

dc_1098_15

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**AZ ISCHAEMIÁS KÓRÁLLAPOTOK
BEFOLYÁSOLHATÓSÁGA AZ IDŐ
FÜGGVÉNYÉBEN**



Dr. Szijártó Attila

Semmelweis Egyetem

Budapest

2015

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés	6
2. Célkitűzések	8
3. Anyagok és módszerek.....	10
3.1. Kísérleti elrendezés - Műtéttechnika	10
3.1.1. Törvényi háttér	10
3.1.2. Állatok	10
3.1.3. Anesztézia, testhőmérséklet és a műtét ideje.....	10
3.1.4. A műtét menete - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálata.....	10
3.1.5. Csoportbeosztás - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálata	12
3.1.6. A műtét menete - Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata	13
3.1.7. Csoportbeosztás - Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata	15
3.2. Vizsgált paraméterek - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálata	16
3.2.1. Hemodinamikai vizsgálatok	16
3.2.2. Hisztológiai vizsgálatok	16
3.2.3. Izomrost életképesség (NBT - morfometria).....	17
3.2.4. Laboratóriumi vizsgálatok.....	18
3.2.5. Redox-státusz	18
3.2.6. Molekuláris vizsgálatok (ELISA).....	18
3.2.7. Távoli szervek károsodásaink vizsgálatai	18
3.3. Vizsgált paraméterek - Máj ischaemia-reperfúziós károsodások vizsgálata	20
3.3.1. Hemodinamikai vizsgálatok	20
3.3.2. Hisztológiai vizsgálatok	20
3.3.3. Életképesség vizsgálat (NBT morfometria)	22
3.3.4. Laboratóriumi vizsgálatok.....	22
3.3.5. Redox-státusz	22
3.3.6. Molekuláris vizsgálatok (ELISA).....	23
3.4. Statisztikai analízis	23
4. Eredmények.....	23
4.1. Rövididejű végtagi ischaemia vizsgálata és mérséklése PostC segítségével.....	23
4.1.1. Végtagi mikrocirkuláció vizsgálata	23
4.1.2. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata.....	23
4.1.3. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata	24
4.1.4. Szabadgyök szint - luminometriás vizsgálatok	24
4.1.5. Szérum TNF-a szint meghatározás.....	24
4.1.6. Szérum IL-6 szint meghatározás	24
4.2. Rövididejű végtagi ischaemia veseszövődményeinek vizsgálata PostC segítségével.....	24

4.2.1. Vese mikrocirkuláció vizsgálata.....	24
4.2.2. Vese fénymikroszkópos vizsgálata.....	24
4.2.3. Anti-myoglobin immunhisztokémiai vizsgálat	25
4.2.4. Lipid peroxidáció	25
4.2.5. Vese funkció meghatározása	25
4.2.6. Szöveti HSP-72 szint meghatározás.....	25
4.3. Rövididejű végtagi ischaemia tüdőszövődményeinek vizsgálata PostC segítségével.....	25
4.3.1. Tüdő fénymikroszkópos vizsgálata	26
4.3.2. Tüdő szövet nedvességtartalma (W/D arány).....	26
4.3.4. Szöveti MPO aktivitás meghatározás.....	26
4.3.5. Szöveti HSP-72 szint meghatározás.....	26
4.3.6. Artériás vérgázanalízis	26
4.4. Rövid idejű végtagi ischaemia bélszövődményeinek vizsgálata és mérséklése PostC segítségével	26
4.4.1. Artériás középnyomás meghatározása	26
4.4.2. Arteria mesenterica superior véráramlásának vizsgálata.....	27
4.4.3. A vékonybél mikrocirkulációjának vizsgálata	27
4.4.4. A vékonybél fénymikroszkópos vizsgálata	27
4.4.5. Bél mikrocirkuláció és szövettani károsodás közti korreláció	28
4.5. Kritikus ischaemia időtartamának meghatározása	28
- 4-, 6-, 8 óra ischaemia -.....	28
4.5.1. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata.....	28
4.5.2. Izomrost életképesség meghatározása	28
4.6. Hosszú idejű (kritikus) végtagi ischaemia mérséklése PostC segítségével	28
4.6.1. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata.....	28
4.6.2. Izomrost életképesség meghatározása	29
4.6.3. Elektronmikroszkópia	29
4.6.4. Izomszövet nedvességtartalma (W/D arány).....	29
4.6.5. Laboratóriumi vizsgálatok.....	29
4.7. Izomrost életképesség meghatározás (NBT) vizsgálata	30
4.7.1. Végtagi mikrocirkuláció vizsgálata	30
4.7.2. Ischaemiás károsodás vizsgálata	30
4.8. A hosszú idejű ischaemia-reperfúziós károsodás vizsgálata	31
4.8.1. Izomrost életképesség meghatározása.....	31
4.8.2. Félvékony metszetek fénymikroszkópos vizsgálata.....	31
4.8.3. Elektronmikroszkópia	31
4.9. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - távoli szervi perkondicionálás (I-PerC)	31
4.9.1. Artériás középnyomás meghatározás.....	31

4.9.2. Máj és alsó végtagi mikrocirkuláció vizsgálata.....	32
4.9.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata	32
4.9.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT).....	32
4.9.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet).....	32
4.9.6. Szérum TNF- α szint meghatározása.....	33
4.10. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata és a távoli szervi perkondicionálás (I-PerC) neurális hatásmechanizmusának tanulmányozása.....	33
4.10.1. Artériás középnyomás meghatározása	33
4.10.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata	33
4.10.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (morfometria).....	33
4.10.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT).....	33
4.10.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet).....	34
4.11. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - Levosimendan előkezelés vizsgálata.....	34
4.11.1. Artériás középnyomás meghatározása	34
4.11.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata	35
4.11.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (HE, Sudan IV, TUNEL, PARP)	35
4.11.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT).....	35
4.11.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet).....	36
4.11.6. HSP-72 szint meghatározása	36
4.11.7. Életképesség meghatározás (NBT).....	36
4.12 Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - "Rövid latenciájú" glutamin előkezelés (Glu-R) vizsgálata	37
4.12.1. Artériás középnyomás meghatározása	37
4.12.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata	37
4.12.3. Máj metszeteinek fénymikroszkópos vizsgálata (HE, TUNEL, caspase-3).....	37
4.12.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT).....	37
4.12.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum)	38
4.12.6. TNF- α -szint meghatározása	38
4.13. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - "Hosszú latenciájú" glutamin (Glu-H) előkezelés vizsgálata	38
4.13.1. Artériás középnyomás meghatározása	38
4.13.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata	38
4.13.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (HE, Sudan IV, TUNEL, PARP)	38
4.13.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT).....	39
4.13.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum)	39
4.14. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - PJ-34 előkezelés vizsgálata	40
4.14.1. Artériás középnyomás meghatározása	40
4.14.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata	40

4.14.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (HE, TUNEL)	40
4.14.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT).....	40
4.14.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum)	40
5. Következtetések.....	41
6. Új megállapítások.....	42
7. Közleményjegyzék	43
7.1. Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai közlemények időrendben (Σ IF: 38,411 IF)	43
7.2. A Ph.D. fokozat megszerzését megelőző vagy követő időszak egyéb nemzetközi és hazai közleményei időrendben (Σ IF: 37,362 IF)	46
7.3. A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények	51
8. Köszönetnyilvánítás	52

1. Bevezetés, irodalmi áttekintés

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

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

Jelen munka azon gyakorló sebész szemével íródott, aki napi tapasztalatait, kérdéseit kísérletes elrendezésekbe fordítva keres választ az egyes szervek ischaemia-reperfúziós károsodásainak leírására, illetve azok kivédésének lehetőségeire. Ezt hivatott képviselni az alábbiakban tárgyalt két szerv keringészavarait bemutató egy-egy klinikai példa is. A szerző vizsgálatainak célpontjául két olyan szervet, szövetet választott (alsó végtagi vázizomzat, máj), melyek az ischaemia-reperfúziós károsodás szempontjából, annak időbeli lefolyásában és így a károsodások mérséklését célzó beavatkozások időzítetttségében jelentős eltéréseket mutatnak.

Míg az alsó végtagi ischaemiás tolerancia eléri a 8-12 órát, addig májszövet esetében ez nagyjából mindösszesen egy órára tehető. Amíg az izomszövetben kialakuló reperfúziós válaszelenségek az ischaemia-reperfúziós károsodások „tisztá” formáját mutatják, úgy a májban a speciális szöveti struktúra és a helyhez kötött macrophagok jelenléte nagymértékben megváltoztatja a folyamat dinamikáját, kimenetelét. Továbbá míg az alsó végtagi akut verőér-elzáródások egy jelenős része nem műtéti szituációhoz kötött, tehát nem tervezetten hozzuk azt létre, hanem heveny tromboemboliás jelenségek klinikai megjelenése kapcsán lép fel (számottevően leszűkítve a terápiás lehetőségek tárházát), addig a májszöveten létrehozott ischaemiás inzultus az esetek döntő hányadában tervezett műtéti beavatkozás része. Ennek megfelelően, míg az előbbi esetben a már kialakuló ischaemia és az azt követő károsodások kivédése lehet a cél, addig a máj esetén az ischaemiás tolerancia perioperatív növelése a klinikai végpont.

