

Hartmann Petra_154_23

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**MIKROKERINGÉSI ÉS MITOKONDRIÁLIS
DISZFUNKCIÓ DIAGNOSZTIKÁJA ÉS TERÁPIÁS
LEHETŐSÉGEI**

DR. HARTMANN PETRA



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
SZENT-GYÖRGYI ALBERT ORVOSTUDOMÁNYI KAR
TRAUMATOLÓGIAI ÉS ORTOPÉDIAI KLINIKA
SZEGED**

2025

TARTALOMJEGYZÉK

1	ELŐSZÓ.....	8
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1	A mikrokeringés jellemzői és funkcionális szerepe.....	10
2.1.1	A mikrokeringés monitorozása	13
2.1.2	A mikrokeringési vizsgálómódszerek fejlődése	15
2.1	Mitokondriumok és funkcionális vizsgálataik	18
2.2	Az L- α -glicerilfoszforilkolin kísérletes és klinikai szerepe	24
2.3	A CH ₄ biológiai hatása.....	25
2.3.1	A CH ₄ gyulladáscsökkentő hatásai	26
2.3.2	A CH ₄ diagnosztikus célú használata	27
2.4	Politraumatizált betegek diagnosztikája.....	28
2.4.1	A szívfrekvencia szerepe a vérzés felismerésében	28
2.4.2	A vérvesztés diagnosztikájának nehézségei traumás sérülésekben	29
2.4.3	A trauma-indukált koagulopátia és a trombociták szerepe.....	31
3	CÉLKITŰZÉSEK	33
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	36
4.1	Mikrokeringés változása gyulladásos modellekben.....	36
4.1.1	Mikrokeringési vizsgálómódszerek	36
4.1.2	Szinovialis mikrokeringés vizsgálata akut artritiszben.....	38
4.1.3	A bőr mikrokeringése bőrirritációban és sebgyógyulásban.....	39
4.1.4	A perioszteum és endoszteum keringése kiterjedt oszteoszintézist követően	43
4.1.5	A távoli iszkémiás prekondicionálás és a L- α -glicerilfoszforilkolin hatása a máj iszkémia-reperfúziós mikrokeringésére	44
4.2	Mitokondriális diszfunkció iszkémia-reperfúzióban.....	47
4.2.1	Máj meleg iszkémia-reperfúziós károsodása	51
4.2.2	Máj hideg iszkémia-reperfúziós károsodása	53
4.2.3	Szív iszkémia-reperfúziós károsodása	55
4.3	Trauma és alkoholfogyasztás okozta stressz biomarkereinek monitorozása	59
4.3.1	Kilélegzett CH ₄ meghatározás fotoakusztikus spektroszkópiával.....	59
4.3.2	Kilélegzett CH ₄ vizsgálata alkoholfogyasztás okozta stresszben	60

4.3.3	Vitális paraméterek és a szívfrekvencia prediktív értéke traumás sokkban ...	61
4.3.4	A kilélegzett CH ₄ kimutatása traumával összefüggő vérzésben.....	64
4.3.5	Mitokondriális diszfunkció trauma-indukált koagulopátiában	66
5	EREDMÉNYEK	69
5.1	Mikrokeringés változása gyulladásos modellekben.....	69
5.1.1.	Szinovialis mikrokeringés akut artritiszben.....	69
5.1.2.	Bőr mikrokeringése bőrirritációban és sebgyógyulásban	69
5.1.3	A perioszteum és endoszteum keringése kiterjedt oszteosztézist követően	76
5.1.4	A távoli iszkémiás prekondicionálás és a L- α -glicerilfoszforilkolin hatása a máj iszkémia-reperfúziós mikrokeringésére	76
5.2	Mitokondriális diszfunkció	80
5.2.1	Mitokondriális diszfunkció máj meleg iszkémia-reperfúziós károsodásában	80
5.2.2	Máj hideg iszkémia-reperfúzió mitokondriális hatása	85
5.2.3	Iszkémia-reperfúzió szívmitokondriumokra gyakorolt hatása.....	88
5.3	Trauma és alkoholfogyasztás okozta stressz biomarkerei.....	93
5.3.1	Kilélegzett CH ₄ alkoholfogyasztás okozta stresszben	93
5.3.2.	Vitális paraméterek prediktív értéke traumás sokk osztályozásban	95
5.3.3	A kilélegzett CH ₄ kimutatása traumával összefüggő vérzésben.....	101
5.3.4.	Mitokondriális diszfunkció trauma-indukált koagulopátiában	103
6	MEGBESZÉLÉS.....	110
6.1	Mikrokeringési kutatások.....	110
6.2	Mitokondriális kutatások.....	114
6.3	Trauma és alkoholfogyasztás okozta stressz biomarkerei.....	121
7	ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK.....	129
8	ÖSSZEFOGLALÁS.....	133
9	IRODALOMJEGYZÉK.....	136
10	SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	155
11	SZCIENTOMETRIA	164
12	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	165

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4-CMC – 4-klór-m-krezollal

AIS – rövidített sérülési pontszám (Abbreviated Injury Severity Score)

Ama – antimicin-A

Amplex UltraRed – N, N'-diacetyl-3, 3'-dimetilbenzidin

aPTT – aktivált parciális tromboplasztin idő

ASPI – multiplate teszt arachidonsav hozzáadásával

ATLS – Advanced Trauma Life Support

ATP – adenzin-5'-trifoszfát

AU – tetszőleges mértékegység

AUC – görbe alatti terület

AUC – görbe alatti terület

Bax – bcl-2-like protein

Bcl-2 – B-sejtes limfóma 2

BD – bázis deficit

BSA – szarvasmarha-szérum-albumin (bovine serum albumin)

C/EBP – CCAAT/enhancer binding protein

C/K – karragén/kaolin

CCCP – karbonil-cianid m-klórfenil-hidrazin

CH₄ – metán

CO₂ – szén-dioxid

CT-vizsgálat – számítógépes tomográfia

CT – vérárvadási idő

CS – Custodiol® (HTK) oldat

DA – dantrolén

DC lemez – dinamikus kompressziós lemez

DCFDA – 2',7'-dichlorofluorescein diacetate

ECAR – extracelluláris savasság

EDFH – endotélium-eredetű hiperpolarizáló faktor

EDTA – etilén-diamin-tetraecetsav

eFAST – kiterjesztett fókuszált ultrahangos vizsgálat traumában

EGTA – etilén-glikol-tetra-ecetsavval
EP – elektroporáció
ER – endoplazmatikus retikulum
EtCO₂ – kilégzés végi szén-dioxid szint
EX-teszt – extrinsically activated test
FAD – flavin-adenin-dinukleotid
FAST – fókuszált ultrahangos vizsgálat traumában
FCCP – karbonil-cianid p-trifluor-metoxi-fenil-hidrazin
FCD – funkcionális kapilláris denzitás
FFP – friss fagyasztott plazma
FIB-teszt – fibrinogen assay
FITC – fluorescein izotiocianát
GCS – Glasgow-kóma skála
GPC – L- α -glicerilfoszforilkolin
GSK3 β – glikogén-szintáz kináz 3 béta
Hb – hemoglobin
Hct – hematokrit
HEPES – hidroxietil-piperazin-etánszulfonsav
HIF1 α – hipoxia-indukálható faktor 1-alfa
HR – szívfrekvencia
HRR – magas felbontású respirometria
HTK – hisztidin-triptofán-ketoglutarát oldat
HVM – kézi videó kapillaroszkópia
IBS – irritábilis bél szindróma
ICAM-1 – intercelluláris adhéziós molekula-1
IIS – sérülés súlyossági pontszám (Injury Severity Score)
INR – nemzetközi normalizált arány
IPC – iszkémiás prekondicionálás
IPRL – izolált patkánymáj perfúziós rendszer
IQR – interquartile range
IR – iszkémia-reperfúzió

IVM – intravitális video-mikroszkópia
LDF – Lézer-Doppler áramlásmérés
Leak – IV-es mitokondriális légzési állapot, „szivárgó” protonok
LHT – helyi hiperémia teszt
LSCI – Laser-Speckle Contrast Imaging (lézeres szóródási kontrasztalapú képalkotás)
LV – bal kamra
MAPK – mitogén-aktivált protein kináz
MCF – maximális alvadásszilárdság
MFI – mikrovaszkuláris áramlási index
ML – maximális lízis
MP – mesenterialis perfúzió
MPO – mieloperoxidáz
mPTP – mitokondriális permeabilitási tranziens pórus
mtDNS – mitokondriális DNS
NAD⁺/NADH – nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) és redukált alakja (NADH)
NADP⁺/NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADP⁺) és redukált alakja (NADPH)
NF-κB – nukleáris faktor-kappa B
NIRS – közeli-infravörös spektroszkópia
NO – nitrogén-monoxid
NOX2/4 – NADPH-oxidáz 2 vagy 4
NRMC – újszülött patkány szívizomsejt
NVC – körömágyi video kapillároszkópia
O2C – „Oxygen-to-see” módosított spektrális képalkotás
OCR – „oxygen control ratio”, oxigénfogyasztási arány
OPS – ortogonális polarizációs spektrális képalkotás
OxPhos – oxidatív foszforiláció, III-as mitokondriális légzési állapot
PAS – fotoakusztikus spektroszkópia
PCR – polimeráz-lánreakció
PMN – polimorfonukleáris neutrofil sejtek
pO₂ – oxigén parciális nyomása

POC – point of care, magyarul betegágy melletti ellátás
PR – perfúziós arány
PRP – trombocitákban gazdag plazma
PT – protrombin idő
PU – perfúziós egység
qPCR – kvantitatív valós idejű PCR
QUIPS – prognosztikai tanulmányok minősége (Quality In Prognostic Studies)
RBCV – vörösvértestek áramlási sebessége
RCR – légzéskontroll-arány
rHb – szöveti hemoglobin
RIPA – „Radio-Immunoprecipitation Assay” puffer
ROS – reaktív oxigén szabadgyök
ROX – reziduális oxigénfogyasztást
SBP – szisztolés vérnyomás
SD – standard deviáció
SDF – Sidestream Dark Field (oldalirányú sötét mezős) mikroszkópia
SERCA – Endoplazmatikus Retikulum Ca^{2+} -ATPáz
SIBO – vékonybél bakteriális túlnövekedése
SLS – nátrium-lauril-szulfát
SMA – felső mesenterialis artéria
StO₂ – szöveti oxigénszaturáció
SUIT – szubsztrát-szétkapcsolószert-gátlószert protokoll
TBS – Tris-pufferelt sóoldat
TIC – trauma-indukált koagulopátia
TMRM – tetrametilrhodamin-metil-észter
TNF- α – tumornekrózis-faktor alfa
TXA – tranexámsav
Vldlr – alacsony sűrűségű lipoprotein receptor
VS – vitális paraméterek
XOR – xantin-oxidoreduktáz
 $\Delta\Psi_m$ – mitokondriális membránpotenciál

“It has long been an axiom of mine that the little things are infinitely the most important”

Sir Arthur Conan Doyle

1 ELŐSZÓ

A traumatológiai sérülések, törések és a sebészi beavatkozások során gyakran előforduló átmeneti vértelenség következménye az iszkémia-reperfúziós (IR) károsodás, ami többek között helyi mikrokeringési problémákat és szisztémás gyulladást eredményez. Gyulladásban az oxigénszállítás és oxigén felhasználás közötti egyensúly felborulása az egyik alapvető mechanizmus, mely részben a mikrokeringés elégtelen voltára, részben pedig a mitokondriumok oxigént hasznosító zavarára (anaerob metabolizmusra) vezethető vissza. A két folyamat együttesen vagy egymás következményeként jön létre: megfelelő terápiás beavatkozás hiányában a romló mikrokeringés következtében szöveti hypoxia alakul ki, ami a mitokondriális légzés károsodásával a sejtek energetikai zavarán alapuló sejtpusztulást eredményezhet.

Kutatásunk középpontjában a mikrokeringési és mitokondriális diszfunkció olyan tényezőinek azonosítása áll, amelyek befolyásolásával csökkenthetők a szövetek strukturális és funkcionális károsodásai. Ennek részeként vizsgáltuk a szövetekben kialakuló gyulladással leukocita-endotélsejt interakciók minőségi és időbeli változásait, valamint a perfúzió zavarát. A mikrokeringési gyulladással kapcsolatos reakciók a szakirodalomban az IR által kiváltott gyulladással kapcsolatos reakciók oldaláról vannak leginkább feltérképezve. Ezért vizsgálatunkat elsődlegesen ennek taglalásával és ezt befolyásolni hivatott iszkémiás prekondicionálással (IPC) köztük a távoli IPC pathomechanizmusának és a védelmet biztosító tényezők feltárásával kezdtük. A mikrokeringési változások diagnosztikai célú vizsgálatát elősegíti, hogy ezen reakciók szövetspecifikusak, másrészt a gyulladás szakaszai és a szöveti regeneráció is jellegzetes mikrokeringési változásokkal járnak, így a sebgyógyulást és törésgyógyulást elősegítő terápiák hatékonyságát, a bőrfelszínről történő gyógyszerfelszívódást és a szöveti implantátumok által kiváltott reakciókat is meg tudjuk ítélni.

A mikrokeringési vizsgálatok széles körű alkalmazását a klinikumban korlátozza, hogy többnyire nehezen kivitelezhető, nagy gyakorlatot igénylő, invazív és hosszadalmas vizsgálatokról van szó, ráadásul sok módszer esetében a kapott eredmények elemzése is időigényes. A vizsgálatunk során alkalmazott intravitális video-mikroszkópiás (IVM),

módosított spektrális képalkotás (O₂C) és Lézer-Doppler áramlásmérési (LDF) módszerek megbízhatóan tükrözik a mikrokeringési folyamatok dinamikáját, és jól alkalmazhatók a szövetek perfúziós zavarainak és gyulladásos reakcióinak nyomonkövetésére.

Mitokondriális funkcióra vonatkozó vizsgálataink során nagy felbontású respirométerrel jellemeztük az IR során mind a meleg- és hideg iszkémiás periódus, mind a reperfúzió következtében létrejövő mitokondriális diszfunkciót, valamint a feltételezett védő molekulák, egyrészt az L- α -glicerilfoszforilkolin (GPC) és az exogén metán (CH₄), hatását. A GPC a membránok foszfolipid szintézisének kolin-donora, jelentős szerepe van hipoxiás folyamatokban a foszfolipid homeosztázis fenntartásában. GPC gyulladásgátló tulajdonságokkal rendelkezik, csökkenti a membránkárosodást a központi idegrendszer területén, és elősegíti az adenzin-5'-trifoszfát (ATP) szint regenerálódását a májban. Emellett hatásosan alkalmazható a lipidperoxidáció és az oxido-reduktív károsodások ellen. A korábban biológiailag inaktívnak vélt CH₄ szerepének vizsgálata a kutatás egyik eleme, különféle IR-s kísérletek igazolják gyulladáscsökkentő tulajdonságait. Az intracelluláris CH₄ lehetséges célpontja a mitokondrium, és a CH₄ antioxidáns és anti-apoptotikus hatása által valósulhat meg, hogy befolyásolja a mitokondriális reaktív oxigén szabadgyök (ROS) termelést és a légzési aktivitást.

Klinikai vizsgálatunkban felvetettük az endogén metanogenezis lehetőségét fokozott alkoholfogyasztást követően mitokondriális funkciózavar alatt egészséges embereken és patkányokban. Vizsgálataink kiterjednek a politraumatizált betegek monitorozására is, beleértve vérzéses shock esetén a kilélegzett CH₄ szintjét és a vitális paraméterek prediktív értékének meghatározását, valamint a mitokondriális légzés vizsgálatának diagnosztikai alkalmazását trauma-indukált koagulopátiában (TIC).

Az értekezés célja a mikrokeringési és mitokondriális diszfunkció mechanizmusainak feltárása, amely új terápiás célpontokat azonosíthat az IR károsodások mérséklésére és a szöveti regeneráció elősegítésére. Az elemzés újdonsága, hogy a gyulladásos reakciók és a mitokondriális funkciózavarok összefüggéseit nemcsak alapkutatási, hanem klinikai környezetben is vizsgálatuk.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A mikrokeringés jellemzői és funkcionális szerepe

A mikrokeringés a szisztémás keringés része, amely a legkisebb, 5–100 μm átmérőjű ereket – arteriolákat, kapillárisokat és venulákat – foglalja magában [1]. A mikrokeringés kulcsszerepet játszik az oxigén és a tápanyagok szállításában a vérből a szövetek parenchimális sejtjeihez, valamint az anyagcsere végtermékeinek eltávolításában. Az oxigén passzív diffúzióval jut el a sejtekhez, ahol az energiaigények kielégítését és a megfelelő működést biztosítja [2]. Emellett a mikrokeringés szabályozza az oldott anyagok cseréjét az intravaszkuláris és szöveti terek között, így hozzájárul a hormonok, tápanyagok, valamint az immunrendszer és a hemosztázis szempontjából fontos tényezők szállításához [3].

