikus hatású.¹⁰⁶

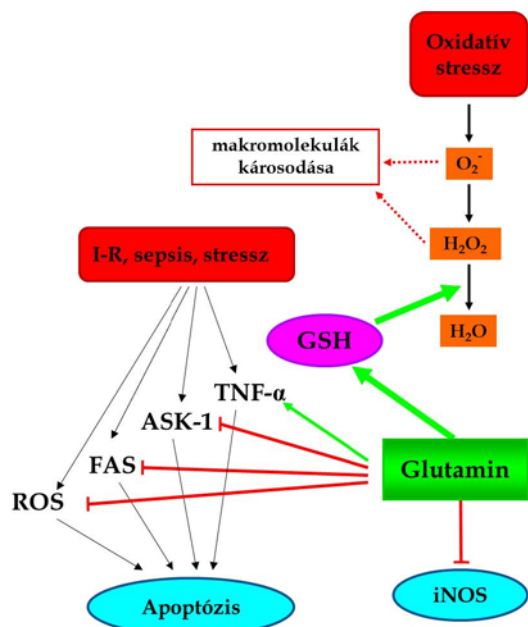
C) Poszttranszkripció hatások

A szerveink működését szabályozó szubcelluláris mechanizmusokat változatos módon befolyásolhatja a glutamin. Fibroblaszt sejtvonalban például fokozott kollagén szintézist eredményez,¹⁰⁷ ami hatással van többek között parenchimás szervek és kötőszöveti elemek szerkezetére is. A glutamin-szintáz poszttranszkripció szabályozásán keresztül modulálja a saját szintézisének mértékét. Metabolizmusa során továbbá befolyást gyakorolhat különböző homeosztázis szabályozó folyamatok

működésére. Erre egy példa, hogy megnövekedett renális glutamin-katabolizáció esetén acidózis generálódik, mely változásokat eredményez a veseszövet genátírásában.¹⁰⁸

1.3.1.3. Glutamin és a ROS mennyiségének összefüggései

A glutaminnal kapcsolatban régóta ismert, hogy a glutation prekursoraként fontos szerepet játszik az oxidatív stresszel szembeni egyik legfontosabb endogén védekezési mechanizmus fenntartásában. Fokozott ROS-termeléssel járó kórállapotokban ez a funkció létfontosságúvá válik.¹⁰⁹ Képes továbbá az iNOS-expresszió gátlásán keresztül a szisztémás gyulladásos válasz és az ezzel összefüggésbe hozható szervkárosodások (ú.m. szeptikus tüdőkárosodás) mérséklésére.¹¹⁰ Ezen hatása hozzájárulhat a toxikus nitrozatív gyökök keletkezésének csökkentéséhez is az I-R késői szakában. A szabadgyök termelésre gyakorolt gátló hatásának, illetve az antioxidáns kapacitás



6. ábra A glutamin szerepe az apoptózis és az oxidatív stressz befolyásolásában. (Roth E, Nutrition, 2002 alapján)

javulásának egyaránt szerepet tulajdonítanak az iszkémiás szívbetegek glutaminban gazdag diétája következtében tapasztalt kardioprotekció kialakulásában.¹¹¹

Az oxidatív károsodás csökkenését segíti elő továbbá indirekt módon a glutamin által kiváltott gyulladáscsökkentő hatás is, melynek háttérében részben a HSP70-termelés fokozódása állhat. Ez a hő sokkfehérje képes fontos proinflammatorikus transzkripciós faktorok, mint az NF- κ B, vagy az AP-1 gátlására és ezáltal potens antiinflammatorikus hatást fejt ki.¹¹² (6. ábra)

1.3.2. A glutamin szerepe a táplálásterápiában

1.3.2.1. Glutamin előkezelés állatkísérletekben

Általánosan ismert és kísérletesen is bizonyított tény, hogy az alultápláltság, valamint a tápanyaghiányos állapot a posztoperatív mortalitás emelkedéséhez vezet a normál tápláltsági állapothoz képest. A kísérletesen glutamin adásával a malnutrició

kedvezőtlen hatása részben felfüggeszthető: parciális hepatektómiát követően a kezelt állatokban javul a májregeneráció mértéke.¹¹³

Máj iszkémia-reperfúzió állatkísérletes modelljében, glutamin parenterális alkalmazása emeli 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 csökken.¹¹⁴

A glutamin jótékony hatása azonban nem minden kísérleti elrendezésben jelentkezik. Noh és mtsai. szerint az előkezelés hatására a HSP-szint nem emelkedik jelentősen, illetve alig csökken a neutrofil beáramlás és a nekrozis mértéke I-R károsodást követően.¹¹⁵ A posztisztkémiás glutamin kezelés pedig Fukatsu és mtsai. szerint kifejezetten súlyosbítja az I-R károsodást.¹¹⁶

1.3.2.2. A glutamin klinikai alkalmazása

A számos kórállapotban megemelkedő oxidatív stressz káros hatásainak ellensúlyozása az antioxidáns státusz javításán keresztül lehetséges. Ennek fontos eleme a glutation koncentráció emelése, mely a glutamin, mint prekursor molekula adagolásával valósítható meg. Ha figyelembe vesszük, hogy betegség során a glutamin esszenciális aminosavvá válhat, klinikai diéták során adása feltétlenül indokolt.¹¹⁷ Csontvelő-transzplantáción átesett betegcsoportban végzett vizsgálatok alapján a glutamin enterális alkalmazása hatástalan, továbbá kellemetlen mellékhatásai (pl. hasmenés) is vannak, ezért ilyenkor parenterális adagolást javasolnak.¹¹⁸

Parenterálisan alkalmazva a glutamin monoamin formában csekély oldékonysággal és stabilitással rendelkezik. Alanil-glutamin (Ala-Gln) dipeptidként (Dipeptiven[®], Fresenius Kabi) ezzel szemben sokkal jobb farmakokinetikájú vegyületnek bizonyult.^{119,120}

Intravénás kezelés során gyulladáscsökkentő és közvetett antioxidáns hatásának köszönhetően, a glutamin képes csökkenteni az oxidatív stressz mértékét. A jelenség szubcelluláris magyarázata az előzőekben említett szignáltranszdukciós útvonalakra gyakorolt moduláló hatás, valamint a GSH-szintézisben betöltött szerepe. Kísérletesen a glutamin adása javítja a gasztrointesztinális- és az immunrendszer működését. Stimuláló hatással rendelkezik a leukocitákra, növeli a neutrofil granulociták és a makrofágok

fagocita funkcióját és RNS-szintézisét, valamint véd bizonyos szisztémás fertőzések ellen, anélkül, hogy emelné a keringő fehérvérsejtek számát.^{121,122}

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.^{123,124,125}

A glutamin inflammatorikus molekulákra kifejtett moduláló hatása számos kórállapot kezelésében kihasználható: gyulladással járó bélbetegségekben csökkenti a proinflammatorikus interleukinek (az akut fázis fehérvérjék génexpresszióját növelő IL-6, és a neutrofil granulociták kemoattrakcióját serkentő IL-8) szintjét, míg a gyulladással szembenes IL-10 koncentrációját emeli. Pankreatitiszben és szepszis állapotban, az intravénásan adott glutamin csökkenti az IL-8 mennyiségét. Ezen kívül enterális glutamin alkalmazásakor indukálódik a hem-oxigenáz-1 nevű hő sokk protein (HSP) a humán duodenum nyálkahártyájában. Kritikus állapotú betegeknél az egyik legfontosabb dajka-fehérje, a HSP70 is indukálódik általa, amit a szérumban mérhető koncentrációjának emelkedése igazol hétnapos kezelést követően.¹²⁶ Képes továbbá az immunfolyamatok regulálásában is részt vevő NF- κ B szintjét és állatkísérletek alapján a gyulladással járó folyamatokban kulcsszerepet betöltő TNF- α szintjét is csökkenteni.¹²⁷

A glutamin jótékony hatást fejt ki a bélnyálkahártyára nézve. Kísérletesen növeli a jejunális fehérjeszintézis mértékét, ami a bélhámsejtek jobb működésére, illetve stimulálására utal. Kritikus állapotú betegeken a Dipeptiven[®] adásával megőrizhető volt a bél felszívó képessége, megelőzhető a nyálkahártya atrófia és a következményes malnutrició.¹²⁸ Alkalmazásakor továbbá in vivo és in vitro egyaránt csökken a nyálkahártya IL-6 és IL-8 termelése, miáltal gyulladáscsökkentő hatású.¹²⁹ A bélnyálkahártya citokin termelésének modulálása valószínűleg poszttranszkripció szinten valósul meg.

A posztoperatív glutamin kezelés javítja a nitrogén egyensúlyt, serkenti a fehérjeszintézist, védi a gasztrointesztinális rendszer működését és mindezek eredőjeként csökkenti a hospitalizációt, valamint a mortalitást. Egy prospektív randomizált vizsgálat adatai alapján, 9 napos glutamin kezelés után a fél éves túlélés 66,7%-ra nőtt a 40%-os kontroll értékkel szemben szövődményes, intenzív terápiás kezelésben részesülő betegek esetén, bár a kórházban töltött idő és a kórházi mortalitás

nem volt szignifikánsan alacsonyabb. Ez arra utalhat, hogy a protektív hatások elsősorban hosszú távon nyilvánulnak meg.¹³⁰

Humán alkalmazásban a parenterális glutamin ajánlott mennyisége 0,5 g/ttkg/nap.

1.4. Levosimendan

A levosimendan dekompenzált szívelégtelenség kezelésére használt inodilatátor hatású molekula. A szívizom kontraktilis elemeinek Ca^{2+} iránti érzékenyítésén keresztül fejt ki pozitív inotróp és anti-stunning hatást, valamint a vaszkuláris simaizomzat szarkolemmális K^+ _{ATP}-csatornáit nyitva hoz létre vazodilatációt. Újabb vizsgálatok igazolták, hogy a mitokondriális K^+ _{ATP}-csatornák nyitására is képes.¹³¹ Ez a felismerés kiindulási pontot jelentett a vegyület anti-iszkémiás hatását vizsgáló in vitro és in vivo vizsgálatok számára, melyek alapján ma a levosimendant kardioprotektívnek tartják.¹³² Több eredmény is alátámasztja továbbá, hogy más pozitív inotróp vegyületekkel ellentétben nem hoz létre áramlás-csökkenést a szplachnikus területen, inkább kedvezően befolyásolja a vékonybél,¹³³ illetve a máj^{134,135} keringését, valamint protektív hatást képes kifejteni a szeptikus akut veseelégtelenséggel szemben.¹³⁶ Mindezen tulajdonságai potenciálisan képessé tehetik a máj I-R károsodásának mérséklésére is. A következőkben a levosimendan farmakológiai hatásai és klinikai tulajdonságai kerülnek bemutatásra.

1.4.1. A levosimendan farmakológiai hatásai

1.4.1.1. Ca^{2+} érzékenyítő hatás

A levosimendan pozitív inotróp hatását a szív kontraktilis elemeinek Ca^{2+} -érzékenyítésén keresztül hozza létre, több különböző támadási pontot érintve. N-terminális vége Ca^{2+} jelenlétében kötődik a troponin-C-hez, növeli annak Ca^{2+} -iránti affinitását, és stabilizálja Ca^{2+} -kötött formáját. Disztálisan mintegy helyettesíti a troponin-C-t, azaz képes az aktivált molekula felületét növelni kontrakció során.¹³⁷ Az ily módon létrejövő pozitív inotróp hatás nem befolyásolja a diasztolés telődést, illetve mivel a Ca^{2+} -beáramlás dinamikájától független, nem jár intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció emelkedéssel.^{132,138}

Mint a celluláris ionegyensúly eltolódásával foglalkozó részben, az I-R károsodással kapcsolatban is láthattuk, az intracelluláris (ic.) Ca^{2+} -koncentráció túlzott

emelkedése súlyos sejtkárosodás forrása lehet. Az ATP-termelés fokozásával egészséges, jó vérellátású szövetben a kompenzációs képesség igen széles határok között mozog. Mindazonáltal a sejtek O_2 -igénye jelentősen megnő, melyet a vérellátás fokozódása, a szív pumpafunkciójának támogatását igénylő kórállapotokban, nem feltétlenül tud kellő mértékben követni. Ennek következtében relatív hipoxia jöhet létre, mely a szívizomsejtek diszfunkcióját, illetve szélsőséges esetben azok elhalását vonja maga után, valamint szívritmuszavarok kialakulására hajlamosít. A szívizomsejtek Ca^{2+} -terhelését nem fokozó hatásmechanizmus miatt, a levosimendan különleges helyet foglal el a pozitív inotróp molekulák között.

A Ca^{2+} -érzékenyítő vegyületek alkalmazásával kapcsolatban gyakran megjelenő probléma, hogy míg a sejtek Ca^{2+} -túlterhelése tekintetében kedvezőek, diasztolés diszfunkciót idéznek elő azáltal, hogy szisztolében és diasztolében egyaránt kötődnek a troponin-C-hez.¹³⁹ A levosimendan ezzel szemben, Ca^{2+} -függő módon létesít kapcsolatot a troponin-C-vel, minek köszönhetően a kötődés döntően a szisztolé alatt valósul meg. A diasztolé során, az ic. Ca^{2+} -koncentráció csökkenésével párhuzamosan, a levosimendan és a troponin-C közti kötés valószínűsége is folyamatosan csökken. Ennek következtében, a kontraktilitás fokozásához csak minimális O_2 -igény emelkedés és jó diasztolés bal kamra funkció társul.¹³⁸

A levosimendan metabolizmusa során egy hosszú felezési idejű aktív metabolit keletkezik (OR-1896), mely körülbelül 72 órán keresztül van jelen hatáson koncentrációban a keringésben. In vitro és in vivo kísérletek eredményei egyaránt arra engednek következtetni, hogy az OR-1896 a levosimendanhoz hasonló Ca^{2+} -érzékenyítő hatással és famakodinámiás tulajdonságokkal bír. Egyszeri 24 órás infúziót követően, a levosimendan elhúzódó pozitív inotróp hatását ezen hosszú felezési idejű aktív metabolitjával magyarázzák.¹⁴⁰

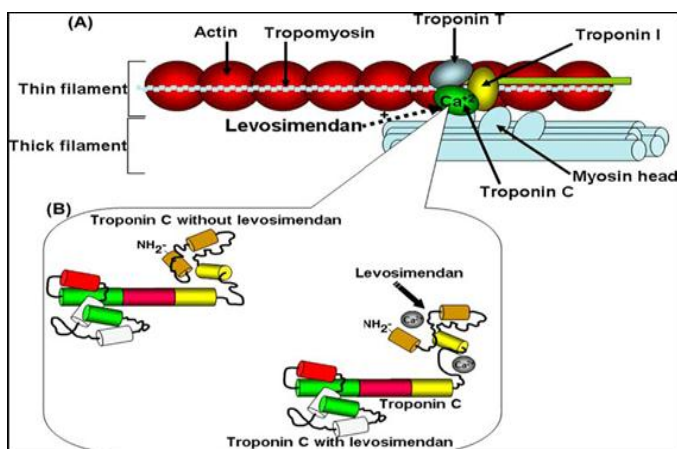
1.4.1.2. Foszfodiészteráz gátló hatás

A foszfodiészteráz (PDE)-gátlás, a levosimendan pozitív inotróp hatásának további, jelentőségében a kontraktilis elemek Ca^{2+} -érzékenyítése mögött számottevően elmaradó eleme. A PDE enzim gátlásával, a β -ardenerg hatáshoz hasonlóan, intracelluláris cAMP-szint emelkedés érhető el, mely fokozza a sejtek Ca^{2+} -felvételét az L-típusú Ca^{2+} -csatornák aktiválásán keresztül. Ellentétben más PDE-gátló pozitív inotróp vegyületekkel, levosimendan esetében nem mutatható ki egyértelmű dózis-hatás

összefüggés a kontraktilitás fokozódása és az intracelluláris cAMP-koncentráció emelkedése között.^{138,139} Továbbá a levosimendan hatásos koncentrációja nem feltétlenül jár együtt az ic. Ca^{2+} -szint emelkedésével sem, tehát dózis-hatás összefüggés Ca^{2+} -ra vonatkozóan sem állítható fel.^{134,141} Ezek értelmében nem teljesen tisztázott, hogy mennyiben járul hozzá a PDE-gátlás a pozitív inotróp hatás létrehozásához.

Az emberi szívben a PDE_{III} izoenzim fordul elő legnagyobb koncentrációban, de újabb vizsgálatok alapján a PDE_{IV} aktivitásának csökkentése is jelentősen fokozza a katekolamin-indukált cAMP-szint emelkedést. Kísérletesen igazolást nyert, hogy mind a levosimendan, mind az OR-1896 képes szelektíven gátolni a PDE_{III}-as típusát.¹³⁷ A hatásos gátló koncentráció (EC₅₀) levosimendan esetében 2,5 nM, OR-1896-ra vonatkozóan 94 nM. A PDE_{IV}-es típusának gátlásához a 24 órás levosimendan infúziót követően létrejövő 6 nM-os levosimendan, illetve 12 nM-os OR-1896 koncentrációnál szignifikánsan magasabb koncentráció szükséges, mely mindkét molekula esetében bőven az in vivo toxikus tartományba esne, tehát ez a folyamat klinikai jelentőséggel feltételezhetően nem bír. Valószínűnek tartják, hogy az ic. cAMP-szint emelkedéséhez, valamint a Ca^{2+} -beáramlás fokozódásához, több PDE izoenzim egyidejű gátlása szükséges. Kísérletesen egy izoforma szelektív aktivitáscsökkenését a többi izoenzim jelentős mértékben képes kompenzálni, megakadályozva ezáltal a cAMP-koncentráció túlzott emelkedését.¹⁴²

A klinikai alkalmazásban a levosimendan PDE_{III}-gátló hatása nem hoz létre kritikus mértékű cAMP-szint emelkedést a szívizomsejtekben. Az in vitro vizsgálatok azt is igazolták továbbá, hogy az OR-1896 terápiásan elért koncentrációja nem közelíti



7. ábra A levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatása.
(Forrás: Tátrai Miklós: Rektori Pályázat, 2008)

meg a PDE_{III}-gátláshoz szükséges koncentrációt. A PDE gátlása tehát, csak átmeneti hatásként jelenhet meg az alkalmazás során.¹³⁷ Ez részben magyarázza azt is, hogy normál plazma szint mellett miért alacsonyabb a levosimendan arritmogenitása az egyszerű PDE-gátló vegyületekhez képest.¹⁴³ (7. ábra)

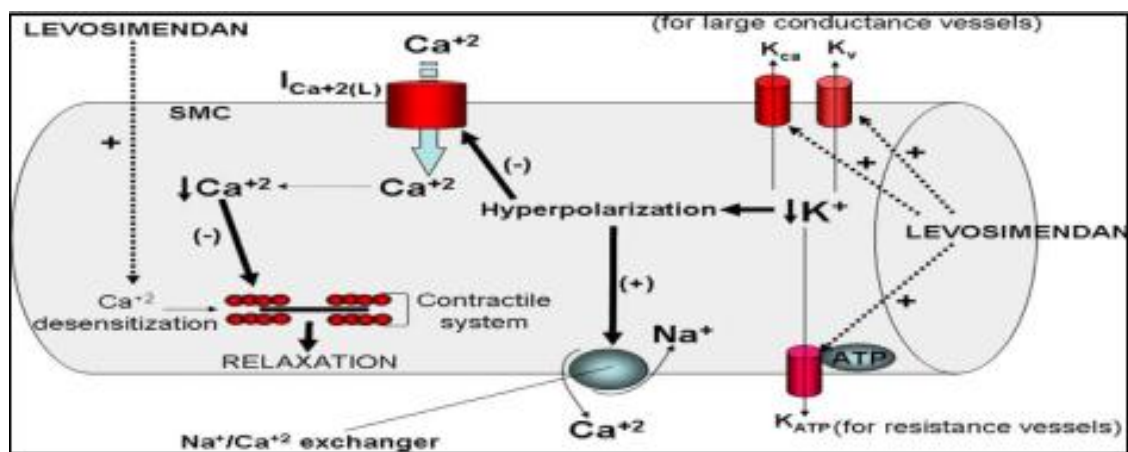
1.4.1.3. Vazodilatátor hatás

Az előzőekben bemutatott pozitív inotróp hatáson túlmenően, a levosimendan artériás és vénás vazodilatációt is létrehoz különböző K^+ -csatornákon keresztül. Az érfali simaizom szarkolemmális K^+ ATP-csatornáinak nyitása, mind a rezisztencia-, mind a kapacitáserek esetében fontos szerepet játszik.¹⁴⁴ A simaizomrelaxációhoz az artériás oldalon, a Ca^{2+} -aktivált K^+ -csatornák, valamint a feszültség függő K^+ -csatornák aktiválása is hozzájárul.^{145,146} A K^+ -beáramlás a membránban hyperpolarizációt vált ki, miáltal gátolja a befele irányuló Ca^{2+} -áramot és működésbe hozza a Na^+/Ca^{2+} -antiportert. Mindezek eredőjeként csökken az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció, tehát a simaizomsejtek relaxációja jön létre.

A vazodilatáció létrehozásának két másodlagos útja a K^+ -áram változásaitól független. Egyrészt a szívizommal ellentétben, az érfali simaizom kontraktilis elemeinek Ca^{2+} -érzékenysége levosimendan hatására csökken, miáltal azonos Ca^{2+} -tartalom mellett kisebb lesz az összehúzódások ereje.¹⁴⁷ Másrészt a PDE_{III} -gátlás következtében kialakuló cAMP-koncentráció emelkedés, a simaizomsejtekben relaxációt vált ki. Bár nem teljesen tisztázott, hogy a vaszkuláris PDE_{III} gátlása terápiás szérumkoncentrációk mellett létrejön-e, valószínűsítik, hogy a klinikai gyakorlatban ez is a vazodilatátor hatás egyik elemét képezi.¹³⁷

A levosimendan simaizom relaxáló hatását számos érterület vonatkozásában igazolták. Létrejön emberi és állati koronária erekben, a pulmonális artériában,^{148,149} illetve a kis- és nagyvérkör artériáiban és vénáiban egyaránt.¹⁵⁰ Hemodinamikailag a kontraktilitás fokozódásával párhuzamosan megjelenő vazodilatáció, mind a pre-, mind az afterload csökkentésére képes, jelentősen redukálva ezáltal a szív terhelését. A koronáriaperfúzió javulásával párhuzamosan megjelenő alacsonyabb oxigénigény, egyértelműen antiiszkémiás hatású a szívben.¹⁵¹

A levosimendan aktív metabolitjának, az OR-1896-nak is relaxáló hatása van az érfali simaizom sejtekben. Vazodilatátor hatása mind a szív-, mind a vázizomzat ereiben megnyilvánul, de az előbbi érterületen érvényesül kifejezettebben.¹⁵² Terápiás tartományba eső 10 nM-os OR-1896 koncentrációnál, in vitro szignifikánsan nagyobb mértékű relaxáció mutatkozik a koronáriákban, mint a vázizom ereiben, mely különbség a koncentráció emelésével csökken, majd megszűnik. (8. ábra)



8. ábra A levosimendan vasodilatátor hatása. (Forrás: Tátrai Miklós: Rektori Pályázat, 2008)

1.4.1.4. Antiiszkémiás hatás

A levosimendan antiiszkémiás hatásához alapvetően két különböző mechanizmus járul hozzá: a szívizom oxigénigényének csökkentése, illetve a mitokondriális K^+_{ATP} -csatornákon keresztül érvényesülő protektív hatás. A miokardiális oxigénigény csökkentéséről az előző fejezetrészekben részletesen volt szó. A koronária-dilatáció egyik további fontos aspektusa ebben a vonatkozásban, hogy a szarkolemmális K^+_{ATP} -csatornák nyitása a rosszul oxigenizált, alacsony ATP/ADP-arányú területeken jön létre jelentősebb mértékben.¹⁵³

Más plazmamembrán K^+_{ATP} -csatornákat nyitó vegyületekről szintén ismert, hogy képesek a mitokondriális belső membrán hasonló csatornáinak nyitására is. Az I-R károsodás mérséklésének lehetőségeivel foglalkozó fejezetrészen bemutatottak alapján, a mitokondriumok döntő szerepet játszanak a sejt túlélése szempontjából és számos protektív mechanizmus közös találkozási pontját képezik. A belső membrán K^+_{ATP} -csatornáinak nyitása, védi a mitokondriumot a 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 hepatocitákból izolált mitokondriumok esetében. Ennek alapján valószínűsítik, hogy célzott sejtszintű protektív hatás létrehozására is képes az I-R károsodással szemben.^{147,149} Jelenleg ezen direkt antiiszkémiás hatás vizsgálata képezi a levosimendannal kapcsolatos kutatások fő irányvonalát.

A K^+_{ATP} -csatornák aktiválása a szívben egy fontos mellékhatás forrása lehet, amennyiben a szívizomsejtek külső membránjában elhelyezkedő K^+_{ATP} -csatornákat is

érinti. A kifelé irányuló K^+ -áram növelése hiperpolarizálja a sejtmembránt rövidítve ezáltal az akciós potenciál idejét, ami végső soron csökkenti a refrakter periódus időtartamát és proarritmogén hatású lehet. A klinikai vizsgálatok erre vonatkozóan nem egységesek (lásd alább), de izolált szívizomsejtek in vitro tanulmányozása alapján, a levosimendan direkt arritmogenitását nem valószínűsítik.

1.4.2. A levosimendan a klinikai tapasztalat tükrében

1.4.2.1. Szisztémás hemodinamikai hatás

A levosimendan az előzőek értelmében több farmakológiai hatásmechanizmus eredőjeként idéz elő mintegy 0,4-0,8 liter/perces perctérfogat növekedést mind az összehúzódnaként kilökött vérmennyiség, mind a frekvencia növekedése által. Ennek következtében a pulmonális kapilláris éknyomás 4-6 Hgmm-rel csökken, de mivel csökken a szisztémás érelenállás is, a transzpulmonális grádiens nem változik. Szintén a kardiális teljesítmény javulására utal a keringő pro-atriális natriuretikus peptid koncentrációjának csökkenése, mely 24 órás levosimendan infúziót követően jelentkezik idült szívelégtelenségben szenvedő, átlagosan 25%-os bal kamrai ejekciós frakcióval rendelkező betegeknél.¹⁵⁴

A szívfrekvencia emelkedésének előidézése egyelőre nem pontosan tisztázott, de részben kompenzatórikusnak tekinthető, és a vazodilatáció által aktivált baroreceptor reflexeken keresztül valósul meg.¹⁵⁵ Mindazonáltal a szívfrekvencia változása az ajánlott dózistartományban klinikai körülmények között nem járul hozzá számottevően a perctérfogat növekedéséhez.