2. Célkitűzések

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

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

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

1. Rágszáló modellben milyen mértékű lokális és távoli szervi károsodást képes létrehozni egy prolongált, de kritikusnak nem mondható, műtéti helyzetet is modellező infrarenális aortakirekesztés?
2. A fenti modellben milyen hatásokkal bír a reperfúzió kezdetén alkalmazott adaptív sebészeti manőver - a posztkondicionálás - mind a célszerv, mind a távoli szervek (vese, tüdő, bél) tekintetében?
3. Az izomszöveten létrehozott, fokozatosan hosszabbodó ischaemiás időtartamok milyen fény-, és elektron mikroszkópos változásokat okoznak? Hol van a kritikus ischaemia határa?
4. Az általunk alkalmazott NBT enzimhisztokémián alapuló új módszer alkalmas-e a kialakult károsodást megfelelő érzékenységgel detektálni?
5. Alkalmas-e a posztkondicionálás hosszú idejű ischaemiát követően a szövettani károsodás mértékének csökkentésére?

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

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

Hogyan befolyásolja a preoperatív alkalmazott PJ-34 PARP inhibitor a máj károsodását ischaemia-reperfúziós modellben?

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti elrendezés - Műtéttechnika

3.1.1. Törvényi háttér

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

3.1.2. Állatok

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

3.1.3. Anesztézia, testhőmérséklet és a műtét ideje

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

3.1.4. A műtét menete - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálat

Intraperitoneális anesztézia-indukciót követően a jobb vena jugularis interna kipreparálása után 22 G-s polietilén kanül került bevezetésre, melyen keresztül a műtét időtartama alatt az általános anesztézia fenntartása és a parenterális folyadékpótlás biztosítása történt. A fenntartó altatás megkezdését követően invazív vérnyomás monitorozása céljából a bal artéria carotis communis kipreparálására és kanülálására került sor. Ezt követően az állatok bal lábszárnak külső oldalán, a végtag tengelyével párhuzamosan ejtett 2 cm hosszú bőrmetszés segítségével a m. biceps femoris laterális felszíne feltárássra került. A metszésen keresztül a térd felett 0,5 cm-rel lézer Doppler áramlásmérő került rögzítésre, majd 5 perc alapáramlást regisztrálása történt. A medián laparotómiát a hasi aorta infrarenális szakaszának kipreparálása követte, mely után az aortára, közvetlenül a bifurkáció felett atraumatikus mikroklip (Aesculap Yasargil FT260T, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Németország) került felhelyezésre. Az ischaemia alatt a hasüreget tovaftató varratsorral zártuk. Adott hosszúságú ischaemiás szakaszt (3, 4, 6, 8, 9 óra) követően az okklúziót megszüntettük, melyet csoportbeosztástól függően 2-72 óra hosszúságú reperfúziós periódus követett (lásd csoportbeosztás 2. táblázat). A reperfúzió ideje alatt az altatást fenntartottuk, valamint a

hasüreget kétrétegű tova futó varratsorral zártuk. Az állatok egy csoportjában közvetlenül a reperfúziót megelőzően posztkondicionálást (PostC) végeztünk 6 ciklusban, ciklusonként 10 másodperc reperfúzióval, 10 másodperc reokklúzióval, összesen tehát 2 percen keresztül (lásd csoportbeosztás 2. táblázat). A kísérlet végeztével az állatokat altatásban a jobb kamra punkcióján keresztül kivérettük, majd izom (m. tibialis anterior) és egyéb mintavételre került sor. Az áloperált csoportban nem került felhelyezésre mikroklip, minden más tekintetben - az időbeli viszonyokat is figyelembe véve - pontosan úgy jártunk el, mint a többi csoportban.

3.1.5. Csoportbeosztás - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálata

Az állatok csoportbeosztását és a felhasznált állatok számát az 1. táblázat tartalmazza.

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

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

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

3.1.6. A műtét menete - Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata

A kísérletekben használt állatmodell alapját a Semmelweis Egyetem I. sz. Sebészeti Klinikáján kifejlesztett modell képezi (Kupcsulik P. és munkatársai 1979). [211, 212] Lényege, hogy patkánymáj lebonyozott szerkezetét alapul véve (14. ábra), a máj tömegének nagy részét képező mediális (medial lobe: ML) és bal laterális (left lateral lobe: LLL) lebenyek a keringésből kirekeszthetők, mialatt az jobb laterális (right lateral lobe: RLL) és caudalis (caudate lobe: CL) lebenyeken át a splanchnikus keringés zavartalan, így az állatok által nehezen tolerált splanchnikus pangás, illetve anhepaticus fázis elkerülhető.

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

Az állatok egy részénél, csoportbeosztástól függően (lásd 3. táblázat) különböző sebészi, illetve farmakológiai (elő)kezelést végeztünk az ischaemia idejét megelőzően, illetve az ischaemia alatt. **Távoli szervi kondicionálást** vizsgáló (ischaemiás perkondicionálás: I-PerC) csoportokban az aorta infrarenális szakaszának atraumatikus mikrokliptel történő okklúziójával, a 60 perces máj ischaemia 20. percétől kezdődően 4 ciklusban (5 perc ischaemia, 5 perc reperfúzió) perkondicionálást végeztünk az alsó végtagi vázizomzaton. Az állatok egy részénél az I-PerC háttérmechanizmusának vizsgálata érdekében, a szegmentális máj ischaemiát megelőzően, a nervus femoralis és ischiadicus hozzátétőlegesen 0,5 cm hosszú resectióját végeztük, melyet 20 perc regenerációs időszak követett (-N csoportok). **"Rövid latenciájú" glutamin előkezelés csoportban** (Glu-R) az állatok közvetlenül a máj ischaemiáját megelőzően 400 mg/ttkg Dipeptiven® (Fresenius Kabi, Budapest, Magyarország) infúzióban részesültek 3 óra alatt. **"Hosszú latenciájú" glutamin előkezelés csoportban** (Glu-H) az állatok 24 órával az ischaemiát megelőzően 500 mg/ttkg Dipeptiven® infúzióban részesültek 5 óra alatt, 1 ml/h sebességgel. Dipeptiven® választott dózisa megegyezik a kísérlet idejében ajánlott (és jelenleg is érvényben lévő) klinikai dózissal, viszont az ajánlás változását követve eltér a korábbi vizsgálatban (Glu-R) adott (400 mg/ttkg) mennyiségtől. Mindkét fent említett glutamin adagolással végzett kísérletben az áloperált és az IR-kontroll csoport esetében 1 ml/h sebességgel, kevert aminosav (Aminoven®, Fresenius Kabi, Budapest, Magyarország) oldatot infundáltunk azonos volumenben az ischaemia előtt 3 órával („rövid latenciájú” csoport), illetve 5 órán keresztül 24 órával a műtét előtt („hosszú latenciájú” csoport). A **PARP inhibitor előkezelt csoportban** PJ-34 szelektív PARP-1 inhibitor alkalmaztuk (Inotek Pharmaceuticals

Corporation, Massachusetts, Beverly, Amerikai Egyesült Államok) 1 órával a máj ischaemia előtt 10 mg/ttkg dózisban intravénásan. Itt az áloperált és az IR-kontroll csoportban fiziológiás sóoldatot kaptak az állatok azonos térfogatban. **Levosimendan 1 (Lev-1) és -24 (Lev-24) előkezelt csoportok**nak megfelelően, az előkezelést közvetlenül a műtét előtt, vagy az ischaemiát 24 órával megelőzően végeztük 5 ciklusban. A levosimendan (Simdax[®], OrionPharma Kft, Magyarország) testtömegre számítottan adható dózisát (kalkulációs séma: 24µg/kg bólus + 0,4µg/kg/h infúzió) 5x5 perc alatt adtuk intravénásan, infúziós pumpa segítségével. Az infúziós ciklusok között 10-10 perc szünetet tartottunk. Az IR-kontroll és az áloperált csoportokban az állatok azonos módszerrel és azonos volumenben kapták a vegyület oldószerként használt 5%-os glukóz oldatot.

3.1.7. Csoportbeosztás - Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata

Az állatok csoportbeosztását és a felhasznált állatok számát a 2. táblázat tartalmazza.

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

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

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

3.2. Vizsgált paraméterek - Végtagi ischaemia-reperfúzió vizsgálata

3.2.1. Hemodinamikai vizsgálatok

3.2.1.1. Artériás középnyomás meghatározása

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

3.2.1.2. Szöveti mikrocirkuláció

A bal alsó végtagi (m. biceps femoris) perfúzió mértéke lézer Doppler áramlásmérővel (MOOR Instruments Ltd, London, UK; DRT4, kétcsatornás eszköz; $\lambda = 632,8$ nm; monokromatikus; 2 mW HeliumNeon lézer) került rögzítésre. A műszer a kibocsátott lézer fény Doppler-elv alapján történő visszaverődésének detektálásának révén működik. Az eszköz online adatrögzítéssel és számítógépes feldolgozással regisztrálja a mérőfej alatti kb. 1 mm³-es szövethengerben a kapillárisokban mért átlagos áramlást, vörösvértest koncentrációt és a hőmérsékletet. Az áramlási adatok által kirajzolt görbék összehasonlíthatósága érdekében, matematikai korrekció történt. Ennek alapja az ischaemia alatti áramlási átlagérték - az ún. biológiai nulla érték - minden flux értékből való kivonása, és az adatok relatív skálán való ábrázolása, melyen a 0%-os értékének az ischaemia alatti áramlást, míg 100%-os szélsőértékének az alapáramlást vesszük. Az ezt követő reperfúzió leírására újabb fogalmak bevezetésére van szükség: (1) plató maximum (PM) - a reperfúziós szakasz végső szakaszához (utolsó mért 10 perc) tartozó értékek számtani átlaga. (2) Reperfúziós terület (RT) - kiszámítása a reperfúzióhoz tartozó görbe alatti terület integrálásával történik. Az utóbbi paramétert az adatok jobb összehasonlíthatósága érdekében egy hipotetikus, már a reperfúzió nulla pillanatában 100%-os áramlással jellemezhető áramlási függvény görbe alatti területének százalékában adtuk meg. A feldolgozásnál minden áramlási görbe individuális kiértékelése történt. A kísérleti elrendezés szempontjából egy csoportba tartozó egyedek értékei átlagolásra kerültek. Ezt követően történt az átlagolt áramlási értékek grafikus megjelenítése.