Az oxigén szállítása a vérben két formában történik: hemoglobinhoz (Hb) kötődve (oxiHb) és oldott állapotban a plazmában. Azokon a területeken, ahol az oxigén parciális nyomása ($p\text{O}_2$) csökken, a Hb oxigén iránti affinitása is mérséklődik, megkönnyítve az oxigén diffúzióját a kapilláris falon keresztül az interstitiumba és a sejtekbe. A mikroereken keresztül diffundáló oxigén sugárirányban akár 100–200 μm -es szöveti távolságot is képes elérni [2]. A sejtekben az oxigén a mitokondriális elektrontranszport-láncban (ETC) vesz részt, ahol oxidatív foszforiláció (OxPhos) révén ATP keletkezik. Így a mikrokeringés kulcsszerepet játszik az ATP-termelés fenntartásában, az oxigén folyamatos és megfelelő szállításával a sejtek igényeinek megfelelően [4].

A mikrokeringés artériás szakaszának hagyományos szerepe az érellenállás szabályozása, valamint a metabolikus igények és a véráramlás összehangolása. A szabályozás az arteriolák falának és a prekapilláris szfinkterek simaizmainak kontrakcióján és relaxációján alapul, amelyet helyi és idegi mechanizmusok irányítanak [5,6]. Az érfal átmérőjének módosulása hidrodinamikai ellenállást eredményez, amelyet a nyomáscsökkenés és a térfogatáram arányában határoznak meg, ami nagyjából megfelel Poiseuille törvényének. Például ha egy érszegmenst kétszeresére tágítunk, az ellenállás körülbelül 16-szorosára változik. Nem meglepő, hogy az arteriolákban, ahol a nyomáskülönbség a legnagyobb, egyben az a terület is, ahol az aktív átmérőváltozások a legjelentősebbek. Az érfal átmérőjének csökkenése megvédi a érrendszer következő szakaszát a nyomás akut emelkedésének káros hatásaitól,

megelőzi a túlzott véráramlást a perfundált szövetek felé, és fenntartja az áramlási tartalék kapacitását [7]. Az érrendszeri tónus modulátorai közé tartozik a sejtek közötti elektromos kapcsolódás és az endotélium által termelt anyagok (például nitrogén-monoxid (NO), prosztaciklin, endotélium-eredetű hiperpolarizáló faktor (EDHF), endotelin-1, és tromboxán A₂), amelyek az endotélréteg alatti simaizomsejtekben ellazulást vagy összehúzódást idéznek elő [8,9]. Az artériás szakaszt követően a kapilláris hálózat nagy felszíni területe és az izolációt biztosító simaizomsejtek hiánya lehetővé teszi, hogy ezek az endotélium által termelt mediátorok áthatoljanak a kapillárisokat határoló parenchimális sejtekbe, így a mikrokeringés közvetlen hatást fejt ki a szövetekre. A vaszkuláris parakrin szabályozás magyarázatot adhat az endotélium által termelt anyagok sokféleségére, amelyek hasonló mértékű értágulást idéznek elő, ugyanakkor lehetővé teszik a helyi szöveti válaszok széles skáláját. Ezek közé tartozik a sejtek proliferációja, fibrózisa, apoptózisa és trombózisa [8,9]. Ez a szabályozási mechanizmus nemcsak a szöveti metabolikus jelekre válaszolva befolyásolja az áramlást, hanem fordítva is: a mikrokeringés által felszabadított mediátorok révén a helyi szöveti válaszokat is modulálja. Például az endotélsejtek által, áramlás hatására felszabaduló NO diffundál a parenchimális sejtekbe, ahol gátolja a mitokondriális metabolizmust, csökkenti a ROS termelését, és gyulladáscsökkentő hatást fejt ki [10]. A parakrin hatás kétirányú: a luminalisan felszabaduló NO gátolja a trombocitaaktivációt és az adhéziós molekulák kifejeződését, ezzel megelőzve a trombózist és az érfali gyulladást [10]. A mikrokeringés vizsgálatához kulcsfontosságú azoknak a paramétereknek a meghatározása, amelyek befolyásolják a perfúziót, és közvetlen hatással vannak a szövetek oxigénellátására. Ilyenek például a kapilláris sűrűség, az átjárt kapillárisok aránya, a vörösvérsejtek áramlásának sebessége, valamint a vér viszkozitásának dinamikus változásai. A csökkent kapilláris-sűrűség például az oxigén diffúziós távolságának megnövekedését eredményezi, amelynek következtében a szövetek oxigénfelvétele csökken, ez pedig gyulladáshoz és szöveti hipoxiához vezet [11]. A mikrokeringés másik fontos paramétere a vörösvérsejtek áramlásának sebessége, amely szintén kulcsfontosságú szerepet játszik az oxigén szállításában. A vörösvérsejtek áramlási sebessége nem egyenletes a kapillárisokban; a mikrokeringésben az áramlás fokozatosan lelassul (Fåhræus-Lindqvist effektus), és ennek következményeként a vörösvérsejtek az áramlás tengelyéhez közel aggregálódhatnak, míg a sejtmentes zónák szélesedhetnek, ami csökkenti az érfalra kifejtett hidrodinamikai ellenállást.

A fokozott aggregáció és a csökkent deformabilitás mikrokeringési diszfunkcióhoz, és ezzel együtt a szöveti perfúzió csökkenéséhez vezethet [12].

A fenti mikrokeringési paraméterek önállóan még nem határozzák meg egy adott szövet mikrokeringését, mivel az is lényeges, hogy a szöveti térfogatban a keringés mennyire homogén. A mikrokeringési elégtelenség egyik legjellemzőbb jele a véráramlás heterogenitása, amely azt jelenti, hogy a perfundált és nem perfundált kapillárisok eloszlása az adott szövetben nem egyenletes. Ez az oxigénkivonás hatékonyságának csökkenéséhez és hipoxiás zónák kialakulásához vezethet, még akkor is, ha a szerv teljes véráramlása megmarad [13]. Ezen változások kulcsszerepet játszanak a szervi diszfunkció kialakulásában. Számos kutatás is összefüggést mutatott ki a mikrokeringés heterogenitása és a szervi diszfunkció kialakulása, illetve a mortalitás között [13–15]. Ebből adódik, hogy mikrokeringési zavarok akkor is előfordulhatnak, ha a szisztémás hemodinamika még a kielégítő határértékeken belül van. A perfúzió heterogenitása az oxigenizáció heterogenitásával is együtt jár [16,17]. Mi több, a heterogén perfúzió önmagában súlyosabb oxigénellátási problémákhoz vezethet, mint a homogén módon csökkent perfúzió [16–18]. Szepszisben szenvedő betegeknél kimutatták, hogy a perfúzió heterogenitása szorosabb összefüggésben áll a beteg kimenetelével mint a véráramlási sebesség [13]. A mikrokeringési változások vizsgálata során ezért elengedhetetlen, hogy a monitorozásra használt technika képes legyen feltárni a szöveti perfúzió és oxigenizáció heterogenitását.

Korábbi IVM-el végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a mikrokeringés az IR károsodás egyik fő célpontja [19]. A mikrokeringési sérülés a parenchimális károsodás előtt jelentkezik, és annak hátterében az iszkémia során fellépő mikrokeringési perfúzió hiányából adódó másodlagos hipoxia („no-reflow”), valamint a reperfúzióhoz kapcsolódó gyulladással válasz áll, amely magában foglalja a polimorfonukleáris neutrofil sejtek (PMN-ek) aktiválódását („reflow-paradoxon”). A mikroerekben fellépő „no-reflow” jelenség az endotél duzzanata és intravaszkuláris hemokoncentráció következménye. Az iszkémia alatt ugyanis a vér viszkozitása emelkedik, és a vörösvérsejtek deformabilitása csökken, ami fokozott véráramlási ellenállást és a kapillárisok perfúziójának zavarát okozza. [20]. A reperfúzió során pedig a gyulladással citokinek és gyorsan felszabaduló ROS (például szuperoxid anionok) oxidatív stresszt okoznak, amelyek súlyosbítják a vörösvérsejtek károsodását, és ezáltal tovább rontják a mikrokeringés állapotát [20].

A mikrokeringési diszfunkció egyik további jele IR-ben a fokozott leukocita-endotél interakciók jelenléte [21]. A gyulladásoos válasz során a PMN-ek aktiválódnak, és fokozottan tapadnak az endotélsejtekhez, ami a kapillárisokban a vér áramlásának lassulásához vezethet. A folyamat kezdetén a ROS által közvetített endotélkárosodás következik be, és a sérült/aktivált endotélsejtek kemotaktikus anyagokat termelnek, mint például trombocita-aktiváló faktort, leukotrién B₄-et és kemokineket, amelyek elősegítik a PMN-ek mozgását. A gördülést (angolszász irodalomban rolling) a szelektinek közvetítik, amelyek szénhidrát-szerű struktúrák az endotélsejtek és a leukociták felszínén [22]. Ezt követően a leukociták adhéziós ereje megerősödik, amely a szilárd tapadásukhoz (sticking) vezet az endotéliumhoz. Ebben a fázisban a PMN-ek levetik L-szelektinjüket, és helyette növelik a β 2 integrinek (CD11a,b,c/CD18) expresszióját. Ezek az integrinek kapcsolatba lépnek az endotélsejtek ligandumaival, például az intercelluláris adhéziós molekula-1-gyel (ICAM-1), erős adhéziós kölcsönhatást kialakítva létrehozzák a kitapadást. Végül a PMN-ek transzmigrációja következik be, amelynek típusosan az endotélsejtek határainál történik [23]. A tézis kísérleteiben a mikroerek direkt ábrázolására alkalmas IVM-el végeztük a leukocita-endotél interakciók vizsgálatát, ami kiváló módszer a PMN-ek és az endotélréteg közötti kölcsönhatások kimutatására és kvantifikálására [24].

2.1.1 A mikrokeringés monitorozása

A mikrokeringési véráramlás változásait számos betegségben azonosították, beleértve az égési sérüléseket, a súlyos traumákat, a műtétek során előforduló IR károsodást, a szepszist és a többszervi elégtelenséget is [14,25,26]. A jelenlegi kutatások már ezen változások klinikai következményeire összpontosítanak [27,28], valamint az alkalmazott terápiák hatásait vizsgálják [28,29], amihez szükséges a mikrokeringési változások monitorozásának lehetősége.

A mikrokeringés intraoperatív monitorozása különösen fontos nagyobb sebészeti beavatkozások, például hasi műtétek esetén, mivel lehetővé teszi a szöveti oxigénellátás és véráramlás valós idejű követését, ezáltal minimalizálva a posztoperatív komplikációk kockázatát. Például laparoszkópos szigmoid resectio során a bél serosális mikrokeringésének finom változásai kimutathatók a később részletezésre kerülő Sidestream Dark Field (SDF,

oldalirányú sötét mezős) technikával, amely segíthet a nem életképes bélszakaszok azonosításában [30]. Ezen kívül a bél IR károsodásának monitorozása is kulcsfontosságú, mivel ez a jelenség számos sebészeti beavatkozás során megfigyelhető szövődményként, különösen szívsebészeti beavatkozások, szervátültetések vagy nagyér-műtétek alkalmával [31]. A bél mikrokeringésének nyomon követése történhet indirekt módszerekkel, mint a mikrodialízis vagy tonometria, amelyek a szöveti anyagcsere, pH és metabolitok szintjét mérik. Azonban ma már elérhetőek olyan ágy melletti technikák is, amelyek a mikrokeringés direkt vizualizálására alkalmasak, lehetőséget biztosítva ezzel az IR által okozott szöveti károsodások korai felismerésére és kezelésére [31]. Intraoperatív mikrokeringési monitorozást végeztek már idegsebészeti beavatkozásoknál is, például aneurysma eltávolítása során a hiperkapnia okozta vasospasmus agyi hatásait vizsgálva [32], valamint rekonstrukciós sebészetben a szabadlebenyek folyamatos perfúziójának monitorozásával a lebenyhatárok meghatározására [33]. Továbbá, peritoneális metasztázisok angiogenezisének és mikroszerkezetének vizsgálata is történhet ilyen módon [34].

Különösen nagy jelentőséggel bír az intraoperatív mikrokeringés monitorozása a tumor sebészetben. A normál szövetekhez képest a szolid tumorok gyakran kaotikus és rendezetlen, heterogén mikrovaszkuláris hálózatot alakítanak ki [35]. E különbségek különböző daganattípusok között, sőt ugyanazon daganaton belül is jelentősek lehetnek, miközben az egészséges érrendszer jellemzői megmaradnak, hogy biztosítsák az optimális sejtműködést [34,36]. A mikrokeringési monitorozás így segíthet a tumor rezekciós szélének pontos meghatározásában, lehetővé téve az egészséges és tumoros szövetek határainak elkülönítését [37].

A súlyos sérültek ellátása szinte minden esetben kapcsolódik az intenzív terápiás osztályokhoz, ahol a mikrokeringési paraméterek folyamatos követése támogatja a betegek állapotának stabilizálását. Szepszis, sokk vagy súlyos vérvesztés esetén a mikrokeringés gyorsan károsodhat, ami szöveti hypoxiához vezethet [14]. Ilyen helyzetekben az IR következtében fellépő kapilláris perfúzió zavar és gyulladás tovább ronthatja a beteg állapotát. A monitorozás nemcsak sebészeti típusú kórképekben, hanem belgyógyászati betegségek diagnosztikájában és kezelésében is kiemelten hasznos. Autoimmun betegségek, mint például a szisztémás szklerózis vagy a Raynaud-szindróma esetében a jellegzetes kapilláris-eltérések diagnosztikai értékűek, és kapillaroszkópiával jól nyomon követhetők [38]. Hasonlóképpen,

gyulladásos folyamatok során a mikrokeringés korai változásai már a szöveti károsodások kialakulása előtt kimutathatók, ami lehetőséget teremt a gyulladásos folyamatok intenzitásának követésére és a kezelés hatékonyságának ellenőrzésére. A diabéteszes láb és krónikus sebgyógyulási problémák esetében a mikrokeringési zavarok pontos felmérése segíti a célzott kezelések megtervezését és az eredmények értékelését [39].

A mikrokeringési vizsgálatok fejlődése több évtizedes kutatás eredménye, és számos módszer kifejlesztését eredményezte, melyek célja a kiserek és a mikrokeringés, valamint a szöveti perfúzió vizsgálata. Az alábbi összefoglaló bemutatja a mikrokeringés direkt vizsgálatára alkalmas főbb módszereket a kialakulásuk sorrendjében, röviden áttekintve a technológiák alapját és klinikai alkalmazhatóságukat.

2.1.2 A mikrokeringési vizsgálómódszerek fejlődése

Az egyik legrégebbi mikrokeringési vizsgálati módszer a kapillaroszkópia, melynek első leírásai az 1900-as évekre tehetőek. A módszer során a bőr felszíni kapillárisainak morfológiáját vizsgálják, elsősorban a körömágyon, ahol a kapillárisok jól megfigyelhetők. Az első kapillaroszkópok, amelyek a 20. század elején jelentek meg, egyszerű optikai rendszereket használtak, egy lencsét és egy fényforrást tartalmaztak, amely megvilágította a vizsgált területet. A kapillárisok képe a lencsén keresztül került megfigyelésre, lehetővé téve a kapillárisok átmérőjének, elágazásainak és a véráramlás sebességének vizsgálatát [40]. A kapillaroszkópok fejlődése során a technológia folyamatosan fejlődött, és a modern kapillaroszkópok, mint például a videokapillaroszkópok (kézi videó kapillaroszkópia (HVM) és a körömágyi video kapillaroszkópia (NVC), digitális képfeldolgozást és nagyobb nagyítást kínálnak, lehetővé téve a részletesebb elemzést [41]. A kapillaroszkópia különösen hasznos a reumás megbetegedések, mint például a szisztémás szklerózis és a Raynaud-jelenség diagnosztizálásában, mivel a kapillárisok morfológiai változásai korai jelei lehetnek a betegség progressziójának [40]. A kapillaroszkópia lehetővé teszi a kapillárisok sűrűségének, a megakapillárisok jelenlétének és az avaszkuláris területeknek az azonosítását, amelyek fontos információkat nyújtanak a betegség állapotáról és a kezelés hatékonyságáról [42]. Az 1980-as években az IVM megjelenése új perspektívát nyitott a mikrokeringési kutatásokban, mert közvetlen vizuális információt nyújtott a mikrovaszkuláris folyamatokról, például a leukocita-endotél interakciókról és a szöveti gyulladások dinamikájáról. A technika

során a szövetet egy specifikus hullámhosszúságú fényforrással, például higanygőz-lámpával vagy lézerrel világítják meg. Ez a gerjesztő fény elnyelődik a mintában található fluoreszcens molekulák által, amelyek így magasabb energiaszintre kerülnek. A gerjesztett molekulák rövid idő után visszatérnek alacsonyabb energiaszintjükre, miközben hosszabb hullámhosszú (alacsonyabb energiájú) fényt bocsátanak ki. A visszavert fényt egy mikroszkóp segítségével rögzítik, lehetővé téve a kapillárisok, arteriolák és venulák részletes vizualizálását [43]. Fluoreszcens festékekkel, mint például a rhodamin és a fluorescein, különböző sejttípusok és biológiai reakciók vizualizálására van lehetőség. A rhodamin különösen hasznos a fehérvérsejtek, például a PMN-ek megjelölésére, lehetővé téve a leukocita-endothelsejt interakciók megfigyelését. Ezen interakciók megértése kulcsfontosságú a gyulladásos reakciók és a mikrokeringési zavarok tanulmányozásában [23]. A fluorescein, más néven fluorescein izotiocianát (FITC), gyakran alkalmazott festék a vörösvérsejtek megjelölésére, amellyel nyomon követhető a vörösvértetek mozgása a mikrokeringésben, sebességet és kapilláris perfúziót lehet általa mérni, ami fontos információkat nyújt a szöveti oxigénellátottságról és a gyulladásos folyamatokról. A módszer limitációja az invazivitása, többnyire sebészi preparálást igényel, hogy a vizsgált szövethez hozzáférjenek, másrészt a fluoreszcens anyagok használata nem teljesen veszélytelen. A fluoreszcens anyagok használata során fototoxicitás és a fotobleaching fordulhat elő, amelyek károsíthatják a szöveteket és torzíthatják az eredményeket. A szöveteknek különböző mértékű autofluoreszcenciájuk is van a természetesen előforduló fluoreszcens molekulák (fluorofórok), például nikotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) és flavin-adenin-dinukleotid (FAD) mennyiségétől függően, ami zavarhatja a vizsgálatot [44]. Ezen kívül a fluoreszcens festékek alkalmazása szigorú validációt igényel, hogy biztosítsák a biztonságos és megbízható használatot emberi alanyok esetében, ami korlátozhatja a technika alkalmazhatóságát a klinikai gyakorlatban. Mindezek miatt az IVM megfigyelések többnyire állatkísérletes modellekben nyújtanak részletes adatokat a mikrocirkuláció mechanizmusairól [6].