A szívelégtelenség standard terápiájában alkalmazott dobutaminnal összehasonlítva, a levosimendan kifejezettebb perctérfogat emelkedést és pulmonális éknyomáscsökkenést hoz létre súlyos, alacsony perctérfogatú szívelégtelenségben. A szisztolés vérnyomáscsökkenés és a vazodilatáció mértéke szintén a levosimendan-kezelt csoportban volt nagyobb. Hemodinamikai hatásait, eltérően a dobutamintól, β -blokkolók együttadása nem csökkentette. Mivel a súlyos kardiális dekompenzáció kezelésében egyre több evidencia támasztja alá a β -blokkoló kezelés hasznosságát, ez a megfigyelés nem elhanyagolható. Egy különböző dózisokat is vizsgáló tanulmány kimutatta, hogy a levosimendan összes jelenleg használt dózisa nagyobb fokú pulmonális éknyomáscsökkenést eredményez, mint a placebo vagy a dobutamin.

Magasabb levosimendan dózisoknál jelentősebb volt a perctérfogat növekedés, de kifejezettebbé vált a tachikardizáló hatás is, valamint átlagosan 5-10 Hgmm-es szisztolés vérnyomásesés mutatkozott.

Összegzésként elmondható, hogy a levosimendan javítja a hemodinamikát szívelégtelenségben, és ez a hatás hosszabb időn keresztül fennáll az infúzió beadását követően.¹⁵⁵

1.4.2.2. Arritmogenitás

A PDE-gátlók és a dobutamin alkalmazhatóságát sok esetben arritmogenitásuk limitálja.¹⁵⁶ Különösen a PDE-inhibitorok indukálnak sustained kamrai tachycardiát, ezáltal növelve a mortalitást.

Bár az állatkísérletes adatok részben ellentmondásosak,¹⁵⁷ a klinikai tapasztalatok alapján, a standard levosimendan infúzió nem emeli a kamrai aritmiák előfordulását, vagy a szívelégtelenség kialakulásának kockázatát, bár a szívfrekvencia mérsékelten növekedhet az infúzió kezdetén. A QT-távolságban nem jön létre számottevő növekedés.¹⁵⁸ A pitvar- és kamraizomzat, valamint a szív ingerületvezető rendszerének különböző mértékű refrakteridő csökkenése ismert, de jelenleg úgy tartják, hogy jelentős mértékű kamrai aritmiát előidéző hatással nem kell számolni.^{147,150,159}

1.4.2.3. Kardioprotekció

Miokardiális iszkémiát követően, az irodalomban miokardiális „stunning”-ként, vagy hibernációként emlegetett jelenség figyelhető meg a reperfúzió kezdeti szakában. Okozójának a kontraktilis elemek csökkent Ca^{2+} -érzékenységét tartják, mely a reperfúzió során keletkezett oxigén tartalmú szabadgyökök mennyiségének, illetve az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációnak az emelkedése következtében jöhet létre.¹⁶⁰ Klinikailag ilyenkor a szisztolés diszfunkcióhoz társuló diasztolés relaxációs zavar figyelhető meg az echokardiográfiás vizsgálat során. Stunning-ban a levosimendan Ca^{2+} -érzékenyítő hatása, direkt javítja a pumpafunkciót a diasztolés diszfunkció súlyosbítása nélkül.

A fentiekben említésre került továbbá, hogy a levosimendan javítja a koronáriakeringést és ezáltal csökkenti az infarktusz méretét, valamint nem idéz elő oxigénigény-növekedést, mely további károsodás forrása lehet a posztisztkémiás

szövetben. Placebóhoz képest nem idéz elő emelkedést az aritmiák gyakoriságában a korai posztinfarktusos időszakban és a bypass műtéteket követő posztoperatív szakban sem.

1.4.2.4. Antiapoptotikus és antiinflammatorikus hatás

A gyengült szívizomban, nagy mennyiségben termelődnek proinflammatorikus citokinek, melyek a szívelégtelenség kialakulásának patofiziológiájában fontos szerepet játszanak. Emelkedett koncentrációjuk elősegíti a szívelégtelenség szimptomatikussá válását, csökkenti a szívizom kontraktilitását, apoptózist indukál a miocitákban és a szöveti struktúra átszerveződéséhez vezet. Levosimendan infúziót követően egy hónappal, szignifikánsan csökkent a keringő proinflammatorikus citokinek (pl.: IL-6), valamint szolúbilis apoptotikus mediátorok (pl.: FASL) koncentrációja dekompenzált szívelégtelenségben szenvedő betegekben.^{161,162} Ennek háttérében a kedvezőbb hemodinamikai paraméterek következtében csökkent kardiális citokintermelés és a jobb perifériás szöveti perfúzió egyaránt állhat.¹⁶³ Ezen immunmoduláló hatás hozzájárul a tünetek tartós enyhüléséhez és javítja az echokardiográfiás képet.

2. Célkitűzések

Az I. sz. Sebészeti Klinika kísérletes munkacsoportja évek óta foglalkozik az iszkémiás-reperfúziós májkárosodás témakörével, illetve mérséklésére irányuló technikák vizsgálatával. A kísérletek alapjául egy sebészi beavatkozás által előidézett iszkémiás-reperfúziós májkárosodást létrehozó patkánymodell szolgál, melyet jelen kísérletek esetében is használtunk. Az értekezésben bemutatott munka tehát alapvetően az eddigi kutatások folytatását képezi, még inkább klinikum-orientált irányba továbbgondolva azokat. A megvizsgált farmakológiai kezelések jelentőségét az adja, hogy olyan a klinikai gyakorlatban más indikációs területen eredményesen használt vegyületekről van szó, amelyek potenciálisan új alkalmazási területtel bővíthetnek a preoperatív alkalmazás által. Mint farmakológiai kezelések, magukban hordozzák annak lehetőségét, hogy olyan műtétek esetében is növeljék a máj iszkémia toleranciáját, amikor más szerven végzett műtét során lép fel hipoperfúziós májkárosodás veszélye fokozott kockázatú betegek esetében.

2.1. Hosszú latenciájú glutamin előkezelés

Ez a kísérlet munkacsoportunk egy korábbi vizsgálatának továbbvitele, ahol a közvetlenül műtét előtt adott glutamin előkezelés protektív hatását sikerült igazolni (lásd az „előkísérlet” fejezetben). A dolgozatban bemutatott első kísérlet célkitűzéseit az alábbi kérdések formájában lehet megfogalmazni:

- 1) Képes-e a 24 órával műtétet megelőzően adagolt glutamin előkezelés a definitív májszöveti iszkémiás-reperfúziós károsodás csökkentésére?
- 2) Javul-e „hosszú latenciájú” glutamin előkezelést követően a máj korai reperfúziós mikrocirkulációja?
- 3) Milyen hatással van a „hosszú latenciájú” glutamin előkezelés az antioxidáns státusz (elsősorban lokális) alakulására?

2.2. Rövid és hosszú latenciájú levosimendan előkezelés

A levosimendan a bevezetés részben összefoglalt tulajdonságai alapján, több támadásponton is befolyásolhatja a máj I-R károsodásának alakulását. Jelen kísérleti elrendezés egy közvetlenül műtét előtti és egy 24 órával korábban alkalmazott előkezelést tartalmaz, mely a prekondicionálás két időablakának vizsgálatára is alkalmas. A dolgozat második kísérletében az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

- 1) Csökken-e levosimendan kezelés hatására a 60 perces iszkémia talaján kialakuló definitív májszöveti károsodás mértéke?
- 2) Javul-e a máj korai reperfúziós mikrocirkulációja a kezelés hatására?
- 3) Van-e hatással a levosimendan előkezelés a májszöveti antioxidáns státusz alakulására reperfúziót követően?
- 4) Valószínűsíthető-e direkt hepatoprotektív protektív hatás szerepe jelen kísérleti elrendezésben?
- 5) Mutatkozik-e különbség közvetlenül műtét előtt, illetve 24 órával korábban alkalmazott levosimendan kezelés hatásai tekintetében?

A direkt hepatoprotektív hatás irányába mutató tájékozódó jellegű vizsgálatok ellenére jelen kísérleti elrendezésben nem volt elsődleges cél a szisztémás, valamint lokális hatások közti differenciálás. Ennek érdekében a két vonal külön-külön célzott vizsgálatára lenne szükség, adott esetben más-más állatmodellen.

3. Módszerek

3.1. Kísérleti elrendezés

3.1.1. Törvényi háttér

Az állatkísérletek során követtük az 1998. évi XXVIII. sz. állatvédelmi törvény előírásait, valamint betartottuk a 243/1998 (XII. 31) Kormányrendelet szerint elvárt követelményeket. Kísérleteinket a 1858/000/2004 számú engedély alapján, a Semmelweis Egyetem EÁB által kiállított, állatkísérletek végzésre feljogosító 27/2000 sz. bizonyítvány birtokában végeztük.

3.1.2. Állatok

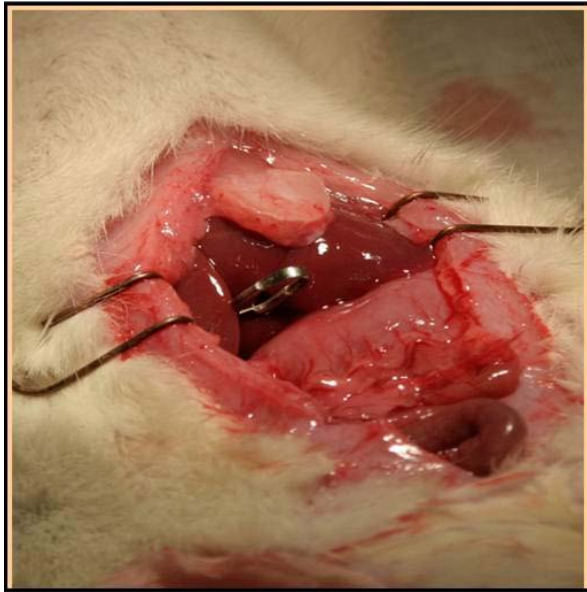
A kísérleteket 250-280g súlyú, spf (specified pathogen free), hím Wistar patkányokon végeztük (Charles River Magyarország Kft.). Elhelyezésük 22-24°C-os hőmérsékleten történt, táplálékhoz és vízhez való szabad hozzáférés biztosítása mellett, melyet a műtét előtti 12 órában táplálékmevönás követett. A cirkadián ritmus befolyásoló hatásának kizárása érdekében a kísérletek reggelente azonos időben kezdődtek.

3.1.3. Altatás és monitorozás

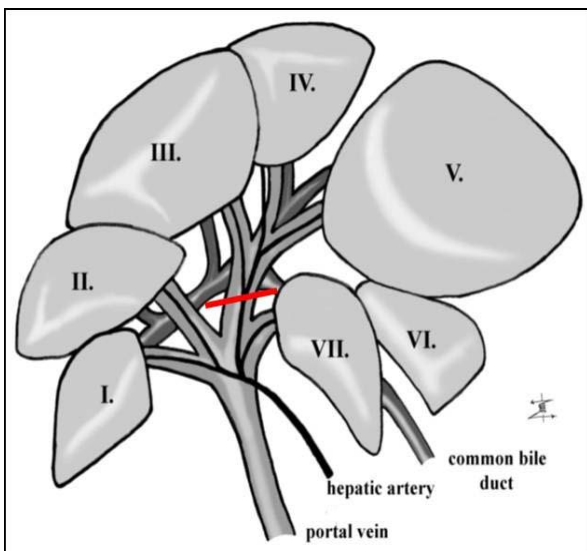
Intraperitoneális bólus injekcióval (75 mg/kg ketamin + 7.5 mg/kg xylasin) végzett indukciót követően, az anesztézia fenntartása a jobb juguláris vénán keresztül folyamatos perfúzoros adagolással (25 mg/kg/h ketamin + 2.5 mg/kg/h xylasin), intravénás formában történt. A vérnyomás az azonos oldali artéria karotisz-ban invazív módszerrel került monitorozására. A testhőmérséklet követésére a májáramlás vizsgálatához kapcsolva a laser Doppler áramlásmérő készülék nyújtott lehetőséget. A normotermia intraoperatív fenntartása fűthető műtőasztal segítségével történt.

3.1.4. Műtéti modell

A máj iszkémiás-reperfúziós károsodásának vizsgálatát munkacsoportunk korábban is alkalmazott, standardizált műtéti modelljén végeztük.^{164,165,166} Ennek anatómiai alapja, hogy a különálló lebenyekre tagolódó patkánymáj lehetőséget nyújt bizonyos területek I-R károsodásának vizsgálatára a szplanchnikus keringés folyamatos fenntartására mellett. Ily módon elkerülhető a teljes anhepatikus fázis által okozott multiviszcerális pangás, melyet a patkányok csak igen rövid ideig tolerálnának.



9. ábra Az iszkémiás máj fényképe



10. ábra A kísérletekhez használt műtéti modell.
(Rajz: Mihály Zoltán)

Az ábrán látható a patkánymáj szerkezete (III-IV-V lebeny: jobb és bal lebeny; I-II: lobus quadratus; VI-VII: lobus caudatus), a májkapu képletei, valamint pirossal az iszkémiát létrehozó mikroklipp helyzete.

Medián laparotómiát követően, elsőként mobilizáltuk a májlebenyeket, majd a III-as, IV-es, V-ös lebenyekhez futó biliovaszkuláris nyélre helyezett atraumatikus mikroklipp segítségével ezek 60 perces iszkémiáját hoztuk létre. A zsigerek említett söntkeringését ezen idő alatt a „lobus quadratus”-nak megfelelő I-II-es, valamint a „lobus caudatus”-nak megfelelő VI-VII-es

lebenyek tartották fenn. Mindezen söntlebenyek közvetlenül a reperfúzió előtt eltávolításra kerültek, így a reperfúzió csak a korábban iszkémizált – a máj össz-tömegének körülbelül 65-70%-át kitevő – területét érintette. (9. és 10. ábra)

A máj mikrocirkulációjának követése az V-ös lebenyre helyezett lézer Doppler flowmeter (LDF) mérőfej segítségével történt. Az iszkémiát megelőzően 5 perces alapáramlást mértünk, majd folytattuk a regisztrálást a kirekesztés időtartama alatt és a reperfúzió első órájában. Az explorált hasüreget mindvégig nedves lappal fedtük a folyadékvesztés minimalizálása érdekében.

3.1.3. Előkezelések

3.1.3.1. Kísérlet I: Glutamin

Mint a fentiekben már említésre került, a jelen dolgozatban bemutatott glutamin előkezelés korábbi kísérleteink folytatásának tekinthető, ezért az alább következő levosimendan előkezeléssel ellentétben itt csak egy időablakot vizsgáltunk. A kezelt csoportban 24 órával a máj iszkémiáját megelőzően 500 mg/ttkg Dipeptiven[®] infúzióban részesültek az (altatott) állatok 5 óra alatt, 1 ml/h sebességgel. A Dipeptiven[®] oldatból (4,1 g L-alanyl + 6,73 g L-glutamin/ 50 ml) hidrolizációt követően ekvimoláris mennyiségű alanin és glutamin szabadul fel a szérumban. A Dipeptiven[®] választott dózisa megegyezik a kísérlet idejében ajánlott (és jelenleg is érvényben lévő) klinikai dózissal, viszont az ajánlás változását követve eltér a munkacsoportunk korábbi vizsgálatában adott (400 mg/ttkg) mennyiségtől (lásd „előkísérlet”).

Az áloperált és az I-R kontroll csoport esetében 1 ml/h sebességgel kevert aminosav (Aminoven[®]) oldatot infundáltunk 5 órán keresztül az iszkémia előtt 24 órával.

3.1.3.2. Kísérlet II: Levosimendan

Az alább következő vizsgálati csoportoknak megfelelően, az előkezelést szintén altatásban vagy közvetlenül a műtét előtt, vagy az iszkémia előtt 24 órával, a bal femorális vénán keresztül végeztük 5 ciklusban. A levosimendan (Simdax[®], OrionPharma Kft, Magyarország) 75 perc alatt adható testtömegre számított dózisértékét (kalkulációs séma: 24 µg/kg bólus + 0,4 µg/kg/h infúzió) 5x5 perc alatt infundáltuk perfúzor segítségével. Az infúziós ciklusok között 10-10 perc szünetet tartottunk, így hozva létre a sebészi iszkémiás prekondicionáláshoz hasonló kezelési mintázatot. Szintén az iszkémiás prekondicionálást – illetve annak első és második védelmi időzónáját („first and second window of protection”) – modellezi a kezelés általunk választott két időablaka, így téve lehetővé az esetlegesen fellépő kémiai prekondicionálás vizsgálatát. A választott dózis megfelel a gyógyszer bevezetése során említett legmagasabb humán dózissal, mely a kísérlet idejében a klinikai gyakorlatban alkalmazott dózis duplája volt. Mivel azonban az adagolási séma is újszerű és ismert a gyógyszer jó tolerálhatósága, állatkísérletes adatokra támaszkodva a magasabb dózis mellett döntöttünk.

Az I-R kontroll és az egyszerű áloperált csoportokban a vegyület oldószereként használt 5%-os glukóz oldatot kapták az állatok azonos volumenben, valamint azonos módszerrel.

3.1.5. Kísérleti csoportok

3.1.5.1. Kísérlet I: *Glutamin* (1. táblázat)

A kísérletet csoportonként 10-10 állaton végeztük, 3 vizsgálati csoportban.

A műtéti stressz modellezésére szolgáló **áloperált** (a továbbiakban „*Sham*”) csoportban a máj I-R károsodásának létrehozásán kívül mindazon műtéti beavatkozásokat végrehajtottuk, mint a másik két csoportban, beleértve a kis májlebenyek (I., II., VI., VII.) rezekcióját is. Az előzőekben részletezett első napi aminosavinfúziót követően, a kísérlet második napján összesen 120 percen keresztül mértük a máj mikrocirkulációját, majd további 23 órával később mintagyűjtéssel egybekötve termináltuk a kísérletet.

Az **I-R kontroll** (a továbbiakban rövidítve „*I-R*”) csoportban, 24 órával az aminosavinfúziót követően a fent bemutatott elrendezésben hoztunk létre 60 perces részleges májiszkémiát, valamint teljes reperfúziót. Ennek 24 órás időtartamából az első órában végeztünk áramlásmérést, majd a reperfúzió hátralevő része zárt hasüreg és a narkózis felfüggesztése mellett történt.

Az *L-alanyl-L-glutamin* (**glutamin**) **előkezelés**ben részesülő (a továbbiakban rövidítve „*Gln*”) csoport esetében az eljárás az előzőekkel megegyező volt, csak az előkezelés aminosav összetételében volt különbség az I-R kontroll csoportnál alkalmazotthoz képest.

1. Táblázat Vizsgálati csoportok: Kísérlet I.

ALKALMAZOTT KEZELÉS	VIZSGÁLATI CSOPORTOK		
	Sham	I-R	Gln
Áloperáció	+	-	-
Máj I-R	-	+	+
Glutamin	-	-	+
EGYEDSZÁM	10	10	10

Kereszt (+) jelöli a táblázatban az adott csoportban végzett beavatkozást/ beavatkozásokat, vonal (-) azok hiányát. Az alsó sorban dőlten szedve a csoportok egyedszáma látható.

3.1.5.1. Kísérlet II: Levosimendan (2. táblázat)

Az előző kísérlet elrendezéséhez képest itt az alapvető különbség a kettős időablak párhuzamos vizsgálata volt. 55 állatot osztottunk összesen hét vizsgálati alcsoportra, melyeket a közvetlenül műtétet megelőző, valamint a 24 órával korábban alkalmazott előkezelésnek megfelelően „*rövid latenciájú*” (A), illetve „*hosszú latenciájú*” (B) kategóriába soroltunk. A közvetlen preoperatív bólusok és a 24 órával korábban végzett előkezelés a fent említetteknek megfelelően az iszkémiás prekondicionálás két időablakát modellezi.

A műtéti stressz modellezését biztosító *egyszerű áloperált* (1) csoportban (n=5) az előző kísérlethez hasonlóan iszkémiát nem hoztunk létre és minden tekintetben pontosan úgy jártunk el, mint a közvetlenül műtét előtt előkezelt „*rövid latenciájú*” csoportokban. Preoperatív glükózinfúziót követően a májáramlás 2x60 perces mérése következett, melyet a kis májlebenyek rezekciója szakított meg.

Az *áloperált + levosimendan* (A/1 és B/1) csoportokban (n=5-5), szintén nem indukáltunk I-R károsodást, hanem levosimendan adott időkategóriának megfelelő adagolása mellett végeztük a műtéti stressz modellezését az egyszerű áloperált csoporthoz hasonlóan. Ez a két vizsgálati csoport elsősorban a vegyület hemodinamikai hatásainak izolált vizsgálatára szolgált.

Az *I-R kontroll* (A/2 és B/2) és a *levosimendan* (A/3 és B/3) csoportokban (n=10-10) a fent részletezett sémájú előkezelést követően 60 perces májiszkémiát, majd 24 óras reperfúziót hoztunk létre a „*rövid*” és „*hosszú latenciájú*” kategóriában külön-külön.

2. Táblázat Vizsgálati csoportok: Kísérlet II.

ALKALMAZOTT KEZELÉS	VIZSGÁLATI CSOPORTOK						
	egyszerű áloperált	„ <i>rövid latenciájú</i> ” előkezelés			„ <i>hosszú latenciájú</i> ” előkezelés		
	1	A/1	A/2	A/3	B/1	B/2	B/3
Áloperáció	+	+	-	-	+	-	-
Máj I-R	-	-	+	+	-	+	+
Levosimendan	-	+	-	+	+	-	+
EGYEDSZÁM	5	5	10	10	5	10	10

Kereszt (+) jelöli a táblázatban az adott csoportban végzett beavatkozást/ beavatkozásokat, vonal (-) azok hiányát. Az alsó sorban dőlten szedve a csoportok egyedszáma látható.

3.1.6. Mintavétel

A nyitott hasüreget feltételező, LDF-fel monitorozott első reperfúziós óra elteltével, zártuk a hasüreget és felfüggesztettük a narkózist a következő 23 óra idejére. A kísérletek mintavétellel egybekötött terminálását 24 órás reperfúziót követően altatott állatokon végeztük. Szternotómiát követően a jobb szívkamra közvetlen punkciójával nyert vérminták centrifugálásával készült szérummintákat folyékony nitrogénben fagyaszottunk le, majd további vizsgálatig -80°C -on tároltuk. Az I-R károsodáson átesett III-as, IV-es, és V-ös májlebenyekből szövettani vizsgálathoz 3 mm vastag szeleteket fixáltunk 4%-os formalinban. Fagyasztáshoz a szomszédos területekről 5x5 mm-es szövetdarabokat vettünk. A lebenyek fennmaradó részéből Potter-Elvehjem készülékkel jeges hűtés mellett ($0-4^{\circ}\text{C}$) májhomogenizátumot készítettünk, melyet szintén -80°C -on tároltuk minden további vizsgálatig.

3.2. Vizsgálóeljárások

A két kísérlet eredményeit közel azonos módszerrel értékeltük ezért a következőkben az összes alkalmazott vizsgálóeljárás egy helyen kerül bemutatásra

3.2.1. Hemodinamikai monitorozás

Az állatok artériás vérnyomását és szívfrekvenciáját a jobb oldali artéria karotiszban invazív vérnyomásmérővel (Dasy Lab V9.00.02., National Instruments Corporation, Austin, TX, USA) regisztráltuk.

3.2.2. A máj mikrokeringésének vizsgálata

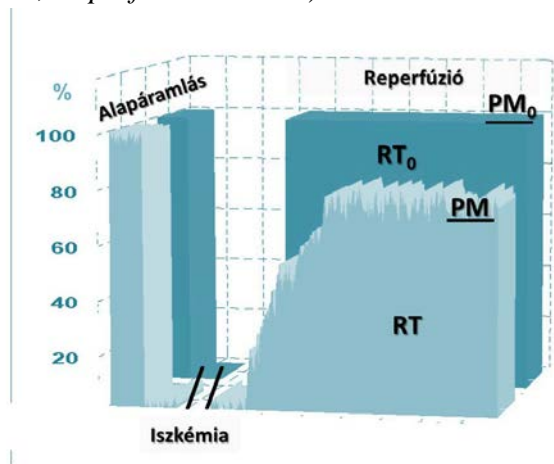
A máj mikrocirkulációját felszíni mérőfejjel ellátott lézer Doppler monitor (MOOR Instruments Ltd., London, Egyesült Királyság. DRT4; kétcsatornás; $\lambda=632,8$ nm; monokromatikus 2 mW Helium-Neon lézer) segítségével monitoroztuk. Az eszköz által mért flux függ a mérőfej által vizsgált szövetvolumenben mozgó vörösvértestek mennyiségétől és átlagsebességétől. A 0,5 cm átmérőjű felszíni mérőfejet az egyes állatoknál, az V-ös lebenynek mindig azonos pontjára helyeztük. Méréseink eredménye a hőmérsékletre, a vörösvértest koncentrációra és szövetvastagságra korrigált flux, mely a vizsgálat során grafikusan folyamatosan követhető adatsor. A mért értékek regisztrálása, grafikus ábrázolása GraphPad Software (GraphPad Software Inc, La Jolla,

CA) alkalmazásával történt. További feldolgozás céljából a flux adatsorból 4 másodpercenként vett minták kerültek elmentésre.

Az áramlási görbék összehasonlíthatósága érdekében a munkacsoportunk által korábban publikált matematikai korrekciót végeztük,¹¹ mely az adott görbére vonatkozó átlag iszkémiás flux minden egyes flux-értékből történő kivonásából és az individuális áramlási görbék relatív skálába való átszámításából áll. A korrigált áramlási értékpontok (T_{flux}) ábrázolására szolgáló relatív skála maximumához (100%) az iszkémia előtt regisztrált áramlási alapérték (baseline) közelít legjobban, míg az iszkémia alatti érték (biological zero - bz) az elérhető minimum és 0%-nak felel meg. A korrigált áramlási érték (T_{flux}) számítása a következő képlet szerint történik: $T_{flux} = (flux - bz) / (baseline - bz) \times 100$. Ezen matematikai korrekciónak köszönhetően az egyedi áramlási görbék összehasonlíthatóvá válnak.