3.2.2. Hisztológiai vizsgálatok

3.2.2.1. Rutin hematoxin-eozin festés - fénymikroszkópos vizsgálat

Minden állatból a bal oldali m. tibialis anterior azonos anatómiai lokalizációjából történt szövettani mintavétel. Az izomminták 4 %-os formalinban való 24 órás fixálását követően paraffinba kerültek beágyazásra. A rutin szövettani vizsgálatok elemzése konvencionális fénymikroszkóppal (Olympus BX50 mikroszkóp Olympus DP70 kamerával felszerelve; Olympus Corporation, Tokió, Japán) történt 3-5 μ m vastag metszeteken, hematoxin-eozin (HE) festést követően. A vizsgáló patológus a minták jelzését nem ismerte. Az izomkárosodás szemikvantitatív kiértékelésére McCormack és munkatársainak „Fourfold divided frame counting” módszerét alkalmaztuk: [213] az izom teljes keresztmetszetéről 200x-os nagyítással 15 db fénykép készült, mely lefedte az izom teljes területét. Ezek után minden egyes fényképet 4 egyenlő részre osztottunk, majd a negyedeket sorba rendeztük. Random generátorral meghatároztuk a negyedek vizsgálati sorrendjét. Egy vizsgált negyedben minden izomrost

beosztásra került sérült, vagy nem sérült csoportba. Sérültnek tekintettünk egy rostot, ha körvonala egyenetlen volt, vagy megszakadt, szerkezete, vagy színe inkonzisztens volt, intracellulárisan vacuolák voltak jelen, és/vagy a magok elkülönültek a rosttól. Mindegyik állatból összesen 300 izomrostot értékeltünk, hogy a megfelelő abszolút hibaszázalékot elérjük.

3.2.2.2. Elektronmikroszkópia

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

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

3.2.2.3. Nedvességtartalom meghatározás - Wet/dry arány

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

3.2.3. Izomrost életképesség (NBT - morfometria)

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

(gyorsan összehúzódó, glikolitikus) típusú izomrostok életképességének szelektív meghatározását is. Az egyes egyedekhez tartozó eredmények átlagolásra kerültek. A végső eredményt kezeletlen kontroll állatok értékeihez viszonyítva adtuk meg százalékban.

3.2.4. Laboratóriumi vizsgálatok

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

3.2.5. Redox-státusz

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

3.2.6. Molekuláris vizsgálatok (ELISA)

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

3.2.7. Távoli szervek károsodásainak vizsgálatai

3.2.7.1. Vese

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

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

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

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

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

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

3.2.7.2. Tüdő

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

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

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

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

A tüdő funkcionális állapotának megítélésére artériás vérgáz analízist végeztünk. A reperfúzió kezdetén, a második és negyedik órában a bal a. carotis communisból artériás vérmintát vettünk. A mintákat Radiometer ABL80 (Radiometer Medical ApS Åkandevaj 21 DK-2700 Brønshøj Denmark) Astrup gépen vizsgáltuk meg. A pO₂, pCO₂ értékek kerültek mérésre.

3.2.7.3. Vékonybél

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

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

3.3. Vizsgált paraméterek - Máj ischaemia-reperfúziós károsodások vizsgálata

3.3.1. Hemodinamikai vizsgálatok

3.3.1.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az állatok artériás vérnyomását a 4.2.1.1 szerint metodikával regisztráltuk.

3.3.1.2. Szöveti mikrocirkuláció

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

3.3.2. Hisztológiai vizsgálatok

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

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

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

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

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

A PARP (Poly(ADP-Ribose) Polymerase) enzim aktivitását a termék poly(ADP-Ribose) (PAR) molekulák kimutatásán keresztül végeztük az irodalomban közölt módszer alapján. A formalinban fixált májszövetet paraffinba ágyasztuk és 4 µm vastag metszeteket készítettünk. A deparaffinált metszeteket 0,6% hidrogénperoxiddal kezeltük, hogy az endogén peroxidáz aktivitást gátoljuk, majd 0,2 M-os citrát pufferben (pH 3,0) végeztünk antigén feltárást melegítés segítségével. Ezt követően 1,5%-os ló szérummal blokkolt mintákat 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd 1:1000 titerben poliklonális egér PAR-ellenes antitesttel (Calbiochem) inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on, majd biotinizált ló anti-egér szekunder antitesttel (1:200) és avidin-biotin-peroxidáz komplexszel (Vector ABC Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) végeztünk kezelést. A peroxidáz aktivitást DAB (3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride) kromogénnel detektáltuk, majd hematoxilines háttérfestést alkalmaztunk. A metszetek értékelése fénymikroszkóp segítségével történt. A TUNEL aktivitás vizsgálatához hasonlóan számszerűsítettük az összefüggő PAR-pozitivitást mutató területek arányát, majd 1000 különálló sejtet megszámolva, a környező területek PAR pozitivitását fejeztük ki százalék formájában.

Az apoptosis kimutatására formalinban fixált májszövetet paraffinba ágyasztuk és 4 µm vastag metszeteket készítettünk, majd a deparaffinált metszeteket 0,6% hidrogénperoxiddal kezeltük. Az apoptosis kimutatására a metszeteket aktív caspase-3 (Chemicon International Inc., Temecula, CA, Amerikai Egyesült Államok) ellenes antitestekkel inkubáltuk egy éjszakán át, 4°C-on. PBS-sel való bőséges mosást követően, a metszeteket biotinizált szekunder

antitesttel kezeltük. Az immunreakciót avidin-biotin-peroxidáz komplex és diaminobenzidin segítségével tettük láthatóvá.

3.3.3. Életképesség vizsgálat (NBT morfolometria)

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

3.3.4. Laboratóriumi vizsgálatok

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

3.3.5 Redox-státusz

Az antioxidáns státusz vizsgálata májhomogenizátumból, illetve szérumból történt. Luminometriás össz-scavenger kapacitás meghatározása Heide-Bögl módszerének Blázovics féle módosítással történt az alsóvégtagi vizsgálatoknál leírtaknak megfelelően (4.2.5. fejezet). A redukálóképesség vizsgálata Oyaizu [221] módszere szerint történt, mely a szérumból és a szövet teljes antioxidáns képességéről informál. 200 µl minta bidesztillált vízzel 1 ml-re történő kiegészítése, és 2,5 ml pH 6,6 foszfátpufferrel (0,2M), illetve 2,5 ml 1 %-os $K_3Fe(CN)_6$ -oldattal való elegyítése után 20 perces inkubáció zajlott 50 °C-on. A 2,5 ml 10 %-os triklórecetsav-oldat hozzáadása után a reakcióelegy 10 perces centrifugálása történt 2500 rpm-mel. A felülúszó 2,5 ml-et 2,5 ml bidesztillált vízzel összekeverve, majd 0,5 ml 0,1 %-os $FeCl_3$ -oldatot hozzáadva, a minta által emittált fény színintenzitása 700 nm-en mérhető, és arányos a minta redukálóképességével. A továbbiakban a redukálóképesség a referencia vegyület, az aszkorbinsav redukáló képességének függvényében kerül megadásra ($ASE = \text{aszorbinsav ekvivalens}$). A kapott eredmény a fehérjéhez (SH-csoport) és a nem fehérjéhez kötött proton donor (H^+ -donor) szummációjának tekinthető, ezért a szervezet össz antioxidáns státuszáról jól tájékozhat. A redukálóképesség értéke arányos a minta antioxidáns tartalmával.

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

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

3.3.6. Molekuláris vizsgálatok (ELISA)

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

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

3.4. Statisztikai analízis

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

4. Eredmények

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

4.1. Rövididejű végtagi ischaemia vizsgálata és mérséklése PostC segítségével

- 3 óra ischaemia és 4-, 24-, valamint 72 óra reperfüzió vizsgálata, posztakondicionálással -

4.1.1. Végtagi mikrocirkuláció vizsgálata

A végtagi mikrocirkuláció méréstechnikai okokból valamennyi vizsgálati csoport esetén a reperfüzió első órájában került kiértékelésre. A görbéket elemezve látható, hogy jelentős különbség adódott a PostC és az IR-kontroll csoport között: a reperfüzió első fél órájában látott kezdeti ingadozások után az IR-kontroll csoportban hypoperfüzió alakult ki, a PostC csoportban pedig a végtag keringése hyperaemiás áramlással normalizálódott. A plató maximumokat (PM) és a reperfüziós területeket (RT) alapul véve elmondható, hogy a PostC csoportban a m. biceps femoris mikrocirkulációja a reperfüzió végén szignifikánsan magasabb szintet ért el a nem kezelt IR csoporthoz képest (PM: 123,3 % vs. 62,7%, RT: 113,6% vs. 56,1%, $p < 0,05$).