Ezek a hátrányok részben kiküszöbölhetők az ortogonális polarizációs spektrális képalkotással (OPS), ami a mikrokeringés vizsgálatára egy nem-invazív képalkotó módszer. A vizsgált szövetet lineárisan polarizált fényvel világítják meg, majd a visszavert fényt speciális szűrők segítségével detektálják. Ez a megközelítés lehetővé teszi a Hb-ban gazdag

struktúrák, például a mikroerek részletes megjelenítését, anélkül hogy kontrasztanyagra lenne szükség, akár 2-3 mm-es szövetmélységig. A módszer képes a mikrokeringési paraméterek, például a vörösvérsejtek áramlási sebességét, a kapilláris sűrűséget és a mikrovérkeringés permeabilitását valós időben vizsgálni [45].

Az SDF szintén a Hb fény abszorpcióján alapuló vizsgálat, függetlenül annak oxigenizációjától, és különösen hasznos a kapillárisok perfúziójának és mikrovaszkuláris áramlási indexének (MFI) kvantitatív elemzésében [46]. Az SDF technológia stroboszkópos LED gyűrűs világítást használ, a szövetekbe irányított fény impulzusokat generál, amelyeket a Hb tartalmú mikrovérerek visszavernek, így lehetővé téve a mikrokeringési struktúrák és dinamikák részletes vizsgálatát.

Az SDF-képalkotást az OPS-el való összehasonlítás során a kapillárisok átmérőjét és a vörösvértettek sebességét tekintve azonos kvantitatív eredményeket kapunk. A vénás kontraszt, élesség és a képminőség is azonos OPS és az SDF képalkotás esetében. A kapillárisok kontrasztja és képminősége azonban szignifikánsan magasabbnak bizonyult az SDF-képalkotás alkalmazásával. Mindkét módszer nem invazív jellege miatt alkalmazható a klinikumban, és képesek a mikrokeringés heterogenitásának kimutatására, akár egy heterogenitási index megadásával is, amely az MFI értékekből számítható ki [47]. A vizsgálatot ágy melletti, valós idejű, sőt, intraoperatív körülmények között is elvégezhetjük, így lehetővé téve a gyors klinikai döntéshozatalt [[31] [48]. A legnagyobb szakirodalmi háttér a kritikus állapotú, intenzív osztályon kezelt betegek szublingvális mikrokeringésének vizsgálatának van, mely a betegség prognózisának meghatározására, valamint a terápiás beavatkozások hatékonyságának jellemzésére is alkalmasnak bizonyult [49]

Az LDF az 1970-es években jelent meg, és egyszerűsége valamint relatív olcsósága miatt egyike a legelterjedtebb keringés vizsgáló módszereknek. Az előző módszerekkel ellentétben, bár a keringés közvetlen vizualizálására nem alkalmas, lehetővé teszi egy adott szöveti térfogatban a véráramlás valós idejű mérését [50]. A módszer a Doppler-effektuson alapul: a lézersugár a mozgó vörösvértestekről visszaverődve frekvenciaváltozást idéz elő, amely alapján a véráramlás sebessége meghatározható. A módszer általában a felszíni szövetekben, körülbelül 1 mm³-es térfogatban méri a mikrokeringést, bár a pontos mérési mélység és térfogat függ a szövet típusától és a használt eszköz specifikációjától. Elsősorban a bőr vagy a nyálkahártya szöveti perfúziójának monitorozására használják [51].

A 1990-es években megjelent Laser-Speckle Contrast Imaging (LSCI, lézeres szóródási kontrasztalapú képalkotás) a lézeres technológiát fejlesztette tovább azáltal, hogy kétdimenziós, valós idejű perfúziós képeket nyújtott. Az LSCI az optikai szóródási mintázatok elemzésével nemcsak gyors, hanem kvantitatív adatokkal is szolgált a perfúzió mértékéről, ami különösen hasznos a neurológiai és kardiovaszkuláris területeken [52].

A 2002-ben bemutatott O2C (Oxygen to See, LEA Medizintechnik GmbH) technológia a lézer Doppler és a fehér fény spektroszkópia ötvözet. A lézer Doppler technika lehetővé teszi a véráramlás mérését, míg a fehér fény spektroszkópia a Hb oxigénszaturációjának és a relatív Hb-szintnek a meghatározására szolgál [53]. A fehér fény spektroszkópia a Lambert–Beer törvényen alapul, amely a fény abszorpcióját és szóródását vizsgálja a szövetekben [54]. Az O2C technológia tehát egyesíti e két módszer előnyeit, lehetővé téve a szöveti perfúzió és oxigénellátottság pontos és megbízható mérését, amely különösen hasznos lehet a sebészeti beavatkozások során, például szabad lebenyek monitorozásánál [55].

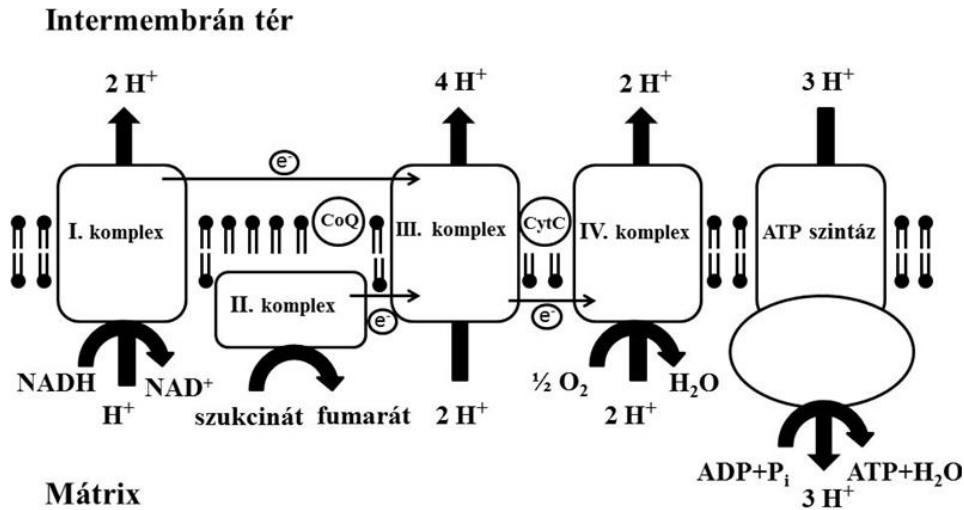
A 2010-es évekre a közeli-infravörös spektroszkópia (NIRS) technológiájával megvalósított szöveti oxigénszaturáció (StO₂) monitorozása vált elérhetővé. A NIRS az elektromágneses spektrum 800–2500 nm közötti tartományát használja. Alapelve, hogy a szövetek különböző mértékben nyelik el a közeli infravörös fényt, ami lehetővé teszi a szövetek oxigénellátottságának és vérkeringésének valós idejű monitorozását. A vizsgálat során a közeli infravörös fényt a szövetekre irányítják, ahol az különböző mértékben nyelődik el a Hb és más kromofórok által. Az elnyelődés mértéke függ a Hb oxigénnel való telítettségétől, így a visszavert vagy áteresztett fény spektrális elemzésével meghatározható a szövetek oxigénszintje. Mivel a módszer non-invazív módon méri a szövetek oxigénszintjét, különösen hasznos az intenzív terápiában és sebészeti környezetekben, mivel segíti a hypoxia és perfúziós zavarok gyors felismerését [56].

2.1 Mitokondriumok és funkcionális vizsgálataik

A mitokondriumok a sejtek energiatermelő központjai, amelyek az OxPhos révén biztosítják az ATP-termelést. Az ATP kulcsfontosságú a sejtek normális működéséhez, különösen a stresszhelyzetekben, mint például trauma és IR esetén. Ismeretes, hogy iszkémia során az

oxigén- és tápanyagellátás megszűnése csökkent ATP-termelést okoz, ami sejtműködési zavarhoz és ionháztartási egyensúlyvesztéshez vezet. A mitokondriumokban bekövetkező anyagcserezavarok miatt már az iszkémia alatt károsodás alakul ki. Reperfúzióban viszont az oxigénellátás helyreállításakor a hirtelen megnövekedett oxigénszint intenzív ROS-termelést indukál [57–59] A ROS közvetlenül károsítja a mitokondriumok fehérjéit, lipidjeit és DNS-ét, ami tovább súlyosbítja a sejtkárosodást. A mitokondriumokból kiszabaduló fehérjék, például a citokróm-c, az apoptózis kaszkádját indítják el, amely sejthalált eredményezhet hozzájárulva a szövetkárosodáshoz. A trauma során a sejtek belső kalcium (Ca^{2+}) koncentrációja megemelkedhet, ami túlterheli a mitokondriumokat, és hozzájárul a mitokondriális permeabilitási tranziens pórusának (mPTP) nyitásához [58]. Ez a folyamat a mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi_m$) elvesztéséhez és szintén sejthalálhoz vezethet.

A mitokondriális belső membránjában található ETC négy komplexből (I, II, III, IV), egy lipid komponensből (ubikinon), valamint a hem-csoportot tartalmazó citokróm c fehérjéből áll (1. ábra). Működése során a szubsztrátokból származó elektronokat továbbítja a végső elektronakceptor, az oxigénmolekula felé, miközben az ionszűrőként is funkcionáló komplexeken (I, III, IV) keresztül protonokat pumpál ki a mátrixból az intermembrán térbe [60]. Az így kialakuló protongrádiens az ATP-szintáz hasznosítja az ADP ATP-vé alakításához a belső membrán mátrix felőli oldalán. A légzési lánc komplexei nem különállóan működnek, hanem szuperkomplexeiket alkotva növelik az elektrontranszport hatékonyságát [61]



1. ábra. A mitokondriális ETC működése. Az elektronok nagy energiájú, redukált molekulákból, például NADH és FADH_2 -ből származnak, és lépcsőzetesen haladnak végig a láncon. E közben az egyes komplexek oxidálódnak vagy redukálódnak, ahogy az elektronok átadódnak egymásnak. Az első lépésben a Komplex I (NADH-dehidrogenáz) az NADH-tól elektronokat vesz fel, ami oxidációval jár, így NADH-ból NAD^+ alakul. Az elektronok eközben átkerülnek a koenzim Q-ra (ubikinon), amely redukálódik. A következő lépésben a Komplex II (szukcinát-dehidrogenáz) a FADH_2 -től elektronokat vesz át, mely oxidációval FAD-ra alakul, és az elektronok ismét a koenzim Q-ra (CoQ kerülnek). A koenzim Q továbbítja az elektronokat a Komplex III-hoz (citokróm bc1 komplex), ahol az elektronokat továbbítja a citokróm c felé, miközben protonokat pumpál át a mitokondriális membránra. Végül a Komplex IV (citokróm c oxidáz) veszi fel az elektronokat, amelyeket molekuláris oxigén (O_2) fogad, így oxigén redukálódik vízzé (H_2O). Az elektronok áramlása az ETC-n keresztül lehetővé teszi a protonok pumpálását a mitokondriális membránra, ami a protongradiens kialakításához vezet, és végső soron szükséges az ATP szintéziséhez. ETC: elektrontranszportlánc, NADH: nikotinamid-adenin-dinukleotid, FAD: flavin-adenin-dinukleotid.

A mitokondriális funkciók vizsgálata során az oxigén- és szubsztrátfelhasználás függvényében különböző metabolikus állapotokat lehet azonosítani [62]. Az I. állapot (State I) a mitokondriumok nyugalmi állapota, amelyben az oxigénfogyasztás minimális, és a protonok nem pumpálódnak az intermembrán térbe. Ez a mitokondriális légzés alapvető kiindulópontja, amely lehetővé teszi a későbbi állapotok elérését, például a II. állapotot (State II) [63]. Ebben az állapotban a mitokondriumok ugyan oxidálják a szubsztrátokat, de nem termelnek ATP-t; a protonok felhalmozódása az intermembrán térben a $\Delta\Psi_m$ stabilitását eredményezi. Ez egyfajta nyugalmi fázis, amely a későbbi ATP-termelés előfeltétele [64]. A legismertebb és legaktívabb szakasz a III. állapot (State III), amely megegyezik az OxPhos folyamatával. Ekkor az ATP-termelés aktívan zajlik: a mitokondriumok intenzíven oxidálják a szubsztrátokat, miközben a protonok a mitokondriális membrán keresztül visszaáramlanak a mátrixba, lehetővé téve az ATP-szintáz számára az ATP előállítását [65–67]. A IV. állapot (State IV) a mitokondriumok ún. „Leak” légzése (protonszivárgásos

légzés), mely során nem történik ATP szintézis, a protonok az ETC által létrehozott elektrokémiai grádienszt megkerülve szivárognak vissza a mitokondrium mátrixába. Az OxPhos és a Leak légzés ismeretében kiszámíthatjuk a mitokondrium kapcsoltsági hatékonyságát kifejező OxPhos/Leak arányt, amit légzéskontroll-aránynak is neveznek (RCR). OxPhos során jellemzően magas az RCR, amely a mitokondriumok hatékony energiaátalakító képességét tükrözi. Ezzel ellentétben a Leak állapot jellemzője a csökkent RCR és a fokozott hőtermelés, mivel a protonok áramlása már nem jár ATP-termeléssel [59,68,69]. Végül az V. állapot (State V) a mitokondriális membrán permeabilitásának növekedése következtében alakul ki, amely a protonszivárgás fokozódásával tovább csökkenti az RCR-t. Ebben az állapotban a mitokondriumok már nem képesek hatékonyan fenntartani a $\Delta\Psi_m$ -t, ami súlyos sejtműködési zavarokhoz vezethet [62,70–73].

A mitokondriális funkciók vizsgálata kulcsfontosságú a sejtek energiaellátásának megértésében, valamint a diszfunkciók felismerésében és terápiás célpontjainak azonosításában. Pontos monitorozásuk nemcsak alapkutatási, hanem klinikai szempontból is lényeges, mivel a korai eltérések felismerése hozzájárulhat a betegségek diagnosztikájához és kezeléséhez. A mitokondriális vizsgálómódszerek fejlődése az elmúlt évtizedekben forradalmasította az orvosi és biológiai kutatásokat. A különböző technikák eltérő szempontok szerint vizsgálják a mitokondriális aktivitást, az OxPhos-t, az oxigénfogyasztást, a ROS-termelést és a $\Delta\Psi_m$ -t. Az alábbiakban a mitokondriális kutatásokban leggyakrabban alkalmazott módszereket mutatjuk be, történeti sorrendben.

A Clark-féle elektróda volt az első olyan eszköz, amely lehetővé tette a mitokondriális oxigénfogyasztás közvetlen mérését. Leland C. Clark által kifejlesztett amperometrikus elektródot 1962-ben mutatták be, amely a polarográfiai elvén működik, és lehetővé teszi az oxigén folyamatos, valós idejű mérését [74]. Az eszköz működése azon alapul, hogy az oxigén egy membránon keresztül diffundálva a platina katódon redukálódik, miközben a keletkező áram erőssége az oxigén koncentrációjával arányos. A polarográfiai mérés stabilitása érdekében az elektróda ezüst anódot és kálium-klorid oldatot használ, amely biztosítja az ionvezetést. Az első alkalmazások között szerepelt a szöveti oxigénszint mérése, különösen sebészeti beavatkozások és szív- és érrendszeri kutatások során [75]. A mitokondriális vizsgálatok terén a Clark-féle elektróda a 1970-es évektől kezdve vált széles körben alkalmazottá, mivel képes volt mérni a mitokondriumok oxigénfogyasztását,

hozzájárulva a mitokondriális bioenergetika és a sejtlegzés megértéséhez [76]. A modern mitokondriális respirometriás eszközök közül az Oxygraph-2k és a NextGen-O2k (Oroboros), amelyek 2002 óta elérhetők, a magas felbontású respirometria (HRR) technológián alapulnak, és nemcsak az oxigén koncentrációját, hanem annak időbeli változását (fluxusát) is képesek mérni, ami kulcsfontosságú a mitokondriális légzési kapacitás értékeléséhez. Erich Gnaiger 1995-ös közleményében vezette be a HRR fogalmát, amely alacsony oxigénszinteken is lehetővé teszi a pontos mérést [77]. A fluxusmérések segítségével különböző mitokondriális szubsztrátok, inhibitorok és szétkapcsolószerek alkalmazásával az egyes respirációs fázisok, mint például a redukált szubsztrátok jelenlétében történő II-es állapotú mitokondriális légzés, III-as légzési állapotú OxPhos és IV-es légzési állapotú Leak, pontosan azonosíthatók és elemezhetők. A rendszer kétkamrás felépítése lehetővé teszi a párhuzamos kísérleteket, miközben termosztatikus szabályozása biztosítja a hőmérsékleti stabilitást. Az Oxygraph-2k alkalmazása széles körben elterjedt a mitokondriális diszfunkciók vizsgálatában, különösen neurodegeneratív betegségek, metabolikus szindróma és szepszis esetén.