3.2.3. Áramlási görbék elemzése és értelmezése

A reperfúziós áramlási görbék összehasonlítására a görbe alatti terület integrálja (RT , reperfúziós terület) és a maximális áramlási plató (PM , plató maximum – a



11. ábra Az áramlási görbék értelmezése.
(Forrás: Szijártó Attila)

A különböző reperfúziós görbék összehasonlítása a reperfúziós terület (RT) és plató maximum (PM) alapján egy hipotetikus reperfúziós görbével összevetve (RT_0 , PM_0) területarányokkal végezhető el.

reperfúzió utolsó 10 perce) szolgált. Az egyes görbék esetében számított két értéket egy hipotetikus ideális reperfúziós görbe százalékában fejeztük ki, ahol a reperfúzió már az első pillanatban 100%-os. Ez a transzformáció könnyen átlátható összehasonlítást és statisztikai analízist tesz lehetővé egyes állatok, illetve állatcsoportok között. (11. ábra)

3.2.4. Szövetteni elemzés

Minden állat májából a korábban leírtak szerint 3 mintát vettünk azonos anatómiai helyről, melyeket 4%-os formalinban fixáltunk 24 órán át, majd dehidráltunk és

paraffinba ágyasztunk. 3-5 µm vastag, hematoxilin-eozin (HE) festett metszeteken, fénymikroszkóppal (Olympus BX mikroszkóp) az alábbi patológiás jelek előfordulását vizsgáltuk: sejtduzzadás, lipoid degeneráció, szinuszoidális pangás, szöveti bevezés, leukocita infiltráció, nekrozis jelei (vakuolizáció, kariolízis, kariorrhesis, eozinofília), apoptózis jelei (sejtsugorodás, kromatin-marginizáció, -kondenzáció, -fragmentáció, „apoptotic bodies”). A fenti eltérések az alábbiak szerint kerültek pontozásra: 0: nincs változás, +: a látótér sejtjeinek kevesebb, mint 10%-a érintett, ++: 10-50 %, +++: több mint 50% érintett. A maximális pontszám a fentiek értelmében 21 volt. 7 pont alatt a károsodás mértékét enyhének, 7-14 között közép súlyosnak, 14 pont felett súlyosnak véleményeztük.

A lipoid degeneráció további verifikálása *Sudan IV*-gyel festett fagyasztott májmintákon történt hematoxilines háttérfestés mellett. A metszeteket fénymikroszkóp alatt elemezve szemikvantitatív értékelést végeztünk.

Két patológus egymástól függetlenül elemezte a metszeteket. A rendelkezésükre bocsátott lista alapján nem derült ki számukra, hogy az egyes metszetek mely vizsgálati csoportba tartozó állatokból származnak.

3.2.5. Immunhisztokémiai vizsgálatok

TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling*) **assay**: A DNS-fragmentáció detektálására a TUNEL reakciót használtuk, melyet kereskedelmi forgalomban lévő kit-tel végeztünk (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA) a gyártó protokollját követve. A szöveti struktúra megjelenítésére hematoxilin-es háttérfestést (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) alkalmaztunk. A metszeteket fénymikroszkóppal értékeltük két lépésben. Először a demarkált területek arányát határoztuk meg egy adott metszetben, majd 100x-os nagyításon tíz egymást át nem fedő látótérben, 1000 sejtet számoltunk meg, a TUNEL pozitív sejtek számát az összes sejt ezrelékében fejezve ki. Az első arányszám az irreverzibilis szöveti károsodás mértékének lehet mutatója, míg a különálló TUNEL-pozitivitás apoptózis jelenlétére utalhat.

PARP (*Poly(ADP-Ribose) Polymerase*) **aktivitás**: A PARP enzim aktivitását a termék poly(ADP-Ribose) (PAR) molekulák kimutatásán keresztül végeztük az irodalomban közölt módszer alapján.¹⁶⁷ 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 a mintákat órán keresztül szobahőmérsékleten, majd 1:1000 titerben poliklonális egér PAR-ellenes antitesttel (Calbiochem) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on.¹⁶⁸ PBS-sel való bőséges mosást követően, 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 megszámolva, a környező területek PAR-pozitivitását fejeztük ki százalék formájában.

3.2.6. Szérum nekroenzim mérések

Az alvadásgátolt vérmintákat centrifugáltuk (3000 rpm 10 percen keresztül), majd a felülúszót elválasztottuk a sejtes elemektől. Az így nyert szérumot folyékony nitrogénbe helyezve lefagyasztottuk, majd -80°C-on tároltuk. A spektrofotetrián alapuló enzim meghatározásokat 24 órán belül, standard laboratóriumi automatán (Hitachi 747) végeztük. Rutin laboratóriumi tesztek felhasználásával szérum *alanin-aminotranszferáz* (ALAT, a májkárosodás specifikus markere) és *aszpartát-aminotranszferáz* (ASAT, nem-specifikus markere a májkárosodásnak) szintet mértünk.

3.2.7. Az antioxidáns státusz vizsgálata

Az alkalmazott eljárások közül, a *luminometriás össz-scavenger kapacitás* meghatározás a legérzékenyebb, mivel a mintában lévő szabadgyökök mennyiségét nmol/l-es nagyságrendben képes kimutatni. Ezzel a módszerrel, mind a szérum, mind a májhomogenizátum mintákban végeztünk méréseket. A vizsgálathoz használt reakcióelegy hidrogén-peroxidot, luminolt és mikroperoxidázt tartalmaz. A mintában jelenlévő szabadgyökök hatására a luminol gerjesztett állapotba kerül és fényt bocsát ki, melyet luminométerrel (Lumat LB9051; Lumat Bertold, Windbad, Németország) detektáltunk.¹⁶⁹ A mért fényintenzitás arányos a mintában található szabadgyökök koncentrációjával és gyökfogó vegyületek jelenlétében csökken. A Relative Light Unit (RLU) egységben megjelenő eredmények a háttér aktivitás százalékában is kifejezhetők

(RLU %, vagy háttér %, II. kísérlet). Májhomogenizátum minták esetében, a minták fehérjetartalmát 10 mg/ml-re állítottuk be és a mérést 0,06 ml-es térfogatból végeztük. A fehérjetartalmat Lowry szerint határoztuk meg.¹⁷⁰ A luminol, a mikroperoxidáz és a hidrogén peroxid beszerzése, a SIGMA cégtől (St. Louis, MO, USA) történt. A többi reagenst a Reanal Chemical Co. (Budapest, Magyarország) szállította.

Az antioxidáns státusz részletesebb elemzésére további **három spektrofotometriás módszerrel** végeztünk méréseket Jasco V-550 típusú spektrofotométer segítségével. A *redukáló képesség* szintén a minta globális antioxidáns tulajdonságát vizsgálja. Meghatározása Oyaizu szerint történt.¹⁷¹ A mérés során a reakcióelegyben lévő Fe^{3+} - Fe^{2+} -átalakulást kísérő abszorbancia változást 700 nm-en detektáltuk. A redukáló képességet aszkorbinsav ekvivalensben (ASE) fejeztük ki. A *szabad SH-csoportok* a fehérjékhez kötődő redukáló képességet jelenítik meg. Kimutatásukra az Ellmann reakción alapuló Sedlack módszert használtuk.¹⁷² Az eredményeket mmol/l-ben adtuk meg. A *H-donor kapacitás* meghatározása fehérjekicsapást követően történik, így ez a fehérjétől független antioxidáns tulajdonságra utal. A mérést a Blázovics és mtsai. által módosított Blois módszerrel végeztük,¹⁷³ 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) gyök jelenlétében. Spektrofotométerrel mérve a DPPH abszorpciós maximuma 517 nm-en van. H-donor vegyületek jelenlétében, a molekula regenerálódik és a reakcióelegy abszorbanciája csökken. Az eredményt gátlás %-ban fejeztük ki.

3.2.8. NADH-tetrazolium enzimhisztokémiai reakció

A NADH-tetrazolium reakció során a mitokondriumban található NADH-dehidrogenáz enzimkomplex által katalizált reakcióban a NADH molekuláról egy H^+ ion kerül a jelenlévő akceptor nitroblue-tetrazolium-kloridra, mely a redukció következtében kék színű formazán terméket képez. A színes reakciótermék jól detektálható, abszolút szöveti mennyisége a jelen lévő mitokondriumok funkcionáló enzimeinek abszolút számával hozható egyenes arányba. Intenzívebb festődés több funkcionáló mitokondrium jelenlétére utal, ezért a sejtek életképességének mérőszáma lehet.

A májszövetből 5 μm vastag fagyasztott metszetek készültek, melyek a forgalmazó (Sigma-Aldrich Inc., München, Németország.) által biztosított nitroblue-tetrazolium (NBT) és NADH 0,05 M-os TRIS pufferes (pH 7,6) oldatában, fénymentes körülmények között 30 percig 37°C-on kerültek inkubálásra. Desztillált vizes mosást

követően, a reakció során fel nem használt NBT reagenst aceton-oldat (30, 60, 90%) felszálló, majd leszálló koncentrációiban távolítottuk el a metszetekből, majd vízbázisú fedés következett.¹⁷⁴

A *szöveti életképesség (viabilitás) meghatározása* a reakció kvalitatív kiértékelésével, Leica Qwin Pro morfometriás szoftver (Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Németország) segítségével történt, mely egy adott szintartomány terület-nagyságának meghatározására képes. A szintartomány pontos beállítását egészséges állatok metszetei alapján a szoftvert professzionálisan használó patológus végezte. Az így kapott érték és szövetrészlet teljes területének hányadosa jól korrelál a reakcióval pozitívnak ábrázolódó mitokondriumok számával és ezen keresztül a szöveti életképességgel. Ezen hányados továbbá kiküszöböli az egyes állatok között fellépő egyéni különbségeket, így az egyéni értékek objektíven összehasonlíthatóvá válnak. Minden állat májmintájából 10 különböző látótér került véletlenszerűen kifényképezésre, majd látóterenként meghatározásra kerültek a fent ismertetett terület-hányadosok, melyeket állatonként, majd vizsgálati csoportonként átlagolva kaptuk a csoportra jellemző pozitivitási értéket, melyet az egészséges állatok NBT-pozitivitási értékének százalékában fejeztünk ki. Ez a hányados a szöveti viabilitásra utal.

3.2.9. HSP72 expresszió (Western blot analízis)

Az alább külön ki nem emelt reagensek a Sigma-Aldrichnál (München, Németország) kerültek beszerzésre. Az 5x5 mm-es fagyasztott májszövet darabokat háromszoros mennyiségű, 10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 4 mM benzamidin és 100 U/ml aprotinin (Richter Gedeon PLC, Budapest, Magyarország) tartalmú jéghideg puffer oldatban homogenizáltuk 5x10 másodpercen keresztül szonikátor (Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, IL, USA) segítségével. A májszöveti HSP72 expresszió Western blot analízise az így nyert májhomogenizátumból történt. Bradford szerint meghatároztuk a minták fehérjekoncentrációját.¹⁷⁵ Mintánként 40 µg fehérje elektroforézisét, 8%-os Na-dodecylszulfát-polyakrilamid gélen Laemmli szerint végeztük,¹⁷⁶ majd 100 V feszültség mellett 1 órán keresztül vittük át a fehérjéket nitrocellulóz membránra. A membránokat 5%-os zsírmentes száraz tejben (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) blokkoltuk 1 órán keresztül, majd további 1 órán át 1:10.000 hígítású nyúl anti-HSP72 szérummal inkubáltuk szobahőmérsékleten.¹⁷⁷ Végül 1:10.000 hígítású torma-peroxidázhoz

kapcsolt kecske anti-nyúl szekunder antitesttel (Dako A/S, Glostrup, Dánia) 1 órán át hibridizáltuk a membránt, majd felerősített kemiluminescenciás módszerrel vizsgáltuk a megjelenő csíkokat. A számszerűsítés érdekében az előhívott membránt Image software segítségével (NIH, Bethesda, MD, USA) analizáltuk. A fehérjetartalom kontrolljaként a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) gén expresszióját is vizsgáltuk egyazon membránon. A GAPDH kimutatása egér anti-GAPDH antitest (1:10.000 hígítás, 1 h; Biorad International, Saco, ME, USA) tolna-peroxidázhoz kapcsolt kecske anti-egér szekunder antitest (1:10.000 hígítás, 1 h; Dako A/S, Glostrup, Dánia) segítségével történt.

3.2.10. Statisztikai elemzés

A táblázatban a mérések eredményét a mért értékek átlagával és a standard deviáció megadásával (\pm S.D.) fejeztük ki. Az adatok statisztikai elemzését kétmintás t-próbával végeztük (Statisoft Hungary Ltd, Budapest, Magyarország), a grafikus megjelenítéshez a Microsoft Office 2007 Excel programot használtuk. Az átlagértékek közötti különbségeket $p < 0,05$ konfidencia intervallum esetén szignifikánsnak, $p < 0,01$ konfidencia intervallum esetén erősen szignifikánsnak tekintettük.

4. Eredmények

4.1. Előkísérlet: Rövid latenciájú glutamin előkezelés

Az előzőekben említésre került, hogy a műtét előtt 24 órával végzett glutamin előkezelés egy korábbi vizsgálat közvetlen folytatását képezi. E témakört érintő első kísérletben a máj I-R károsodását közvetlenül megelőzően („rövid latenciával”) végeztünk parenterális glutamin előkezelést. Tekintve, hogy a két vizsgálati protokoll jelentős eltéréseket mutat, eredményeik nem vethetők össze közvetlenül, mint az alább következő levosimendan előkezelés esetében. A kísérlet összefoglalása és a felismerések rövid bemutatása ugyanakkor ide kívánkozik, mivel hozzásegít ahhoz, hogy teljesebb kép alakulhasson ki a preoperatív glutamin-adagolás hatásairól a két kezelési időablak ismeretében.

4.1.1. Kísérleti elrendezés és előkezelés

A műtéti modell, valamint az iszkémia időtartama a „hosszú latenciájú” glutamin és a levosimendan előkezelések fent ismertetett protokolljával megegyezett. Az előkezeléshez szintén Dipeptiven® oldatot használtunk, az akkor érvényben lévő ajánláshoz igazodva 400 mg/kg dózisban, melyet 3 óra alatt infundáltunk. Az áloperált és az I-R-kontroll csoportban fiziológiás sóoldatot kaptak az állatok azonos térfogatban. 60 perces iszkémiás időt 6 óra reperfúzió követett, melynek első órájában követtük a máj mikrocirkulációjának alakulását. Az altatást a reperfúzió teljes ideje alatt fenntartottuk, majd mintavétellel egybekötve termináltuk a kísérletet.

Összesen 45 állatot osztottunk három vizsgálati csoportba (n=15/csoport). A jelen kísérletekből már ismerős áloperát csoport a műtéti stressz modellezésére szolgált. Ebben a csoportban a májiszkémia kivételével azonos módon jártunk el a műtét többi része és az előkezelés tekintetében, mint az I-R kontroll csoport esetében. Az iszkémiás-reperfúzió kontroll (I-R kontroll) csoport állatai a glutamin előkezelt (Gln) csoporthoz hasonlóan 60 perces májiszkémiát szenvedtek el, mely az alkalmazott modellnek megfelelően a máj 2/3-át érintette.

4.1.2. Eredmények

A laser Doppler flowmeter-rel detektált májáramlás kiindulási értékei (alapáramlás) tekintetében nem volt különbség az egyes csoportok között. Az iszkémia

során mind az I-R kontroll, mind a Gln-előkezelt csoportban szignifikáns áramláscsökkenést tapasztaltunk, mely az iszkémia végére elérte az adott állatnak megfelelő „0” értéket. A reperfúzió során a glutamin előkezelt csoport áramlása, szignifikáns javulást mutatott az I-R kontroll csoporttal szemben az áramlási görbe utolsó 10 percének plató maximuma és a görbe alatti terület tekintetében egyaránt (PM: $p=0,047$; RT: $p=0,041$). A szignifikáns különbség elsősorban a vizsgált időtartam második felében tapasztalható folyamatos lassú áramlásjavulásnak köszönhetően jött létre, mely glutamin előkezelés hiányában elmaradt.

A fénymikroszkópos vizsgálatnak alávetett HE-festett szövettani metszetek alapján az áloperát csoport májában károsodásra utaló eltéréseket nem találtunk. Az I-R kontroll csoportban 60 perces iszkémiát és 6 órás reperfúziót követően vénatágulat, periportális neutrofil infiltráció, valkuólás degeneráció és főleg centrilobuláris lokalizációjú fokális nekrosis jelei voltak megfigyelhetőek. A csoport átlaga 19 pontnak adódott, ami a használt szemikvantitatív pontrendszer alapján súlyos károsodásnak felel meg. A Gln csoportban csökkent a gyulladásos sejtes beszűrődés és a szöveti destrukció mértéke. Nekrosisra utaló jelek gyakorlatilag nem mutatkoztak a metszeteken, inkább apoptotikus Councilman-testeknek imponáló zsugorodott sejtek jelentek meg a súlyosabban károsodott területeken. A csoport átlagban 14 pontot ért el, mely az I-R kontroll csoporthoz képest szignifikánsan kisebb, mérsékelt szövetkárosodást jelent.

Az apoptózis és nekrosis differenciálása érdekében elsőként TUNEL-immunhisztokémia segítségével vizsgáldtunk tovább. Az áloperált csoportban tapasztalt 1,6 % megfelelő érintetlen szövetek vizsgálata során detektált adatoknak. Az I-R kontroll csoportban a nekrotikus területek kihagyásával a megszámlolt sejtek 26,5 % e mutatott TUNEL-pozitivitást, a Gln-előkezelt csoportban ez az arány valamelyest magasabb: 31,9 %. A TUNEL-pozitív sejtek lokalizációjukat tekintve az iszkémiás károsodásra jellemzően mindkét utóbbi csoportban túlnyomórészt centrolobulárisan jelentek meg. Szignifikáns különbség nem alakult ki a csoportok között, ami arra az említett tényre utal, hogy a TUNEL-reakció I-R-károsodás esetében nem specifikus markere az apoptózisnak. Az apoptózis specifikus markereként használt aktív kaszpáz-3 immunhisztokémia alapján ezzel szemben, szignifikánsan több apoptotikus sejt valószínűsíthető a glutamin-előkezelt csoportban (28,9 %), az I-R kontroll csoporthoz (15,4 %) képest.

A szérumban detektált TNF- α -szint Gln-kezelést követően alacsonyabb volt, mint az I-R kontroll csoport esetében, mely a nagyobb arányban megjelenő apoptotikus sejthalál következtében kialakuló kisebb gyulladási válaszra utalhat.

A Gln-előkezelt csoport kisebb iszkémiás-reperfúziós károsodását támasztották alá továbbá az I-R kontroll csoporttal szemben szignifikánsan alacsonyabbnak mutató szérumban nekroenzim szintek is ($p=0,045$).

A globális májszöveti antioxidáns státuszt vizsgáló luminometriás össz-scavenger kapacitás glutamin előkezelést követően szignifikánsan javult az I-R kontroll csoporthoz képest ($p=0,03$). A Gln 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 redukáló képesség tekintetében javuló tendenciát tapasztaltunk. Valószínűsítettük. A szérumban minták antioxidáns kapacitását vizsgáló paraméterek közül a redukáló képesség ($p=0,042$) és a szabad SH-csoportok ($p=0,037$) tekintetében szignifikáns javulást tapasztaltunk a Gln-előkezelt csoportban, míg a H-donor kapacitás esetében javuló tendenciát láttunk. Az antioxidáns státuszról összefoglalóan elmondható, hogy glutamin kezelést követően (részben szignifikáns) javulást tapasztaltunk az I-R kontroll csoporthoz képest.

4.1.3. Összefoglalás

A fenti eredmények alapján a „rövid latenciájú” glutamin előkezelés hatásos antioxidáns előkezelés lehet májrezekcióra kerülő betegek számára a máj I-R károsodásának mérséklése érdekében. Irodalmi adatok alapján, a szabadgyökökkel szembeni hatékonyabb védekezés befolyást gyakorolhat redox-szenzitív kinázokra, melyek a citokintermelés csökkenését vonják maguk után és apoptózis irányába terelik a sejteket.¹⁷⁸ A TNF- α szint csökkenését és az apoptózis arányának fokozódását mi is tapasztaltuk a glutamin előkezelt csoportban. Mindezek következtében csökkent a posztiszkémiás májszövet gyulladási sejtbeszűrődése (mely szintén az egyik legfontosabb szabadgyök-forrás a reperfúzió során) és szignifikánsan javult a reperfúziós májszöveti mikrocirkuláció. A májkárosodás mértékére utaló szérumban ALAT-aktivitás szintén szignifikánsan csökkent a Gln-előkezelt csoportban.

Mindezen eredményeket biztatónak tartottuk a témakör további vizsgálata szempontjából egy olyan kísérleti elrendezésben, mely a klinikai gyakorlatra vonatkozóan elvben jobban megvalósítható glutamin előkezelési protokollt vizsgál.

4.2. Kísérlet I.: Hosszú latenciájú glutamin előkezelés

4.2.1. Hemodinamika

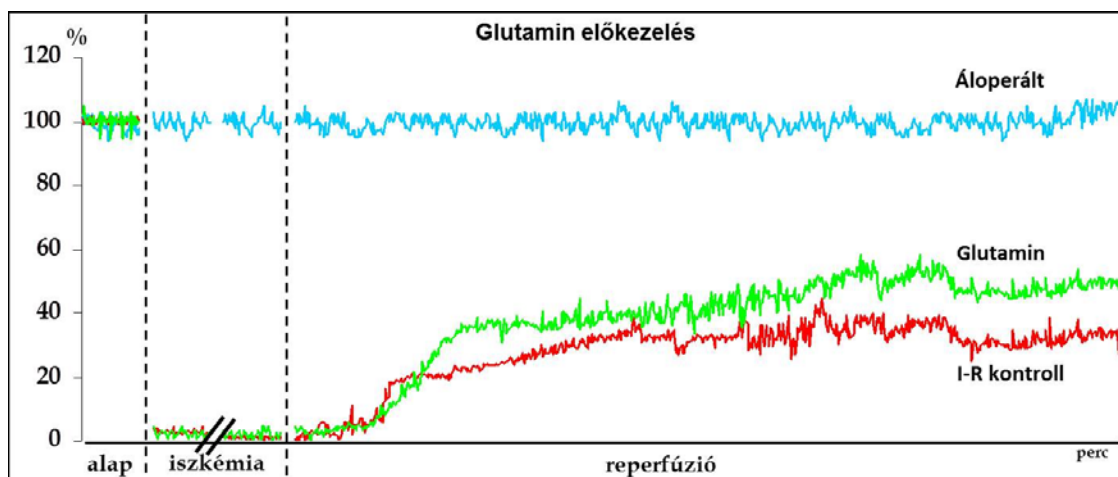
Az áloperált csoport esetében a vérnyomás és a szívfrekvencia nem mutatott számottevő ingadozást a vizsgált időszakban, tehát konstansnak mondható. Az I-R kontroll és a Gln csoportban az iszkémia előtti vérnyomásérték, valamint szívfrekvencia az áloperált állatokéhoz hasonló értéket mutatott. Az iszkémia során sem jött létre szignifikáns változás az artéria karotisban mérhető szisztémás hemodinamikai paraméterekben, bár annak kezdetén valamelyest magasabb, végén valamelyest alacsonyabb artériás középnyomás-értéket tapasztaltunk a kiindulási értékhez képest és az állatok szívfrekvenciája emelkedett. A reperfúzió kezdetén mindkét csoportban szignifikáns vérnyomásesés volt tapasztalható ($p_{I-R}=0,035$; $p_{Gln}=0,039$), melyet a szívfrekvencia további emelkedése kísért. 5-10 perces reperfúziót követően, az artériás középnyomás folyamatos lassú emelkedésnek indult. Értéke az első óra végére megközelíti, de nem éri el a kiindulási középnyomás értékét. Az I-R kontroll és Gln-kezelt csoport között e tekintetben számottevő eltérés nem mutatkozott.

4.2.2. Mikrocirkulációs változások

Az ábrázoláshoz és a statisztikai értékeléshez csoportonkénti átlagot számítottunk a módszerek között bemutatott matematikai transzformációval előkészített individuális áramlási görbékből. Az iszkémia előtti alapáramlás (baseline) tekintetében nem tapasztaltunk különbséget az egyes csoportok között. Ugyanez mondható el az iszkémiás áramlásról (biological zero) az I-R kontroll és a Gln csoportok esetében. Az áloperált állatok májának mikrocirkulációja a vizsgálat egész időtartama alatt konstansnak mutatkozott.

Az iszkémia-reperfúzió átesett csoportok reperfúziós görbéit a görbe alatti terület (RT) és a vizsgálati periódus utolsó 10 percében elért maximális áramlási plató (PM_{10}) alapján összehasonlítva, a Gln csoportban javuló tendenciát láttunk az I-R-kontroll csoporthoz képest (RT: $p=0,096$; PM_{10} : $p=0,084$). A reperfúzió első órájának végére a

vártanak megfelelően bekövetkezett a mikrocirkuláció stabilizálódása. Az eddigre elért értékek az áloperált csoport 100%-ot közelítő értékéhez képest erősen szignifikánsan alacsonyabbnak adódtak ($p < 0,01$). (12. ábra)

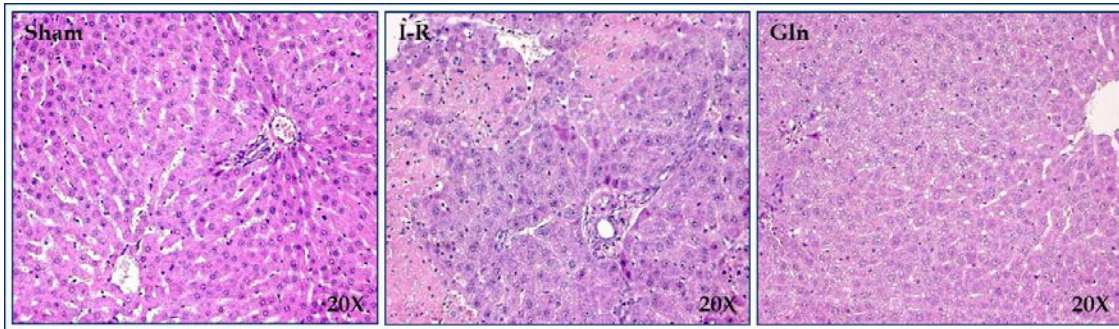


12. ábra A máj mikrocirkulációja: Kísérlet I.

A glutamin-előkezeltekt állatok korai reperfúziós mikrocirkulációja (RT: 30,8%, PM: 40,9%) javuló tendenciát mutat a kontroll csoporthoz képest (RT: 19,3%, PM: 23%), de szignifikánsan alacsonyabb marad, mint az áloperált csoportban (RT: 98,7%, PM: 97,4%).