4.1.2. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata

Három óra ischaemián és 4 óra reperfüzió után átesett állatokban az alsó végtagi izomszöveti metszeteken morfológiai elváltozás nem volt jellemző. A harántcsíkolt és magfestés többnyire megtartott volt, szöveti ödéma nem volt kimutatható. Az IR-kontroll csoportban elvétve kezdődő rhabdomyolysisre jellemző morfológiai kép (hullámossá vált rostok, induló intracelluláris dezorganizáció) ugyan megfigyelhető volt, de érdemleges

elváltozásról az áloperált állatok metszeteihez képest nem beszélhetünk egyik vizsgálati csoportban sem. 24 órát követően súlyos szöveti gyulladás bontakozott ki az IR csoport szövettani metszetein, jelentős leukocytá infiltrációval és ödéma képződéssel, míg a PostC csoportban szignifikánsan kedvezőbb szöveti kép volt megfigyelhető. 72 óra reperfüziót követően a gyulladásos reakció lezajlódott, patológiai eltérés egyik csoportban sem volt látható.

4.1.3. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata

A szérumszövetelhalást jelző paraméterei tekintetében (ASAT, LDH, CK) szignifikáns növekedés volt tapasztalható mindkét ischaemia-reperfüzió átesett csoport esetében az áloperált állatok értékeihez képest. A PostC ugyan képes volt mérsékelni ezen változásokat, de szignifikáns különbség nem mutatkozott a PostC és az IR-kontroll csoport között.

4.1.4. Szabadgyök szint - luminometriás vizsgálatok

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

4.1.5. Szérumszérumszint meghatározás

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

4.1.6. Szérumszérumszint meghatározás

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

4.2. Rövididejű végtagi ischaemia veseszövődményeinek vizsgálata PostC segítségével

- 3 óra ischaemia és 4-, 24-, 72 óra reperfüzió posztkondicionálással -

4.2.1. Vese mikrocirkuláció vizsgálata

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

4.2.2. Vese fénymikroszkópos vizsgálata

A 4 órás IR-kontroll állatok veseszövettani metszetei egy közepesen súlyos tubuláris károsodásnak megfelelő képet mutattak. A tubulusok lumenét feltehetőleg a filtrálódott

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

4.2.3. Anti-myoglobin immunhisztokémiai vizsgálat

Az antimyoglobin immun- hisztokémiai vizsgálatok alapján a reperfúzió 4. órájában a myoglobin megjelent a tubulusok lumenében, illetve a sejtek apikális oldalán az endofagolizoszómákban. Az IR-kontroll csoportban nagyobb mennyiségben voltak jelen a pozitív festődést mutató fehérjék a PostC csoporthoz képest. A 24 illetve a 72 órát túlélő állatokban az immunfestés eredménye már negatívnak mutatkozott, feltehetően a lebomlott myoglobin epitópok következtében.

4.2.4. Lipid peroxidáció

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

4.2.5. Vese funkció meghatározása

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

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

4.2.6. Szöveti HSP-72 szint meghatározás

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

4.3. Rövididejű végtagi ischaemia tüdőszövődményeinek vizsgálata PostC segítségével

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

4.3.1. Tüdő fénymikroszkópos vizsgálata

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

4.3.2. Tüdő szövet nedvességtartalma (W/D arány)

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

4.3.4. Szöveti MPO aktivitás meghatározás

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

4.3.5. Szöveti HSP-72 szint meghatározás

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

4.3.6. Artériás vérgázanalízis

Az artériás pO_2 értéke csökkent az IR-kontroll csoportban az áloperált csoporthoz képest. A PostC csoportban szignifikánsan magasabb értékek voltak mérhetőek a reperfúzió alatti mintavételi időpontokban az IR-kontroll csoporthoz viszonyítva. Az IR-kontroll csoportban az artériás pCO_2 érték megnövekedett az áloperált csoporthoz képest a reperfúzió második és negyedik órájában mérve, azonban a különbségek nem szignifikáns mértékűek. A PostC csoport esetében az artériás pCO_2 értékek csökkentek az IR-kontroll csoport értékeihez képest, azonban a csökkenés nem tekinthető szignifikánsnak.

4.4. Rövid idejű végtagi ischaemia bélszövődmenyeinek vizsgálata és mérséklése PostC segítségével

- 3 óra ischaemia és 4 óra reperfúzió posztkondicionálással -

4.4.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az áloperált állatokban az artériás középnyomás értéke nem változott szignifikáns mértékben. Ugyanakkor a 3 óra ischaemia alatt a középnyomás szignifikánsan megnövekedett az IR-kontroll és PostC csoportban áloperált állatok értékeihez képest. A reperfúzió kezdetén azonban az artériás középnyomás visszaesett a kiindulási értékre és a reperfúzió későbbi

időpontjaiban már egyik csoport (IR-kontroll, PostC) esetén sem különbözött szignifikáns mértékben az áloperált csoportban látottaktól. Az IR-kontroll és PostC csoportok között szignifikáns különbség nem mutatkozott.

4.4.2. Arteria mesenterica superior véráramlásának vizsgálata

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

4.4.3. A vékonybél mikrocirkulációjának vizsgálata

Az infrarenalis aorta kirekesztés következtében a *duodenum* mikrocirkulációja szignifikáns mértékben károsodott mind az IR-kontroll, mind a PostC csoport esetén az áloperált csoport értékeihez képest, mely a 3. órára normalizálódott. Az alsó végtagi reperfúzió az IR-kontroll csoportban a *duodenum* mikrocirkulációjának folyamatos csökkenését eredményezte, mélypontját a 2. órában érve el. A PostC szignifikáns mértékben képes volt javítani a *duodenum* reperfúzió alatti mikrocirkulációját, melynek eredményeként az nem különbözött szignifikáns mértékben az áloperált csoport értékeitől.

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

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

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

4.4.4. A vékonybél fénymikroszkópos vizsgálata

A fénymikroszkópos vizsgálatok valamennyi bélszakasz tekintetében csupán enyhe szöveti eltéréseket mutattak az áloperált csoport állataiban. A *duodenumban* a végtagi kirekesztés hatására nem következett be jelentős károsodás sem az IR-kontroll, sem a PostC csoportokban. Ezzel szemben az *ileum* és a *jejunum* területén jelentős károsodások jöttek létre

az IR-kontroll csoportban az áloperált állatokban látottakhoz képest. Ugyanakkor a PostC képes volt szignifikáns mértékben mérsékelni a szöveti károsodás mértékét mindkét bélszakasz esetén.

4.4.5. Bél mikrocirkuláció és szövettani károsodás közti korreláció

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

4.5. Kritikus ischaemia időtartamának meghatározása

- 4-, 6-, 8 óra ischaemia -

4.5.1. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata

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

4.5.2. Izomrost életképesség meghatározása

Az enzimhisztokémiai vizsgálatok szerint az egészséges izom-szövethez képest a mitokondriumok sűrűsége az ischaemia idejének növekedésével fokozatosan csökkent az izomrostokban. 8 órás ischaemiát elszenvedett állatok rostjaiban vált a csökkenés a legkifejezettebbé, ezen időtartam után az izomrostokban szinte egyetlen funkcionáló mitokondrium sem volt található, mely feltételezhetően a folyamat kritikus voltát jelzi (27. ábra).

4.6. Hosszú idejű (kritikus) végtagi ischaemia mérséklése PostC segítségével

- 8 óra ischaemia és 2-, 6-, 12-, 24 óra reperfúzió és posztkondicionálás –

4.6.1. Vázizomzat fénymikroszkópos vizsgálata

A HE festett metszeteken az áloperált csoportokban izomkárosodás jelei nem voltak láthatóak. A két óra hosszúságú reperfúzió a sérült izomrostok számának szignifikáns mértékű megemelkedésével járt mind az IR-kontroll, mind a PostC csoportokban az áloperált állatokhoz képest ($p<0,05$). Hat óra elteltével a károsodott izomrostok mennyisége tovább nőtt mindkét ischaemia-reperfúziót elszenvedett csoportban (28/C-D. ábra; $p<0,001$), a PostC csoportban

(28/D. ábra) azonban szignifikánsan kisebb mértékű izomkárosodás volt detektálható az IR-kontroll csoporthoz képest. A károsodás tovább növekedett 12 óra elteltével mindkét csoportban ($p_{IR}<0,05$; $p_{PostC}<0,001$); az IR-kontroll csoport metszetein megjelentek az extracelluláris ödéma morfológiai jelei (28/E. ábra), továbbá gyulladásos sejtes beszűrődés volt látható (28/E. ábra, beszúrt kép). A PostC ezen időpontban is képes volt a károsodás mértékének mérséklésére, mind az izomrostok számának ($p<0,05$), mind az ödéma mértékének tekintetében. A PostC metszeteiken gyulladás nem volt látható. 24 óra elteltével a károsodott izomrostok száma az előző időpillanathoz viszonyítva szignifikáns mértékben nem változott, valamint az IR-kontroll csoportban az ödéma és a gyulladás mértéke sem mutatott eltérést a korábbiakhoz képest. A PostC ezen időpillanatban is képes volt a károsodást mérsékelni (28/H. ábra). Gyulladás a metszeteiken továbbra sem volt látható.