A HRR technológiával párhuzamosan fejlődött a Seahorse XF Analyzer, amely 2003 óta van széles körben alkalmazásban, és főként sejt kultúrák valós idejű, nem invazív mérésére használják. A Seahorse mikroplate alapú technológiát alkalmaz az oxigénfogyasztás (OCR) és a glikolízis intenzitását jelző extracelluláris savasság (ECAR) párhuzamos mérésére [78]. A Seahorse segítségével könnyen vizsgálható a mitokondriális energiahatékonyság, az ATP-termelés, valamint az OxPhos és a glikolízis közötti egyensúly. A Seahorse rendszer gyors és automatizált mérést biztosít, így az időbeli változások is könnyen nyomon követhetők. Klinikai alkalmazásában a Seahorse XF Analyzer a sejtmetabolizmus és anyagcsere-betegségek, például daganatok, cukorbetegség és szívbetegségek kutatásában terjedt el, lehetővé téve a tumorsejtek és az inzulinrezisztencia mechanizmusainak vizsgálatát, valamint a szívizomsejtek energiefelhasználásának monitorozását [76]. Az oxigénfogyasztáson kívül a mitokondriális funkciókra a mitokondriális $\Delta\Psi_m$ mérése ad információt, amit fluoreszcens festékek segítségével lehet mérni. A $\Delta\Psi_m$ a mitokondrium belső és külső membránja közötti elektrokémiai gradiens, amely a protonok (H^+) eloszlásának különbségéből adódik. A belső membrán negatív töltésű, míg a külső membrán pozitív töltésű, ami körülbelül 180 mV-os potenciálkülönbséget eredményez. A $\Delta\Psi_m$ fenntartása elengedhetetlen a sejtek

energiaellátásához, mivel a pozitív töltésű ionok, mint például a Ca^{2+} és a H^+ , elektrokémiai gradiensük révén képesek bejutni a mitokondriumokba, és ez utóbbi biztosítja azt a protonmotoros erőt, ami az ATP molekula szintéziséhez kell [79]. Elsőként az 1970-es években Rhodamine 123-at használtak a mitokondriális potenciál vizsgálatára élő sejtekben, mivel az a $\Delta\Psi_m$ függvényében halmozódik fel a mitokondriumokban, így a fluoreszcens jel erőssége közvetlenül arányos a potenciál nagyságával. A 1991-ben a JC-1 színezék bevezetése forradalmasította a $\Delta\Psi_m$ méréseinek módszertanát. A JC-1 képes a $\Delta\Psi_m$ változásait színváltozás formájában jelezni, amely lehetővé teszi a mitokondriális diszfunkciók korai észlelését [80]. Azóta számos más fluoreszcens festék, például a pozitív töltésű TMRM (tetrametilrhodamin-metil-észter) is elérhetővé vált, amely szintén a $\Delta\Psi_m$ növekedésével arányosan halmozódik fel a mitokondriumokban és a sejthalál vizsgálatának egyik alapvető eszközévé vált, mivel képes érzékelni a potenciál csökkenését, amely a sejtek apoptózisához vagy nekrozisához vezethet [81]. A következő mérföldkő a fluorospirometria kifejlesztése volt, ami egyesíti a fluoreszcens színezékek érzékenységét a respirometria precizitásával. Az Oroboros Instruments 2012-ben mutatta be a fluorometriai modulját a HRR rendszerhez. Ez a technika képes valós időben mérni a mitokondriális hidrogén-peroxid (H_2O_2) termelést (Amplex UltraRed (N, N'-diacetyl-3, 3'-dimetilbenzidin), DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate), a Ca^{2+} -áramlást (Calcium Green, Rhod-2 AM) és a $\Delta\Psi_m$ -t (TMRM, Safranin O [82]. Klinikai kutatásokban, például gyulladásoos bélbetegségek vagy trauma kapcsán jelentős szerepet játszik a mitokondriális funkciók jellemzésében [83–85].

A mitokondriális DNS (mtDNS) analízis fontos információkat nyújt a mitokondriális biogenezisről és a stresszválaszokról. Bevezetése az 1980-as évek elejére tehető. Az egyik legkorábbi és legjelentősebb közlemény 1981-ben jelent meg, amelyben Anderson és munkatársai először írták le az emberi mitokondriális genom teljes szekvenciáját, és ezzel megnyitották az utat az mtDNS elemzésének alkalmazása előtt különböző területeken, mint például a populációgenetika, az öröklődési betegségek diagnosztikája és az evolúciós kutatások számára [69]. Az említett közleményben leírt mitokondriális DNS szekvenálás még nem a PCR technológia alkalmazásával történt, hanem kémiai (úgynevezett Maxam-Gilbert-féle) szekvenálási módszerekkel. Később a PCR-alapú technológiák lehetővé tették a módszer gyorsabb elterjedését, és elősegítették az mtDNS deletációk, mutációk és más

szerkezeti eltérések detektálását [86].

A mitokondriális vizsgálómódszerek fejlődése az elmúlt évtizedekben lehetővé tette a sejtszintű energiahomeosztázis pontosabb megértését és a betegségek mitokondriális eredetének feltárását. Az olyan eszközök, mint az Oxygraph-2k és a Seahorse XF Analyzer, ma már nélkülözhetetlenek mind az alap kutatások, mind a klinikai alkalmazások terén. A tézis kísérletei során a mitokondriális funkciók megítélésére az Oxygraph-2k-t és fluoreszcens moduljait használtuk.

2.2 Az L- α -glicerilfoszforilkolin kísérletes és klinikai szerepe

A tézis kísérleteiben a mikrokeringés és a mitokondriális diszfunkció hatásait olyan molekulákkal próbáltuk befolyásolni, amelyeknek feltételeztük védőhatását, és más kísérleti elrendezésekben már hatékonynak bizonyultak. Az egyik ilyen molekula a GPC volt, amely endogén eredetű, deacilált foszfatidilkolin-származék. Ez a vegyület a foszfolipid-szintézis és az acetilkolin-termelés kulcsfontosságú előanyaga. Kémiai szerkezetét tekintve a GPC egy foszfo-kolin-egységből és egy glicerín-vázis részletből áll, ami hozzájárul vízdékonyságához és biológiai aktivitásához.

A GPC stabilitását számos környezetben vizsgálták. Kimutatták, hogy ellenáll fotolítikus, termikus és oxidatív stressznek, de alkalikus közegben hajlamos foszfát-észterkötéseinek bomlására [87]. Ez a stabilitás kulcsfontosságú biológiai szerepéhez, amely magában foglalja a sejtmembrán integritásának fenntartását, különösen stresszhatások, például hipoxia vagy IR sérülés esetén [88].

A GPC támogatja a membránfoszfolipidek szintézisét, különösen a Kennedy-útvonalon keresztül, amely kritikus a sejtmembránok regenerációja szempontjából. Ez a mechanizmus különösen fontos hipoxiás körülmények között, ahol a foszfolipidek gyors lebomlása következik be, veszélyeztetve a sejtek életképességét [89–91]. Az oxidatív stressz által kiváltott lipidek peroxidációja szintén jelentős szerepet játszik a membránkárosodásban, amely ellen a GPC védelmet nyújt [92].

A GPC képes csökkenteni a ROS és gyulladásos mediátorok, például a tumornekrozis-faktor alfa (TNF- α) szintjét. Ez elsősorban az NADPH-oxidázok (NOX) aktivitásának csökkentésével valósul meg, amelyek a ROS-termelés egyik fő forrásai a hipoxiás és

gyulladásos környezetben [93]. E tulajdonságai miatt a GPC különösen ígéretes terápiás szernek bizonyul olyan állapotokban, mint az IR okozta májkárosodás [94]. A GPC hiánya ritkán fordul elő, de a foszfolipid-homeosztázis zavarai esetén, például neurodegeneratív betegségekben, jelentős funkcionális eltéréseket okozhat. Klinikai alkalmazása az Alzheimer-kór tüneteinek enyhítésében és az agyi vérellátási zavarok javításában jól dokumentált, részben antioxidáns tulajdonságai és membránvédő szerepe miatt [95,96]. A GPC nootropikus hatásai széles körben ismertek, különösen az acetilkolin-szint növelésére gyakorolt kedvező hatása révén. Alapvető szerepet tölt be a neurotranszmitterek szintézisében, mivel az acetilkolin prekursoraként elengedhetetlen a központi idegrendszer optimális működéséhez. Klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy Alzheimer-kór és más neurodegeneratív betegségek esetén kedvezően befolyásolja a kognitív funkciókat, részben az acetilkolin-termelést támogató tulajdonságainak köszönhetően [89]. Emellett stroke-ot követően neuroprotektív hatása is bizonyított, és enyhe vagy közepesen súlyos demenciában szenvedő betegeknél kognitív javulást eredményezett [97].

A GPC biztonságos anyagként van nyilvántartva, és számos országban jóváhagyott terápiás szerként alkalmazzák. Alkalmazása túlmutat az idegrendszeri betegségek kezelésén, és egyre nagyobb figyelmet kap a kardiovaszkuláris, máj- és egyéb szervi károsodások kezelésében. A jelenlegi kutatások célja a GPC hatásmechanizmusainak jobb megértése, különösen a mitokondriális diszfunkciók modulálása és a gyulladásoz kaszkádok gátlása révén [98,99].

2.3 A CH₄ biológiai hatása

A CH₄ a szén legredukáltabb formája, színtelen, szagtalan, és az emberi érzékszervek számára nem észlelhető, könnyen gyúlékony gáz. Az atmoszférában a szén-dioxid (CO₂) után a második legfontosabb üvegházhatású gázként tartják számon, és légköri koncentrációja jelentős szerepet játszik a klímaváltozásban [100]. A CH₄ emellett jelentős légszennyező anyag is, mivel olyan veszélyes légszennyezőkkel együtt kerül kibocsátásra, mint a szálló por, az ózon és az illékony szerves vegyületek, amelyek veszélyeztethetik az emberi egészséget [101]. Kémiai szempontból a CH₄ a legegyszerűbb szénhidrogén, amely egy szénatomból és négy hidrogénatomból áll. Ez a stabil molekula magas hőmérsékleten könnyen reagál oxigénnel, égési reakció során szén-dioxidot és vizet termelve. Fizikai

tulajdonságai közé tartozik, hogy szobahőmérsékleten és normál légköri nyomáson gáz halmazállapotú, és bár vízben oldódik, oldhatósága alacsony, különösen magasabb koncentrációknál [102]. Az oldhatóság függ a víz pH-jától és hőmérsékletétől, míg a lipidfázisokban való jobb oldódóképessége lehetővé teszi a sejtmembránokon való áthatolást, ezáltal befolyásolva azok működését. Ez a tulajdonság hozzájárulhat a CH₄ biológiai hatásaihoz, mivel a membránokba bejutva módosíthatja a fehérjék és ioncsatornák aktivitását [103].

A környezeti hatások mellett a CH₄ közvetlen biológiai hatásokkal is rendelkezhet. A CH₄-termelő archeák gyakoriak az emberi bélmikrobiomban; az anaerob mikroorganizmusok akár 10%-a CH₄-termelő archea lehet [104]. A magas életkort megélt emberek mikrobiomját vizsgáló kutatásokban ezeknek az archeáknak a sokfélesége és mennyisége pozitív összefüggést mutatott az életkorral [105]. Az archeák gazdaszervezettel és szimbiotikus baktériumokkal való kölcsönhatása előnyös és káros hatásokat egyaránt kiválthat az emberi egészségre [105]. Bár patogén archeákat eddig nem azonosítottak [106], ismert, hogy a CH₄-termelés a bélben hozzájárulhat székrekedéshez és egyéb gasztrointesztinális problémákhoz. Irritábilis bél szindrómában (IBS) szenvedő betegek mikrobiomjában megemelkedett a CH₄ termelő archeák, különösen a *Methanobrevibacter smithii* abundanciája, melyek jelenléte összefüggést mutatott a lassabb béltranszitidóval [107]. Kísérleti adatok szerint a CH₄ gátolja a gasztrointesztinális traktus normális perisztaltikus aktivitását, valószínűleg a neuropeptidek és az enterális idegrendszer működésére gyakorolt hatása révén [108].

Ezen túlmenően, a CH₄ belégzése rendkívül magas koncentrációban közvetlen toxikus hatásokat okozhat az emberi szervezetben, például reverzibilis toxikus alveolitist és akut légzési distressz szindrómát eredményezhet [109]. Ugyanakkor a CH₄ belégzéséből származó közvetlen pulmonális toxicitásról ritkán számolnak be [109].

2.3.1 A CH₄ gyulladáscsökkentő hatásai

A CH₄ fent említett biológiai hatásai mellett úttörő jelentőségű volt Boros és munkatársainak „The anti-inflammatory effects of methane” című közleménye, amely a CH₄ jótékony hatására világított rá a gyulladással összefüggésben [110]. Ez a közlemény jelentős bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy az exogén CH₄ gyulladáscsökkentő hatást fejthet ki, különösen a vékonybél IR sérülés állatmodelljében, az oxidatív stressz és a gyulladással

válaszok csökkentése révén. A 2,5 % CH₄ dúsított mesterséges levegő inhalálása jelentősen javította a bélnyálkahártya szövettani károsodását és csökkentette az oxidatív stressz markereit, például a neutrofil infiltrációt jelző mieloperoxidáz (MPO) szintjét [110]. Az eredmények azt sugallták, hogy a CH₄ szerepet játszhat a gyulladásos útvonalak modulálásában, ami potenciálisan terápiás előnyöket kínálhat különböző gyulladásos állapotokban.

Ezt a kezdeti tanulmányt követték a későbbi kutatások, köztük a tézisben szereplő közlemények is, melyek folytatták azoknak a mechanizmusoknak a feltárását, amelyek révén a CH₄ kifejtí gyulladáscsökkentő hatását, beleértve a kulcsfontosságú jelátviteli útvonalakra, például a nukleáris faktor-kappa B-re (NF- κ B) és a mitogén-aktivált protein kinázra (MAPK) gyakorolt hatását [111,112]. Mostanra számos kutatás alátámasztja azt az elképzelést, hogy a CH₄ nemcsak anyagcsere melléktermékként szolgál, hanem jelentős bioaktív tulajdonságokkal is rendelkezik, amelyeket terápiás célokra lehetne hasznosítani a gyulladással kapcsolatos betegségek kezelésében.

2.3.2 A CH₄ diagnosztikus célú használata

A CH₄ diagnosztikai célú felhasználása számos ígéretes lehetőséget kínál, különösen a gastrointestinalis rendellenességek és a gyulladásos állapotok terén. A CH₄ kilégzési tesztsjei, amelyek a bélflóra állapotának felmérésére szolgálnak, segíthetnek a bélbaktériumok egyensúlyának megértésében, különösen a vékonybél bakteriális túlnövekedése (SIBO) esetén [113]. A CH₄ szintjének mérése a kilélegzett levegőben lehetővé teszi a különböző emésztési zavarok, például a laktóz intolerancia és a fruktóz malabszorpció diagnosztizálását [113,114]. A CH₄ kilégzési tesztsjei a sportteljesítmény és az ergometriás mérések során is alkalmazhatók, mivel a CH₄ szintje összefüggésbe hozható a fizikai aktivitás során bekövetkező anyagcsere-változásokkal [115]. A CH₄ koncentrációjának nyomon követése segíthet a sportolók teljesítményének optimalizálásában és a táplálkozási állapotuk felmérésében [115]. A CH₄ diagnosztikai célú felhasználása tehát széleskörű lehetőségeket kínál, amelyek hozzájárulhatnak a különböző egészségügyi állapotok jobb megértéséhez és kezeléséhez.

A tézisben említett cikkek alapján a CH₄ diagnosztikai alkalmazása a fentiekén túl kiterjedhet a mesenterialis perfúzió monitorozására is, amely fontos biomarker lehet a súlyos vérzés és

a traumás állapotok diagnosztizálásában [116]. A CH₄ szintjének mérése segíthet a sürgősségi ellátásban, mivel a csökkent perfúzió jelezheti a gyors beavatkozást igénylő belső vérzést [116]. A CH₄ diagnosztikai alkalmazása tehát nemcsak a bélrendszeri egészség monitorozására, hanem a sürgősségi orvosi helyzetekben is hasznos lehet.

2.4 Politraumatizált betegek diagnosztikája

A 45 év alattiak körében a traumás sérülés a vezető halálozási ok, ezért a trauma ellátás optimalizálása, különösen a halálozás csökkentése mind társadalmi-gazdasági, mind erkölcsi szempontból rendkívül fontos [117,118]. A traumás betegeknél a vérzés a sokk leggyakoribb oka [119], amely a vérveszteség következtében kialakuló szervi perfúzió elégtelenségét és a szövetek oxigénellátásának csökkenését eredményezi [120]. A különböző társbetegségek és a betegek kompenzációs mechanizmusainak eltérései miatt azonban a vérzéses sokkot nehéz egyértelmű, minden esetben alkalmazható kritériumok alapján meghatározni.