4.2.3. Szövettani értékelés

A fent ismertetett szempontok alapján vizsgálva, az áloperált csoport szövettani metszetei károsodást nem, vagy csak igen enyhe szinuszoidális tágulat formájában mutattak. Az I-R kontroll csoportban jelentős mértékű szöveti degeneráció volt megfigyelhető, melyek fő jellemzőiként intracelluláris vakuolizációt, periportális neutrofil infiltrációt, szöveti bevérzést, valamint nekrozist figyeltünk meg. A legsúlyosabb nekrozis centrolobularisan jelent meg, mely lokalizációban az enyhébben károsodott területek esetében lipoid degeneráció volt valószínűsíthető. A számszerűsítés alapján a csoport átlaga 12,4 pontnak adódott, tehát a károsodás közepsúlyosnak véleményezhető. A glutamin előkezeltekt csoport esetében, a károsodás egyes elemei hasonlóak, de összességében kevésbé súlyosak voltak. A szöveti kép integritása megtartottabbnak mutatkozott az I-R kontroll csoporthoz képest és csökkent a gyulladással sejtes beszűrődés mértéke is. Szöveti bevérzést ebben a csoportban nem tapasztaltunk. Számszerűsítve a csoport átlaga 10,2 pont volt, mely szintén közepsúlyos károsodásnak felel meg, de szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll csoport károsodása ($p = 0,047$). (13. ábra)

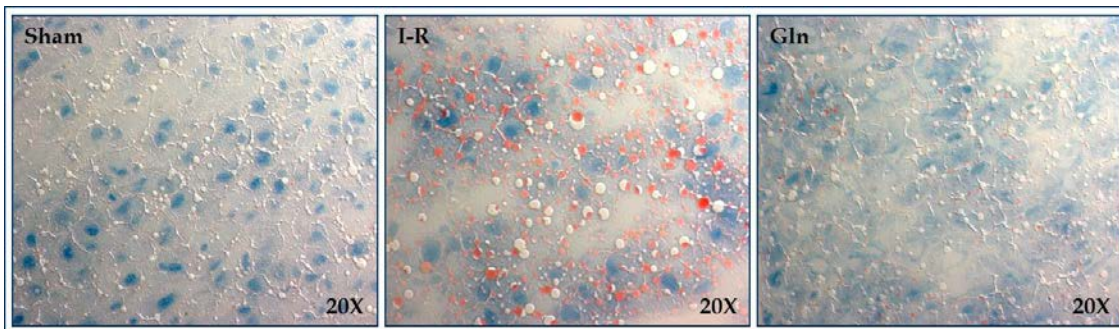


13. ábra Hematoxilin-eozin festés: Kísérlet I.

Glutamin kezelést követően kevesebb összefüggő nekrotikus terület található a májszövetben.

24 órás reperfüziót követően, mindkét I-R károsodott csoportban megjelent a nekrotikus területek demarkációja, míg apoptózis a HE-festett metszetek alapján egyik csoportra sem volt kifejezetten jellemző. Ezen a vonalon az alább következő TUNEL immunhisztokémia segítségével vizsgáltunk tovább.

A HE-festett metszetek értékelése során felmerült súlyos hepatocita károsodásra utaló zsíros degeneráció megjelenése. Ezen elváltozást igazoló lipidtartalom kimutatására Sudan IV festést végeztünk. A Gln csoportban jelentősen kisebb területek mutattak érintettséget az I-R kontroll csoporthoz képest, míg az áloperált csoportban pozitív festődést csak elszórtan láttunk. (14. ábra)



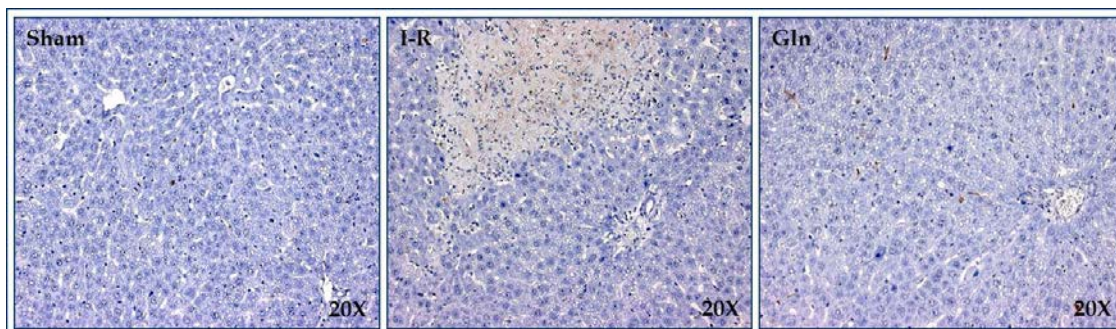
14. ábra Sudan IV festés

Glutamin előkezelést követően számottevően kevesebb pirosas festődésű lipidcsepp ábrázolódik a fagyasztott metszetekben. (háttérfestés: hematoxilin)

4.2.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

A TUNEL reakció általánosságban a DNS lánctörések kimutatására alkalmas és ennek megfelelően mutat pozitivitást májszöveti I-R károsodás esetében is, ahol a demarkálódott területekre nem kizárólag a nekrozis tiszta formája jellemző, hanem számos nekrozis – apoptózis közti átmeneti forma is megjelenik. Ennek értelmében itt a TUNEL-reakció utalhat ugyan apoptózis jelenlétére, de specifikusnak nem mondható.¹⁷⁹

A TUNEL pozitívitásnak 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, az I-R kontroll csoport és a Gln csoport között szignifikáns különbség mutatkozott ($p=0,023$). A különálló sejtekben megjelenő pozitív festődés tekintetében nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes csoportok között. (15. ábra)



15. ábra TUNEL-immunohisztokémia: Kísérlet I.

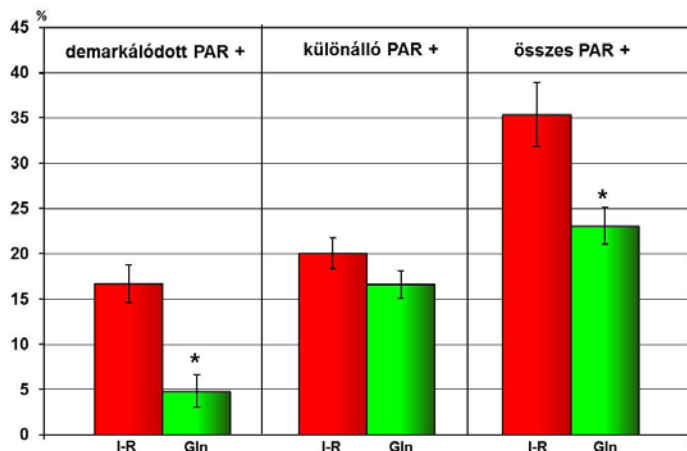
Glutamin előkezelést követően szignifikánsan kevesebb (4,2%) a demarkálódott TUNEL-pozitív területek aránya az I-R kontroll csoporthoz képest (14,9%).

E helyen szükséges megemlíteni, hogy saját vizsgálataink során is tapasztaltuk a TUNEL-reakció bizonyos mértékű megbízhatatlanságát – kiváltképp a különálló pozitívítás értékelésére nézve – tekintve, hogy ugyanezen minták egy másik kittel történt korábbi értékelése során jelentősen eltérő eredményt kaptunk. Mivel az itt bemutatott adatok a DNS-károsodást indirekt módon szintén jelző PAR-immunohisztokémiai reakcióval is korrelálnak, ezeket tartjuk elfogadhatónak.

A mintákban detektált poly-ADP-ribóz polimeráz (PARP) aktivitás a lokális májkárosodás egy másik aspektusára világít rá. A markánsan pozitív festődés az esetben jelenik meg, ha a károsodott DNS-t javító enzimszisztéma „túlzott” aktiválódást mutat. Ez esetben a fokozott lokális ATP-felhasználás és romló energetikai egyensúly következtében további szövetkárosodás kialakulásával kell számolni. A PARP-túlaktiválódás jellemzően súlyos DNS-károsodás következménye, ezért a jelenség kialakulásával I-R esetében is számolhatunk.

A TUNEL-reakcióhoz hasonlóan, PAR-immunohisztokémia esetében is demarkálódott területeken, illetve elkülönült sejtekben megjelenő pozitív festődés különíthető el. A Gln-kezelt csoportban ezen reakcióval is szignifikánsan kisebb volt a

demarkálódott területek mérete ($p=0,027$). Az áloperált csoportban a különálló sejtekben is igen ritkán jelent meg PARP-pozitivitás, míg az I-R károsodáson átesett két



16. ábra PAR-immunhisztokémia: Kísérlet I.

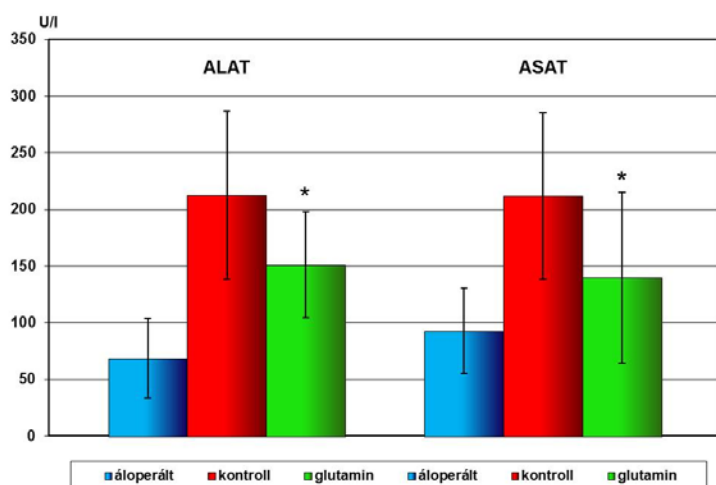
A Glutamin-előkezelt csoportban szignifikánsan csökken a PARP-reakcióval pozitívan festődő demarkálódott területek mérete az I-R kontroll csoporthoz képest (4,8% vs.16,9%). A különálló sejtekben megjelenő PAR-pozitivitás csökkenő tendenciát mutat (16,6% vs. 20,1%).

csökkent a glutamin előkezelt csoportban ($p=0,013$). (16. ábra)

A PAR-pozitív területek mérete jól korrelál a TUNEL reakcióval kapott eredményekkel.

4.2.5. Nekroenzimek

Az alanin-aminotranszferáz szérumszintje a glutamin előkezelt és az I-R kontroll csoportban egyaránt erősen szignifikáns emelkedést mutatott az áloperált csoporthoz képest ($p=0,0004$, illetve $p=0,00009$). A Gln csoportban mindazonáltal



17. ábra Szérumszintek nekroenzimek: Kísérlet I.

szignifikánsan alacsonyabb értéket ért el, mint az I-R kontroll csoport esetében ($p=0,042$).

csoport esetében nagyobb gyakorisággal mutatkozott. A Gln csoport esetében előfordulása, nem statisztikailag szignifikáns mértékben, de alacsonyabb arányú volt az I-R kontroll csoporthoz képest ($p=0,166$). A vizsgált teljes szövetrész százalékában kifejezett összes szöveti PARP aktivitás – mit a fentiek összegzése – mindazonáltal szignifikánsan

Az aszpartát-aminotranszferáz szérumszintje szintén szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott glutamin előkezelést követően, mint az I-R kontroll csoportban

* $p<0,05$

($p=0,044$). Figyelemre méltó, hogy amennyiben a Gln és a Sham csoportot vetettük össze, aktivitása nem emelkedett szignifikáns mértékben a Gln csoportban ($p=0,112$). (17. ábra)

4.2.6. Antioxidáns státusz

A globális antioxidáns státuszt leíró paraméterek közül a *luminometriás össz-scavenger kapacitás* az érzékenyebb, ezért ezzel a módszerrel 24 órás reperfúziót követően párhuzamosan vett szérum és májhomogenizátum mintákat egyaránt megvizsgáltunk. Azt tapasztaltuk, hogy a kibocsátott fényintenzitás, glutamin előkezelés hatására mind a szérum-, mind a májhomogenizátum-mintákban szignifikánsan alacsonyabb volt az I-R kontroll csoporthoz képest. Az RLU értékek közötti különbség mértéke szérum esetében szignifikánsnak ($p=0,0496$), míg a májhomogenizátumban mérve erősen szignifikánsnak ($p=0,0003$) mutatkozott.

A máj antioxidáns státuszának további vizsgálatára homogenizátum mintákban végeztünk három különböző spektrofotometriás mérést, melyek más-más aspektusra világítanak rá. Összefoglalóan elmondható, hogy glutamin előkezelés hatására szignifikánsan javult a szöveti redox homeosztázis. Az I-R kontroll csoporthoz képest a Gln csoportban, erősen szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető a *szabad SH-csoportok* koncentrációjában ($p=0,0001$). A *H-donor kapacitás* itt az áloperált csoportban mért értéket közelítette ($p=0,7675$) és szignifikánsan magasabb volt, mint az I-R kontroll csoport esetében ($p=0,0205$). A májszöveti *redukáló képesség* nem mutatott ugyan szignifikáns javulást az I-R kontroll csoporthoz képest ($p=0,0878$), de szintén az áloperált csoportban mért értéket közelítette ($p=0,9082$), míg előkezelés nélkül a Sham-hez képest csökkent értéket adott. (3. táblázat)

3. Táblázat Antioxidáns vizsgálatok: Kísérlet I.

MÉRÉS	MIINTA	VIZSGÁLATI CSOPORTOK			„p”	
		Sham	I-R	Gln	ÉRTÉK	
Luminometriás össz-scavenger kapacitás (RLU)	szérum	564219,9 ± 230552,1	2698404,9 ± 1300564,1	1102854,5 ± 362887,8	0,0496	
	máj	545082,3 ± 258924,5	4806672,5 ± 647777,5	1906994,0 ± 206511,0	0,0003	
S P E C T R O F O T O M E T R I A	redukáló képesség ($\mu\text{mol AS/g prot}$)	máj	385,4 ± 47,2	320,6 ± 55,9	382,1 ± 41,9	0,0878
	szabad SH-csoportok (mmol/l)	máj	0,069 ± 0,013	0,026 ± 0,005	0,079 ± 0,011	0,0001
	H-donor kapacitás (gátlás%)	máj	42,2 ± 5,0	34,3 ± 4,5	41,4 ± 2,1	0,0205

A „p” érték minden mérés esetében az I-R kontroll és a Gln csoport statisztikai összevetésének eredményét mutatja. A szignifikáns különbségeket vastagon szedtük és piros keretessel emeltük ki.

4.3. Kísérlet II.: Levosimendan előkezelések

4.3.1. Hemodinamika

Az egyszerű áloperált csoportban, az artéria karotiszban mért vérnyomás értékek, valamint a szívfrekvencia nem változott számottevően a monitorozott időszakban. Levosimendan adagolás során fokozatos szisztolés és diasztolés vérnyomáscsökkenés, valamint a szívfrekvencia emelkedése volt megfigyelhető az egyszerű áloperált, illetve a glukóz infúzióban részesülő kontroll állatokhoz képest. Az előkezelés végére, mindkettő szignifikánssá vált ($p_{RR}=0,044$, $p_{HF}=0,049$). A „rövid latenciával” előkezelt áloperált csoportban (A/1), az előkezelést követően monitorozott további 2 óra során – tehát a lapatotómia idején – ez a különbség megtartott maradt.

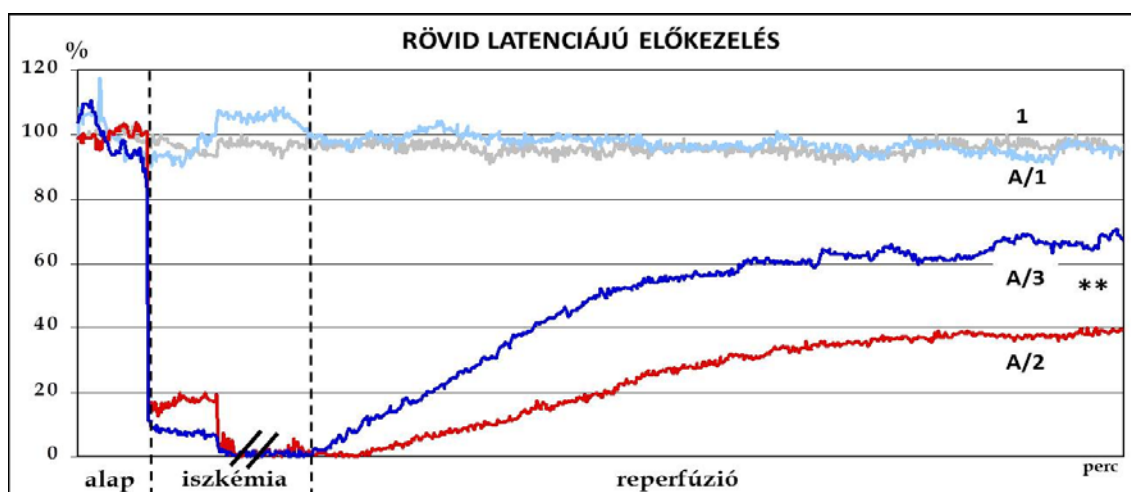
A 60 perces iszkémia alatt a vizsgált hemodinamikai paraméterek egyik csoportban sem változtak szignifikánsan az azt közvetlenül megelőző értékekhez képest. A reperfúzió kezdetén a kontroll csoportokban szignifikáns vérnyomásesés ($p_A=0,047$; $p_B=0,033$) és reflektórikus tachikardizálódás volt megfigyelhető. 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 iszkémia előtti értékeket. A „hosszú latenciájú” I-R kontroll csoport (B/2) hemodinamikai paraméterei

valamelyest rosszabbnak adódtak, mint a „rövid latenciával” előkezelt kategória azonos csoportjában (A/2) mért értékek, de a különbség statisztikailag nem vált szignifikáns.

A levosimendan kezelt csoportokban a reperfúzió kezdetén tapasztalható vérnyomásesés nem volt szignifikáns a mikroklipp felhelyezése előtti értékekhez képest és a reperfúzió első órájának végére ismét elérte azt. A különböző latenciájú előkezelések tekintetében ezen dinamikát illetően nem mutatkozott különbség, de fontos megemlíteni, hogy a „hosszú latenciájú” előkezelés esetében (B/3) a közvetlenül iszkémia előtt mért vérnyomásértékek megközelítették az állatok kiindulási vérnyomását, tehát – nem szignifikánsan ugyan – de magasabbak voltak ($p=0,11$), mint a „rövid laticával” előkezelt (A/3) csoport esetében. Ez korrelált a két előkezelési ablak áloperált csoportjai között mutatkozó vérnyomáskülönbséggel is, ahol a 24 órával a műtét előtt levosimendan kezelésben részesült csoport (B/1) vérnyomásértékei a kezelés előtti értékekhez közelítettek a laparatómia alatt, míg a közvetlenül műtétet megelőző előkezelés (A/1) esetében a szignifikáns különbség megtartott.

4.3.2. Mikrocirkulációs változások

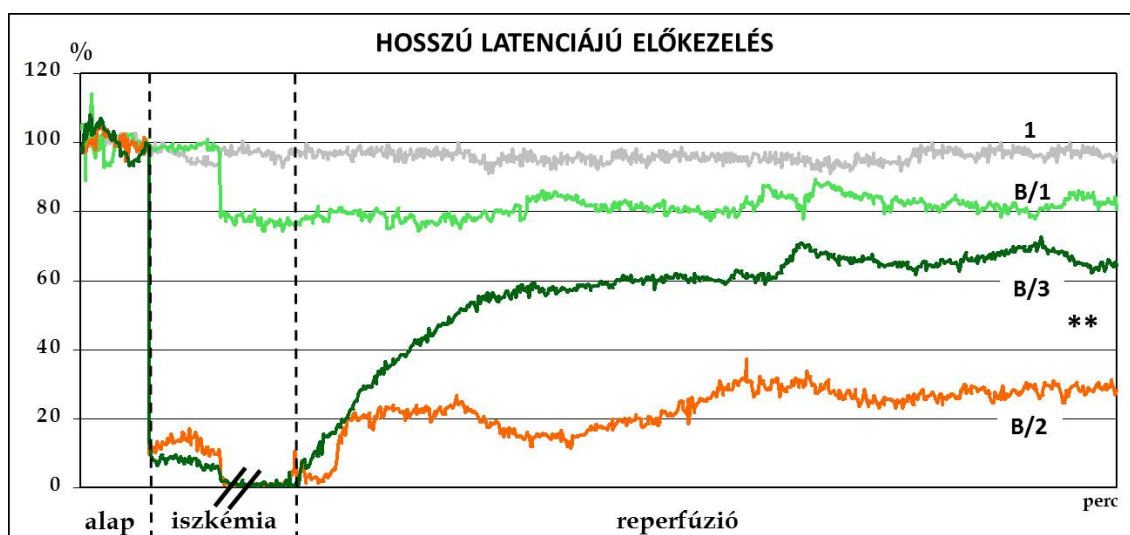
A reperfúzió első órájának csoportok szerint átlagolt áramlási görbéi alapján, mind a műtét előtt közvetlenül, mind a 24 órával korábban végzett levosimendan előkezelés erősen szignifikáns javulást eredményezett a májszövet mikrocirkulációjában a reperfúziós terület (RT: $p_A=0,0012$; $p_B=0,0010$), valamint az áramlási plató maximum (PM₁₀: $p_A=0,0019$; $p_B = 0,0007$) tekintetében a megfelelő I-R kontroll csoporthoz képest. (18.ábra)



18. ábra A máj mikrocirkulációja: Kísélet II, Rövid latenciájú levosimendan előkezelés

A levosimendan-kezelt csoportban (A/3) szignifikánsan javult a máj korai reperfúziós mikrocirkulációja az I-R kontroll csoporthoz képest (A/2). (RT: 47,2% vs. 23,9%; PM: 66,8% vs. 37,9%)

A „hosszú latenciával” előkezelt áloperált állatok (B/1) esetében a mikrocirkuláció alacsonyabb szinten stabilizálódott, mint a másik két áloperált csoportban. Az áramlás csökkenése statisztikailag egyik vizsgált paraméter tekintetében sem volt szignifikáns, a jelenség mindazonáltal utalhat az egész kategóriára jellemző nagyobb műtéti megterhelésre is. Ezen megfigyeléssel összhangban áll a „hosszú latenciájú” kategória I-R kontroll csoportjának (B/2) alacsonyabb RT és PM értéke a „rövid latenciájú” kezelésben részesült azonos csoporthoz (A/2) képest. Érdekes megfigyelni, hogy a „hosszú latenciával” kezelt kategóriában a levosimendan csoport (B/3) mikrocirkulációja tendenciájában még kifejezettebben javult az I-R kontroll csoporthoz képest. (19. ábra)



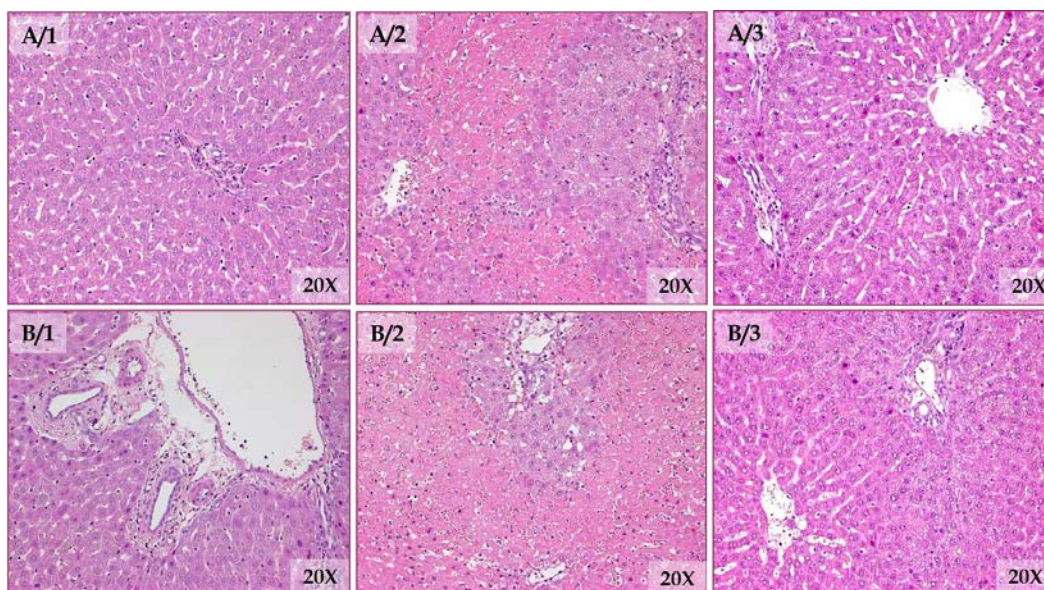
19. ábra A máj mikrocirkulációja: Kísérlet II, Hosszú latenciájú levosimendan előkezelés

A levosimendan kezelés (B/3) szignifikáns javulást eredményezett a hepatikus mikrocirkulációban az I-R kontroll csoporthoz (B/2) képest. (RT: 55,6% vs. 22,8%; PM: 67,1% vs. 28,4%) A 24 órával korábban előkezelt, majd áloperált csoport (B/1) áramlása a vizsgált időtartam végére alacsonyabb, mint az egyszerű áloperált állatok esetében (1). (RT: 81,3% vs. 95,7%; PM: 81,8% vs. 95,6%)

4.3.3. Szöveti értékelés

A „rövid latenciával” előkezelt áloperált (A/1) csoportban, az egyszerű áloperált állatokhoz (1) hasonlóan, normál szöveti kép volt megfigyelhető, helyenként enyhe szinusoidális tágulattal. Az I-R kontroll (A/2) csoportban 24 órás reperfüziót követően, összefüggő területeket érintő, jelentős mértékű nekrosis jött létre – lokalizációját tekintve főleg az átmeneti (II.) zónában. Jellemző volt ezen területek kifejezett leukociták beszűrődése és helyenként bevérvések is mutatkoztak (11,6 pont). A levosimendannal kezelt állatok (A/3) esetében ehhez képest látványosan kevesebb,

karakterét tekintve inkább fokális nekrotikus terület mutatkozott a reperfúzió 24. órájának végén. Ennek megfelelően szöveti bevézés nem volt jellemző és a leukocitás beszűrődés is kisebb mértékű volt (7,8 pont). Az iszkémia-reperfúziót 24 órával megelőző előkezelést követően az áloperált (B/1) csoportban kissé fokozottabb szinuszoidális tágulat volt megfigyelhető a másik két áloperált csoporthoz képest és helyenként perivaszkuláris ödéma is megjelent. A károsodás mértéke mindazonáltal ezen csoportban is enyhének mondható (4,8 pont). A „hosszú latenciájú” I-R kontroll (B/2) csoport metszeteiben nagy összefüggő területeket érintő, számos helyen bevézett, sokszor pánlobularis nekrozis mutatkozott, számottevő leukocitás beszűrődés kíséretében (12,3 pont). A kategória levosimendan kezelt (B/3) csoportjában egy-egy nagyobb kiterjedésű nekrotikus terület mellett inkább fokálisan megjelenő sejtelhalás volt jellemző. Az I-R kontroll állatokhoz képest kisebb mértékű szöveti bevézés és enyhébb gyulladással kísért beszűrődés alakult ki, bár a közvetlenül műtét előtt előkezelt kategória azonos csoportjával összevetve, itt is valamelyest súlyosabb a károsodás mértéke (7,9 pont).