4.6.2. Izomrost életképesség meghatározása

Az izomrostok életképessége az áloperált csoportokban szignifikánsan nem változott a kísérlet alatt. A 8 órás ischaemiát követő 2 órás reperfúzió az izomrostok életképességének jelentős csökkenéséhez vezetett mindkét ischaemia-reperfúziót elszenvedett csoportban ($p<0,001$) az áloperált csoporthoz képest. Az életképesség ezt követően szignifikáns változást nem mutatott egyik csoportban sem. PostC hatására azonban az izomrostok életképessége szignifikánsan magasabb értéken stabilizálódott mindegyik vizsgált időpontban (2-, 6-, 12-, 24 óra reperfúzió), a megfelelő IR-kontroll csoporthoz képest ($p<0,001$).

4.6.3. Elektronmikroszkópia

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

4.6.4. Izomszövet nedvességtartalma (W/D arány)

A 8 óra ischaemiát követő reperfúzió a végtagi ödéma mértékének szignifikáns emelkedéséhez vezetett mind az IR-kontroll, mind a PostC csoportokban ($p<0,001$) az áloperált állatokhoz képest. 6 óra reperfúzió a nedvességtartalom további emelkedését idézte elő az IR-kontroll csoportban ($p=0,01$), ezt követően az ödéma mértéke nem változott az idő előrehaladtával. A PostC 2 óra reperfúzió után nem volt képes az ödéma mértékének szignifikáns csökkentésére ($p>0,05$), azonban 6 óra elteltével minden mért időpontban szignifikánsan mérsékelte az izom nedvességtartalmát ($p<0,001$) a megfelelő IR-kontroll csoporthoz képest.

4.6.5. Laboratóriumi vizsgálatok

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

és 12 óra reperfúziót követően is a megfelelő IR-kontroll csoporthoz képest ($p < 0,05$). A 24. posztoperatív órában a CK szintek szignifikánsan nem különböztek egymástól egyik csoportban sem ($p > 0,05$).

4.7. Izomrost életképesség meghatározás (NBT) vizsgálata

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

4.7.1. Végtagi mikrocirkuláció vizsgálata

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

4.7.2. Ischaemiás károsodás vizsgálata

4.7.2.1. Izomrost életképesség meghatározása

Az izomrostok össz-életképessége az ischaemia hosszával lineárisan csökkent. Az I-es és a IIb típusú rostok esetében hasonló karakterisztika volt megfigyelhető. Az I-es típusú rostok nagyobb károsodást szenvedtek a meghatározott életképesség értékek alapján, mint a IIb típusúak, mely különbség 6 óra ischaemia elteltével vált szignifikánssá ($p_{60} < 0,05$; $p_{80} < 0,01$; $p_{90} < 0,05$). Az adatok feldolgozása során erős, szignifikáns korreláció igazolódott az ischaemia hossza, valamint a kapott életképesség értékek között mindhárom vizsgált típus esetén (össz-életképesség: $r = -0,989$; $r^2 = 0,978$; $p < 0,001$, I-es típusú rostok: $r = -0,990$; $r^2 = 0,979$; $p < 0,001$; IIb típusú rostok: $r = -0,989$; $r^2 = 0,978$; $p < 0,001$).

4.7.2.2. Félvékony metszetek fénymikroszkópos vizsgálata

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

4.7.2.3. Elektronmikroszkópia

A fiziológias kontroll állatok elektronmikroszkópos képe nem mutatott károsodást. A 8 órás hosszúságú ischaemia a mitokondriumokban közepes mértékű duzzadást okozott. Egyes mitokondriumok helyén lipid-szerű homogén bennékű cseppek voltak megfigyelhetők, főként a mitokondriumban gazdag rostokban, a cseppeket elektrondenz szegély vette körül. 9 órás

ischaemia a mitokondriumok alakjának deformitását idézte elő, a mátrixban néhol flokkulens denzitások voltak megfigyelhetők. A mitokondriumok nagyobb része a diszrupció jeleit mutatta. A 8 órás ischaemiás csoportban látott lipid-szerű cseppek előfordulása 9 órás ischaemiát követően megsokszorozódott, valamint már a szubsarkolemmális mitokondriumok között is előfordultak. A metszeteken megfigyelhető volt még a szarkoplazmatikus retikulum közepes fokú duzzanata, néhol dezorganizációja. A leírt változások már nemcsak a mitokondriumban gazdag, hanem a mitokondrium-szegény rostokban is láthatóvá váltak, ugyan kisebb mértékben.

4.8. A hosszú idejű ischaemia-reperfúziós károsodás vizsgálata

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

4.8.1. Izomrost életképesség meghatározása

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

4.8.2. Félvékony metszetek fénymikroszkópos vizsgálata

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

4.8.3. Elektronmikroszkópia

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

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

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

4.9.1. Artériás középnyomás meghatározás

Az ischaemiát megelőző artériás középnyomás értékekben nem volt szignifikáns különbség a csoportok között. A reperfúzió kezdetén mindegyik máj ischaemián átesett csoportban jelentős középnyomás csökkenés volt megfigyelhető. A késői reperfúzió

tekintetében szignifikáns különbség volt látható az áloperált, PerC és az IR-kontroll csoportok között (áloperált vs. IR-kontroll: $80,6 \pm 1,9$ Hgmm vs. $67,8 \pm 7,6$ Hgmm, $p=0,026$; I-PerC vs. IR-kontroll: $80,9 \pm 6,2$ Hgmm vs. $67,8 \pm 7,6$ Hgmm, $p=0,012$).

4.9.2. Máj és alsó végtagi mikrocirkuláció vizsgálata

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

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

4.9.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata

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

Hat óra reperfúzió jelentős kiterjedésű centrilobuláris necrotikus zónák megjelenését eredményezte az IR-kontroll csoport metszetein, míg az I-PerC csoportban csupán kisebb necrotikus területek voltak megfigyelhetők. A 24 óra reperfúciónak kitett állatok metszetei esetében kifejezett necrotikus zónákat detektáltunk az IR-kontroll csoportban. A károsodás mértékének tekintetében az I-PerC csoport elmaradt az IR-kontroll csoportban látottakhoz képest.

4.9.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

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

4.9.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet)

Hat és 24 óra reperfúziót követően a májhomogenizátum kemilumineszcens intenzitása szignifikánsan csökkent az I-PerC csoportban az IR-kontroll csoporthoz képest, ugyanakkor az 1 órás reperfúziós csoportban mindez nem volt megfigyelhető. A májszöveti globális antioxidáns kapacitást jellemző redukáló képesség megőrzöttnek bizonyult az I-PerC csoportban összehasonlítva az IR-kontroll csoporttal. Az 1 órás reperfúziós időtartam kivételével minden időpontban szignifikánsan magasabb proteinhez kötött (SH-csoportok) és protein független (H^+ -donor kapacitás) antioxidáns kapacitás értékeket mértünk az I-PerC csoportban az IR-kontroll csoporthoz képest (8. táblázat)

4.9.6. Szérum TNF- α szint meghatározása

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

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

- 1 óra ischaemia + 24 óra reperfúzió, perkondicionálással -

4.10.1. Artériás középnyomás meghatározása

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

4.10.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

A kísérletek során nem találtunk szignifikáns különbséget az áloperált csoportok (áloperált, áloperált-N) mikrocirkulációjának tekintetében. A négy IR csoport vonatkozásában szignifikánsan csökkent mikrokeringési paramétereket detektáltunk az áloperált csoportokhoz képest. Mindazonáltal az I-PerC kezelés képes volt a reperfúziós terület és a plató maximum értékek szignifikáns javítására az IR-kontroll csoporttal történő összehasonlításban. Ezen előnyös változás nem volt megfigyelhető a végtagi denerváción átesett (I-PerC-N) csoportban.

4.10.3. Máj fénymikroszkopos vizsgálata (morfometria)

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

4.10.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

Huszonegy óra reperfúziót követően az IR károsodott csoportok szérum transzamináz értékei szignifikánsan emelkedettek voltak. Az ALAT vonatkozásában szignifikánsan magasabb ($p < 0,01$) szinteket mértünk az IR, IR-N, és I-PerC-N csoportban az áloperált és

áloperált-N csoportokkal összehasonlítva. Az I-PerC csoport tekintetében a szérum ALAT emelkedése szignifikánsan enyhébb volt, mint a további három IR károsodott csoport esetében. Az ASAT felszabadulási karakterisztikája mindettől eltérőnek bizonyult, egy szignifikáns emelkedés ($p < 0,01$) volt látható mindegyik IR károsodott csoportban az áloperált csoportokhoz képest. Mindazonáltal az I-PerC kezelésnek nem volt hatása az ASAT szintekre.

4.10.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet)

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

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

4.11. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - Levosimendan előkezelés vizsgálata

- 1 óra ischaemia + 6 óra reperfúzió, levosimendannal -

4.11.1. Artériás középnyomás meghatározása

Az egyszerű áloperált csoportban az artériás középnyomás nem változott számottevően a vizsgált időszakban. Levosimendan adagolás során fokozatos vérnyomáscsökkenés volt megfigyelhető az áloperált állatokhoz képest. A 60 perces ischaemia alatt a vizsgált hemodinamikai paraméterek egyik csoportban sem változtak szignifikánsan az azt közvetlenül megelőző értékekhez képest. A reperfúzió kezdetén az IR-kontroll csoportokban szignifikáns vérnyomásesés volt megfigyelhető. Ezek mélypontja kb. 5-10 perccel a reperfúzió kezdete utánra tehető, majd a vérnyomás lassú normalizálódásnak indult, de egy órán belül nem érte el teljesen az ischaemia előtti értékeket. A levosimendan kezelt csoportokban a reperfúzió

kezdetén tapasztalható vérnyomásesés nem volt szignifikáns az ischaemia előtti értékekhez képest és a reperfüzió első órájának végére ismét elérte azt. A különböző latenciájú előkezelések (IR+Lev-1, IR+Lev-24) tekintetében ezen dinamikát illetően nem mutatkozott különbség.