Az Advanced Trauma Life Support (ATLS) program – amelyet a sürgősségi traumatológiai ellátók széles körben alkalmaznak – a hipovolémiás sokkot négy súlyossági fokozatra osztja a becsült vérveszteség alapján. Az osztályozás a vitális paraméterek (VS), például a szívfrekvencia (HR), a szisztolés vérnyomás (SBP) és az anyagcsere-markerek, például a bázisdeficit (BD) értékeinek felhasználásával történik [119]. Az egyes ATLS osztályokhoz külön ajánlások tartoznak a vérátömlesztés szükségességére vonatkozóan [119]. Annak ellenére, hogy az ATLS-osztályozás széles körben elfogadott, alkalmazhatósága és érvényessége a klinikai gyakorlatban vitatott, mivel a sokkhoz kapcsolódó élettani reakciók egyénenként eltérhetnek [121]

2.4.1 A szívfrekvencia szerepe a vérzés felismerésében

Az akut vérzéses sokk felismerésének egyik legnagyobb kihívása, hogy időben azonosítsuk azokat az állapotokat, amelyek a sokk kialakulásához vezethetnek, még annak megjelenése előtt. A sérült kezdeti hemodinamikai állapotának értékelése során az egyik legvitatottabb vitális paraméter a szívfrekvencia (HR) [122,123]. A HR alkalmazásával kapcsolatos gyakori kritika, hogy nem kizárólag a hemodinamikai változások befolyásolják, hanem számos más

tényező, például szorongás, fájdalom és gyógyszerek hatásai is, ami alacsony specificitást eredményez a vérzés kimutatásában [122,124,125]

Az ATLS irányelvek szerint a HR folyamatosan emelkedő tendenciája összefüggést mutathat a vérzés súlyosságával [126]. Azonban a klinikai megfigyelések alapján a HR vérvesztésre adott válasza inkább két- vagy háromfázisú, semmint lineáris [124,127]. Ebből adódóan az elmúlt évtizedekben több tanulmány is megkérdőjelezte a HR-re való támaszkodás hasznosságát a vérzéses trauma korai kezelésében [128,129].

Mindazonáltal a megemelkedett HR régóta ismert a hypovolemiás sokk egyik jellemzőjeként, és a szívfrekvencia mortalitási előrejelző szerepét számos tanulmány is alátámasztotta [130,131]. Egy nemzetközi, keresztmetszeti vizsgálat két nagy trauma-kohorsz adatait felhasználva dolgozott ki és validált egy modellt a vérzés következtében bekövetkező halálozás előrejelzésére. Az elemzés során szignifikáns összefüggést találtak a HR és a mortalitás között, azonban az összefüggés görbéje U-alakúnak bizonyult, nem pedig lineárisnak, ahogyan azt az ATLS irányelvek sugallják [131]. Már az ezredforduló elején megkérdőjelezték a HR megbízhatóságát, amikor egy 14 325 traumás beteg adatait vizsgáló retrospektív elemzés kimutatta, hogy a HR nem rendelkezik megfelelő érzékenységgel és specificitással a trauma utáni hipotenzió előrejelzésében [125]. Egy későbbi regiszterelemzés tovább erősítette ezeket a kétségeket, mivel a HR gyengén teljesített az akut beavatkozások szükségességének, illetve a sérülést követő első 24 órában történő vörösvérsejt-transzfúziók előrejelzésében [122].

Az ATLS irányelvek elterjedésével párhuzamosan vita tárgyává vált a szívfrekvencia szerepe a hypovolemiás sokk osztályozásában. Egy 2013-as elemzésben 16 305 beteget soroltak be az ATLS által meghatározott sokk súlyossági osztályokba (I–IV), azonban egyik csoportban sem mutatkozott releváns tachycardia [132].

Annak ellenére, hogy a HR alkalmazását számos kritika érte, továbbra is fontos paraméter a hypovolemiás sokk diagnosztikájában, különösen a prognosztikai értéke miatt. A kutatások eredményei azonban rámutatnak arra, hogy a HR értékelése során figyelembe kell venni a lehetséges nem lineáris összefüggéseket és a klinikai helyzet komplexitását.

2.4.2A vérvesztés diagnosztikájának nehézségei traumás sérülésekben

A VS és metabolikus markerek mellett a Hb és hematokrit (Hct) szintek a vérvesztés

leggyakrabban alkalmazott indikátorai. Ezek számos előnyüknek köszönhetően – például a standard laboratóriumi vagy minimálisan invazív point-of-care (POC) tesztekkel való egyszerű mérhetőségük – széles körben használatosak. Diagnosztikai értékük azonban a traumaellátás kezdeti szakaszában továbbra is vitatott [133]. Az induló Hb és Hct szinteket számos, vérzéssel nem összefüggő tényező befolyásolja, mint például az életkor, nem, testsúly és meglévő alapbetegségek, például vérszegénység [134,135]. Emellett a helyszíni Hb-értékek gyakran alacsonyabbak a trauma utáni szinte azonnali folyadékpótlás következtében, amely az intravaszkuláris térfogat helyreállítását célozza. Az előzetes folyadékreszuszcitáció tovább fokozza a hemodilúciót, ami a Hct- és Hb-szintek további csökkenéséhez vezet. Ezért a trauma okozta vérzés értékeléséhez sorozatos méréseket javasolnak [135,136], bár az eredmények továbbra is ellentmondásosak [134,137].

A képkalkoló technikák fontos kiegészítői a kezdeti hemodinamikai értékelésnek a traumaellátás során. A számítógépes tomográfia (CT-vizsgálat) megbízható módszer a belső vérzés kimutatására; azonban a sürgősségi osztályon kívül szükséges elvégezni, ami kedvezőtlen idővesztéssel jár. A CT-vizsgálattal szemben az ultrahang számos előnnyel rendelkezik, például ágy melletti elérhetőség, sugárzásmentesség, reprodukálhatóság és alacsony költségek [138]. A traumás sérültek esetében alkalmazott gyors ultrahangos értékelés (FAST, focused assessment with sonography in trauma) és annak kiterjesztett változata (eFAST) kevesebb mint 5 perc alatt elvégezhető, és magas érzékenységgel és specifitással rendelkezik a hemoperitoneum, hemoperikardium és hemothorax kimutatására [138]. Azonban az eFAST több korláttal is szembesül. Leginkább az ultrahang pontossága függ a felhasználó tapasztalatától és a beteg testösszetételétől. Emellett retroperitoneális vérzés vizualizálása, valamint a vér és a vizelet közötti különbségtétel ultrahanggal alig lehetséges [138]

A klinikumban nehéz monitorozni, de a mesenterialis perfúzió (MP) csökkenése az egyik legkorábbi kompenzációs válasz a vérvesztésre, így ígéretes korai indikátora lehetne a vérzésnek. A vérvesztés miatt fellépő keringési redisztribúció során a nem létfontosságú szervek, például a bél vérellátása jelentősen csökken, amit a superior mesenterialis artéria (SMA) áramlásának gyors hanyatlása is tükröz [139,140]. Az MP mérése számos jelenlegi módszerrel lehetséges, de ezek gyakorlati korlátai miatt csak kis részük alkalmazható a rutin sürgősségi ellátásban [139,141,142]. Az utóbbi évek kutatásai szerint a kilélegzett CH₄

szintje szorosan összefügg az SMA áramlás változásaival, mivel a CH₄ gyorsan kilégzésre kerül a bél mikroperfúziójából a tüdőn keresztül. Ez lehetőséget nyújthat a vérvesztés nem invazív, valós idejű monitorozására. Egy állatmodellben végzett vizsgálat kimutatta, hogy az kilélegzett CH₄ szintje szorosan követi az SMA áramlás és a bél mikroperfúzió változásait, gyakran megelőzve a szisztémás hemodinamikai válaszokat [139]. A CH₄ méréséhez használt fotoakusztikus spektroszkópia (PAS) eszközök valós idejű monitorozást tesznek lehetővé, és könnyen integrálhatók lennének a sürgősségi vagy prehospitális ellátásba, például mentőautókba.

Összességében nem létezik arany standard módszer a súlyos trauma okozta vérzés diagnosztizálására és értékelésére; ezért a döntéshozatal rendszerint több vizsgálat kombinációján alapul, amelyek mindegyike rendelkezik erősségekkel és korlátokkal.

2.4.3 A trauma-indukált koagulopátia és a trombociták szerepe

A traumás sérülések következtében gyakran kialakul trauma-indukált koagulopátia (TIC), amely a súlyosan sérült betegek körülbelül egynegyedét érinti, és az esetek 30–50%-ában halálhoz vezet. Ennek következtében a vérzéscsillapítás komoly kihívást jelent a klinikusok számára [143,144]. Bár a súlyos sérüléseket követő véralvadási változásokat már az 1960-as években dokumentálták, [145], a TIC-re mindmáig nem létezik egységes definíció [146].

A TIC-et diszfunkcionális vérrögképződés és -lebontás, valamint károsodott vaszkuláris homeosztázis jellemzi, amelyek a többszervi elégtelenség és a magasabb mortalitás fokozott kockázatával társulnak [147]. A patogenezisében központi szerepet játszik a koagulációs faktorok kimerülése és a diszregulált fibrinolízis, ugyanakkor egyre több bizonyíték utal arra, hogy a megváltozott trombocita-biológia is jelentős hozzájáruló tényező [148].

Kapcsolódó vizsgálatok kimutatták, hogy a traumás betegek körülbelül 50%-ánál aggregometriás módszerekkel diszfunkcionális trombocita-aggregáció azonosítható, amely a halálozás magasabb kockázatával jár együtt [149]. A csökkent trombocitafunkciókat a sérülés által kiváltott korai trombocita-hiperaktiváció következményének tartják [148]. Mindazonáltal a folyamat pontos mediátorai és útvonalai egyelőre nem teljesen ismertek, ezért további kutatások szükségesek ezek tisztázására.

Az elmúlt évtizedben számos betegség hátterében igazolták a megváltozott mitokondriális funkciók szerepét [150]. A traumával összefüggő állapotokban, például a vérzéses sokkban

és a traumás agysérülésben, a különböző sejtípusok mitokondriális diszfunkciója szintén gyakran megfigyelhető. Mivel a trombociták központi szerepet játszanak a TIC patomechanizmusában, a trombociták mitokondriális folyamatai kiemelt jelentőségűek lehetnek [151,152]. Ezek jobb megértése új terápiás célpontokat tárhat fel a súlyos traumás betegek kezelésében.

3 CÉLKITŰZÉSEK

Mikrokeringési kutatások célkitűzései

Általános célkitűzésünk volt a mikrokeringési kutatásaink során a meglévő módszertani alapok és vizsgálati technikák fejlesztése. A mikrokeringés kutatásához alkalmazott technikák (IVM, LDF, O2C) klinikai és kísérletes alkalmazási lehetőségeinek feltérképezése. Ezen felül új, *in vivo* kísérleti modellek kialakítása a mikrokeringési folyamatok részletes vizsgálatára, különös tekintettel a gyógyszerpenetráció és -felszívódás pontos mérésére működő mikrocirkulációval rendelkező szövetekben. Ezen általános célkitűzéseink mellett az egyes vizsgálatok során specifikus célkitűzéseink is voltak:

1. Gyulladásos modellek mikrokeringési változásainak vizsgálata

- Az akut monoarthritisben jelentkező szinoviális mikrokeringési változások elemzése, különös tekintettel a leukocita-endotél kölcsönhatásokra és a gyulladás csökkentésére irányuló terápiás stratégiákra.
- Elektroporációval (EP) támogatott helyi gyógyszeradagolás hatékonyságának vizsgálata az ízületi gyulladás csökkentésére és összehasonlítsa a diclofenac hidrogél szinoviális folyadékba való behatolási tulajdonságait különböző alkalmazási módok után.

2. Bőrirritáció és sebgyógyulás mikrokeringési mechanizmusainak feltárása

- A bőrirritáció és sebgyógyulás mikrokeringési változásainak elemzése, különösen az irritatív dermatitisz modellezésében és a transzdermális gyógyszerpenetráció vizsgálatában.
- A bőr sebgyógyulási folyamataiban szerepet játszó Ca^{2+} -csatornák (Ryanodin receptorok) terápiás célpontként történő kiértékelése.
- A periimplantáris mikrokeringés posztoperatív változásainak vizsgálata új típusú implantátumok és műtéti technikák hatására.

3. A perioszteum és endoszteum keringésnek vizsgálata kiterjedt oszteosztézist követően

- Az endoszteális és perioszteális mikrokeringés változásainak elemzése kiterjedt csontszintézis után, különös tekintettel a helyi perfúzió elégtelenségére és az állízület kialakulásának mechanizmusaira.

4. Távoli IPC és gyulladáscsökkentő szerek hatásának elemzése

- A távoli IPC hatásainak feltárása az IR májsérülések által kiváltott mikrokeringési

zavarokra.

- A GPC hatásának vizsgálata a posztisztkémiás gyulladási válaszokra, különösen a NADPH-oxidáz izoformák expressziójára és a máj mikrokeringési paramétereire.

Mitokondriális kutatások célkitűzései

Általános célkitűzésünk volt a mitokondriális diszfunkciók molekuláris mechanizmusainak és patofiziológiai következményeinek részletes feltárása IR-modellekben különböző szervek (máj, szív) esetében. A mitokondriumok célzott terápiás beavatkozásokkal történő védelmének lehetőségeinek vizsgálata, különös tekintettel a GPC és a CH₄ bioaktív hatásaira. Specifikus célkitűzéseink a vizsgálatok során a következők voltak:

5. Máj meleg és hideg IR során a mitokondrium célzott védelmének lehetőségei bioaktív molekulákkal

- A máj meleg IR sérülések során fellépő mitokondriális diszfunkció mechanizmusainak feltárása, különös tekintettel a légzési lánc komplexeinek működésére és az OxPhos zavarára.
- A GPC hatásának vizsgálata a mitokondriális respirációra és az IR által kiváltott oxidatív stresszre májmodellben.
- A CH₄ belélegzésének hatásának elemzése a máj IR sérülések során fellépő mitokondriális diszfunkcióra és oxidatív stresszre, különösen a respirációs kapacitás és a ROS-termelés vonatkozásában.
- A CH₄-al dúsított szervtartósító oldatok alkalmazásának vizsgálata hideg iszkémiás májtranszplantációs modellekben, különös tekintettel a mitokondriális OxPhos-ra, a Ca²⁺-homeosztázisra és a szervfunkciók megőrzésére.

6. Szív IR mitokondriális következményeinek enyhítése exogén CH₄ adásával

- A CH₄ alkalmazásának vizsgálata a szív IR sérülések által kiváltott mitokondriális diszfunkció mérséklésére, különös tekintettel az ETC komplexeinek aktivitására, az oxidatív stresszre és az apoptózisra.
- A CH₄-dúsított tárolóoldatok hatásának elemzése a hideg iszkémiás szívtranszplantáció során, különös tekintettel a mitokondriális funkciók megőrzésére, az apoptózis csökkentésére és a szív graft funkciójának javítására.

Trauma és alkoholfogyasztás okozta stressz biomarkereinek monitorozása

Általános célkitűzésként biomarkerek, például a kilélegzett CH₄ klinikai alkalmazhatóságát vizsgálatuk a traumás sokk és a vérvesztés korai azonosítására. Ezen kívül a trauma okozta mitokondriális diszfunkció és koagulációs zavarok mechanizmusait, amelyek hozzájárulhatnak új diagnosztikai és terápiás stratégiák kidolgozásához.

7. A kilélegzett CH₄ mint biomarker szerepének vizsgálata traumában és alkohol okozta stresszben

- Az alkoholfogyasztás által indukált CH₄-termelés mechanizmusainak feltárása, különös tekintettel a mitokondriális diszfunkció és az oxidoreduktív stressz közötti összefüggésekre.
- A kilélegzett CH₄ szintjének klinikai felhasználhatóságának vizsgálata mint potenciális biomarker az oxidatív stressz és a mitokondriális diszfunkció detektálására

8. Traumás sokk és vérzés prediktív paramétereinek elemzése

- A jelenlegi és korábbi ATLS-sokkosztályozási rendszerek összehasonlítása a 30 napos mortalitás prediktív értéke szempontjából, különös tekintettel a VS-ek (GCS, BD, SBP) szerepére.
- A HR mortalitást előrejelző képességének vizsgálata traumás vérzéses sokkban, és a HR-változások értelmezési keretének újragondolása az ATLS protokollban.

9. A kilélegzett CH₄ kimutatása traumával összefüggő vérzésben

- A kilélegzett CH₄ koncentrációjának vizsgálata traumás vérzéses sokk korai azonosítására, különös tekintettel a vérvesztéssel és VS-vel való kapcsolatára.
- A CH₄ -mérések valós idejű alkalmazhatóságának és klinikai relevanciájának elemzése súlyosan sérült betegek esetében.

10. Mitokondriális diszfunkció és TIC összefüggéseinek feltárása

- A mitokondriális diszfunkció és a trombociták aktivációjának zavara közötti kapcsolat vizsgálata TIC-ben, különös tekintettel az OxPhos-ra és a reaktív oxigéntermelésre.
- A trombociták mitokondriális funkciójának és TIC során fellépő maladaptív válaszainak részletes elemzése új terápiás célpontok azonosítása érdekében.