20. ábra Hematoxin-eozin festés: Kísélet II.

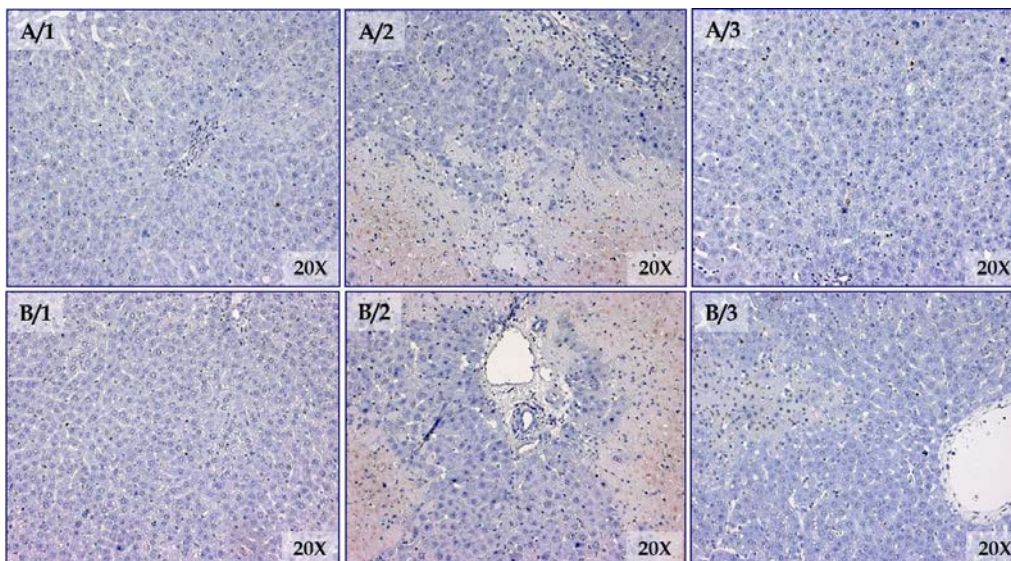
Levosimendan kezelést követően (A/3, B/3) csökken a májszöveti károsodás mértéke az azonos kategória I-R kontroll csoportjához képest (A/2, B/2). A B/1 áloperált csoportban enyhe károsodás mutatkozik a normál szöveti képhez képest (A/1).

A szubjektíven jelentősnek imponáló különbségek ellenére, az értékeléshez használt szemikvantitatív pontrendszer alapján, a károsodás mértéke iszkémia-reperfúziót követően minden csoportban közepsúlyosnak adódott, bár az I-R kontroll

csoporthoz ezen besorolás felső, míg a levosimendan kezelt csoportok ennek alsó határához közelítettek és a károsodás típusa is figyelemreméltó eltérést mutatott. Statisztikailag a „hosszú látenciával” előkezelt csoportok között mutatkozott szignifikáns különbség a levosimendan-kezelt csoport javára ($p_B=0,021$), míg a közvetlenül műtét előtt adott levosimendan esetében javuló tendenciát láttunk ($p_A=0,089$). (20. ábra)

4.3.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok

TUNEL immunfestéssel vizsgáltuk a sejtmagban előforduló DNS-töredezettség mértékét 100x-os fénymikroszkópos nagyítás mellett. Az I-R károsodott csoportokban különböző kiterjedésben, de mindenütt megjelentek diffúz pozitivitást mutató területek, melyek elhelyezkedésüket és morfológiájukat tekintve a hematoxin-eozin-festett metszetekben látott nekrotikus területekkel mutattak kongruenciát. Mind a „rövid”, mind a „hosszú latenciájú” levosimendan előkezelést követően megfigyelhető volt ezen demarkálódott területek szignifikáns méretcsökkenése az adott kategória I-R kontroll csoportjával szemben ($p_A=0,05$; $p_B=0,034$). Az áloperált állatok esetében demarkációra utaló festődést nem találtunk. Különálló TUNEL-pozitivitást mutató sejtek a műtét előtt 24 órával előkezelt (B/1) csoportban nagyobb arányban jelentek meg a másik két áloperált csoportra jellemzőnél. Előfordulásuk továbbá minden I-R károsodást elszenvedett csoportban szignifikáns mértékben emelkedett az áloperált csoportokhoz képest. Ezen belül a levosimendan-kezelt állatok mintáiban voltak jelen nagyobb arányban, mely különbség a „hosszú latenciával” előkezelt csoportok esetében statisztikailag is szignifikánsnak adódott ($p_A=0,09$; $p_B=0,04$). (21. ábra)



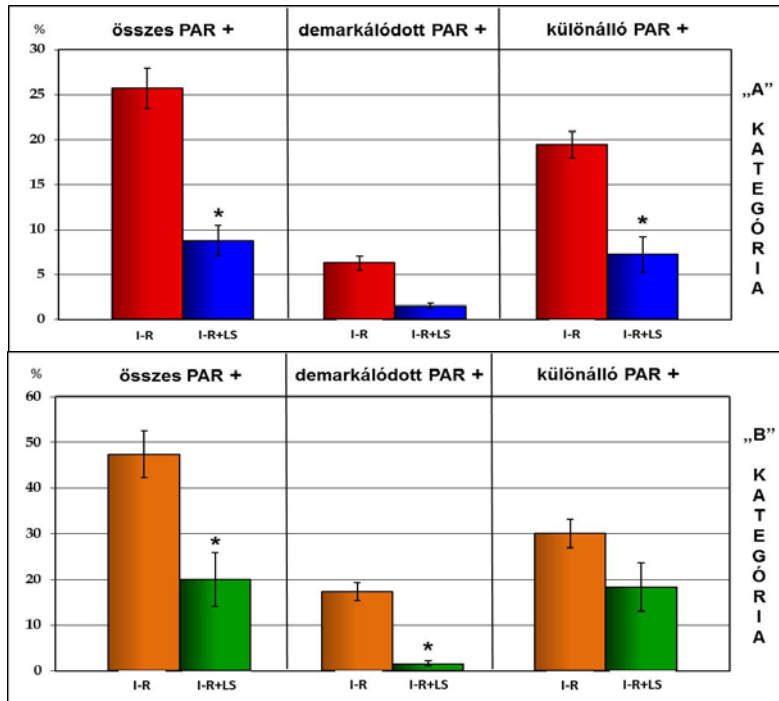
21. ábra TUNEL-assay: Kísérlet II.

Levosimendan kezelést követően (A/3, B/3) az összefüggő TUNEL-pozitivitást mutató területek mérete szignifikánsan csökkent mindkét időablak esetében (A: 1,2% vs. 5,7%; B: 1,2% vs. 15,7%). A különálló TUNEL-pozitivitást mutató sejtek aránya ugyanakkor növekedett (A: 9,5‰ vs. 5,4‰; B: 13,7‰ vs. 6,2‰)

A PAR immunfestés a PARP enzim produktumát festi meg, ezért utal annak aktivitására. Pozitív festődés ebben az esetben is az összefüggő károsodást mutató területeken, illetve azok széli részén, valamint különálló sejtekben jelenhet meg. PARP aktivitás szempontjából csak az I-R károsodott csoportok összehasonlítását végeztük, mivel az áloperált állatokban aktiválódása várhatóan nem számottevő mértékű (lásd I. kísérlet). Mindkét kezelési időablak esetén, az összes PAR-pozitivitás szignifikáns csökkenését láttuk a levosimendan kezelt csoportokban ($p_A=0,02$; $p_B=0,04$). Különkülön értékelve a demarkálódott területekben, illetve különálló sejtekben megjelenő pozitív festődést, érdekes különbséggel találkoztunk a két időablak eredményei között. Levosimendan adását követően a „rövid latenciával” előkezelt kategóriában a különálló sejtekben megjelenő PAR-pozitivitás ($p_A=0,02$; $p_B=0,15$), míg a „hosszú latenciával” előkezelt kategóriában a demarkálódott területek mérete csökkent szignifikáns mértékben ($p_A=0,06$; $p_B=0,04$). Ennek háttérében a 24 órával korábban előkezelt csoportokban manifesztálódó súlyosabb károsodás állhat, mely levosimendan kezelést követően kevésbé kifejezett. Ha az alább következő diagramokon a két időablak azonos csoportjait hasonlítjuk össze megfigyelhető, hogy az összes PAR-pozitivitás és ezen belül a demarkálódott területek mérete egyaránt jelentősebb emelkedést mutat a „hosszú latenciájú” I-R kontroll csoport, mint a levosimendan-kezelt csoport esetében. A

különálló PAR-pozitivitás mértéke ugyanakkor párhuzamosan emelkedik a kezelt és nem-kezelt csoportban a két időablak viszonylatában. (22. ábra)

Összegezve a két immunfestési eljárás eredményét megállapítható, hogy a



22. ábra A+B PARP-immunhisztokémia: Kísérlet II

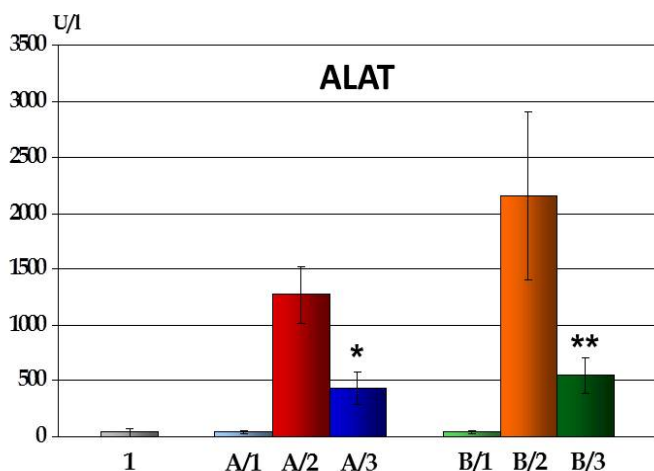
A demarkálódott PAR-pozitív területek mérete kifejezettebb emelkedést mutat a két kezelési időablak között I-R kontroll csoportok esetében (A/2: 6,3%; B/2: 17,3%), mint a levosimendan-kezelt csoportokban (A/3: 1,5%; B/3: 1,6%).

demarkálódott területek aránya mindkét módszerrel hasonlóan adódott és az összefüggő területeket érintő sejtelhalást reprezentálja. A különálló pozitivitás a két módszer alapján látszólag ellentétes irányba változott, de az eltérő mértékegységre és jelentésre való tekintettel ez közvetlenül nem összehasonlítható. Utalhat ugyanakkor arra, hogy 24 órás reperfüziót követően a PAR-festés nagyobb

érzékenységgel jelzi a folyamatban lévő sejtkárosodást, illetve megjeleníti azokat a sejteket, melyekben aktív a DNS-repair. TUNEL-reakcióval ugyanakkor a már elhalt sejtek festődnek meg. Ez összhangba hozható azzal a megfigyeléssel is, hogy hematoxin-eozin festés alapján a levosimendan-kezelt csoportokban láttunk nagyobb arányban pontszerű nekrozist az I-R kontroll csoportokhoz képest.

4.3.5. Nekroenzimek

Az alanin-aminotranszferáz szérumszintje az áloperált csoportok esetében a



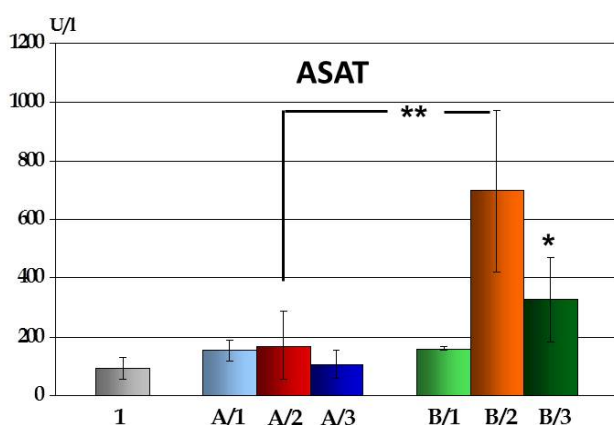
23. ábra Szérum ALAT: Kísérlet II.

A levosimendan-kezelt csoportok (A/3, B/3) májkárosodása szignifikánsan kisebb mértékű, a kontroll csoportokhoz képest (A/2, B/2).

normál tartományon belül mozgott, míg I-R károsodást követően szignifikánsan magasabb értékeket ért el. Szérumban mért aktivitása, levosimendan kezelést követően mind a két kezelési időablakban szignifikánsan csökkent a

megfelelő I-R kontroll csoportokhoz képest ($p_A=0,02$; $p_B=0,005$). (23. ábra)

Az aszpartát-aminotranszferáz szérumszintje minden csoportban a meghaladta a normál értéket. Feltűnő, hogy a műtét előtt 24 órával előkezelt I-R károsodott csoportokban elért szérumszintek jóval magasabbnak adódtak a „rövid latenciával” előkezelt csoportokhoz képest. A két kezelési időablak I-R kontroll csoportja között az ASAT-értékekben statisztikailag erősen szignifikáns különbség mutatkozott ($p_2=0,009$). Ez szintén utalhat a 24 órával korábban előkezelt csoportok nagyobb szisztémás károsodására, mely az előzőekben bemutatott eredmények alapján is felmerült. Ezzel



24. ábra Szérum ASAT: Kísérlet II.

A szérum ASAT értékek alapján a műtét előtt 24 órával előkezelt csoportokban (B) az I-R károsodás számottevően súlyosabb.

összhangban a két időablak levosimendan-kezelt csoportja között is szignifikáns különbség jött létre ($p_3=0,02$). A „hosszú latenciájú” levosimendan előkezelt követően (B/3) kialakuló ASAT-emelkedés ugyanakkor szignifikánsan alacsonyabb a kategória I-R kontroll csoportjában tapasztaltnál képest ($p_B=0,04$). (24. ábra)

4.3.6. Antioxidáns státusz

A különböző mérési technikákkal a redox-homeosztázis más-más aspektusát kívántuk vizsgálni. Globális paraméternek leginkább a *luminometriás össz-scavanger kapacitás* meghatározása tekinthető, mely érzékenységét illetően kitűnik a többi eljárás közül. A vártnak megfelelően mind szérumban, mind májhomogenizátumban mintákból végzett vizsgálatok eredményei a szabadgyök koncentráció szignifikáns emelkedésére utalnak az I-R károsodott csoportokban az áloperált csoportokhoz képest. Az I-R kontroll csoportokkal összevetve, levosimendan adását követően a májhomogenizátumban mérhető szabadgyökök mennyisége mind a két kezelési időablakban csökkenő tendenciát mutat ($p_A=0,06$; $p_B=0,07$). A szérumban mintákban „hosszú latenciájú” előkezelés esetében szintén csökkenő tendenciát látunk ($p_B=0,06$), míg a „rövid latenciájú” előkezelést követően szignifikánsan jobb antioxidáns kapacitás valószínűsíthető a levosimendan csoportban az I-R kontroll csoporthoz képest ($p_A=0,03$).

A szintén globális antioxidáns státuszra utaló *redukáló képesség* értéke a szérumban levosimendan kezelést követően szignifikánsan javult az I-R kontroll csoportokhoz képest mindkét időablakban ($p_A=0,01$; $p_B=0,03$). A májhomogenizátum minták vonatkozásában a javulás csak a „rövid latenciával” adott előkezelésre nézve mutatkozott szignifikánsnak ($p_A=0,01$; $p_B=0,06$).

A fehérjékhez kötött antioxidáns tulajdonságra utaló *szabad SH-csoportok* esetében a májhomogenizátum mintákban tapasztaltunk szignifikáns javulást a levosimendan-kezelt csoportokban az I-R kontroll csoportokhoz képest ($p_A=0,02$; $p_B=0,03$), míg a szérumban mintákban javuló tendenciát láttunk ($p_A=0,06$; $p_B=0,07$).

A fehérjétől független antioxidáns kapacitást jelző *H-donor aktivitás* „rövid latenciájú” levosimendan kezelést követően mutatott szignifikáns javulást a szérumban ($p_A=0,04$; $p_B=0,08$), míg a májhomogenizátumban, illetve a „hosszú latenciájú” kezelés esetében javuló tendenciát láttunk ($p_A=0,06$; $p_B=0,07$). (4. táblázat)

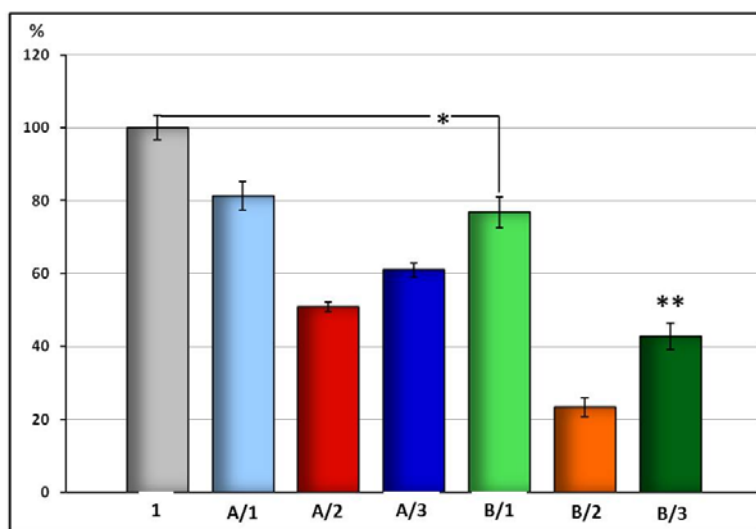
4. Táblázat Antioxidáns vizsgálatok összefoglalása: Kísérlet II.

MÉRÉS	MINTA	VIZSGÁLATI CSOPORTOK							„p” ÉRTÉK	
		„RÖVID LATENCIÁJÚ”			„HOSSZÚ LATENCIÁJÚ”					
		1	A/1	A/2	A/3	B/1	B/2	B/3		
Luminometriás össz-scavenger kapacitás (háttér %)	szérum	4,38 ± 1,68	4,40 ± 2,15	12,07 ± 2,77	8,51 ± 2,62	3,77 ± 3,03	9,69 ± 2,35	6,71 ± 3,74	A: 0,03 B: 0,06	
	máj	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	A: 0,06 B: 0,07	
S P E C T R O F O T O M E T R I A	redukáló képesség	szérum (µmol AS/ml)	-	0,38 ± 0,23	0,54 ± 0,13	0,79 ± 0,20	1,13 ± 0,53	0,66 ± 0,34	1,08 ± 0,13	A: 0,01 B: 0,03
		máj (µmol AS/g prot)	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	A: 0,01 B: 0,06
	szabad SH-csoportok (mmol/l)	szérum	-	0,043 ± 0,018	0,023 ± 0,007	0,030 ± 0,007	0,045 ± 0,006	0,023 ± 0,009	0,034 ± 0,019	A: 0,06 B: 0,07
		máj	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	A: 0,02 B: 0,03
	H-donor kapacitás (gátlás%)	szérum	-	64,01 ± 8,95	40,66 ± 9,38	51,28 ± 7,03	58,01 ± 9,20	38,75 ± 8,02	47,83 ± 11,05	A: 0,04 B: 0,08
		máj	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	A: 0,06 B: 0,07

A „p” érték alatt minden mérés esetében az I-R kontroll és a megfelelő levosimendan-előkezelt csoport statisztikai összehasonlításának eredményét mutatjuk be. A szignifikáns különbséget vastag betűs kiemelés és piros keretelés jelöli.

4.3.7. NADH-tetrazolium enzimhisztokémiai reakció

Az NADH-tetrazolium enzimhisztokémiai reakció, vagy NBT-enzimhisztokémia, a szöveti életképességre utal a funkcionáló mitokondriumok kimutatásán keresztül. Mivel korábbi vizsgálataink alapján az egyszerű áloperált állatokban megjelenő NBT-



25. ábra NBT-enzimhisztokémia: Kísérlet II.

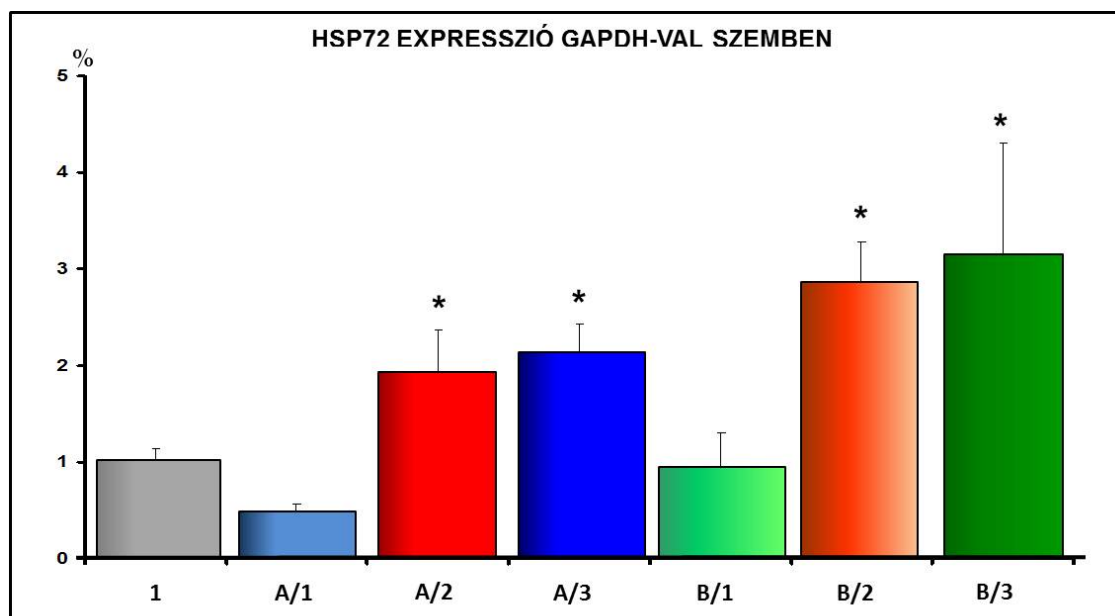
Az egyszerű áloperált csoportot (1) tekintve 100%-nak, a műtét előtt 24 órával kezelt áloperált csoport (B/1) festődése szignifikánsan csökken (76,8%). Ezen időablakban levosimendan kezelést követően (B/3: 42,9%) szignifikánsan kisebb csökkenést látunk az I-R kontroll csoporthoz (B/2: 23,4%) képest.

pozitívias nem különbözik az egészséges állatok értékeitől, a jobb szemléltethetőség érdekében ezen csoport százalékában adtuk meg a többi vizsgálati csoport értékeit. A „hosszú latenciával” előkezelt áloperált (B/1) csoportban szignifikánsan alacsonyabb arányban voltak jelen funkcionáló mitokondriumok, mint az

egyszerű áloperált állatok esetében ($p=0,024$), míg a „rövid latenciájú” áloperált (A/1) csoport csak csökkenő tendenciát mutatott ($p=0,104$). Ezen túlmenően, minden „hosszú latenciájú” I-R károsodott csoport szignifikánsan alacsonyabb festődést mutatott az azonos kezelésben részesült „rövid latenciájú” csoporthoz képest ($p_2=0,0001$; $p_3=0,015$). Ez direkt módon utal a csökkent májszöveti viabilitásra a „hosszú latenciával” kezelt csoportokban, így alátámasztja az eddigiek alapján is felmerülő súlyosabb szövetkárosodást ezen kategóriában. Az I-R károsodott csoportokat összehasonlítva azt találtuk, hogy a műtét előtt 24 órával adott levosimendan kezelést követően (B/3) szignifikánsan nőtt az NBT-pozitív területek aránya ($p_B=0,003$) az I-R kontroll csoporthoz képest (B/2), míg a közvetlenül műtét előtt alkalmazott levosimendan előkezelés esetében (A/3) javuló tendencia volt megfigyelhető ($p_A=0,14$). (25. ábra)

4.3.8. HSP72 expresszió

Iszkémiás prekondicionálás esetében a HSP72 részt vesz a hepatoprotektív hatás létrehozásában. Az iszkémia-reperfúzió átesett csoportok mindegyikében a HSP72 expresszió szignifikáns – áloperált csoportokhoz képest 2-3x-os – emelkedését tapasztaltuk. A levosimendan kezelés sem önmagában, sem I-R károsodás előtt alkalmazva nem eredményezett változást a HSP72 expresszió mértékében. (26. ábra)



26. ábra HSP72 expresszió: Kísérlet II.

Az áloperált csoportokhoz képest minden I-R károsodáson átesett csoportban szignifikánsan nő a GAPDH-val szemben vizsgált HSP72 expresszió mértéke.

5. Megbeszélés

Az iszkémiás-reperfúziós károsodás számos sebészi és nem-sebészi kórképpel összefüggésbe hozható, napjainkban szerteágazóan vizsgált patofiziológiai jelenség. Mérséklésére több módszert próbáltak alkalmazni jelentősebb siker nélkül, míg a Murry által közölt prekondicionálás⁷⁷ alapvető változást nem hozott. Az ennek hátterében álló feltételezett endogén védelmi mechanizmus vizsgálata új lendületet adott mind az iszkémiás-reperfúziós szindróma mélyebb megértésére, mind a potenciális kezelési lehetőségek megismerésére irányuló kutatásoknak. Ennek ellenére, igazán hatékony módszerek csak korlátozott számban ismertek, és még ennél is kevesebb alkalmazható ténylegesen a betegágy mellett, a mindennapi klinikai gyakorlatban.⁹

A máj I-R károsodása transzplantáción túlmenően megjelenik portális kirekesztésben operált kiterjedt májrezekciók, valamint traumás májléziók ellátása során. Hozzájárul továbbá szепtikus betegek állapotának súlyosbodásához, illetve számottevően rontja károsodott májfunkcióval műtetre kerülő betegek posztoperatív kimenetelét is. Szerteágazó jelentőségére való tekintettel számottevő igény áll fenn a hepatoprotektív intervenciók palettájának bővítésére, az adott klinikai szituációnak leginkább megfelelő technika biztosítása érdekében.