4.11.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

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

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

Az áloperált csoportokban normál szöveti kép volt megfigyelhető, helyenként enyhe szinuszoidális tágulattal. Az IR-kontroll csoportban (IR-1) összefüggő területeket érintő, jelentős mértékű necrosis jött létre. Jellemző volt ezen területek kifejezett leukocytás beszűrődése és helyenként bevézések is mutatkoztak (score: 11,6 pont). A levosimendannal kezelt állatok esetében (IR+Lev-1) ehhez képest látványosan kevesebb, karakterét tekintve inkább fokális necrotikus területek mutatkoztak a reperfüzió 24. órájának végén. Ennek megfelelően szöveti bevézés nem volt jellemző, és a leukocytás beszűrődés is kisebb mértékű volt (score: 7,8 pont; $p=0,089$ versus IR-1). Az ischaemiát 24 órával megelőző előkezelést követően az IR-kontroll csoport (IR-24) metszeteiben nagy, összefüggő területeket érintő, számos helyen bevézett necrosis mutatkozott, számottevő leukocytás beszűrődés kíséretében (score: 12,3 pont). A 24 órával korábbi levosimendan kezelt (IR+Lev-24) csoportban egy-egy nagyobb kiterjedésű necrotikus terület mellett inkább fokálisan megjelenő sejtelhalás volt jellemző. Az IR-kontroll állatokhoz képest csupán kisebb mértékű szöveti bevézés és enyhébb gyulladásos beszűrődés alakult ki (score: 7,9 pont; $p=0,021$ versus IR-24).

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

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

4.11.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

Az alanin-aminotranszferáz szérumszintje az áloperált csoportok esetében a normál tartományon belül mozgott, míg IR károsodást követően szignifikánsan magasabb értékeket ért el. Levosimendan kezelést követően mind a két kezelési időablakban szignifikánsan csökkent a szérum transzamináz szint a megfelelő IR-kontroll csoportokhoz képest. Az aszpartát-aminotranszferáz szérumszintje minden csoportban meghaladta a normál értéket. Feltűnő, hogy a műtét előtt 24 órával előkezelt IR károsodott csoportokban elért szérumszintek jóval magasabbnak adódtak a 1 órás előkezelt csoportokhoz képest. A 24 órás levosimendan előkezelést követően kialakuló ASAT-emelkedés ugyanakkor szignifikánsan alacsonyabb a kezelési ablak IR-kontroll csoportjában tapasztaltnál képest.

4.11.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet)

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

Az IR-kontroll csoportokkal összevetve a levosimendan adását követően a májhomogenizátumban kemiluminometriával mérhető szabadgyökök mennyisége mind a két kezelési időablakban csökkenő tendenciát mutatott. A szérumban 24 órás előkezelés esetében szintén csökkenő tendenciát látunk, míg az 1 órás előkezelést követően szignifikánsan jobb antioxidáns kapacitás valószínűsíthető a levosimendan csoportban az IR-kontroll csoporthoz képest ($p=0,03$).

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

4.11.6. HSP-72 szint meghatározása

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

4.11.7. Életképesség meghatározás (NBT)

Az NADH-tetrazolium enzimhisztokémiai reakció, azaz NBT-enzimhisztokémia, a szöveti életképességre utal a funkcionáló mitokondriumok kimutatásán keresztül. A „hosszú latenciával” előkezelt áloperált csoportban szignifikánsan alacsonyabb arányban voltak jelen funkcionáló mitokondriumok, mint az egyszerű áloperált állatok esetében ($p=0,024$), míg a „rövid latenciájú” áloperált csoport csak csökkenő tendenciát mutatott ($p=0,104$). Ezen túlmenően, minden „hosszú latenciájú” IR károsodott csoport szignifikánsan alacsonyabb festődést mutatott az azonos kezelésben részesült „rövid latenciájú” csoporthoz képest ($p<0,05$). Ez direkt módon utal a csökkent májszöveti viabilitásra a „hosszú latenciával” kezelt csoportokban. Az IR károsodott csoportokat összehasonlítva azt találtuk, hogy a műtét előtt 24 órával adott levosimendan kezelést követően szignifikánsan nőtt az NBT-pozitív területek aránya ($p=0,003$) az IR kontroll csoporthoz képest, míg a közvetlenül műtét előtt alkalmazott levosimendan előkezelés esetében javuló tendencia volt megfigyelhető ($p=0,14$).

4.12 Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - "Rövid latenciájú" glutamin előkezelés (Glu-R) vizsgálata

- 1 óra ischaemia + 6 óra reperfúzió, glutaminnal –

4.12.1. Artériás középnyomás meghatározása

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

4.12.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

Az áloperált állatok májmikrocirkulációja számottevő mértékben nem változott a kísérlet alatt. Az IR-kontroll csoportban szignifikáns mikrocirkulációs károsodás volt megfigyelhető a reperfúzió alatt az áloperált állatok értékeihez viszonyítva. A glutamin előkezelés szignifikáns mértékben képes volt javítani a máj keringését az IR-kontroll csoporthoz képest, mely alapjául a mért eredmények szolgálnak (áloperált, IR-kontroll, Glu-R): Reperfúziós terület: $101,1 (\pm 4)$; $30,3 (\pm 11)^*$; $53 (\pm 14)^{\#}$ és plató maximum: $99,5 (\pm 2)$; $35 (\pm 9)^*$; $50 (\pm 15)^{\#}$, ahol $* p < 0,05$ IR vs áloperált; $\# p < 0,05$ Glutamin vs IR-kontroll.

4.12.3. Máj metszeteinek fénymikroszkopos vizsgálata (HE, TUNEL, caspase-3)

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

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

4.12.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

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

4.12.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum)

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

4.12.6. TNF- α -szint meghatározása

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

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

4.13.1. Artériás középnyomás meghatározása

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

4.13.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

Az áloperált állatok májának mikrocirkulációja a vizsgálat egész időtartama alatt konstansnak mutatkozott. Az ischaemia előtti alapáramlás tekintetében nem tapasztaltunk különbséget az egyes csoportok között. Ugyanez mondható el az ischaemiás áramlásról az IR-kontroll és a Glu-H csoportok esetében. Az ischaemia-reperfúzió átesett csoportok mikrocirkulációja a reperfúzió alatt az áloperált csoport értékeihez képest erősen szignifikánsan alacsonyabbnak adódott ($p<0,01$). Ugyanakkor a reperfúziós görbéket összehasonlítva, a Glu-H csoportban javuló tendenciát láttunk az IR-kontroll csoporthoz képest (RT: $p=0,096$; PM₁₀: $p=0,084$) (49. ábra). Ezen eredmények rendre (áloperált, IR-kontroll, Glu-H): Reperfúziós terület: $98,2\pm 3,8$; $19,3\pm 4,4^*$; $30,8\pm 19,4^\#$ és plató maximum: $97,4\pm 5,2$; $23,2\pm 11,4^*$; $40,9\pm 27,5^\#$, ahol $* p<0,05$ IR vs áloperált; $\# p<0,05$ Glutamin vs IR-kontroll.

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

Az áloperált csoport szövettani metszetei károsodást nem, vagy csak igen enyhe szinuszoidális tágulat formájában mutattak. Az IR-kontroll csoportban jelentős mértékű szöveti

degeneráció volt megfigyelhető, melyek fő jellemzőiként intracelluláris vacuolizáció, periportális neutrophyl infiltráció, szöveti bevérzés, valamint necrosis volt megfigyelhető (score: 12,4 pont). A Glu-H csoport esetében a szöveti károsodás szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkozott az IR-kontroll csoporthoz képest (score: 10,2 pont, $p = 0,047$).

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

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

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

4.13.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

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

4.13.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum)

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

4.14. Máj ischaemia-reperfúzió vizsgálata - PJ-34 előkezelés vizsgálata

4.14.1. Artériás középnyomás meghatározása

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

4.14.2. Máj mikrocirkuláció vizsgálata

A máj mikrocirkulációt tekintve nem volt számottevő különbség a vizsgálati csoportok között az ischaemiát megelőzően. A reperfüzió kezdetén az ischaemián átesett csoportokban jelentős áramlás csökkenés következett be. Később a máj mikrocirkulációja fokozatosan felépült, mely mértékét a PJ-34 előkezelés szignifikánsan javította az IR-kontroll csoporthoz képest ($p<0.05$).