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A humán és állatkísérletes etikai engedélyszámok:

A humán vizsgálatokat a Szegedi Tudományegyetem Klinikai Központ Etikai Bizottsága és a Regionális Humán Kutatási Etikai Bizottság jóváhagyta, engedélyszámok: 3175.2013; 0623.2014; 49/B-165/2014; 182/2019-SZTE, 10/2021-SZTE REKB.

Az állatkísérletes vizsgálatokat Magyarország illetékes nemzeti hatósága, az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (ÁTET) döntését követően, a Csongrád-Csanád Vármegyei Kormányhivatal, Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Főosztály, Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Osztály határozatai alapján, a következő engedélyszámokkal végeztük el: 15.1/00755/002/csongr/2007; V./145/2013; V./148/2013; V./1416/2021.

4.1 Mikrokeringés változása gyulladásos modellekben

A mikrokeringés vizualizálására IVM-et, LDF-et és az LDF és fehér fény spektroszkópia kombinációját, egy speciális spektrofotometriás eszközt, O2C-t használtunk. A mikrokeringési diszfunkciónak szövet-specifikus következményei lehetnek, ezért tartottuk fontosnak az endoszteum a perioszteum és a synovium, a bőr és a máj mikrokeringési reakcióinak jellemzését különböző gyulladásos modellekben.

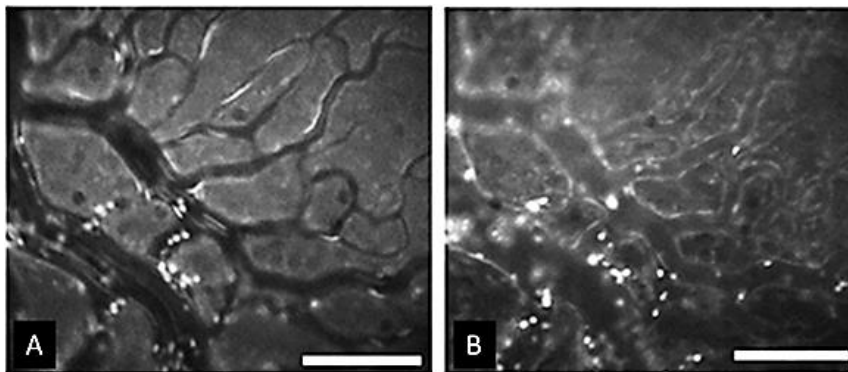
4.1.1 Mikrokeringési vizsgálómódszerek

4.1.1.1 IVM

A vizsgálatokat Zeiss AxioTech Vario 100 HD IVM-el végeztük (100 W HBO higanygőz lámpa, Acroplan 20 víz immerziós objektív). FITC (Sigma, St. Louis, MO, USA) jelölt vörösvértestek szolgálták fluoreszcens perfúziós markerként (0,2 ml i.v.), vagy egerekben 2%-os FITC-jelölt dextransz injekció (150 kD) [153] A leukociták festésére, pedig rodamin 6G-t (Sigma, St. Louis, MO, USA) (0,2%, 0,1 ml i.v.) használtunk (ld. 2. ábra). A mikroszkópos képeket CCD videokamera (AVT HORN-BC 12) segítségével S-VHS videó rekorderrel (Panasonic AG-MD 830) rögzítettük, amit egy személyi számítógéphez csatlakoztattunk az adatok analízise céljából. A mikrokeringési paraméterek mérése a kísérleteket követően számítógépes szoftverrel történt. A funkcionális kapilláris denzitást (FCD; a perfundált kapillárisok hossza, és a megfigyelt terület aránya; cm^{-1}) és a

vörösvértetek áramlási sebességét (RBCV; μm^{-1}) 5 különböző látótérben és 5 kapillárisban mértük. A kísérlet minden mérési időpontjában 25 mérés átlagát számoltuk. A perfúziós arányt (PR) a perfundált, működő erek hosszának meghatározása után a látómezőben mért teljes érhosszra vonatkoztattuk. Legalább 3 különböző mezőben meghatározva százalékban adtuk meg. Az érátmérőt (VD, μm) az adott látómezőkben vagy látómezőben lévő összes ér mérése, kivéve a $< 6 \mu\text{m}$.

A leukocita-endotélsejt interakciókat állatonként 5 (10–20 μm átmérőjű) posztkapilláris venulában vizsgáltuk. Kitapadó leukocitáknak azokat a sejteket definiáltuk, melyek nem mozdultak, vagy legalább 30 másodpercig rögzültek az endotélsejt felszínéhez a megfigyelési periódus alatt. Gördülő leukocitáknak tekintettük azokat a sejteket, melyek sebessége nem érte el a mikroerek középvezetékében mért vörösvértetek áramlási sebesség 40%-t. Számukat az átáramló leukociták százalékos arányában határoztuk meg a megfigyelési periódus 30 másodperce alatt.



2. ábra. Reprezentatív mikroszkópos felvételek a tibia disztális perioszteumának posztkapilláris venuláiról. (A) panel: FITC-jelölt vörösvértetek, (B) panel: ugyanez a mező rodamin 6G-jelölt leukocitákkal. A skála 100 μm -t jelent.

4.1.1.2 LDF

A szövetekben a véráramlást LDF-el rögzítettük (780 nm-es sugárzással ellátott lézerdíóda; PeriFlux System 5000, Perimed, Jarfalla, Svédország) sterilizált száloptikai szondával (a bőrön #457, "termosztikus szonda"; testen belül #416, "dental probe" használatával) szárelválasztás: 0,25 mm, behatolási mélység ~ 1 mm melyet a felületre merőlegesen alkalmaztunk. A mérések előtt a szondát a gyártó által szállított speciális motilitási standarddal kalibráltuk. A felületen a szív ciklusokkal szinkronizált áramlásgörbét detektáltuk $\tau = 0,2$ s és jellegzetes görbét $\tau = 0,03$ s üzemmódban, az azt mutatta, hogy a próba okozta nyomásból eredő artefaktumok kizárhatóak voltak. A kívánt jelminőség elérése után az

alapvonalbeli áramlási értékek rögzítettük a perioszteum vagy endoszteum vizsgálatánál 30 mp-ig, a bőrön 10 percig és háromszor ismételtük. A vizsgált szövet tartalék kompenzációs képességének értékelésére helyi hiperémia tesztet (LHT) végeztünk. Ebben az esetben a helyi hőmérséklet emelkedését, mint erőteljes vazodilatátor ingert a mikrovaszkuláris érrendszer jellemzésére használjuk, mint például diabétesz mellitusban és szisztémás keringési zavarban szenvedő betegeknél. A bőrt felmelegítettük 44 °C-ra 5 percig. A szöveti perfúziót perfúziós egységben (PU) fejeztük ki, vagy a változását (például LHT hatására) a véráramlás növekedésének százalékában (%) fejeztük ki.

4.1.1.3 O2C készülék

A máj szöveti véráramlásának és oxigén telítettségének egyidejű mérésére a noninvazív, módosított spektrofotometriás O2C rendszert (LEA Medizintechnik, Gießen, Németország) használtuk. Az O2C készülék egyetlen lapos szondában egyesíti a féhérfény-spektroszkópiát az LDF-el, így lehetővé teszi a szöveti oxigéntelítettség (SO₂ százalék, abszolút érték), a szöveti Hb (rHb, AU), a kapilláris véráramlás (AU) és a kapilláris véráramlási sebesség (RBCV, AU) egyidejű rögzítését. A regionális heterogenitás és az időbeli véráramlás-változások elkerülése érdekében a méréseket a máj felszínének három előre meghatározott pontján végeztük el, egyenként 30 másodpercig, a mérés előtt környezeti fénykorrekcióval.

4.1.2 Szinovialis mikrokeringés vizsgálata akut artritiszben

A kísérleteket hím Sprague Dawley patkányokon (átlagtömeg 300 ± 50 g) végeztük. A szinoviális mikrocirkuláció akut ízületi gyulladással összefüggő változásait IVM-el vizsgáltuk. Az állatokat intraperitoneális nátrium-pentobarbitállal (45 mg kg⁻¹) altattuk, és a diklofenák beadási módja szerint négy csoportra osztottuk. Az állatok az 1. csoportban *per os* diklofenákot (75 mg kg⁻¹ diklofenák-nátrium, Novartis Hungaria Kft., Budapest, Magyarország) kaptak (n = 6), a 2. csoportban helyileg alkalmazott diklofenák-gélt (50 mg mL⁻¹ 230 µL térfogatban; n = 6), a 3. csoportban pedig elektroporációval (EP)-vel kombinált helyileg alkalmazott diklofenák-gélt (50 mg mL⁻¹ 230 µL térfogatban; n = 6). A 4. csoport *per os* sóoldattal itatott kontrollként szolgált (n = 6). A kezeléseket mindig 2 órával az artritisz indukciója előtt (t = -2 ó) és 2 órával utána (t = 2 ó) alkalmaztuk.

Artritisz indukciójához az állatokat intraperitoneális (IP) ketaminnal (50 mg kg⁻¹) és xilazin

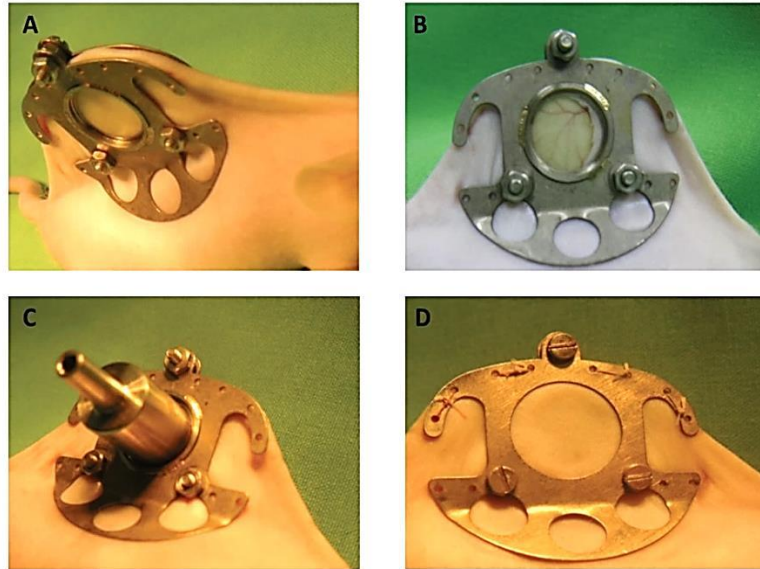
(12 mg kg⁻¹) keverékével altattuk, és a térd feletti bőr betadinos lemosását követően a jobb térdízületbe egyszeri injekciót adtunk be 2%-os λ -karragén (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) és 4%-os kaolin sóoldatban lévő 75 μ l keverékéből. A kontralaterális térdbe fiziológiás sóoldatot adtunk.

A helyileg alkalmazott diklofenák-gél bevitelének fokozására nem invazív EP kezelést alkalmaztunk, amihez Mezoforte Duo Mez 120905-D készülékkel (Dr Derm Equipment Kft., Budapest, Magyarország) végeztük. Polipropilénnel borított kezelő fejet használtunk 25 mm átmérőjű lemezelektrodával (moduláció 900 V-os impulzusokkal, 5 ms feszültségimpulzust 20 ms szünet követett). 230 μ l diklofenák-hidrogélt használtunk, az EP kezelési idő 8 perc volt.

4.1.3 A bőr mikrokeringése bőriritációban és sebgyógyulásban

4.1.3.1 A háti bőrredő kamra beültetése, penetrációs modell kialakítása

A kísérleteket 15 hetes hím SKH-1 szőrtelen egereken végeztük (testtömeg: 36-42 g). Az állatokat IP ketamin (90 mg/ttkg) és xilazin (25 mg/ttkg) keverékével altattuk a steril körülmények között végzett műtéthez. Elsőként két tartó öltést helyeztünk a hát középvonalában, hogy bőrredő alakuljon ki. Ezután a bőr kettős rétegének „szendvicsbe” illesztésére két szimmetrikus titánkeretet (IROLA GmbH, Schonach, Németország) alkalmaztunk (3A. ábra). A bőrredőt a fémkeretekhez varratokkal, a másik kerethez pedig három csavarral rögzítettük. A seb létrehozása a terület tintabélyegzővel szabványosított kör alakú megjelölése után történt. Mikrosebészeti technikával a bőr egyik oldalán a bőrredő teljes bőrének a musculus panniculus carnosusig történő eltávolításával kör alakú teljes bőrvastagságú, körülbelül 66-70 mm² -es sebet hoztunk létre (3B. ábra). Az ellenkező oldalon a nem sebzett bőr minden réteggel rendelkezett: epidermiszből, dermiszből és harántcsíkolt bőrízomzatból állt. A seb oldalát egy eltávolítható vékony üveglemezzel fedtük be, amelyet az egyik titánkeretbe építettek be. Ez a rendszer lehetővé tette, hogy gyógyszerpenetrációs kísérletekhez az üveglap eltávolítása után egy 1 ml térfogatú rozsdamentes acélhengert rögzítettünk a titániumkeret ablakába (3C. ábra). Az ellenkező, nem sebzett oldal (3D. ábra) szolgált a vizsgálati készítmény felvitelére.



3. ábra. A bőrredőkamra alkalmazásának lépései. (A) titánkeretek a bőrredő mindkét oldalán; (B) kör alakú, teljes bőrvastagságú seb; (C) az akceptor puffert tartalmazó fémhenger (sebzett oldal); (D) nem sebzett oldal.

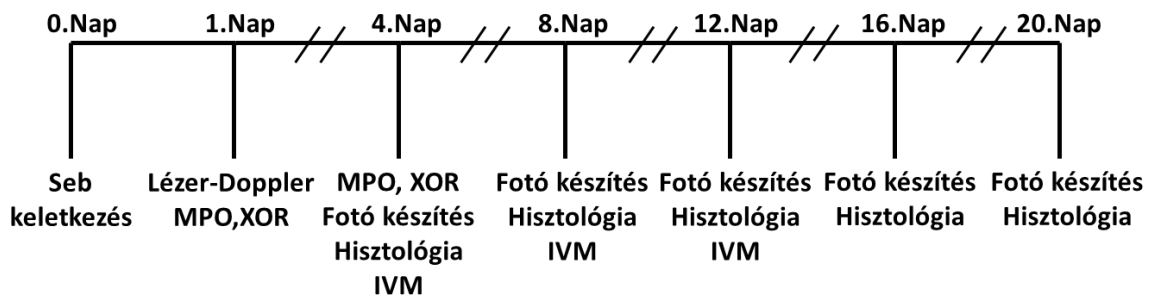
A mikrocirkulációt IVM-el vizualizáltuk. A vizsgálatok során az objektívet mind a seb felőli, mind pedig a bőrredő ép oldalán is lehet használni. Az RBCV-t ($\mu\text{m/s}$) és PR-t határoztunk meg.

4.1.3.2 A bőr mikrokeringése bőrirritációban

A bőrirritáció vizsgálatához nátrium-lauril-szulfát (SLS) kiváltott gyulladást, mint ismert modellt választottuk, és a mikrokeringési következményeket a bőrt két potenciális védő hatású anyag (glicerin és xilit) különböző koncentrációival kezelve hasonlítottuk össze. Az egereket véletlenszerűen 6 kísérleti csoportra osztottuk. Az 1. csoport ($n = 20$) szolgált kontrollként, a háti régiót tisztított vízzel kezelték. A 2. csoport 5%-os SLS-oldattal (SLS: >99%-os tisztaságú, Huntsman Corp. Salt Lake City, UT, USA) lett kezelve. A 3. csoportban a bőrre felvitt oldat 5% SLS-t (5%) és 5% glicerint (Cognis, Düsseldorf, Németország) tartalmazott. A 4. csoport állatai SLS-t (5%) és 8,26%-os xilitet (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazó oldatot kaptak. Az 5. csoportban SLS (5%) és 10%-os glicerin, míg a 6. csoportban SLS (5%) és 16,52%-os xilit került a bőrre. Az SLS-t és a polioloikat tisztított vízben oldottuk. A háti bőrredő kamrát ültettük be (csoportonként $n = 8$) a mikrokeringés tanulmányozására. A mikrokeringést IVM-el vizsgáltuk, RBCV-t ($\mu\text{m/s}$) és a leukocita-endotélsejt reakciókat határoztuk meg.

4.1.3.3 A bőr mikrokeringése sebgyógyulásban

A sebgyógyulás vizsgálatához a bőrredő kamra egyik oldalán körkörös sebet alakítottunk ki, amelyet a kezeléseig a titánkerethez rögzített üveglappal fedtünk le. A kamra másik oldalán ép bőr maradt. A kezelésekhöz az üvegfedél eltávolítását követően steril sóoldatot (pH = 7,4), a rianodinreceptor-agonista 4-klór-m-krezolt (4-CMC; 0,5 mM, pH = 6,5) vagy a rianodinreceptor-antagonista dantrolén (DA; 100 µM, pH = 7,1) oldatát juttattuk mikropipettával (100 µl) a sebekbe. Ezután az üvegfedelelet visszahelyeztük. Minden csoportban naponta egy kezelést alkalmaztunk. Négy naponként fényképeket készítettünk (a 4., 8., 12., 16. és 20. napon), majd az állatokat ketamin túladagolásával elaltattuk, és szövettani elemzéshez szövetmintákat vettünk. A mikrokeringési vizsgálatokat IVM-mel végeztük, a sebszélek kapillárisaiban RBCV-t (µm/s) és érátmérőt (VD, µm) mértük. Emellett a sebszélre merőlegesen elhelyezett LDF segítségével a sebkialakítást követően 24 órával véráramlásmérést (PU) végeztünk. Először rögzítettük a kiindulási áramlási értékeket, majd elvégeztük a sebkezelést. A kezelést követően 10 perccel megismételtük a méréseket. A jelet minden esetben 20 másodpercig rögzítettük (4. ábra).