Az I-R károsodás minden részlete a mai napig nem ismert, de összefoglalóan a következő sarokpontokkal jellemezhető: hipoxiás sejtkárosodás, intracelluláris kalcium felszaporodás és sejtduzzadás, reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) direkt toxikus, valamint lokális és generalizált gyulladást indukáló szerepe, illetve sejtgyulladásos válaszreakció.¹⁸⁰ Bár az alapmotívumok azonosak, maga az I-R károsodás igen eltérő megjelenésű lehet az egyes szervekben, szövetekben. A máj esetében kiemelkedő szerephez jut: (1) az oxigénellátás helyreállításával összefüggésben megjelenő masszív szabadgyök (ROS) termelés, mellyel a szöveti antioxidánsok egy bizonyos határon túl nem tudják felvenni a harcot és a máj antioxidáns kapacitása kimerül,⁴² (2) valamint a nagy számban jelen lévő rezidens szöveti makrofágok (Kupffer sejtek) aktivációja. Az előbbi indirekt, az utóbbi direkt úton vezet jelentős mennyiségű proinflammatorikus citokin (TNF- α , IL-1, IL-8) felszabadulásához.¹⁸¹ A szabadgyökök, citokinek, valamint proteázok túltermelődése és felszabadulása a parenchimális és nem-parenchimális sejteket egyaránt károsítja, mely végül a májfunkció károsodásához vezet. Emellett mindezen parakrin mediátorok olyan nagy mennyiségben kerülhetnek a keringésbe,

hogy számos esetben káros szisztémás hatások megjelenésére is számítani lehet. Ennek egyik eleme a szeptikus szívizom károsodáshoz hasonló kardiális diszfunkció, mely mintegy *circulus vitiosus* szerű állapoton keresztül globális iszkémiás-reperfúziós károsodást eredményezhet.

Az elmúlt 15-20 év kísérletes eredményei és számos kisebb klinikai vizsgálat támasztja alá, hogy a glutamin – praktikus mellékhatások nélkül – kritikus állapotú betegek esetében a kimenetel javítására képes, és elősegíti a gyógyulást.¹⁸² Annak tisztázására, hogy a glutamin pótlás valamely formája súlyos gyulladásos kórállapotok esetében standard részévé válhat-e a terápiás palettának, több nagy multicentrikus klinikai vizsgálat indult világszerte. Azon országok, ahol helyi ajánlásokra és guidelineokra támaszkodva elterjedtebb a glutamin klinikai alkalmazása,¹⁸³ számos új közleménnyel bővítik e témához kapcsolódó nemzetközi ismeretanyagot. A perioperatív alkalmazás tekintetében a legtöbb tapasztalat posztoperatív adagolással kapcsolatos, míg a preoperatív kezelésre vonatkozóan jóval kevesebb adat áll jelenleg rendelkezésre.

Munkacsoportunk több korábbi vizsgálatban foglalkozott a máj iszkémiás-reperfúziós károsodásának mérséklésével.^{11,184} Az I-R károsodás patomechanizmusát figyelembe véve érdemesnek tartottuk megvizsgálni, hogy rejlik-e protektív potenciál parenterális glutamin preoperatív – mintegy profilaktikus – adásában, mivel számos olyan molekuláris, valamint génszintű hatással bír, mely pozitívan befolyásolhatja a kórlefolymást több sarkalatos támadási ponton.¹⁸⁵ Ide sorolható a teljesség igénye nélkül, különböző hősokk fehérjék aktiválása, mely megelőzheti az akut légzési elégtelenség (ARDS) kialakulását,¹⁸⁶ az iszkémiás prekondicionáláshoz hasonló jelátviteli utak indukálása,¹⁸⁷ valamint az immunmoduláció.¹⁸⁸ Több kísérletes eredmény is alátámasztja a glutamin antiinflammatorikus tulajdonságát,^{112,121} melyet kiegészít és támogat az antioxidáns státuszra gyakorolt szupportív hatása.¹⁰⁹ Reperfúzió során a májban hirtelen nagy mennyiségű szabadgyök semlegesítésére van szükség, és a károsodott szövet antioxidáns kapacitása hamar kimerül. Ennek egyik fontos eleme, hogy a kialakuló relatív glutamin hiány következtében a glutation szintézise nem tud lépést tartani a fokozott oxidációval. A glutamin pótlása tehát, a szöveti antioxidáns barrier erősítésén keresztül megelőzheti a lokális gyulladás progresszióját.¹⁸⁹

A preoperatív glutamin kezeléssel végzett előkísérlet során, a közvetlenül műtét előtt infundált Dipeptiven[®] oldat segítségével javuló reperfúziós mikrocirkulációt,

kedvezőbb szöveti antioxidáns státuszt és szignifikánsan kisebb arányú nekrozist 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.

A jelen dolgozatban bemutatott első kísérletben vizsgáltuk, hogy 24 órával a műtét előtt adott Dipeptiven[®] képes-e hasonló mértékben csökkenteni a májkárosodás mértékét. Az alkalmazott dózis tekintetében igazodtunk a klinikai ajánlás változásához, míg a patkánymáj esetében kritikusnak mondható 60 perces iszkémiás időt megtartottuk. A reperfüziós időt 24 órának választottuk, ami az eddigre definitívnek mondható májkárosodás elemzését tette lehetővé. A vizsgálat eredményei ismét egy lépéssel közelebb vihetnek a klinikai alkalmazás felé, hiszen az itt bevezetett adagolási séma potenciálisan helyet kaphat kiterjedt májrezekcióra váró betegek preoperatív előkészítésében.

A reperfüzió korai szakában detektálható mikrocirkuláció alapvetően meghatározza az I-R károsodás mértékét. Elégtelen volta képes prolongálni az iszkémiás időt és növelni az irreverzibilisen károsodó területek kiterjedését, illetve fontos kiindulási pontja a szisztémás választ generáló gyulladással járó sejtes reakcióknak is. Chun és mts. kimutatták, hogy a májszövet lokális vérellátásának mielőbbi helyreállása – a no-reflow jelenség mértékének csökkenése – kedvezően befolyásolja a sejtek életképességét, megakadályozza a sejtelhalást.¹⁹⁰ Az I-R patomechanizmusa számos ponton érinti a májszinzusoidok hemodinamikai tulajdonságait, ezért a szöveti mikrokeringés alakulása a károsodás súlyosságának, illetve a vizsgált beavatkozás hatékonyságának fokmérője is lehet. A mikrocirkuláció ezen kritikus időtartamának vizsgálatát munkacsoportunk korábban publikált módszerére támaszkodva végeztük lézer Doppler áramlásmérő segítségével. A reperfüzió kezdeti 60 percében detektált májáramlás értékelése szintén a már bevezetett metodika szerint történt. Glutamin kezelés hatására javuló tendenciát tapasztaltunk a májszöveti korai reperfüziós áramlásban. A 24 órával korábban adott előkezelés e tekintetben elmaradt a közvetlen preoperatív előkezelési formától, ahol a reperfüzió első órájának végére szignifikáns javulás volt tapasztalható az I-R kontroll csoporthoz képest. Mikrocirkuláció tekintetében sajnos igen nehéz összehasonlításra alkalmas publikációt találni az

irodalomban. Schauer és mtsai. glutamin posztisztkémiás adása mellett intravitális mikroszkópiás vizsgálattal a szinuszidális áramlás majdnem teljes rendeződését találták.¹⁹¹ Ezzel párhuzamosan a fehérvérsejtek kitapadásának csökkenését figyelték meg a májszínuszoidok és a posztszínuszoidális venulák területén.

A mikrocirkuláció javulása részben visszavezethető a lokális gyulladással válaszreakció és a leukocita-kitapadás csökkenésére, ezért elvben kapcsolatba hozható a glutamin gyulladáscsökkentő és az antioxidáns státuszt javító hatásaival. A szöveti redox homeosztázisra gyakorolt kedvező hatást jelen kísérlet eredményei is alátámasztják: a májhomogenizátum minták luminometriás össz-scavenger kapacitása szignifikánsan javult a Gln csoportban. Ennek háttérében a szabad SH-csoportok szöveti koncentrációjában tapasztalt szignifikáns emelkedés állhat, mely indirekt módon nagyobb mennyiségben hozzáférhető glutation jelenlétére utal a májban. A szöveti H-donor kapacitás és redukáló képesség áloperált csoportét közelítő értékei kiegyensúlyozott lokális redox homeosztázisra utalnak. Mindezek az eredmények összhangban vannak a közvetlenül műtét előtt adott glutamin kezelés során tapasztaltakkal. Elmondható továbbá, hogy 24 órás reperfüziót követően a kezelt és az I-R kontroll csoport közötti különbségek még inkább markánsná váltak. A luminometriás össz-scavenger kapacitás plazma mintákban detektált szignifikáns javulása elvben magyarázható lehet a kisebb lokális károsodásra visszavezethető alacsonyabb szisztémás gyulladással, de ezen hipotézis igazolása célzott vizsgálatot igényel. Az előkísérletben szintén tapasztaltuk a plazma antioxidáns kapacitásának javulását, valamint a TNF- α szint csökkenését a reperfüzió egy korábbi időpontjában, ami szintén támogatja az esetleges antiinflammatorikus hatás részletes vizsgálatának megalapozottságát.

Jelen kísérleti elrendezésben mi sokkal inkább a glutamin I-R károsodott májszövetre gyakorolt lokális hatására koncentráltunk. HE-festett metszeteket vizsgálva a glutaminkezelt csoportban nem lépett fel szöveti bevezés, valamint általában megfigyelhető volt a szövetkárosodás és a gyulladással sejtes beszűrődés mérséklődése, mely jól korrelál a szöveti mikrocirkuláció fent említett javulásával. Kihhasználva a 24 órás reperfüzió alatt jól demarkálódó szövetkárosodás nyújtotta lehetőséget, TUNEL-reakcióval vizsgáltuk ezen területek méretét. A glutamin kezelt csoportban szignifikánsan csökkent az összefüggő TUNEL-pozitivitást mutató területek aránya az

I-R kontroll csoporthoz képest, ami számszerűen is alátámasztja a szignifikánsan kisebb mértékű nekrozis jelenlétét. Az ugyancsak súlyos sejtkárosodásra utaló zsíros degeneráció előfordulása, Sudan IV festéssel igazolva, glutamin kezelés hatására szintén csökkent.

A nekrotikus területek méretének csökkenése tükröződik a PAR-immunhisztokémát követően kimutatható szignifikánsan alacsonyabb szöveti PARP-aktivitásban is. Mivel a glutamin kezelt csoportban a különálló sejtekben megjelenő PAR-pozitivitás is alacsonyabb arányú, felmerül, hogy a sejtek kedvezőbb energetikai állapota is szerephez jut. A PARP enzim lokális aktivitása és a szövet energetikai állapota között ugyanis kétirányú kapcsolat áll fenn: a PARP enzim úgynevezett „túlaktiválódása” az eleve súlyosabban károsodott sejtekben jön létre, ahol fokozza a fennálló ATP-hiányt és a sejtet energetikai krízisállapotba sodorhatja.¹⁹² Az energiatermelésükben kevésbé károsodott sejtek ezzel szemben biztosíthatnak a PARP számára elegendő ATP-t az örökítő anyaguk javításához. Amennyiben a DNS olyan súlyos károsodást szenvedett, hogy javítására nincsen lehetőség, az elégséges ATP-termeléssel bíró sejtek választhatják az organizmus szempontjából kedvezőbb energiaigényes sejthalálformát, az apoptózist. A nekrozissal ellentétben a pusztuló sejt ilyenkor nem indukál gyulladást és környezetét nem károsítja. Az irreverzibilisen károsodott sejtek apoptózissal történő elhalását tapasztaltuk glutamin előkezeléssel végzett előző kísérletünk során is 6 órás reperfüziót követően. A kiegészítésként végzett aktív kaszpáz-3 immunhisztokémia is alátámasztja, hogy az előkezelt csoport esetében az apoptózis vált vezető sejthalálformává, míg az I-R kontroll csoportban a nekrozis dominált. Az I-R károsodás által közvetlenül indukált apoptózis vizsgálatára a 24 órás időablak túlságosan hosszúnak bizonyult. Az I-R kontrollhoz képest alacsonyabb PARP-aktivitás lehet azonban a szövet jobb energetikai állapotának következménye is és utalhat indirekt módon a nagyobb arányban lezajlott apoptózisra. Jelen kísérleti elrendezésben, a szöveti PARP-aktivitás csökkenéséhez hasonlóan, a TUNEL-pozitivitás kisebb arányú előfordulása is a glutamin előkezelt állatok májának fokozott iszkémia-toleráciájára utal.

A glutamin kezelés szövet-, illetve sejtkárosodást csökkentő hatását, a szérummintákban mért nekroenzimaktivitások szignifikánsan alacsonyabb szintje is mindkét kezelési időablak esetében alátámasztja.

A dolgozatban szereplő második kísérlet szintén a máj iszkémiás toleranciájának növelésére irányuló kísérletsorozatba illeszkedik. Felépítését tekintve itt is egyazon molekula különböző latenciával való preoperatív alkalmazását végeztük, a Dipeptiven[®]-hez hasonlóan. Az előzőekben már említésre került a súlyos I-R károsodás következtében is kialakuló szeptikus kardiomiopátiához hasonló állapot, mely további szervkárosodások forrásává válhat. Figyelembe véve a májszövet jelentős makrofágtartalmát, I-R károsodásának szisztémás következményei azon esetben sem hanyagolhatóak el, ha jó regenerációs képességének köszönhetően a máj funkciója később teljesen rendeződne.

A levosimendanról kimutatták, hogy szeptikus kardiomiopátia esetén kedvező hatású: mind a szisztolés, mind a diasztolés funkció javítására képes.¹⁹³ A rendelkezésre álló pozitív inotróp molekulák között egyedülállóvá teszi továbbá, hogy nem okoz véráramlás csökkenést a szplachnikus területen,¹³⁴ illetve, hogy a mitokondriális K⁺ATP-csatornák nyitásán keresztül antiiszkémiás hatással is rendelkezik.¹³² Figyelembe véve, hogy mindezen hatások kedvezőek lehetnek a máj I-R károsodásának mérséklésében, illetve következményeinek kezelésében, érdemesnek tartottuk hatásának vizsgálatát máj iszkémiás-reperfúziós modellben.

A szöveti mikrokeringés lézer Doppler áramlásmérővel történő vizsgálata és a reperfúzió korai szakaszának részletes elemzése itt is a metodika fontos részét képezi, hiszen a károsodás súlyosságára és a vizsgált beavatkozás hatásosságára egyaránt utal. Azt tapasztaltuk, hogy mind a műtét előtt közvetlenül, mind a 24 órával korábban végzett levosimendan előkezelés erősen szignifikáns javulást eredményezett a májszövet mikrocirkulációjában a megfelelő I-R kontroll csoportokhoz képest. Ez a jelenség lehet hemodinamikai hatás következménye, de megjelenhet farmakológiai úton indukált prekondicionálás eredményeként is. Az előbbire utalhat, hogy a májáramlásra gyakorolt pozitív hatást más szerzők is leírták szeptikus disznók vizsgálata során,¹³⁵ ahol a pulmonális vaszkuláris ellenállás csökkenése mellett a portális áramlás és mukózális oxigénellátás formájában vizsgált szplachnikus keringés javulását és a noradrenalinra adott vazokonstriktív válasz fokozódását figyelték meg. Az utóbbi mellett szól, hogy a levosimendan farmakológiai prekondicionáló hatását mediálós szignáltranszdukció következtében többek között az endoteliális NO-termelés is fokozódik a koronáriákban.¹⁹⁴ Az eNOS indukciója máj esetében szintén csökkentheti a

kialakuló NO/ET-aránytalanság mértékét és jelentősen javíthatja a szöveti mikrocirkulációt.^{47,48} Vizsgálatunknak nem volt elsődleges célja, hogy e két hatás között differenciáljon, illetve jelentőségük arányáról információt adjon. A hangsúlyt elsősorban a májszöveti károsodás alakulására fektettük – mintegy tájékozódó jelleggel vizsgálva, hogy szerepet kaphat-e a levosimendan a hepatoprotekció területén.

Annak ellenére, hogy az értékelésre használt szemikvantitatív pontrendszer alapján minden I-R károsodáson átesett csoportban középsúlyosnak mondhatjuk a destrukció mértékét, jelentős különbségek mutatkoztak az egyes csoportok között a hematoxilin-eozinnal festett szövettani metszeteken annak karakterét illetően. Míg az I-R kontroll állatok esetében nagy, sokszor összefüggő területeken jelent meg nekrozis számottevő szöveti bevérzés és gyulladáshoz vezető válasz kíséretében, a levosimendannal előkezelte csoportokban látványosan kevesebb, karakterét tekintve inkább fokális sejtelhalás mutatkozott. A levosimendan kezelt csoportok kisebb mértékű májsejtkárosodását támasztja alá továbbá a szérum ALAT aktivitásának szignifikáns csökkenése is mindkét kezelési időablakban. Ezzel összhangban szöveti bevérzés nem volt jellemző és a leukociták beszűrődés is kisebb mértékűnek bizonyult. A gyulladáshoz vezető válasz mérséklődését tapasztalták levosimendan intraperitoneális adását követően egy ezen témakör vizsgálatára gyakran használt, patkányok talpában gyulladást indukáló modellben.¹⁹⁵ A levosimendan a kezelést követően vizsgált 4 óra során idő- és dózisfüggő módon egyre kifejezettebben csökkentette a TNF- α , az IL-1 és IL-6 szinteket és gátolta az ödéma képződést. Ezzel párhuzamosan a szuperoxid-dizmutáz aktivitásának fokozódását és a glutation szintjének emelkedését is megfigyelték, mely a redox-homeosztázis kedvező alakulására utal. Kísérletünkben ez utóbbit a luminometriával mért szabadgyök-szint csökkenés, valamint a spektrofotometriás mérések alapján is javuló tendenciát mutató antioxidáns státusz tükrözi. Jelen kísérletben a kezelt csoport kedvezőbb antioxidáns státuszát inkább másodlagosnak tartjuk, melyet a nekrozis és a gyulladáshoz vezető válaszreakció csökkenése von maga után. Ehhez hasonló jelenséget dekompenzált szívelégtelenséget követően is megfigyeltek.¹⁹⁶ Hogy a gyulladáscsökkentő hatás időfüggése mennyiben marad meg 24 óra elteltével, direkt erre vonatkozó vizsgálati végpontok hiányában, kísérletünkben nem állapítható meg. Utalhat erre a „hosszú latenciájú” előkezelést követően megjelenő kifejezettebb (szignifikáns) javulás az I-R kontroll csoport szöveti károsodásával szemben. Az

antioxidáns státusz javulása ezzel szemben „rövid latenciájú” előkezelést követően javul nagyobb mértékben. Mivel ez egy igen összetett módon befolyásolt vizsgálati paraméter elképzelhető, hogy a jelenség magyarázata az ezen időablakban összességében kisebbnek mutató szisztémás károsodásban keresendő (lásd alább).

TUNEL immunfestéssel minden I-R károsodott csoportban megjelentek diffúz pozitivitást mutató területek, melyek a hematoxin-eozin festéssel is detektálható nekrotikus szövetrészeknek felelhetnek meg. 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 PAR-immunhisztokémiával vizsgálva is igen hasonlóan alakul és mindkét festési eljárás esetében a zonális sejtelhalást reprezentálja. Elmondható továbbá, hogy az összes PAR-pozitivitás alapján mindkét levosimendan-kezelt csoportban szignifikánsan kisebb sejt-, illetve DNS-károsodás jött létre. Érdekes eredmény, hogy míg a „hosszú latenciájú” előkezelést követően a demarkálódott területekkel összefüggésben megjelenő PAR-pozitivitás csökkenése volt szignifikáns mértékű, a „rövid latenciájú” előkezelés esetében a különálló PAR-pozitivitás szignifikáns csökkenését tapasztaltuk. Ennek háttérében a két kezelési időablak károsodásának mértékében tapasztalható különbség valószínűsíthető. A 24 órával korábban előkezelt csoportokban egységesen súlyosabb májszöveti destrukció jön létre, melyet a levosimendan kezelés hatékonyan csökkenteni képes. Erre utal többek között, hogy az összes PAR-pozitivitás és ezen belül a demarkálódott területek mérete egyaránt jelentősebb emelkedést mutat a „hosszú latenciájú” I-R kontroll csoport, mint a levosimendan-kezelt csoport esetében. A különálló PAR-pozitivitás mértéke ugyanakkor párhuzamosan emelkedik a kezelt és a nem-kezelt csoportban a „rövid latenciájú” időablakhoz képest.

Látszólagos diszkrpanciát szül, hogy a különálló pozitívitás TUNEL-immunhisztokémiával vizsgálva, a levosimendan-kezelt csoportokban jelenik meg nagyobb arányban. Emelkedése a „hosszú latenciájú” előkezelés esetében az I-R kontroll csoporthoz képest szignifikáns mértékű. Mindezt magyarázhatja, hogy a PAR-festés 24 órás reperfüziót követően is megjeleníti mindazon sejteket, melyekben még aktív a DNS-repair, míg TUNEL-reakcióval a már elhalt sejtek festődnek meg. Ez összhangba hozható azzal a megfigyeléssel is, hogy hematoxin-eozin festés alapján a

levosimendan-kezelt csoportokban láttunk nagyobb arányban pontszerű nekrozist az I-R kontroll csoportokhoz képest. A különálló PAR-pozitivitás ugyanakkor a szövetkárosodás súlyosságával párhuzamosan emelkedik minden vizsgálati csoportban.

A különálló TUNEL-pozitivitással kapcsolatban mindenkor felmerül a kérdés, hogy apoptotikus sejthalál jelenlétére utal-e? A „rövid latenciájú” glutamin előkezelés esetében az aktív kaszpáz-3 immunhisztokémia is alátámasztotta, hogy igen. Fontos azonban figyelembe venni, hogy azt a vizsgálatot 6 órás reperfüziót követően végeztük, míg jelen kísérleti elrendezésben a reperfüzió időtartama 24 óra volt. Irodalmi adatok is alátámasztják, hogy ilyen hosszú idő elteltével nem fordul elő nagyobb arányban apoptózis az I-R-károsodott májszövetben, mint a károsodás nélküli kontroll májszövet esetében.¹⁹⁷ Ezen időablakban apoptózis jelenléte inkább másodlagos sejtkárosodás manifesztálódására utalna, mely ugyanakkor a többi eredményt is figyelembe véve nem valószínű. A pontszerű nekrozis illetően festődési megjelenését valószínűsíti az is, hogy a levosimendant vese és szívizom I-R károsodása esetében anti-apoptotikus hatásúnak tartják.^{198,199}

Ezen anti-apoptotikus, továbbá az anti-iszkémiás hatás háttérében álló egyik tényezőként azonosított kináz-kaszád, a (reperfusion injury salvage kinase) RISK-útvonal, az iszkémiás prekondicionálás folyamatában is fontos szerepet játszik,¹⁹⁹ ami felveti annak lehetőségét, hogy a levosimendan kezelés direkt hepatoprotektív hatással (is) bír. Ezen hipotézis alátámasztása reményében végeztük a HSP72 expresszió meghatározását, melynek emelkedő szintje iszkémiás prekondicionálás során bizonyítottan hozzájárul a sejtprotektív hatás kialakításához.²⁰⁰ Ebben a vonatkozásban azonban a levosimendan-kezelt csoportok nem mutattak különbséget az I-R kontroll csoportokhoz képest. Tekintve, hogy a folyamat egy kiragadott eleméről van szó, elhamarkodott lenne kimondani, hogy farmakológiai prekondicionálás egyáltalán nem játszik szerepet a májkárosodás csökkentésében. Felmerül ugyanakkor, hogy a máj esetében elsődlegesen szisztémás keringési változásokra visszavezethető hatásról van szó.

Jelen kísérlet hemodinamikai mérési adatai nem nyújtanak elegendő információt a szisztémás keringési hatásokra vonatkozóan. A vérnyomás- és szívfrekvencia regisztrátumok alapján csak az 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.¹⁵⁵ A szervi keringés szempontjából azonban sokkal fontosabb paraméterek, például a perctérfogat, illetve a pulzustérfogat, valamint a belőlük származtatott paraméterek meghatározására lenne szükség. Fontos lenne továbbá lokális gasztrointesztinális paraméterek, úm. a mukózális pH meghatározása is. Annak alapján, hogy a reperfüziós vérnyomásesés kisebb mértékű volt levosimendan kezelést követően, illetve hogy ezen csoportokban jobb hatásfokkal 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 NBT-enzimhisztokémiával vizsgálva a levosimendan-kezelt csoportokban megfigyelhető és „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 az irodalomból is ismert a levosimendannal kapcsolatban,²⁰¹ és mint más hasonló hatást kifejtő molekulák esetében, itt is prekondicionálás szerű anti-iszkémiás hatással hozható összefüggésbe, mely a csatornák specifikus gátlószerevel felfüggeszthető.²⁰² Az NBT-enzimhisztokémiával levosimendan kezelést követően tapasztalt jobb szöveti viabilitás tehát, lehet farmakológiai prekondicionálás eredménye is, melyre vonatkozóan ugyanakkor jelen kísérlet nem szolgáltat elegendő bizonyítékot. A HSP72 expresszió alapján inkább el kell vetnünk ezt a hipotézist, bár a két útvonal közvetlen kapcsolatban nem áll egymással. A levosimendan jelen kísérletben tapasztalt hepatikus I-R károsodást mérséklő hatásának mito- K^+ _{ATP}-csatornák specifikus gátlása mellett való változatlan fennállása illetve csökkenése, ezt a kérdést eldönthetné.

A kezelés két időablakban történő vizsgálata elsődlegesen az iszkémiás prekondicionálással kapcsolatban leírt két fázis modellezésére szolgált. A kísérleti eredmények alapján azonban újra és újra felmerül, 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 glutamin kezelések ilyen irányú összevetése az eltérő reperfüziós idők következtében csak az áramlási paraméterekre korlátozódhat, mindazonáltal itt is megfigyelhető. A jelenség háttérében az állatokat ért nagyobb perioperatív stressz állhat, mely a két fázisban történő kezelés, illetve műtét velejárója és rágcsálók esetében jelentős lehet. Érdekes azonban megfigyelni, hogy a levosimendan kezelés ebben a kategóriában még kifejezettebb javulást eredményezett az I-R kontroll csoporthoz képest. Magyarázatként szolgálhat erre, hogy a levosimendan kezelést követő maximális perctérfogat emelkedés és hemodinamikai válasz a kezelést követő első és második napra tehető.¹⁹⁷

A két vizsgált előkezelés eltérő támadási pontja felveti kombinációjuk lehetőségét is. Érdekes lehet megvizsgálni, hogy elérhető-e nagyobb mértékű károsodás-csökkenés „hosszú latenciájú” levosimendan és „rövid, vagy hosszú latenciájú” glutamin előkezelés esetében. Ez a kombináció kedvező a levosimendan makrohemodinamikai hatásának maximális kihasználása szempontjából. Amennyiben abból indulunk ki, hogy az esetlegesen a máj esetében is szerepet játszó farmakológiai prekondicionáló hatása elsődlegesen a mito- K^+ _{ATP}-csatornák nyitására keresztül érvényesül, elképzelhető hogy a párhuzamosan adott glutamin kezelés a bevitt antioxidánsok miatt csökkenti azt. Ennek megfelelően valószínű, hogy a „rövid latenciájú” glutamin előkezeléssel való kombináció az előnyösebb. Mindazonáltal felmerül az is, hogy a farmakonutrició elvét követve eleve glutamin hiányban szenvedő betegek esetében, többnapos perioperatív terápiával biztosíthatunk leginkább optimális feltételeket a gyógyuláshoz.