4.14.3. Máj fénymikroszkópos vizsgálata (HE, TUNEL)

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

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

4.14.4. Laboratóriumi paraméterek vizsgálata (ASAT, ALAT)

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

4.14.5. Redox homeosztázis meghatározása (máj szövet, szérum)

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

5. Következtetések

1. Az aorta infrarenális szakaszának 3 órás kirekesztését követően - klasszikus szövettani módszerekkel - nehezen detektálható az izomkárosodás megjelenése, ugyanakkor ezen ischaemiás idő is jelentős szöveti és funkcionális eltéréseket idéz elő a távoli szervekben (vese, tüdő, bél).
2. Az alsó végtagon alkalmazott poszt kondicionálás hatékonyan képes csökkenteni a reperfüziós periódusban fellépő vese-, bél-, és tüdőszövődményeket.
3. Az alsó végtag tekintetében a 8 órás ischaemiás inzultus már olyan fokú maradandó celluláris és subcelluláris károsodásokhoz vezet, melyek megalapozzák a kritikus ischaemia terminológiájának használatát patkány alsó végtagi ischaemiás modellben.
4. Az általunk kifejlesztett - enzimhisztokémiai eljárás (NBT) alapuló - kiértékelési módszer magas érzékenységgel képes a kialakult ischaemiás károsodások mértékét meghatározni, hiszen a módszer által kapott értékek jól korrelálnak mind az ischaemia hosszával, mind az elektronmikroszkópos vizsgálatok során látott változásokkal.
5. A poszt kondicionálás a kritikusnak vélt, 8 órás ischaemias időtartamot követően is képes volt a fénymikroszkóposan detektálható szövettani károsodás mérséklésére. A megfigyelés időtartama alatt a kezelés mind a lokális gyulladást, mind az ennek következtében fellépő szöveti ödéma kialakulását mérsékelte.
6. Hatvan perc 70%-os, részleges máj ischaemiás modellben a távoli ischaemiás perkondicionálás mérsékelte a máj ischaemia-reperfüziós sérülését. A módszer használatával szignifikáns javulás volt elérhető a szisztémás hemodinamikai, a mikrocirkulációs (máj és az alsó végtag) paraméterekben; valamint szignifikánsan alacsonyabb szöveti szabadgyök-szint és javuló antioxidáns kapacitás volt megfigyelhető a csökkenő gyulladásos válaszreakció mellett.
7. A perkondicionálással kiváltott májszövetet védő mechanizmusok felfüggeszthetőek a távoli szerv (alsó végtag) denervációjával, így a neurális integritás megléte alapvető feltétele a távoli szervi perkondicionálás létrejöttének.
8. A levosimendan kezelés mindkét (rövid és hosszú latenciájú) formája markánsan képes csökkenteni az ischaemia-reperfüzió talaján kialakuló májkárosodás mértékét. A műtét előtt 24 órával alkalmazott levosimendan előkezelés összességében kifejezettebb védőhatást képes létrehozni, mint a közvetlen műtét előtt végzett kezelés. Ugyanakkor

a jelenlegi kísérleti elrendezésben a szer direkt májszöveti citoprotektív hatása mellett a hemodinamikai eredetű kedvező hatások sem elhanyagolhatóak.

9. A műtét előtt (24 órával) adagolt L-alanil-L-glutamin előkezelés képes a máj ischaemia-reperfúziós károsodásának csökkentésére. A glutamin kezelt csoportban a májszöveti antioxidáns státusz szignifikáns javulása volt tapasztalható, minek alapján valószínű, hogy elsősorban ezen hatás vezet a szövetkárosodás csökkenéséhez.
10. A PJ-34 PARP inhibitor kezelés az ischaemiás inzultus hatásra necroptózisba sodródott májsejteket az apoptózis felé tereli, így a reperfúziót követő gyulladásos reakciók mérséklésével javítja a szöveti túlélést.

6. Új megállapítások

A fentiek alapján az alábbi, új megállapítások tehetők:

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

7. Közleményjegyzék

7.1. Az értekezés alapjául szolgáló nemzetközi és hazai közlemények időrendben (Σ IF: 38,411 IF)

1. Szijártó A., Hahn O., Batmunkh E., Stangl R., Kiss A., Lotz G., Schaff Zs., Váli L., Blázovics A., Gerő D., Szabó Cs., Kupcsulik P., Harsányi L.:

Short-term alanyl-glutamine dipeptide pretreatment in liver ischemia-reperfusion model: effects on microcirculation and antioxidant status in rats

Clinical Nutrition 2007 (26) 640-48 p.

IF: 2.878

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

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

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

IF: 1.836

3. Gyurkovics E., Arányi P., Stangl R., Ónody P., Ferreira G., Lotz G., Kupcsulik P., **Szijártó A.**:

Postconditioning of the Lower Limb-Protection Against the Reperfusion Syndrome

Journal of Surgical Research 2011 169: 139–147

IF: 2.176

4. Gyurkovics E., Arányi P., Turóczy Zs., Garbaisz D., Varga M., Hegedűs V., Lotz G., Kupcsulik P., **Szijártó A.**:

Postconditioning attenuates remote organ injury after lower limb arterial occlusion

Interventional Medicine and Applied Science 2010 2 (4) 169-77 p.

IF: 0

5. Stangl R*., **Szijártó A*.**, Ónody P., Tamás J., Tátrai M., Hegedűs V., Blázovics A., Lotz G., Kiss A., Módos K., Gerő D., Szabó C., Kupcsulik P., Harsányi L.:

Reduction of Liver Ischemia-Reperfusion Injury Via Glutamine Pretreatment

Journal of Surgical Research 2011 166 (1) 95-103 p.

IF: 2.247 (*megosztott elsőszervezők)

6. Szijártó A., Turóczy Zs, Czigány Z., Harsányi L.:

Remote ischemic preconditioning: simple, low risk method to decrease ischemic-reperfusion injury. Review article.

Journal of Surgical Research 2012 178 (2) 797-806 p.

IF: 2.018

- 7. Szijarto A.,** Turoczi Zs., Szabo J., Kaliszky P., Gyurkovics E., Aranyi P., Regali L., Harsanyi L., Lotz G.:
Rapidly progressing, fatal reperfusion syndrome caused by acute critical ischemia of the lower limb
Cardiovascular Pathology 2013 Nov-Dec;22(6):493-500
IF: 2.336
- 8. Garbaisz D.,** Turoczi Zs, Fulop A., Rosero O., Aranyi P., Onody P., Lotz G., Rakonczay Z., Balla Zs.; Harsanyi L., **Szijarto A.:**
Therapeutic option for managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping
Journal of Surgical Research 2013 185 469-476
IF: 2.121
- 9. Czigány Z.,** Turóczi Zs., Ónody P., Harsányi L., Lotz G., Hegedüs V., **Szijártó A.:**
Remote ischemic preconditioning protects the liver from ischemia-reperfusion injury.
Journal of Surgical Research 2013 185:605-13
IF: 2.121
- 10. Onody P.,** Stangl R., Fulop A., Rosero O., Garbaisz G., Turoczi Zs., Lotz G., Rakonczay Zs., Balla Zs., Hegedus V., Harsanyi L., **Szijarto A.:**
Levosimendan: a cardiovascular drug to prevent liver ischemia-reperfusion injury?
PLoS One. 2013 8(9): e73758. doi: 10.1371/journal.pone.0073758
IF: 3.534
- 11. Turóczi Zs.,** Arányi P., Lukáts A., Garbaisz D., Lotz G., Harsányi L., **Szijártó A.:**
Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats.
PLoS One. 2014 13;9(1):e84783. doi: 10.1371/journal.pone.0084783.
IF: 3.234
- 12. Rosero O.,** Németh K., Turóczi Zs., Fülöp A., Garbaisz D., Györffy A., Szuák A., Dorogi B., Kiss M., Nemeskéri Á., Harsányi L, **Szijártó A.:**
Collateral circulation of rat lower limb and its significance in ischemia-reperfusion studies
Surgery Today 2014 44(12): 2345-53
IF: 1.526
- 13. Turóczi Zs.,** Fülöp A., Lukáts A., Garbaisz D., Lotz G., Harsányi L., **Szijártó A.:**
Postconditioning protects skeletal muscle against a long-lasting vascular occlusion.
Journal of Investigative Surgery 2014 27 (5):282-90
IF: 1.158
- 14. Garbaisz D.,** Turoczi Zs., Aranyi P, Fulop A.; Rosero O., Hermes E., Ferencz A., Lotz G., Harsanyi L., **Szijarto A.:**
Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811

PLoS ONE 2014 9(6): e101067. doi:10.1371/journal.pone.0101067
IF: 3.234

15. Czigány Z., Turóczi Zs., Kleiner D., Lotz G., Homeyer A., Harsányi L., Szijártó A.:
Neural elements behind the hepatoprotection of remote preconditioning.
Journal of Surgical Research 2015 193: pp. 642-651
IF: 1.936 (2014)

16. Aranyi P., Turoczi Zs., Garbaisz D., Lotz G., Geleji J., Hegedus V., Rakonczay Z., Balla Zs., Harsanyi L., Szijarto A.:
Postconditioning in major vascular surgery: Prevention of renal failure
Journal of Translational Medicine 2015 13:21 DOI: 10.1186/s12967-014-0379-7
IF: 3.930 (2014)

17. Turóczi Zs., Fülöp A., Czigány Z., Varga G., Rosero O., Tökés T., Kaszaki J., Lotz G., Harsányi L., Szijártó A.:
Improvement of small intestinal microcirculation by postconditioning after lower limb ischemia
Microvascular Research 2015 98:119-125
IF: 2.126 (2014)

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

19. Szijártó A.:
Az ischaemiatolerancia növelésének lehetőségei a májsebészetben (Doktori munka)
Magyar Sebészet 2008 61 (3) 128-35 p.

20. Szijártó A., Gyurkovics E., Arányi P., Ónody P., Stangl R., Tátrai M., Lotz G., Mihály Z., Hegedűs V., Blázovics A., Kupcsulik P.:
Poszt kondicionálás kísérletes alkalmazása aortakirekesztés kapcsán
Magyar Sebészet 2009 62 (4) 180-87 p.