4. ábra. A kísérleti elrendezés, a kezeléseik és vizsgálati napok. MPO: mieloperoxidáz, XOR: xantin-oxidoreduktáz, IVM: intravitális video-mikroszkópia, LDF: lézer-Doppler áramlásmérés.

A sebgyógyulás nyomon követésére fényképeket készítettünk (DiMage A200, Konica Minolta) standard körülmények között: sötét szobában, azonos fényforrások mellett, rögzített fényképezőgéppel. A képek felbontása 3264×2448 volt. A sebtérületet a munkacsoportunk által fejlesztett szoftverrel elemeztük. A seb záródási sebességét két független vizsgáló mérte, és az értékeket a 0. napi területhez viszonyítottuk.

A xantin-oxidoreduktáz (XOR) és MPO aktivitását az 1. és 4. napon a gyulladási fázisban mértük. A bőrbioptziákat feldolgozásig jégen tartottuk, majd foszfát pufferben (pH 7,4; 50

mM Tris-HCl-t, (Reanal, Budapest, Magyarország) 0,1 mM EDTA-t, 0,5 mM ditioneitol, 1 mM fenilmetil-metilszulfonil fluorid, 10 µg/mL szója tripszin inhibitor, 10 µg/mL leupeptin) homogenizáltuk. A homogenátumot 4 °C-on 20 percig 24000 g-nél centrifugáltuk. Az XOR aktivitását az ultraszűrt felülúszóban fluorometriás kinetikai vizsgálattal határoztuk meg, amely a pterin izoxanthopterinné történő átalakulásán alapul az elektronakceptor metilénkék jelenlétében (teljes XOR) vagy hiányában (XO-aktivitás) [154]. A pellet reszuszpendálásával a minták MPO-aktivitását 450 nm-en mértük (UV-1601 spektrofotométer, Shimadzu, Japán), és az adatokat a fehérjetartalomra vonatkoztattuk [155].

4.1.3.4 Bőr implantátum közeli mikrokeringése

Humán bőr regenerációjának prospektív vizsgálatát végeztük oszteointegrált implantátumok beültetését követő 2 és 4 hónap között. Két különböző technika eredményét hasonlítottuk össze a bőr LDF vizsgálatával.

A betegeket három csoportra osztottuk: egy kontroll csoportba ahol nem történt implantáció (n = 7), és a két különböző technikával beültetett oszteointegrált implantátumot kapott csoportban: lágyrészsredukáló (STR, n = 7), ahol U alakú bőrlebenyt alkalmaztak vagy hagyományos lágyrészkímélő (STP, n = 10) technikára ahol lineáris metszést alkalmaztak (5. ábra).

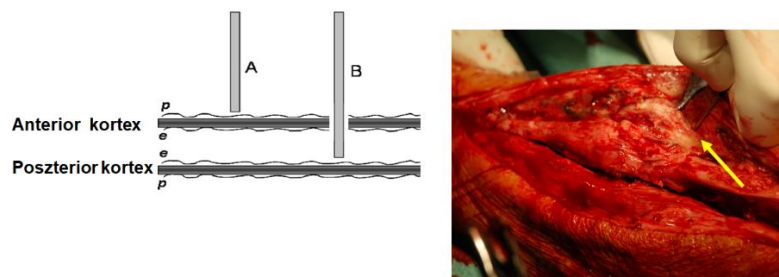


5. ábra. Két beteg posztoperatív fotói, amelyek a különböző műtéti módszereket ábrázolják. (A) bal oldalon egy 59 éves férfi beteg (STR 1) látható, akin klasszikus STR-műtétet végeztek U-alakú bőrlebennyel. (B) A jobb oldalon egy 44 éves nő (STP 1) látható, aki STP műtétet kapott. STR: lágyrészsredukáló technika, STP: lágyrészkímélő technika.

Minden betegnél elvégeztük a vizsgálatot a fej retroaurikuláris részén a beültetett és a nem beültetett oldalon is, amely kontrollként szolgált. A vizsgálatban résztvevőket az értékelés előtt 10 percig akklimatizáltuk kényelmes ülő helyzetben, pulzus és vérnyomás mérés történt. A megfigyelés teljes időtartama alatt a szobahőmérséklet (20 ± 2 °C) és a hónalj hőmérséklet a ($36 \pm 0,5$ °C) állandó volt.

4.1.4 A perioszteum és endoszteum keringése kiterjedt oszteosztézist követően

Mikrokeringési vizsgálatainkat LDF-el végeztük álízület miatti reoperáció során a fémanyagok eltávolítását követően. A vizsgálatot megelőzően 2 évvel a betegnek sípcsonttörése volt egy cementes totál térdprotézis szárának a végpontja magasságában. A gyógyulást sem DC-lemezes oszteosztézissel, sem a tibia mediális és laterális oldalán utólag felhelyezett szögstabil lemezekkel nem tudtuk elérni, álízület alakult ki. A tibia perioszteumát a reoperált végtagon a hagyományos elülső műtéti feltáráson keresztül, a kontralaterális végtagon pedig egy kis (~ 2 cm-es) bőrmetszésen keresztül tártuk fel. Az áramlásmérő szondát egy műanyag tartóval merőlegesen tartottuk a csonthártya felszínére, ami csökkentette a megfigyelt területre gyakorolt nyomást és korlátozta a szonda szögletes mozgását. Ezután az endoprotézist eltávolítottuk, és a csontüregben megközelítettük az endoszteális membrán kompartmentet. Egy kis lyukat fúrtunk az elülső kortikálison, ami hozzáférést biztosított az endoszteumhoz a szemközti (a hátsó) medulláris fal belső felszínén (6. ábra).



6. ábra. Bal oldalon a perioszteum (A) és az endoszteum (B) perifúziójának megfigyelésére szolgáló lézer-Doppler áramlásmérő próbájának elhelyezkedése. A perioszteum (p) megfigyelése a bőrön és az alatta lévő szöveteken végzett kis bemetszésen keresztül történt, míg az endoszteális régiót (e) az elülső kéregben fúrt kis lyukon keresztül értük el, ami hozzáférést biztosított az endoszteális régióhoz a szemközti (a hátsó medulláris fal belső felszínén). Jobb oldalon az intraoperatív mérés fényképe. Sárga nyíl jelzi az álízület alatt felhelyezett próbát.

A fúrt lyuk mérete lehetővé tette, hogy az áramlásmérő szonda számára tökéletesen illeszkedjen. Mivel a kontralaterális (nem műtött) oldalon endoprotézis volt, az endoprotézis szárától distalisan, valamivel az újra műtött oldalon végzett mérés szintje alatt lehetett megmérni az endoszteális keringést; a különbség ~ 1 cm volt.

A megfigyelési időszak alatt a beteg szobahőmérsékleten (20 ± 2 °C) volt és a maghőmérsékletét fenntartottuk; a stabil makrohemodinamikai paramétereket folyamatosan rögzítettük.

4.1.5 A távoli iszkémiás prekondicionálás és a L- α -glicerilfoszforilkolin hatása a máj iszkémia-reperfúziós mikrokeringésére

Kísérleteinket hím Sprague-Dawley patkányokon (Charles River, Sulzfeld, Németország; átlagtömeg 300 ± 20 g) végeztük. Az altatást 25 mg ml⁻¹ (S)-ketaminnal (Ketanest; Parke Davis, Berlin, Németország) és 20 mg ml⁻¹ xilazin (Rompun; Bayer, Leverkusen, Németország) kombinációjával végeztük 8:1 arányban, i.p. injekcióban, és ezt az állapotot 30 percenként kisebb mennyiségben kiegészítő i.v. adagokkal tartottuk fenn. A közleményekben említett részleges máj IR modellben a részleges kifejezés arra vonatkozik, hogy keringési okokból nem a teljes májszövetet érintette a keringésből való kirekesztés, hanem annak csak két lebenyét. A sebészi beavatkozás során középvonalsbeli laparotómia és kétoldali subcostalis metszést követően a középső és a bal májlebeny teljes iszkémiáját a májartéria bal oldali ágainak és a v. portae-nak a 60 percig tartó mikrosebészeti klippel történő elszorításával értük el.

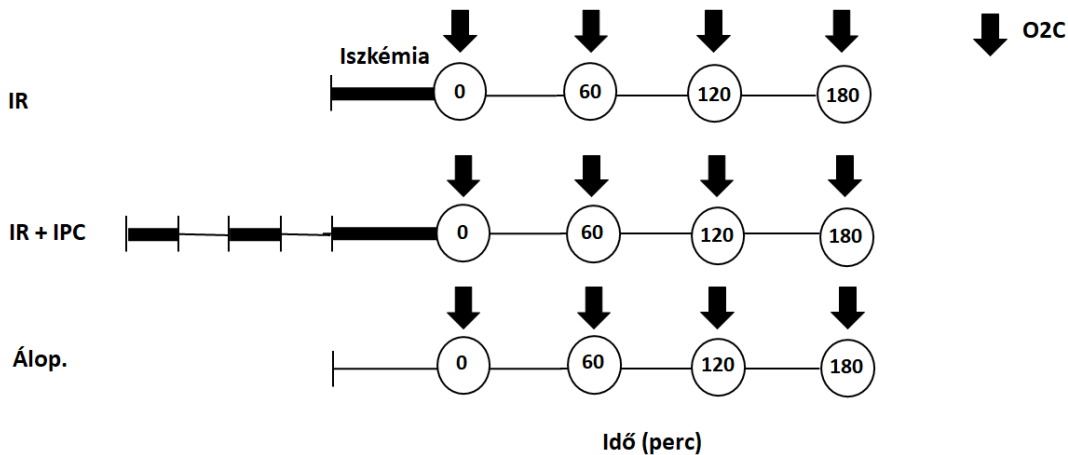
4.1.5.1 Távoli végtag IPC hatása a máj mikrokeringésre

Kísérleteinket két nagy sorozatban végeztük. Az első sorozatban a részleges hepatikus iszkémia mikrokeringési következményeit a noninvazív, módosított spektrometrikus O2C módszerrel (O2C rendszer; LEA Medizintechnik, Gieben, Németország) határoztuk meg. A regionális heterogenitás és az időbeli véráramlás-változások elkerülése érdekében a méréseket a máj felszínének három előre meghatározott pontján végeztük el, egyenként 30 másodpercig, a mérés előtt környezeti fénykorrekcióval.

Az 1. csoportban a máj mikrocirkulációs válaszait vizsgáltuk 60 perces teljes iszkémia, majd 180 perces reperfúziós periódus után (IR csoport, n = 6). A mikrokeringési alapváltozók rögzítése után iszkémiát idéztünk elő a középső és a bal májlebenyben. Ezután az elzárásokat feloldottuk (t = 0 perc), majd a reperfúziós fázis 60., 120. és 180. percében O2C segítségével megfigyeltük a mikrokeringést az érintett lebenyekben. Egy másik csoportban 2 ciklus 10 perces teljes hátsó végtagi iszkémiát és 10 perces reperfúziót alkalmaztak prekondicionáló triggerként a máj iszkémia indukciója előtt (távoli IPC + IR csoport, n = 6). A végtagi iszkémia a proximális combcsont köré helyezett érszorítóval és a combartéria egyidejű elzárásával egy miniklip segítségével valósult meg. A 3. csoportban lévő állatokon ugyanezeket a sebészeti eljárásokat végeztük el, kivéve a máj- vagy végtag iszkémia indukcióját (Álműtött csoport, n = 6). A biokémiai vizsgálatainkhoz a kísérletek során a 0.,

60., 120. és 180. percben vérmintát vettünk. A kísérletek végén szöveti biopsziákat vettünk enzimaktivitás és Western-blot elemzésekhez. A szöveti biopsziákat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, a plazmamintákat pedig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a későbbi vizsgálatok előtt (7. ábra).

A második kísérletsorozatban a csoportok ($n = 6$) és a protokoll megegyezett az első kísérletsorozatával, azzal a különbséggel, hogy az érintett májlebenyek mikrokeringési gyulladásos reakcióit IVM-el vizsgáltuk $t = 60$. percben a reperfúziós fázisban. A gördülő és kitapadó PMN leukociták számát 5 központi acináris vénában (20 és $40\text{ }\mu\text{m}$ közötti átmérővel) határoztuk meg állatonként [156].

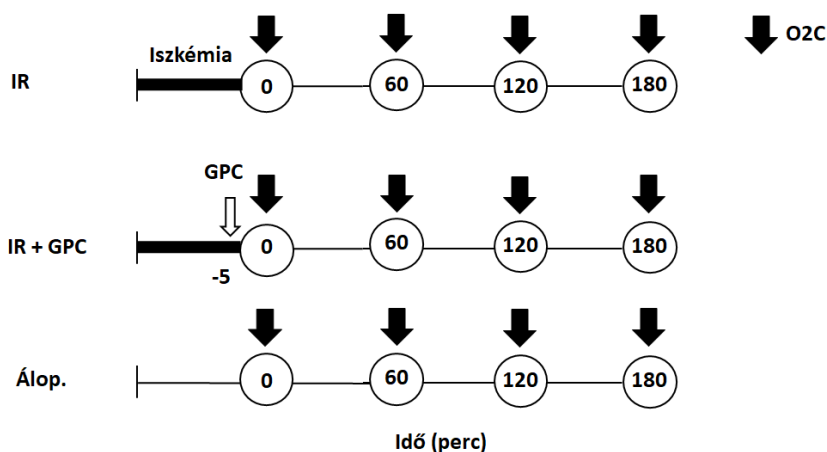


7. ábra. Kísérleti protokoll a távoli végtag IPC máj mikrokeringésre gyakorolt hatásának vizsgálatára. 60 perces részleges meleg iszkémiát idéztünk elő a májban, majd ezt követően 180 perces reperfúzió (IR) következett. Az IR + IPC csoportban a 60 perces iszkémia előtt 2 ciklus 10 perces teljes hátsó végtagi iszkémiát és 10 perces reperfúziót alkalmaztak prekondicionáló triggerként. Az áloperált állatokon ugyanazokat a műtéti eljárásokat végezték el, de az azt követő IR nélkül. Biokémiai mérésekhez májmintákat vettünk a reperfúzió 0., 60., 120. és 180. percben. O2C: mikrokeringés vizsgálat O2C-vel.

4.1.5.2 Kísérleti protokoll a GPC hatásának vizsgálatára a máj mikrokeringésére IR-ban

A kísérletekhez az állatokat véletlenszerűen a következő csoportok egyikébe soroltuk. Az első csoportban a máj mikrokeringési válaszait vizsgáltuk a középső és a bal májlebeny 60 perces teljes iszkémiájára, amelyet 180 perces reperfúziós periódus követett (IR-csoport, $n = 6$). A mikrocirkulációs alapváltozók rögzítése után iszkémiát idéztünk elő a középső és a bal májlebenyben a májartéria bal oldali ágainak és a kapuvénának elszorításával. Az elzárásokat ezt követően feloldottuk ($t = 0$ perc), és a reperfúziós fázisban 60, 120 és 180 perc múlva az O2C segítségével megfigyeltük a mikrokeringést az érintett lebenyekben. A második csoportban 50 mg/kg GPC-t (MW: 257,2) adtunk be a jobb nyaki vénába, 5 perccel az

iszkémiás periódus vége előtt (IR + GPC csoport, n = 6). Ezek az adagolási körülmények korábbi vizsgálatok adatain alapultak; ez a dózis megegyezett a PC hatékony, gyulladáscsökkentő dózisával (MW: 785; 0,064 mM, 50 mg/testtömeg kg, i.v.) rágcsálókban [157,158]. A harmadik csoportban lévő állatokon ugyanazokat a sebészeti eljárásokat végezték el, kivéve a máj iszkémia indukcióját (Álop. csoport, n = 6). A májenzimek meghatározására szolgáló vérmintákat 0 és 60, 120 és 180 percben vettünk, és a vizsgálatokig -20 °C-on tároltuk. A NOX2 és NOX4 fehérjeexpresszió mérésére szolgáló szöveti biopsziákat a kísérletek végén vettünk, és a vizsgálatokig -80 °C-on tároltuk (8. ábra).



8. ábra. Kísérleti protokoll. 60 perces részleges hepaticus meleg iszkémiát idéztünk elő, majd ezt követően 180 perces reperfüzió (IR) következett. Az IR+GPC csoportban 50 mg/kg GPC-t adtunk be a jobb nyaki vénába, 5 perccel az iszkémiás periódus vége előtt. Az áloperált állatokon ugyanazokat a műtéti eljárásokat végezték el, de az azt követő IR nélkül. Az O₂C vizsgálatokat a reperfüzió 0., 60., 120. és 180. percében vettük. O₂C: „Oxygen-to-see”, módosított spektroszkópia.