6. Következtetések

A vizsgálatok tervezésénél feltett kérdésekre az alábbi válaszok adhatók:

6.1. Hosszú latenciájú glutamin előkezelés

1. A szövettani metszetek értékelése alapján, a 24 órával a műtét előtt adott L-alanil-L-glutamin előkezelés képes a máj I-R károsodásának csökkentésére, tervezetten kirekesztésben operált májrezekciók esetén.
2. A máj korai reperfúziós mikrocirkulációjában – a műtét előtt közvetlenül adott L-alanil-L-glutamin előkezeléssel ellentétben – nem jött létre szignifikáns javulás a kezelt csoport esetében.
3. A glutamin kezelt csoportban a májszöveti antioxidáns státusz szignifikánsa javulása tapasztalható, minek alapján valószínű, hogy elsősorban ezen hatás vezet a szövetkárosodás csökkenéséhez.

6.2. Rövid és hosszú latenciájú levosimendan előkezelés

1. 24 órás reperfúziót követően vizsgálva a levosimendan kezelés mindkét formája markánsan képes csökkenteni az I-R talaján kialakuló májkárosodás mértékét.
2. A korai reperfúziós májszöveti mikrocirkulációt mindkét előkezelési protokoll képes szignifikáns mértékben javítani.
3. Az kezelt csoportokban a májszöveti antioxidáns státusz javuló tendenciája figyelhető meg.
4. Jelen kísérleti elrendezésben direkt hepatoprotektív hatás jelenléte nem valószínű, a levosimendan kezelés pozitív hatása inkább hemodinamikai eredetű lehet.
5. A műtét előtt 24 órával alkalmazott levosimendan előkezelés összességében kifejezettebb védőhatást képes létrehozni a májszöveti iszkémiás-reperfúziós károsodással szemben, mint a közvetlen műtét előtt végzett előkezelés.
6. Metodikai jelentőséggel bír inkább az a felismerés, hogy a 24 órával korábban végzett előkezelés jelentősen képes növelni a műtéti stressz mértékét patkányok esetében.

7. Összefoglalás

Bevezetés: Az egyre nagyobb arányban csökkent kompenzációs képességgel műtetre kerülő sebészi beteganyaggal párhuzamosan a máj iszkémiás toleranciájának növelése is fokozódó mértékben válik szükségessé. A portális kirekesztésben operált májrezekciók mellett, kisebb mértékű májkárosodás egyéb átmeneti hemodinamikai megingást okozó beavatkozások esetében is kialakulhat, és meghatározóvá válhat a posztoperatív kimenetel szempontjából. **Célkitűzés:** Kutatócsoportunk korábbi munkájára alapozva, antioxidáns hatással rendelkező glutamin, valamint pozitív inotróp és farmakológiai prekondicionáló hatással egyaránt rendelkező levosimendan előkezelések protektív hatását vizsgáltuk máj iszkémiás-reperfúziós kisállatmodellben. **Anyag & Módszer:** Két külön kísérlet során hím Wistar patkányokon, alkalmaztunk 24 órával a műtét előtt intravénás glutamin, illetve 1 vagy 24 órával a műtét előtt levosimendan előkezelést. A kezelések hatását áloperált és I-R-kontroll csoportokkal szemben vizsgáltuk. A májszöveti iszkémiás-reperfúziós károsodást 60 perces szegmentális kirekesztéssel hoztuk létre, majd elsősorban a lokális változásokra koncentrálnak vizsgálva a korai reperfúziós mikrocirkulációt, valamint a 24 órás reperfúziót követően manifesztálódó szöveti károsodás mértékét és az antioxidáns státusz változásait. **Eredmények:** A reperfúziós mikrocirkuláció első óráját leíró értékek (plató maximum, reperfúziós terület), glutamin kezelést követően javuló tendenciát, míg a levosimendan-előkezelést csoportokban szignifikáns javulást mutattak. A hematoxin-eozin festett szövettani metszetek alapján mind a glutamin, mind a levosimendan szignifikánsan csökkentette a májkárosodás mértékét. Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredményei és a szérumban a nekroenzim szintek alapján szintén szignifikánsan csökkent a májszöveti károsodás glutamin és levosimendan előkezeléseket követően egyaránt. Glutamin kezelést követően szignifikáns javulás mutatkozott az antioxidáns státuszban, míg levosimendan hatására inkább javuló tendencia volt megfigyelhető a kontroll csoporthoz képest. **Megbeszélés:** Eredményeink alapján mind a parenterális glutamin, mind a levosimendan előkezelés helyet kaphat potenciálisan máj iszkémiás-reperfúziós károsodást eredményező műtétek előkészítésében. A protekció hátterében glutamin esetében az antioxidáns státuszra gyakorolt kedvező hatás állhat, míg a levosimendan valószínűleg pozitív makrohemodinamikai tulajdonságai révén másodlagosan javítja a májszövet állapotát.

8. Summary

Background: Increasing number of patients with comorbidities resulting in reduced healing capacity is undergoing major surgery. Therefore the impact of warm liver ischemia-reperfusion (I-R) injury on the postoperative outcome in general is even greater, than the number of hepatic operations would suggest. Great research work has been done to invent possible protective techniques – to increase the ischemic tolerance of the liver. **Aim** of our study was to investigate potential protective effects of the antioxidant glutamine and the positive inotrope and cardioprotective drug levosimendan, applied as parenteral pretreatment in a rodent model of hepatic I-R injury. **Materials & Methods:** Two separate experiments were designed to investigate the effects of glutamine pretreatment given 24 hrs. Prior to liver I-R and levosimendan applied 1 h, or 24 hrs. before the operation. Results of the pretreatment groups were compared with sham-operated and I-R-control groups, respectively. Hepatic I-R injury was induced by 60 minutes normothermic, segmental liver ischemia on male Wistar rats. Concentrating mainly on local effects, we followed hepatic microcirculation during the 1st hour of reperfusion and analyzed the characteristics of liver tissue damage along with the changes of antioxidant state after 24 hrs. of reperfusion. **Results:** Microcirculatory parameters describing the 1st h of reperfusion showed improving tendency after glutamine pretreatment, while there was significant improvement in the levosimendan groups. Both drugs were able to significantly reduce histological damage according to hematoxylin-eosine stained liver samples. Immunohistological analysis and necroenzyme measurements also showed significant beneficial effects of all pretreatment protocols. Glutamine pretreatment resulted in significant improvement of the hepatic redox homeostasis, while there was improving tendency in the levosimendan pretreated groups. **Conclusions:** Our results suggest that parenteral glutamine and levosimendan pretreatments may find clinical application, when preparing patients for major operations, potentially resulting in hepatic ischemic-reperfusion injury. The protective effect of glutamine is likely to be based on advantageous changes of the hepatic antioxidant state, while levosimendan is more likely to have secondary protective effect on the liver, resulting from primary improvement of the systemic circulation.

9. Irodalomjegyzék

- ¹ Foschi D, Castoldi L, Lesma A, Musazzi M, Benevento A, Trabucchi E. (1993) Effects of iszkémiá and reperfusion on liver regeneration in rats. *Eur J Surg*, 159: 393-398.
- ² Kim YI, Hiratsuka K, Kitano S, Joo DH, Kamada N, Sugimachi K. (1996) Simple in situ hypothermia reduced ischaemic injury to human liver during hepatectomy. *Eur J Surg*, 162: 717-721.
- ³ Gurusamy KS, Kumar Y, Pamecha V, Sharma D, Davidson BR. (2009) Ischaemic preconditioning for elective liver resections performed under vascular occlusion. *Cochrane Database Syst Rev*, 21: CD007629.
- ⁴ Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. (2008) Ischaemic preconditioning for liver transplantation. *Cochrane Database Syst Rev*, 23: CD006315.
- ⁵ Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285: H579-H588.
- ⁶ Abu-Amara M, Gurusamy KS, Glantzounis G, Fuller B, Davidson BR. (2009) Pharmacological interventions for iszkémia reperfusion injury in liver resection surgery performed under vascular control. *Cochrane Database Syst Rev*, 7: CD008154.
- ⁷ Li X, Zhang JF, Lu MQ, Yang Y, Xu C, Li H, Wang GS, Cai CJ, Chen GH. (2007) Alleviation of ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation by induction of small interference RNA targeting Fas. *Langenbeck Arch Surg*, 392: 345-351.
- ⁸ Monbaliu D, Brassil J. (2010) Machine perfusion of the liver: past, present and future. *Curr Opin Organ Transplant*, 15: 160-166.
- ⁹ Schmidt R. (2010) Hepatic organ protection: From basic science to clinical practice. *World J Gastroenterol*, 16: 6044-6045.
- ¹⁰ Murry C, Jennings R, Reimer K. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74: 1124-1136.
- ¹¹ Szijártó A, Hahn O, Lotz G, Schaff Z, Madarász E, Kupcsulik P. (2006) Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser Doppler flowmetry. *J Surg Res*, 131: 150-157.

-
- ¹² Lemasters JJ, Ji S, Thurman RG. (1981) Centrilobular injury following hypoxia in isolated, perfused rat liver. *Science*, 213: 661-663.
- ¹³ Hines IN, Hoffman JM, Scheerens H, Day BJ, Harada H, Pavlick KP, Bharwani S, Wolf R, Gao B, Flores S, McCord JM, Grisham MB. (2003) Regulation of postischemic liver injury following different durations of ischemia, *Am J Physiol*, 284: G536-G545.
- ¹⁴ Schindler G, Kincius M, Liang R, Backhaus J, Zorn M, Flechtenmacher C, Gebhard MM, Büchler MW, Schemmer P. (2009) Fundamental efforts toward the development of a therapeutic cocktail with a manifold ameliorative effect on hepatic ischemia/reperfusion injury. *Microcirculation*, 16: 593-602.
- ¹⁵ Pine JK, Aldouri A, Young AL, Davies MH, Attia M, Toogood GJ, Pollard SG, Lodge JP, Prasad KR. (2009) Liver transplantation following donation after cardiac death: an analysis using matched pairs. *Liver Transpl*, 15: 1072-1082.
- ¹⁶ Lemasters JJ. (2005) Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis. *Gastroenterology*, 129: 351-360.
- ¹⁷ Lemasters JJ. (1999) Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol*, 276: G1-G6.
- ¹⁸ Herman B, Nieminen AL, Gores GJ, Lemasters JJ. (1988) Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability. *FASEB J*, 2: 146-151.
- ¹⁹ Nishimura Y, Lemasters JJ. (2001) Glycine blocks opening of a death channel in cultured hepatic sinusoidal endothelial cells during chemical hypoxia. *Cell Death Differ*, 8: 850-858.
- ²⁰ Bredesen DE. (2000) Apoptosis: overview and signal transduction pathways. *J Neurotraum*, 17: 801-810.
- ²¹ Abu-Amara M, Yang S, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. (2010) Liver ischemia-reperfusion injury: processes in inflammatory networks – a review. *Liver Transpl*, 16: 1016-1032.
- ²² Belous AE, Jones CM, Wakata A, Knox CD, Nicoud IB, Pierce J, Chari RS. (2006) Mitochondrial calcium transport is regulated by P2Y1- and P2Y2- like mitochondrial receptors. *J Cell Biochem*, 99: 1165-1174.

-
- ²³ Belous A, Knox C, Nicoud IB, Pierce J, Anderson C, Pinson CW, Chari RS. (2003) Reversed activity of mitochondrial adenine nucleotide translocator in ischemia reperfusion. *Transplantation*, 75: 1717-1723.
- ²⁴ Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. (2009) Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*, 83: 213-225.
- ²⁵ He L, Lemasters JJ. (2002) Regulated and unregulated mitochondrial permeability transition pores: a new paradigm of pore structure and function? *FEBS Lett*, 512: 1-7.
- ²⁶ Di Lisa F, Bernardi PA. (2009) CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. *J Mol Cell Cardiol*, 46: 775-780.
- ²⁷ Kim JS, Qian T, Lemasters JJ. (2003) Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes. *Gastroenterology*, 124: 494-503.
- ²⁸ Pollesello P, Mebazaa A. (2004) ATP-dependent potassium channels as a key target for the treatment of myocardial and vascular dysfunction. *Curr Opin Crit Care*, 10: 436-441.
- ²⁹ Tsukamoto O, Asanuma H, Kim J, Minamino T, Takashima S, Ogai A, Hirata A, Fujita M, Shinozaki Y, Mori H, Tomoike H, Hori M, Kitakaze MA (2005) A role of opening of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in the infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning via activation of protein kinase C in the canine heart. *BBRC*, 338: 1460-1466.
- ³⁰ Fulda S, Debatin K-M (2006) Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25: 4798-4811.
- ³¹ Peter ME, Krammer PH. (2003) The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*, 10: 26-35.
- ³² Ding WX, Yin XM. (2004) Dissection of the multiple mechanisms of TNFalpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med*, 8: 445-454.
- ³³ Barnhart BC, Peter ME. (2003) The TNF receptor 1: a split personality complex. *Cell*, 114: 148-150.
- ³⁴ Kim J-S, Cai X, Smith LK, Jin Y, Deshmukh M, Lemasters JJ. (2005) Increased apoptosis after ischemia/reperfusion to XIAP deficient hepatocytes: reversal by an xiap-expressing adenovirus. *Hepatology*, 42: 501A.

-
- ³⁵ Jaeschke H (2003) Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284: G15-G26.
- ³⁶ Vairetti M, Richelmi P, Berte F, Currin RT, Lemasters JJ, Imberti R. (2006) Role of pH in protection by low sodium against hypoxic injury in isolated perfused rat livers. *J Hepatol*, 44: 894-901.
- ³⁷ Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E. (2000) Ischemic preconditioning reduces Na⁺ accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. *Hepatology*, 31: 166-172.
- ³⁸ Sun K, Liu ZS, Sun Q. (2004) Role of mitochondria in cell apoptosis during hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *World J Gastroenterol*, 10(13): 1934-1938.
- ³⁹ Barritt GJ, Chen J, Rychkov GY. (2008) Ca²⁺-permeable channels in the hepatocyte plasma membrane and their roles in hepatocyte physiology. *Biochim Biophys Acta*, 1783: 651–672.
- ⁴⁰ Janicki PK, Wise PE, Belous AE, Pinson CW. (2001) Interspecies differences in hepatic Ca²⁺-ATPase activity and the effect of cold preservation on porcine liver Ca²⁺-ATPase function. *Liver Transpl*, 7: 132-139.
- ⁴¹ Anderson CD, Pierce J, Nicoud I, Belous A, Knox CD, Chari RS. (2005) Modulation of mitochondrial calcium management attenuates hepatic warm ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl*, 11: 663-668.
- ⁴² Jaeschke H (2003) Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *J Invest Surg*, 16: 127-140.
- ⁴³ Abe Y, Hines I, Zibari G, Grisham MB. (2009) Hepatocellular protection by nitric oxide or nitrite in ischemia and reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys*, 484: 232-237.
- ⁴⁴ Schwabe RF, Brenner DA. (2006) Mechanisms of Liver Injury. I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290: G583-G589.
- ⁴⁵ Seizner M, Seizmer N, Jochum W, Graf R, Clavien PA. (2007) Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATPdependent mechanism. *Liver Transpl*, 13: 382-390.

-
- ⁴⁶ Abe Y, I Hines, G Zibari, MB Grisham. (2009) Hepatocellular protection by nitric oxide or nitrite in ischemia and reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys*, 484: 232-237.
- ⁴⁷ Abu-Amara M, Yang SY, Seifalian A, Davidson B, Fuller B. (2012) The nitric oxide pathway-evidence and mechanisms for protection against liver ischemia reperfusion injury. *Liver Int*, 32: 531-543.
- ⁴⁸ Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, naya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. (2009) Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg*, 22: 46-55.
- ⁴⁹ Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. (2008) Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*, 147: 153-159.
- ⁵⁰ Pardo M, Budick-Harmelin N, Tirosh B, Tirosh O. (2008) Antioxidant defense in hepatic ischemia-reperfusion injury is regulated by damage-associated molecular pattern signal molecules. *Free Radical Bio Med*, 45: 1073-1083.
- ⁵¹ Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundyil J, Taylor SM, Woodruff TM. (2009) Toll-like receptors in ischemiareperfusion injury. *Shock*, 32: 4-16.
- ⁵² Tsung A, Zheng N, Jeyabalan G, Izuishi K, Klune JR, Geller DA, Lotze MT, Lu L, Billiar TR. (2007) Increasing numbers of hepatic dendritic cells promote HMGB1-mediated ischemiareperfusion injury. *J Leukocyte Biol*, 81: 119-128.
- ⁵³ Caban A, Oczkowicz G, bdel-Samad O, Cierpka L. (2002) Influence of Kupffer cells on the early phase of liver reperfusion. *Transplant Proc*, 34: 694-697.
- ⁵⁴ Jaeschke H. (2006) Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290: G1083-G1088.
- ⁵⁵ Kuboki S, Sakai N, Tschöp J, Edwards MJ, Lentsch AB, Caldwell CC. (2009) Distinct contributions of CD4+ T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol*, 296: G1054-G1059.
- ⁵⁶ Fondevila C, Shen XD, Tsuchihashi S, Uchida Y, Freitas MC, Ke B, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. (2008) The membrane attack complex (C5b-9) in liver cold ischemia and reperfusion injury. *Liver Transpl*, 14: 1133-1141.

-
- ⁵⁷ Inderbitzin D, Beldi G, Avital I, Vinci G, Candinias D. (2004) Local and remote ischemia-reperfusion injury is mitigated in mice overexpressing human C1 inhibitor. *Eur Surg Res*, 36: 142-147.
- ⁵⁸ Terada LS, Dormish JJ, Shanley PF, Leff JA, Anderson BO, Repine JE. (1992) Circulation xanthine oxidase mediates lung neutrophil sequestration after intestinal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*, 263: L394-L401.
- ⁵⁹ Weinbroum AA, Nielson VG, Tan S, Gelman S, Matalon S, Skinner KA, Bradley E Jr, Parks DA. (1995) Liver ischemia-reperfusion increases pulmonary permeability in rat: role of circulating xanthine-oxidase. *Am J Physiol*, 268: G988-G996.
- ⁶⁰ Fantini GA, Conte MS. (1995) Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury. *Am Surg*, 61: 316-319.
- ⁶¹ Deitch EA, Xu D, Franko L, Ayala A, Chaudry IH. (1994) Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock*, 1: 141-145.
- ⁶² Marshall JC. (1998) The gut as a potential trigger of 7 exercise-induced inflammatory responses. *Can J Physiol Pharmacol*, 76: 479-484.
- ⁶³ Carden DL, Xiao F, Moak C, Willis BH, Robinson-Jackson S, Alexander S. (1998) Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am J Physiol*, 275: H385-H392.
- ⁶⁴ Tan S, Yokoyama Y, Dickens E, Cash TG, Freeman BA, Parks DA. (1993) Xanthine oxidase activity in the circulation of rats following hemorrhagic shock. *Free Radical Bio Med*, 15: 407-414.
- ⁶⁵ Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace JL, Granger DN. (1990) Role of platelet-activating factor in reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol*, 259: G300-G305
- ⁶⁶ Fan J, Li Y, Levy RM, Fan JJ, Hackam DJ, Vodovotz Y, Yang H, Tracey KJ, Billiar TR, Wilson MA. (2007) Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. *J Immunol*, 178: 6573-6580.
- ⁶⁷ Carey C, Siegfried MR, Ma X, Weyrich AS, Lefer AM. (1992) Antishock and endothelial protective actions of a NO donor in mesenteric ischemia and reperfusion. *Circ Shock*, 38: 209-216.

-
- ⁶⁸ Imberti R, Nieminen AL, Duncan PR. (1990) Mitochondrial inhibition and uncoupling preceding lethal injury to rat hepatocytes by t-butyl hydroperoxide. Protection by fructose, oligomycin, cyclosporin A and trifluoperazine. *Hepatology*, 12: 933-937.
- ⁶⁹ Marsh DC, Vreugdenhil PK, Mack VE, Belzer FO, Southard JH. (1993) Glycine protects hepatocytes from injury caused by anoxia, cold ischemia and mitochondrial inhibitors, but not injury caused by calcium ionophores or oxidative stress. *Hepatology*, 17: 91-98.
- ⁷⁰ Gujral J, Bucci T, Farhood A, Jaeschke H. (2001) Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology*, 33: 397-405.
- ⁷¹ Han SL, Yu LX, Ma JJ, Zeng FY, Liu XY, Sun XY, Shan HT, Yuan Q. (2003) Effect of anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody in alleviating renal ischemia-reperfusion injury. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 23(4): 332-4.
- ⁷² Rudiger HA, Clavien P. (2002) Tumor necrosis factor a, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology*, 122: 202-10.
- ⁷³ Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M. (1997) Up-regulation of oxygen-derived free radicals by interleukin-1 in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*, 64: 1398-403.
- ⁷⁴ Lentsch AB, Yoshidome H, Kato A, Warner RL, Cheadle WG, Ward PA, Edwards MJ. (1999) Requirement for interleukin-12 in the pathogenesis of warm hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *Hepatology*, 30: 1448-53.
- ⁷⁵ Marubayashi S, Oshiro Y, Fukuma A, Okada K, Maeda T, Dohi K. (1999) Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant. Proc.*, 31: 1054.
- ⁷⁶ Melis GC, ter Wengel N, Boelens PG, van Leeuwen PAM. (2004) Glutamine: recent developments in research on the clinical significance of glutamine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7: 59-70.
- ⁷⁷ Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74: 1124-36.

-
- ⁷⁸ Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Hotter G. (1998) Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology*, 28: 768-73.
- ⁷⁹ Van winkle DM, Thornton JD, Downey DM, Downey JM. (1991) The natural history of preconditioning: cardioprotection depends on duration of transient ischemia and time to subsequent ischemia. *Coron Artery Dis*, 2: 613-619.
- ⁸⁰ Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M. (1993) Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res*, 72: 1293-1299.
- ⁸¹ Carini R, Albano E. (2003) Recent Insights on the Mechanisms of Liver Preconditioning. *Gastroenterology*, 125:1480-149.
- ⁸² Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. (2003) Protection of the Liver by Ischemic Preconditioning: A Review of Mechanisms and Clinical Applications. *Dig Surg*, 20: 383-396.
- ⁸³ Rubino A, Yellon DM. (2000) Ischaemic preconditioning of the vasculature: an overlooked phenomenon for protecting the heart? *Trends Pharmacol Sci*, 21: 225-30.
- ⁸⁴ Kowaltowski AJ, Seetharman S, Paucek P, Garlid KD. (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K₁ channel of heart mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280: H649- H657.
- ⁸⁵ Nichols CG, Ripoll C, Lederer WJ. (1991) ATP-sensitive potassium channel modulation of guinea pig ventricular action potential and contraction. *Circ Res*, 68: 280-287.
- ⁸⁶ Wang YP, Maeta H, Mizoguchi K, Suzuki T, Yamashita Y, Oe M. (2002) Intestinal ischemia preconditions myocardium: role of protein kinase C and mitochondrial K channel. *Cardiovasc Res*, 55: 576-582.
- ⁸⁷ Kersten JR, Schmeling TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. (1997) Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of KATP channels: Reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology*, 87: 361-370.
- ⁸⁸ Kowalski C, Zahler S, Becker BF. (1997) Halothane, isoflurane, and sevoflurane reduce postischemic adhesion of neutrophils in the coronary system. *Anesthesiology*, 86: 188-195.

-
- ⁸⁹ Preckel B, Thamer V, Schlack W. (1999) Beneficial effects of sevoflurane and desflurane against myocardial reperfusion injury after cardioplegic arrest. *Can J Anesth*, 46: 1076-1081.
- ⁹⁰ Wischmeyer PE. (2008) Glutamine: role in critical illness and ongoing clinical trials. *Curr Opin Gastroenterol*, 24:190-197.
- ⁹¹ Morel Y, Barouki R. (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*, 3: 481-496.
- ⁹² Griffiths RD, Jones C, Palmer A. (1997) Six-month outcome of critically ill patients given glutamine-supplemented parenteral nutrition. *Nutrition*; 13:295-302.
- ⁹³ Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD II. (2002) Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother*, 56: 446-457.
- ⁹⁴ Kvamme E, Roberg B, Torgner IA. (2000) Glutamine transport in brain mitochondria. *Neurochem Int*, 37: 131-138.
- ⁹⁵ Boza JJ, Moennoz D, Bournot CE, Blum S, Zbinden I, Finot PA, Balleve O. (2000) Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells. *Eur J Nutr*, 39: 38-46.
- ⁹⁶ Darmaun D. (2000) Role of glutamine depletion in severe illness. *Diabetes Nutr Metab*, 13: 25-30.
- ⁹⁷ Babu R, Eaton S, Drake DP, Spitz L, Pierro A. (2001) Glutamine and glutathione counteract the inhibitory effects of mediators of sepsis in neonatal hepatocytes. *J Pediatr Surg*, 36: 282-286.
- ⁹⁸ Dumaswala UJ, Zhuo L, Mahajan S, Nair PN, Shertzer HG, Dibello P, Jacobsen DW. (2001) Glutathione protects chemokine-scavenging and antioxidative defense functions in human RBCs. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C867-873.
- ⁹⁹ Colquhoun A, Newsholme EA. (1997) Aspects of glutamine metabolism in human tumour cells. *Biochem Mol Biol Int*, 41: 583-596.
- ¹⁰⁰ Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Rippe RA, Westwick JK, Cox AD, Berschneider HM, Brenner DA. (1997) L-Glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol*, 272: G943-953.