21. Szijártó A., Arányi P., Turóczi Zs., Kupcsulik P., Gyurkovics E.:
Ischaemiás-reperfúziós károsodás csökkentésének elvi és gyakorlati lehetőségei az érsebészetben. Irodalmi áttekintés
Érbetegségek 2009 16 (4) 113-120 p.

22. Szijártó A., Arányi P., Turóczi Zs., Kupcsulik P., Gyurkovics E.:
A reperfúziós szindróma és a postcondicionálás sejtszintű mechanizmusa. Irodalmi áttekintés
Érbetegségek 2010 17 (1) 11-18 p.

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

Akut kritikus ischaemia az alsó végtagon. Irodalmi összefoglaló

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

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

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

Magyar Sebészet 2010 63 (6) 374-79 p.

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

Posztoperatív érsebészeti technika posztoperatív veseelégtelenség megelőzésére.

Állatkísérletes modell.

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

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

Iszkémiás perkondicionálás – Alternatív adaptív technika a miokardiális iszkémia-tolerancia növelésére. Összefoglaló Közlemény.

Cardiologica Hungarica 2011; 41(5):344-353.

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

Távoli szervi kondicionálás: rövid távú hepatoprotektív hatások patkánymodellben.

Orvosi Hetilap 2012; 153(40):1578–1586

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

Alsó végtagi ischaemiás-reperfüziós károsodás hosszú távú tüdőszövődményeinek megelőzése posztoperatív kondicionálással

Magyar Sebészet 2013; 66 (3): 146–154

7.2. A Ph.D. fokozat megszerzését megelőző vagy követő időszak egyéb nemzetközi és hazai közleményei időrendben (Σ IF: 37,362 IF)

1. Gyurkovics E., Tihanyi B., **Szijártó A.,** Kaliszky P., Temesi V., Sas H., Kupcsulik P.:

Fatal outcome from extreme acute gastric dilation after an eating binge

International Journal of Eating Disorders 2006 39 (7) 602-605 p.

IF: 1.839

2. Lódi Cs., Szabó E., Holczbauer Á., Batmunkh E., Szijártó A., Kupcsulik P., Kovalszky I., Paku S., Illyés Gy., Kiss A., Schaff Zs.:

Claudin-4 differentiates biliary tract cancers from hepatocellular carcinomas

Modern Pathology 2006 (19) 460-69 p.

IF: 3.753

3. Hahn O., Szijártó A., Lotz G., Schaff Zs., Vígváry Z., Váli L., Kupcsulik P.:

The effect of ischemic preconditioning prior to intraoperative radiotherapy on ischemic and on reperfused rat liver

Journal of Surgical Research 2007 142 (1) 32-44 p.

IF: 1.836

4. Németh Zs., Szász AM., Tátrai P., Németh J., Györffy H., Somorác Á., Szijártó A., Kupcsulik P., Kiss A., Schaff Zs.:

Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 protein expression in biliary tract cancers

Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2009 57 (2) 113-121 p.

IF: 2.372

5. Szijártó A., Hargitai B., Fischer S., Darvas K., Kupcsulik P.:

Two-staged procedure of portal ligation and hepatectomy monitored by ICG clearance

Journal of Investigative Surgery 2009 22 (1) 63-8 p.

IF: 1.035

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

Zonula occludens-1, occludin, and E-cadherin protein expression in biliary tract cancers

Pathology and Oncology Research 2009 15 (3) 533-539 p.

IF 1.152

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

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

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

IF: 1.88

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

Experimental models of hemorrhagic shock. Review.

European Surgical Research 2013 50 57–70 p.

IF: 1.4

9. Holczbauer A., Gyöngyösi B., Lotz G., Szijártó A., Kupcsulik P., Schaff Zs., Kiss A.:

Distinct claudin expression profiles of hepatocellular carcinoma and metastatic colorectal and pancreatic carcinomas.

Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2013 61 (4): 294-305
IF: 2.403

10. Szijártó A., Lévy B., Kupcsulik P.:

Postoperative complications of spilled gallstones: A report on two cases
European Journal of Gastroenterology & Hepatology 2014 26:(3) pp. 357-360
IF: 2.253

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

Postconditioning of the small intestine: which is the most effective algorithm in a rat model?
Journal of Surgical Research 2014 187:427-37
IF: 1.936

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

Demonstration of metabolic and cellular effects of portal vein ligation using multi-modal PET/MRI measurements in healthy rat liver
PLoS One 2014 9(3): e90760. doi:10.1371/journal.pone.0090760
IF: 3.234 (*megosztott elsőszervezők)

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

Impaired Intestinal Mucosal Barrier Upon Ischemia-Reperfusion: "Patching Holes In The Shield With A Simple Surgical Method"
BioMed Research International 2014 Article ID 210901, 11 pages
IF: 1.579

14. Györffy A., Szijártó A.:

A new operative technique for aural haematoma in dogs: A retrospective clinical study.
Acta Veterinaria Hungarica 2014 19:1-8
IF: 0.646

15. Holczbauer A., Gyongyosi B., Lotz G., Torzsok P., Kaposi-Novak P., Szijarto A., Tatrai P., Kupcsulik P., Schaff Z., Kiss A.:

Increased Expression of Claudin-1 and Claudin-7 in Liver Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma.
Pathology And Oncology Research 2014 20:(3) pp. 493-502
IF: 1.855

16. Szijarto A., Fulop A.:

Triggered liver regeneration: from experimental model to clinical implications - Invited review
European Surgical Research 2015 54:148-161

IF: 2.474 (2014)

17. Fülöp A., Budai A., Czigány Z., Lotz G., Paku S., Dezső K., Harsányi L., Szijártó A.:

Alterations in Hepatic Lobar Function in Regenerating Rat Liver

Journal of Surgical Research 2015 197: 307-317

IF: 1.936 (2014)

18. Nagy Z., Gyurkovics E., Pajor P., Tarjányi M., Szijártó A., Vari SG.:

New method for treatment of inferior vena cava tumor thrombus - case study.

Croatian Medical Journal 2015 56 (2):139-44.

IF: 1.305 (2014)

19. Czigány Z., Iwasaki J., Yagi S., Nagai K., Szijártó A., Uemoto S., Tolba RH.:

Improving research practice in rat orthotopic and partial orthotopic liver transplantation: a review, recommendation, and publication guide

European Surgical Research 2015 Eur Surg Res 55:119–138

IF: 2.474 (2014)

20. Váli L., Szijártó A., Hahn O., Fehér J., Kupcsulik P.:

A benignus májdaganatok és szabadgyökök kapcsolata

Orvosi Hetilap 2004 145 (40) 2043-50 p.

21. Wacha J., Szijártó A., Kupcsulik P.:

Prebiotikumok, probiotikumok, szinbiotikumok. Irodalmi áttekintés kontrollált klinikai vizsgálatok elemzése alapján

Metabolizmus 2006 4 (1) 62-67 p.

22. Wacha J., Szijártó A., Kupcsulik P.:

Prebiotikumok, probiotikumok, szinbiotikumok. Irodalmi áttekintés kontrollált klinikai vizsgálatok elemzése alapján

Gyógyszerész Továbbképzés 2007 1 (4) 15-20 p.

23. Rosero O., Ónódy P., Stangl R., Hegedűs V., Lotz G., Blázovics A., Kupcsulik P., Szijártó A.:

Posztkondicionálás kísérletes vizsgálata vékonybél ischaemiás-reperfúziós modelljében

Magyar Sebészet 2011 64 (1) 28-36 p.

24. Wacha J., Szijártó A.:

Probiotikumok és a terhesség – összefoglaló referátum

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

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

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

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

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

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

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

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

Posztkondicionálás. A távoli szervi diszfunkciók ellenszere?

Magyar Sebészet 2012; 65(4): 220–227

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

Kritikus mesenterialis ischaemia. Adaptív mechanizmusok. Távoli szervi diszfunkciók.

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

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

Az élődonoros májtraszplantáció speciális kérdései

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

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

Epekövekben levő baktériumok előfordulásának gyakorisága

Magyar Sebészet 2013; 66 (6): 353–356

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

Bakteriális transzlokáció: rés a pajzson - Összefoglaló közlemény

Orvosi Hetilap 2014, 155 (8): 304–312

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

Akut mezenterialis iszkémia: biomarker egyenlő diagnózis? - Összefoglaló közlemény

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

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

Benignus májdagantok laparoszkópos rezekciója

Magyar sebészet 2015; 68 (1): 3-7

Könyvfejezet

1. Szijártó A.:

A kísérleti műtő története, 1950-2009. In: Az Üllői úti Sebészeti Klinika, 1909-2009 :

Jubileumi kiadvány / szerk. Kupcsulik P. - Bp. Semmelweis K., 2009. -105-08 p.

2. Harsányi L., Szijártó A.:

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

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

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

Vékonybél ischaemias károsodásának kivédése adaptív sebészi technikákkal. Algoritmusok. In: szerk. Blázovics Anna, Mézes Miklós, Róth Erzsébet - Oxidatív stressz és betegségek. Szent István Egyetemi Kiadó. 2015: 121-124 oldal

7.3. A Ph.D. értekezésben szereplő közlemények**1. Szijártó A., Hahn O., Lotz G., Schaff Z., Madarász E., Kupcsulik P.:**

Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser doppler flowmetry
Journal of Surgical Research 2006 131 (1) 150-57 p.
IF: 2.038

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

Effect of PJ-34 PARP-inhibitor on rat liver microcirculation and antioxidant status
Journal of Surgical Research 2007 142 (1) 72-80 p.
IF: 1.836

8. Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

Köszönöm.