-
- ¹⁰¹ Papaconstantinou HT, Hwang KO, Rajaraman S, Hellmich MR, Townsend CMJ, Ko TC (1998) Glutamine deprivation induces apoptosis in intestinal epithelial cells. *Surgery*, 124: 152-159.
- ¹⁰² Oehler R, Roth E. (2003) Regulative capacity of glutamine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 6: 277-282.
- ¹⁰³ Roth E. (2001) Oral glutamine: does it make sense? *Nutrition*, 17: 52-53.
- ¹⁰⁴ Savolainen KM, Loikkanen J, Naarala J. (1995) Amplification of glutamate-induced oxidative stress. *Toxicol Lett*, 82–83: 399-405.
- ¹⁰⁵ Rhoads JM, Argenzio RA, Chen W, Graves LM, Licato LL, Blikslager AT, Smith J, Gatzy J, Brenner DA. (2000) Glutamine metabolism stimulates intestinal cell MAPKs by a cAMP-inhibitable, Raf-independent mechanism. *Gastroenterology*, 118: 90–100.
- ¹⁰⁶ Ko YG, Kim EY, Kim T, Park H, Park HS, Choi EJ, Kim S. (2001) Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutaminyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem*, 276: 6030-6036.
- ¹⁰⁷ Bellon G, Chaqour B, Wegrowski Y, Monboisse JC, Borel JP. (1995) Glutamine increases collagen gene transcription in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1268: 311-323.
- ¹⁰⁸ Curthoys NP, Gstraunthaler G. (2001) Mechanism of increased renal gene expression during metabolic acidosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281: F381-F390.
- ¹⁰⁹ Wischmeyer PE, Jayakar D, Williams U, Singleton KD, Riehm J, Bacha EA, Jeevanandam V, Christians U, Serkova N. (2003) Single dose of glutamine preserves myocardial tissue metabolism, glutathione content, and enhances myocardial function following ischemia-reperfusion injury. *J Parenter Enteral Nutr*, 27: 396-403.
- ¹¹⁰ Singleton KD, Beckey VE, Wischmeyer PE. (2005) Glutamine prevents activation of NF-kappaB and stress kinase pathways, attenuates inflammatory cytokine release, and prevents acute respiratory distress syndrome (ARDS) following sepsis. *Shock*, 24:583-589.
- ¹¹¹ Khogali SE, Harper AA, Lyall JA, Rennie MJ. (1998) Effects of l-glutamine on post-ischaemic cardiac function: protection and rescue. *J Mol Cell Cardiol*, 30: 819-827.
- ¹¹² Yang R, Tan X, Thomas AM, Steppacher R, Qureshi N, Morrison DC, Van Way C. (2007) Alanine-glutamine dipeptide (AGD) inhibits expression of inflammation-related genes in hemorrhagic shock. *J Parenter Enteral Nutr*, 31: 32-36.

-
- ¹¹³ Passos de Jesus Mazza R, Bertevello PL, Matos de Miranda Torrinas R, Nonogaki S, Avancini Ferreira Alves V, Gama Rodrigues J, Waitzberg DL. (2003) Effect of glutamine dipeptide on hepatic regeneration in partially hepatectomized malnourished rats. *Nutrition*, 19: 930-935.
- ¹¹⁴ CJ Jia, CL Dai, X Zhang, K Cui, F Xu, YQ Xu. (2006) Alanyl-glutamine dipeptide inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats CN 14-1219/R. *World J Gastroenterol*, 12: 1373-1378.
- ¹¹⁵ Noh J, Behrends M, Choi S, Bedolli MA, Yardi J, Hirose R, Niemann CU. (2006) Glutamin does not protect against hepatic warm ischemia/reperfusion injury in rats. *J Gastrointest Surg*, 10: 234-239.
- ¹¹⁶ Fukatsu K, Ueno C, Hashiguchi Y, Hara E, Kinoshita M, Mochizuki H, Hiraide H. (2003) Glutamine infusion during ischemia is detrimental in a murine gut ischemia/reperfusion model. *J Parenter Enteral Nutr*, 27: 187-192.
- ¹¹⁷ Amores-Sánchez MI, Medina MA. (1999) Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress. *Mol Genet Metab*, 67: 100-105.
- ¹¹⁸ Piccirillo N, De Matteis S, Laurenti L, Chiusolo P, Sora F, Pittiruti M, Rutella S, Cicconi S, Fiorini A, D'Onofrio G, Leone G, Sica S. (2003) Glutamine-enriched parenteral nutrition after autologous peripheral blood stem cell transplantation: effects on immune reconstitution and mucositis. *Haematologica*, 88: 192-200.
- ¹¹⁹ Fürst P. (2000) A thirty-year odyssey in nitrogen metabolism: from ammonium to dipeptides. *J Parenter Enteral Nutr*, 24: 197-209.
- ¹²⁰ Fürst P, Albers S, Stehle P. (1995) Glutamine supplemented nutrition in clinical practice use of glutamine-containing dipeptides. *Infusionsther Transfusionsmed*, 22: 317.
- ¹²¹ Calder PC. (1994) Glutamine and the immune system. *Clin Nutr*, 13: 2-8.
- ¹²² Morlion BJ, Stehle P, Wachtler P, Siedhoff HP, Köller M, König W, Fürst P, Puchstein C. (1998) Total parenteral nutrition with glutamine dipeptide after major abdominal surgery: a randomized, double-blind, controlled study. *Ann Surg*, 227: 302-308.
- ¹²³ JX Song, XH Tu, Lie W, CJ Li. (2004) Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition in patients with colorectal cancer. *Clin Nutrition Suppl*, 1: 49-53.

-
- ¹²⁴ Greig JE, Keast D, Garcia-Webb P, Crawford P. (1996) Inter-relationships between glutamine and other biochemical and immunological changes after major vascular surgery. *Brit J Biomed Sci*, 53: 116-121.
- ¹²⁵ Karwowska KA, Dworacki G, Trybus M, Zeromski J, Szulc R. (2001) Influence of glutamine-enriched parenteral nutrition on nitrogen balance and immunologic status in patients undergoing elective aortic aneurysm repair. *Nutrition*, 17: 475-478.
- ¹²⁶ Ziegler TR, Ogden LG, Singleton KD, Luo M, Fernandez-Estivariz C, Griffith DP, Galloway JR, Wischmeyer PE. (2005) Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 31: 1079-1086.
- ¹²⁷ Coëffier M, Marion R, Ducrotte P, Dechelotte P. (2003) Modulating effect of glutamine on IL-1beta-induced cytokine production by human gut. *Clin Nutr*, 22: 407-413.
- ¹²⁸ Tremel H, Kienle B, Weilemann LS, Stehle P, Furst P. (1994) Glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition maintains intestinal function in the critically ill. *Gastroenterology*, 107: 1595-1601.
- ¹²⁹ Coëffier M, Miralles-Barrachina O, Le Pessot F, Lalaude O, Daveau M, Lavoine A, Lerebours E, Dechelotte P. (2001) Influence of glutamine on cytokine production by human gut in vitro. *Cytokine*, 13: 148-154.
- ¹³⁰ Goeters C, Wenn A, Mertes N, Wempe C, Van Aken H, Stehle P, Bone HG. (2002) Parenteral L-alanyl L-glutamine improves 6-month outcome in critically ill patients. *Crit Care Med*, 30: 2032-2037.
- ¹³¹ Kopustinskiene DM, Pollesello P, Saris NL. (2001) Levosimendan is a mitochondrial KATP channel opener. *Eur J Pharm*, 428: 311-314.
- ¹³² Pollesello P, Papp Z. (2007) The cardioprotective effects of levosimendan: preclinical and clinical evidence. *J Cardiovasc Pharmacol*, 50: 257-263.
- ¹³³ Woolsey CA, Coopersmith CM. (2006) Vasoactive drugs and the gut: is there anything new? *Curr Opin Crit Care*, 12: 155-159.
- ¹³⁴ Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC. (1996) Influence of levosimendan, pimobendan, and milrinone on the regional distribution of cardiac output in anaesthetized dogs. *Brit J Pharmacol*, 119: 609-615.
- ¹³⁵ Garcia-Septien J, Lorente JA, Delgado MA, de Paula M, Nin N, Moscoso A, Sanchez-Ferrer A, Perez-Vizcaino F, Esteban A. (2010) Levosimendan increases portal

blood flow and attenuates intestinal intramucosal acidosis in experimental septic shock. *Shock*, 34: 275-280.

¹³⁶ Zager RA, Johnson AC, Lund S, Hanson SY, Abrass CK. (2006) Levosimendan protects against experimental endotoxemic acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290: F1453-F1462.

¹³⁷ Haikala H, Pollesello P. (2000) Calcium sensitivity enhancers. *Drugs*, 3: 1199-1205.

¹³⁸ Pagel PS, Harkin CP, Hettrick DA, Warltier DC. (1994) Levosimendan (OR-1259), a myofilament calcium sensitizer, enhances myocardial contractility but does not alter isovolumic relaxation in conscious and anesthetized dogs. *Anesthesiology*, 81: 974-987.

¹³⁹ Hajjar RJ, Schmidt U, Helm P, Gwathmey JK. (1997) Ca⁺⁺ sensitizers impair cardiac relaxation in failing human myocardium. *J Pharmacol Exp Ther*, 280: 247-254.

¹⁴⁰ Lilleberg J, Laine M, Palkama T, Kivikko M, Pohjanjousi P, Kupari M. (2007) Duration of the haemodynamic action of a 24-h infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*, 9: 75-82.

¹⁴¹ Brixius K, Reicke S, Schwinger RH. (2002) Beneficial effects of the Ca²⁺ sensitizer levosimendan in human myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 282: H131-137.

¹⁴² Verde I, Vandecasteele G, Lezoualc'h F, Fischmeister R. (1999) Characterization of the cyclic nucleotide phosphodiesterase subtypes involved in the regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *Brit J Pharmacol*, 127: 65-74.

¹⁴³ Lilleberg J, Ylönen V, Lehtonen L, Toivonen L. (2004) The calcium sensitizer levosimendan and cardiac arrhythmias: an analysis of the safety database of heart failure treatment studies. *Scand Cardiovasc J*, 38: 80-84.

¹⁴⁴ Pataricza J, Höhn J, Petri A, Balogh A, Papp JG. (2000) Comparison of the vasorelaxing effect of cromakalim and the new inodilator, levosimendan, in human isolated portal vein. *J Pharm Pharmacol*, 52: 213-217.

¹⁴⁵ Pataricza J, Krassói I, Höhn J, Kun A, Papp JG. (2003) Functional role of potassium channels in the vasodilating mechanism of levosimendan in porcine isolated coronary artery. *Cardiovasc Drugs Ther*, 17:115-121.

¹⁴⁶ Yokoshiki H, Sperelakis N. (2003) Vasodilating mechanisms of levosimendan. *Cardiovasc Drugs Ther*, 17: 111-113.

-
- ¹⁴⁷ Bowman P, Haikala H, Paul RJ. (1999) Levosimendan, a calcium sensitizer in cardiac muscle, induces relaxation in coronary smooth muscle through calcium desensitization. *J Pharmacol Exp Ther*, 288: 316-325.
- ¹⁴⁸ Michaels AD, McKeown B, Kostal M, Vakharia KT, Jordan MV, Gerber IL, Foster E, Chatterjee K. (2005) Effects of intravenous levosimendan on human coronary vasomotor regulation, left ventricular wall stress, and myocardial oxygen uptake. *Circulation* 111: 1504-1509.
- ¹⁴⁹ De Luca L, Sardella G, Proietti P, Battagliese A, Benedetti G, Di Roma A, Fedele F. (2006) Effects of levosimendan on left ventricular diastolic function after primary angioplasty for acute anterior myocardial infarction: a Doppler echocardiographic study. *J Am Soc Echocardiogr*, 19: 172-177.
- ¹⁵⁰ Slawsky MT, Colucci WS, Gottlieb SS, Greenberg BH, Haeusslein E, Hare J, Hutchins S, Leier CV, LeJemtel TH, Loh E, Nicklas J, Ogilby D, Singh BN, Smith W. (2000) Acute hemodynamic and clinical effects of levosimendan in patients with severe heart failure. Study Investigators. *Circulation*, 102: 2222-2227.
- ¹⁵¹ Todaka K, Wang J, Yi GH, Stennett R, Knecht M, Packer M, Burkhoff D. (1996) Effects of levosimendan on myocardial contractility and oxygen consumption. *J Pharmacol Exp Ther*, 279: 120-127.
- ¹⁵² Erdei N, Papp Z, Pollesello P, Edes I, Bagi Z. (2006) The levosimendan metabolite OR-1896 elicits vasodilation by activating the K(ATP) and BK(Ca) channels in rat isolated arterioles. *Brit J Pharmacol*, 148: 696-702.
- ¹⁵³ Kopustinskiene DM, Pollesello P, Saris NE (2004) Potassium-specific effects of levosimendan on heart mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 68: 807-812.
- ¹⁵⁴ Parissis JT, Adamopoulos S, Farmakis D, Filippatos G, Paraskevidis I, Panou F, Iliodromitis E, Kremastinos DT. (2006) Effects of serial levosimendan infusions on left ventricular performance and plasma biomarkers of myocardial injury and neurohormonal and immune activation in patients with advanced heart failure. *Heart*, 92: 1768-1772.
- ¹⁵⁵ Lilleberg J, Laine M, Palkama T, Kivikko M, Pohjanjousi P, Kupari M. (2007) Duration of the haemodynamic action of a 24-h infusion of levosimendan in patients with congestive heart failure. *Eur J Heart Fail*, 9: 75-82.

-
- ¹⁵⁶ Nony P, Boissel JP, Lievre M, Leizorovicz A, Haugh MC, Fareh S, de Breyne B. (1994) Evaluation of the effect of phosphodiesterase inhibitors on mortality in chronic heart failure patients. A meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*, 46:191-196.
- ¹⁵⁷ du Toit EF, Hofmann D, McCarthy J, Pineda C. (2001) Effect of levosimendan on myocardial contractility, coronary and peripheral blood flow, and arrhythmias during coronary artery ligation and reperfusion in the in vivo pig model. *Heart*, 86: 81-87.
- ¹⁵⁸ Toivonen L, Viitasalo M, Sundberg S, Akkila J, Lehtonen L. (2000) Electrophysiologic effects of a calcium sensitizer inotrope levosimendan administered intravenously in patients with normal cardiac function. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35: 664-669.
- ¹⁵⁹ Mebazaa A, Barraud D, Welschbillig S. (2005) Randomized clinical trials with levosimendan. *Am J Cardiol*, 96: 74G-79G.
- ¹⁶⁰ Bolli R, Marbán E. (1999) Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev*, 79: 609-634.
- ¹⁶¹ Parissis JT, Adamopoulos S, Antoniadis C, Kostakis G, Rigas A, Kyrzopoulos S, Iliodromitis E, Kremastinos D. (2004) Effects of levosimendan on circulating pro-inflammatory cytokines and soluble apoptosis mediators in patients with decompensated advanced heart failure. *Am J Cardiol*, 93: 1309-1312.
- ¹⁶² Trikas A, Antoniadis C, Latsios G, Vasiliadou K, Karamitros I, Tousoulis D, Tentolouris C, Stefanadis C. (2006) Long-term effects of levosimendan infusion on inflammatory processes and sFas in patients with severe heart failure. *Eur J Heart Fail*, 8: 804-809.
- ¹⁶³ Hasenfuss G, Pieske B, Kretschmann B, Holubarsch C, Alpert NR, Just H. (1995) Effects of calcium sensitizers on intracellular calcium handling and myocardial energetics. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26: S45-51.
- ¹⁶⁴ Kupcsulik P, Kokas P. (1979) Ischemic damage of the liver. Part II: In vivo investigation of the prevention of the ischemic lesion of the liver. *Acta Hepato-Gastroenterologica*, 26(4): 284-9.
- ¹⁶⁵ Kupcsulik P, Stekker K, Németh M. (1977) Effect of ischaemia on the enzyme activity of the hepatic tissue. *Res Exp Med*, 170(3): 259-70.
- ¹⁶⁶ Kupcsulik P. (1977) Az ischaemia hatása a májra: A májkárosodás megelőzésének lehetőségei. Kandidátusi értekezés, MTA TMB.

-
- ¹⁶⁷ Radovits T, Zotkina J, Lin LN, Bömicke T, Arif R, Gerő D, Horváth EM, Karck M, Szabó C, Szabó G. (2007) Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition improves endothelial dysfunction induced by hypochlorite. *Exp Biol Med*, 232: 1204-1212.
- ¹⁶⁸ Mabley JG, Horvath EM, Murthy KG, Zsengellér Z, Vaslin A, Benkő R, Kollai M, Szabó C. (2005) Gender differences in the endotoxin-induced inflammatory and vascular responses: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 315: 812-820.
- ¹⁶⁹ Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. (1998) Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 36: 2090-7.
- ¹⁷⁰ Lowry OH. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-75.
- ¹⁷¹ Oyaizu M. (1986) Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*, 44: 307-15.
- ¹⁷² Sedlak J, Lindsay RH. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25: 192-205.
- ¹⁷³ Blázovics A, Kovács A, Lugasi A, Hagymási K, Biró L, Fehér J. (1999) Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: a chemiluminescent study. *Clin Chem*, 45: 895-6.
- ¹⁷⁴ Dubowitz V, Sewry CA. (2007) *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, US, pp. 21-40.
- ¹⁷⁵ Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248–254.
- ¹⁷⁶ Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- ¹⁷⁷ Kurucz I, Tombor B, Prechl J, Erdő F, Hegedűs E, Nagy Z, Vitai M, Korányi L, László L. (1999) Ultrastructural localization of HSP-72 examined with a new polyclonal antibody raised against the truncated variable domain of the heat shock protein. *Cell Stress Chaperon*, 4: 139-152.
- ¹⁷⁸ Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR.(2003) Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. *FASEB J*, 17 :64-6.

-
- ¹⁷⁹ Jaeschke H, Lemasters JJ. (2003) Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology*, 125: 1246–1257.
- ¹⁸⁰ Arii S, Teramoto K, Kawamura T. (2003) Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. *J Hepato-Biliary-Pan*, 10: 189-194.
- ¹⁸¹ Lentsch AB, Kato A, Yoshidome H, McMasters KM, Edwards MJ. (2000) Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology*, 32: 169-73.
- ¹⁸² Novak F, Heyland DK, Avenell A, Drover JW, Su X. (2002) Glutamine supplementation in serious illness: a systematic review of the evidence. *Crit Care Med*, 30: 2022-2029.
- ¹⁸³ Lochs H, Valentini L, Schütz T, et al.(2006) ESPEN Guidelines on adult enteral nutrition. *Clin Nutr*, 25: 177-360.
- ¹⁸⁴ Szijártó A, Batmunkh E, Hahn O, Mihály Z, Kreiss A, Kiss A, Lotz G, Schaff Zs, Váli L, Blázovics A, Gerő D, Szabó Cs, Kupcsulik P. (2007) Effect of PJ-34 PARP-Inhibitor on Rat Liver Microcirculation and Antioxidant Status. *J Surg Res*, 142: 72-80.
- ¹⁸⁵ Curi R, Lagranha CJ, Doi SQ, Sellitti DF, Procopio J, Pithon-Curi TC, Corless M, Newsholme P. (2005) Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol*, 204: 392-401.
- ¹⁸⁶ Singleton KD, Serkova N, Beckey VE, Wischmeyer PE. (2005) Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: Role of enhanced heat shock protein expression. *Crit Care Med*, 33: 1206-1213.
- ¹⁸⁷ Kei Y, Yuzo Y, Hidekazu Y, Yasuhide I, Hiroshi U, Kojiro T, Akio N, Yoshio Y. (2001) Suppression of tumor necrosis factor- α production and neutrophil infiltration during ischemia-reperfusion injury of the liver after heat shock preconditioning. *J Hepatol*, 35: 619-627.
- ¹⁸⁸ Singleton KD, Wischmeyer PE. (2007) Glutamine's protection against sepsis and lung injury is dependent on heat shock protein 70 expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292: 1839-1845.
- ¹⁸⁹ Fink MP. (2002) Cytopathic hypoxia. Is oxygen use impaired in sepsis as a result of an acquired intrinsic derangement in cellular respiration? *Crit Care Clin*, 18: 165–175.

-
- ¹⁹⁰ Chun K, Zhang J, Biewer J, Ferguson D, Clemens M. (1994) Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. *Shock*, 1: 3-9.
- ¹⁹¹ Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M. (2004) Glutathione Protects the Rat Liver Against Reperfusion Injury After Prolonged Warm Ischemia. *Ann Surg*, 239: 220-231.
- ¹⁹² Jagtap P, Szabo C. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 4: 421.
- ¹⁹³ Barraud D, Faivre V, Damy T, Welschbillig S, Gayat E, Heymes C, Payen D, Shah AM, Mebazaa A. (2007) Levosimendan restores both systolic and diastolic cardiac performance in lipopolysaccharide-treated rabbits: Comparison with dobutamine and milrinone. *Crit Care Med*, 35: 1376-1382.
- ¹⁹⁴ Grossini E, Molinari C, Caimmi PP, Uberti F, Vacca G. (2009) Levosimendan induces NO production through p38 MAPK, ERK and Akt in porcine coronary endothelial cells: role for mitochondrial K(ATP) channel. *Brit J Pharmacol*, 156: 250-261.
- ¹⁹⁵ Karakus E, Halici Z, Albayrak A, Bayir Y, Aydin A, Unal D, Cadirci E, Ferah I, Odaci E. (2012) Beneficial pharmacological effects of levosimendan on antioxidant status of acute inflammation induced in paw of rat: Involvement in inflammatory mediators. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 112(3):156-63.
- ¹⁹⁶ Avgeropoulou C, Andreadou I, Markantonis-Kyroudis S, Demopoulou M, Missovoloulos P, Androulakis A, Kallikazaros I. (2005) The Ca²⁺ 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*, 7: 882-887.
- ¹⁹⁷ Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaschke H. (2001) Mechanism of Cell Death During Warm Hepatic Ischemia-Reperfusion in Rats: Apoptosis or Necrosis? *Hepatology*, 33:397-405.
- ¹⁹⁸ Grossini E, Molinari C, Pollesello P, Bellomo G, Valente G, Mary D, Vacca G, Caimmi P. (2012) Levosimendan protection against kidney ischemia/reperfusion injuries in anesthetized pigs. *J Pharmacol Exp Ther*, 342: 376-388.
- ¹⁹⁹ Soeding PF, Crack PJ, Wright CE, Angus JA, Royse CF. (2011) Levosimendan preserves the contractile responsiveness of hypoxic human myocardium via

mitochondrial K(ATP) channel and potential pERK 1/2 activation. *Eur J Pharmacol*, 655: 59-66.

²⁰⁰ Kume M, Yamamoto Y, Saad S. (1996) Ischemic preconditioning of the liver in rats: Implications of heat shock protein induction to increase tolerance of ischemia-reperfusion injury. *J Lab Clin Med*, 128: 251-258.

²⁰¹ du Toit EF, Genis A, Opie LH, Pollesello P, Lochner A. (2008) A role for the RISK pathway and K(ATP) channels in pre- and post-conditioning induced by levosimendan in the isolated guinea pig heart. *Brit J Pharmacol*, 154: 41-50.

²⁰² Das B, and Sarkar C. (2007) Pharmacological preconditioning by levosimendan is mediated by inducible nitric oxide synthase and mitochondrial KATP channel activation in the in vivo anesthetized rabbit heart model. *Vasc Pharmacol*, 47: 248-256.

10. Saját publikációk jegyzéke

A tézisek témájához kapcsolódó közlemények

1/ Stangl R, Szijártó A, Ónody P, Tamás J, Tátrai M, Hegedüs V, Blázovics A, Lotz G, Kiss A, Módis K, Gerő D, Szabó Cs, Kupcsulik P, Harsányi L. (2011) Reduction of liver ischemia-reperfusion injury via glutamine pretreatment. J Surg Res, 166 (1): 95-103. **IF: 2.247**

2/ 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. (2007) Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia-reperfusion model: effects on microcirculation and antioxidant status in rats. Clin Nutr, (26):640-48. **IF: 2.878**

További közlemények

3/ Módis K, Gerő D, Stangl R, Rosero O, Szijártó A, Lotz G, Mohácsik P, Szoleczky P, Coletta C, Szabó Cs. (2012) Adenosine and inosine exert cytoprotective effects in an in vitro model of liver ischemia-reperfusion injury. Int J Mol Med, 31 (2): 437-446.

IF: 1.573 (2011)

4/ Rosero O, Ónody P, Stangl R, Hegedüs V, Lotz G, Blázovics A, Kupcsulik P, Szijártó A. (2011) Posztkondicionálás kísérletes vizsgálata vékonybél ischaemiás-reperfúziós modelljében. Magyar Sebészet, 64 (1): 28-36.

5/ Gyurkovics E, Arányi P, Stangl R, Ónody P, Ferreira G, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2011) Postconditioning of the lower limb - protection against the reperfusion syndrome. J Surg Res, 169 (1): 139-47 p. **IF: 2.247**

6/ Szijártó A, Turóczy Zs, Arányi P, Garbaisz D, Varga M, Stangl R, Lotz G, Kupcsulik P. (2010) Hosszú idejű végtagi verőér-elzáródás és izomszövet-életképesség vizsgálata kísérletes állatmodellben. Magyar Sebészet, 63 (6): 374-79.

7/ Szijártó A, Gyurkovics E, Arányi P, Ónody P, Stangl R, Tátrai M, Lotz G, Mihály Z, Hegedüs V, Blázovics A, Kupcsulik P. (2009) Posztkondicionálás kísérletes alkalmazása aortakirekesztés kapcsán. Magyar Sebészet, 62 (4): 180-87.

8/ Stangl R, Szijártó A, Ónody P, Tamás J, Tátrai M, Hegedüs V, Blázovics A, Lotz G, Szász M, Kiss A, Gerő D, Szabó Cs, Kupcsulik P, Darvas K, Harsányi L. (2008) Hosszú latenciájú preoperatív glutamin előkezelés vizsgálata patkány ischaemia-reperfúziós modellben. Aneszteziológia és Intenzív Terápia, 38 (4):179-87.

11. Köszönetnyilvánítás

Befejezésül szeretném megköszönni Dr. Harsányi László és Dr. Kupcsulik Péter Professzor Uraknak, hogy az I.sz. Sebészeti Klinikán végzett kutatómunkát lehetővé tették számomra.

Külön köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Dr. Szijártó Attilának tanácsaiért és kitartó biztatásáért, valamint konzulensemnek Dr. Darvas Katalin Professzorasszonynak támogatásáért és megértéséért. Figyelmük végigkísérte az I.sz. Sebészeti Klinikán töltött éveimet és életre szóló tapasztalatok megszerzéséhez segített hozzá.

További köszönet illeti a Kísérleti Műtő, a II. sz. Patológiai Intézet és a CellScreen Applied Research Center mindazon munkatársait, akik nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el. Köszönet az öt év együtt töltött mindennapjaiért, a kölcsönös segítségnyújtásért, a barátságért és a jó hangulatért!

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni édesanyámnak, testvéremnek és barátaimnak a belém vetett hitüket, mely mindenkor erőt adott.