A májmintákat Potter homogenizátorral homogenizáltuk, majd proteáz inhibitor koktéllal kiegészített RIPA pufferrel (Santa Cruz Biotech) lizáltuk. A fehérje extraktumokat (20 µg összfehérje) 4-15%-os gradiens nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gélekben elektroforizáltuk, és nitrocellulóz membránokra (Millipore) vittük át. A membránokat szobahőmérsékleten 1 órán keresztül Tris-pufferelt sóoldattal (TBS) és 5%-os sovány tejjel blokkoltuk, mielőtt egy éjszakán át 4 °C-on gp91phox (1:2000 hígítás; Epitomics, Burlingame, CA, USA) és NOX4 (1:2000 hígítás; Epitomics, Burlingame, CA, USA) elleni elsődleges antitestekkel inkubáltuk. A Tween-20-szal kiegészített TBS-sel (TBS-T) történő mosást követően a membránokat 1 órán keresztül szobahőmérsékleten tormaperoxidáz-konjugátummal megfelelő másodlagos antitestekkel (antinyúl, 1:2500 hígítás; Promega, Madison, WI, USA) inkubáltuk. A membránokat ezután a SuperSignalWest Pico torna-

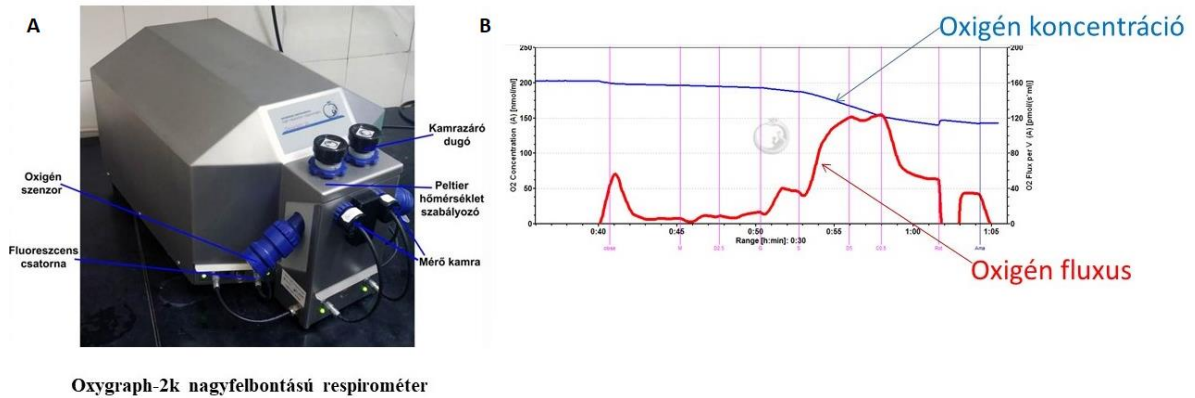
peroxidáz szubsztrát kittel (Pierce, Rockford, IL, USA) hívtuk elő, Lumi-Imager™ (Roche-Diagnostics, Boehringer Mannheim, Németország) képállomáson lefényképeztük, majd a fehérjesávok intenzitását ImageJ programmal kvantitatív módon meghatároztuk és denzitometriás analízist végeztünk. A mintaterhelés és a fehérjeátvitel ellenőrzésére a membránokról a korábban kötött antitesteket stripping pufferral eltávolítottuk, majd újra hidridizáltuk β -aktin antitesttel (1:1000 hígítás; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), így a kapott eredmények megbízhatóak és összehasonlíthatóak egymással.

4.2 Mitokondriális diszfunkció iszkémia-reperfúzióban

Respirometriás vizsgálatok

Kísérleteinkben a mitokondriumok *in vitro* vizsgálatára és humán minták mérésére is alkalmas OROBOROS Oxygraph-2k (Innsbruck, Ausztria) nagyfelbontású respirométert (HRR) és kiegészítő LED2 fluoreszcens modult használtunk (9. ábra). A respirométer a Clark elektród (bipoláris elektrokémiai oxigén szenzor) elvén működő mérőrendszer, amely nagy pontossággal képes biológiai minták pillanatnyi oxigén fogyasztásának meghatározására és követésére [159]. Az elektródot polipropilén membrán borítja, ami oxigénre és szén-dioxidra permeábilis, de nem ereszt át a vizet és az ionokat, továbbá megakadályozza olyan vegyületek bejutását az elektródokhoz, melyek azokat károsíthatják, vagy zavarhatják a mérést. A kicsiny katódfelület, a zárt mintatartó és a minta keverése biztosítja, hogy a minta térfogatában az oxigén koncentráció állandó, amit a katódon történő oxigénfogyasztás nem befolyásol. Ez adja az OxPhos, mint alapvető mitokondrium funkció vizsgálatának az alapját. A módszer alkalmas izolált mitokondriumok, sejttenyészetek, vagy kisméretű (≥ 10 mg), akár finom tű biopsziát követő, vagy műtétek során vett biopsziák fagyasztás nélküli szöveti homogenátumaiból elvégezni a vizsgálatokat [160,161].

A módszer további tulajdonsága, hogy a mitokondrium légzési láncának komplexei működés közben szelektíven vizsgálhatóak, miközben valós időben követhetőek a változások [61] (9. ábra).



9. ábra. (A) Oxygraph-2k nagyfelbontású respirométer. (B) A mérés során kapott regisztrátum a kamrai oxigén koncentrációval és a minta oxigén fogyasztásával.

Mitochondrium izolálás

A máj mitokondriumokat a Gnaiger és munkatársai [162] módszerével izoláltuk áloperált állatokból, a bal májlebenyből izotóniás szacharóz közegben (300 mM szacharóz, 0,2 mM EDTA és 10 mM HEPES, KOH-val 4 °C-on pH 7,4-re beállítva). Az utolsó centrifugálás után a mitokondriális pelleteket szacharóz közegben reszuszpendáltuk.

Szöveti homogenizátum

A szövetmintákat (~ 50 mg májbiopszia vagy újszülött Wistar patkányok szív mintáit) 1 ml MitOx respirációs médiumban (120 mM KCl, 20 mM HEPES, 10 mM KH₂PO₄, 86 mM MgCl₂, 0,025% BSA) homogenizáltuk üveg Potter homogenizátorral, majd 50 µl homogenátumot azonnal a detektáló kamrákba helyeztünk, amelyeket 200 nmol/ml oxigénkoncentrációra kalibráltunk szobai levegőben. A respirometriás adatokat a nedves tömegre normalizáltuk.

Alkalmazott protokollok:

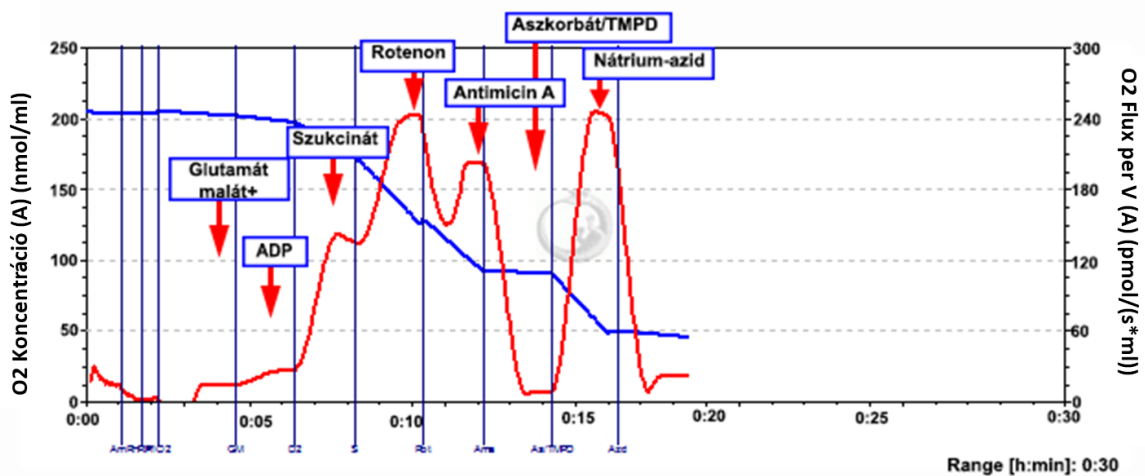
Mitokondriális II-III. állapotú légzési protokoll

A minta állandósult alapállapotú O₂-fogyasztását (minta légzési fluxusa) követően alkalmaztuk a szubsztrátokat: a mitokondriális II-es komplex szubsztrátjának, 10 mM szukcinátnak és 0,5 µM rotenonnak, az I-es komplex inhibitorának hozzáadása után a II-es komplexhez kötött mitokondriális II-es állapotú légzést határoztuk meg. A II-es komplexhez kötött OxPhos meghatározásához 2,5 mM ADP-t adtunk a kamrába. Végül a külső

mitokondriális membrán épségét 10 μM citokrom c hozzáadása után értékeltük. A respirometriás adatokat a nedves tömegre vagy a minta fehérjetartalmára viszonyítva normalizáltuk [163]

SUIT (szubsztrát-szétkapcsolószer-gátlószer) protokoll

SUIT protokollt alkalmaztuk a komplex I és a komplex II relatív szerepének meghatározására a mitokondriális légzés során. Glutamát (2 mM) és malát (10 mM) kombinációját használtuk az I-komplexhez kötött alaplégzés indukálására, majd telítő ADP-t (2,5 mM végső koncentráció) adtunk, hogy a légzést az OxPhos kapacitás szintjére stimuláljuk. Szukcinát (10 mM) hozzáadásával a komplex I + komplex II OxPhos kapacitást detektáltuk, majd a szétkapcsolószer (uncoupler) karbonil-cianid m-klórfenil-hidrazint (CCCP) (C; 0,5 μM lépésként) titráltuk. Végül a komplex I-et rotenonnal (0,5 μM), a komplex III-at pedig antimicin-A-val (Ama) (2,5 μM) gátoltuk. Ezt követően a IV. komplexet nem specifikus elektrondonorokkal (aszkorbát/TMPD) lehet aktiválni, majd nátrium-aziddal gátolni (10. ábra).



10. ábra. Egy nagyfelbontású respirometriás mérés eredeti regisztrátuma. A mitokondriális funkciók meghatározása során a terminális oxidációban résztvevő komponenseket szubsztrátok és inhibitorok használatával lehet vizsgálni. A májból vett mintából homogenizátumot készítünk, melyhez először glutamát és malát szubsztrátok hozzáadásával aktiváljuk az I. komplexet, majd indukáljuk az oxidatív foszforiláció folyamatát ADP-vel. Szukcinát hozzáadásával aktiválódik a II. komplex, ezáltal meghatározható az I. és II. komplex maximális aktivitása. Rotenonnal gátoljuk az I. komplexet, így külön-külön mérhetővé válik az I. és a II. komplex kapacitása. Antimicin-A hatására a III. komplex gátlódik. Végül elektrondonorokkal (aszkorbát/TMPD) aktiváljuk a IV. komplexet, amit nátrium-aziddal lehet gátolni.

Leak és coupling (kapcsoltsági) protokoll

A II-es komplexhez kötött légzést (II-es légzési állapot) 10 mM szukcinát adásával határoztuk meg, 0,5 μ M komplex I inhibitor rotenon hozzáadása után. A komplex II-hez kötött OxPhos meghatározásához minden kamrába 2,5 mM ADP-t adtunk. Végül az ATP-szintáz (Fo, F1 ATP-szintáz) specifikus gátlószerét, 0,5 μ M oligomicint adtunk a közeghez hogy az ún. Leak-légzést (elektron-szökés, IV. állapotú légzés) detektáljuk. A mitokondriumok kapcsoltságának megállapítására alkalmazott ún. coupling protokoll ehhez nagyon hasonló. A protokoll elején az Oxphos (10 mM szukcinát és 5 mM ADP-t követően) majd a Leak-légzés (0,5 μ M oligomicin adásával) kerül meghatározásra. Ha ezt követően 1 μ M-ként titrálva karbonil-cianid p-trifluor-metoxi-fenil-hidrazin (FCCP) szétkapcsolószert adunk, akkor a maximális mitokondriális légzési kapacitást tudjuk mérni. Végül a maradék oxigénfogyasztást (ROX) 1 μ M rotenon és 1 μ M Ama hozzáadásával határoztuk meg.

A citokróm c oxidáz aktivitás kimutatása

A citokróm c oxidáz aktivitást a citokróm c időfüggő oxidációján keresztül számítottuk 550 nm-en, a korábban leírtak szerint [164]. Röviden, a májmintákat 10x jéghideg Mitox közegben Potter darálóval homogenizáltuk, majd 4 °C-on 5 percig 800 g-vel centrifugáltuk. 50 μ l felülúszót adtunk 2,5 ml citokróm c törzsoldathoz (10,6 mg citokróm c 20 ml desztillált vízben oldva) (Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország), és az 550 nm-en mért optikai sűrűség csökkenését spektrofotometriásan mértük 1 perces intervallumokban 0, 30 és 60 percenként.

Mitokondriális H₂O₂ termelés

A mitokondriális H₂O₂-felszabadulást mint a ROS (itt a gyorsan átalakuló szuperoxid-anion) termelésének markerét fluorimetriásan követtük nyomon az Amplex Red/tormaperoxidáz rendszerrel, amelynek során az Amplex Red (nem fluoreszcens) rezorufinná oxidálódik. A H₂O₂-termelés kalibrálását ismert mennyiségű H₂O₂-vel végeztük. Ebben a beállításban a ROS-felszabadulást úgy vizsgáltuk, hogy oxidáló szubsztrátokat (20 mM glutamát, 10 mM malát, 10 mM szukcinát, 5 mM ADP) adtunk a mitokondriumokhoz. Ezt követően a szabadgyök-szivárgást is meghatároztuk, mint a 3. állapot H₂O₂-termelésre átirányított oxigénfogyasztásának százalékos arányát.

Extramitokondriális Ca^{2+} - áramok

A mitokondriális Ca^{2+} -áramlást a kék fluoreszcens modul segítségével mértük (gerjesztés: 465 nm; erősítés: 1000; polarizációs feszültség: 500 mV). A CaCl_2 alkalmazásával kiváltott Ca^{2+} -fluxust CaGreen-5N monofluoreszcens festékkel állapítottuk meg [165]. Az első lépésben a Ca^{2+} -áram alapvonalát a Ca^{2+} -felszabadulás kiváltásának hiányában határoztuk meg fluoreszcens festék (2 μl CaGreen-5N) hozzáadásával. Ez a Ca^{2+} -fluxus az endogén Ca^{2+} -forrásokból származó extramitokondriális Ca^{2+} -alapszintjére utal. Ezután az OxPhos-t szukcinát és ADP szubsztrátok hozzáadásával értük el a mintához, míg a mitokondriális Ca^{2+} -fluxus beindításához az I. komplex gátlóját, a rotenont (1 μM) adtuk hozzá. Ezt követte az exogén CaCl_2 (5 mM) 3 lépcsős titrálása az mPTP megnyílását jelző maximális Ca^{2+} -fluxus eléréséhez. A CaCl_2 túltelítő hatása után az elektrontranszportot a komplex III inhibitor Ama-val blokkoltuk, gátolva a mitokondriális Ca^{2+} -fluxusokat, míg a rendszer Ca^{2+} -potenciálját etilén-glikol-tetra-ecetsavval (1 mM EGTA) állítottuk le.

Mitokondriális membránpotenciál ($\Delta\Psi\text{m}$)

A $\Delta\Psi\text{m}$ -t fluorimetriásan mértük a Safranin O fluorofór (#S2255 Merck KGaA, Darmstadt, Németország) segítségével. Először 1 μM rotenon, 10 mM szukcinát és 1 μM FCCP-t adtunk hozzá. Végül a ROX-ot 1 μM Ama hozzáadásával határoztuk meg.

4.2.1 Máj meleg iszkémia-reperfúziós károsodása

A részleges máj IR modelljét használtuk [166]. Ehhez Sprague–Dawley patkányokat (Charles River, Sulzfeld, Németország; átlagtömeg 300 ± 20 g) patkányokat véletlenszerűen két csoportba osztottuk. Az IR csoportban ($n = 6$) az állatokat 60 perces teljes iszkémia, majd 60 perces reperfúzió alá vetettük. Az áloperált állatokon (Álop. csoport, $n = 6$) ugyanezt a műtéti eljárást végeztük el, de nem történt máj iszkémia. Az érintett lebenyekből a reperfúziós periódus végén, valamint azonos időpontban az Áloperált állatokból vettünk májmintákat. A mitokondriális oxigénfogyasztás az egyes légzési komplexeket vizsgáló SUIIT protokoll alapján mértük.

4.2.1.1. GPC kezelés hatása

A mitokondriális funkciókra ható GPC-koncentráció meghatározása *in vitro*

Ezeknél a kísérleteknél korábbi modellben meghatározott mitokondriális dózis-változás hatását vettük alapul. Ebben a sorozatban újszülött Wistar patkányok szívhomogenátumain az állandósult állapotú alap oxigénfogyasztását (alaplégzés) mérését követően az II-III. állapotú (alaplégzés + OxPhos) mitokondriális légzési protokollt alkalmaztuk különböző koncentrációjú GPC oldatok (1 μ M - 100 μ M GPC oldat) mitokondriális légzésre gyakorolt hatásának meghatározására [167]

Ebből kiindulva, *in vitro* kísérletekben a hatásos GPC-koncentráció-tartomány meghatározásához 1 nM-tól 800 mM-ig terjedő GPC-oldatsorozatokat használtunk kontroll állatok májából készült homogenátumokon normoxiás állapotban. A hatékony koncentrációban 30 perces anoxiás periódust követően is vizsgáltuk az alaplégzést és az OxPhos-t [69].

GPC hatásának vizsgálata *in vivo*

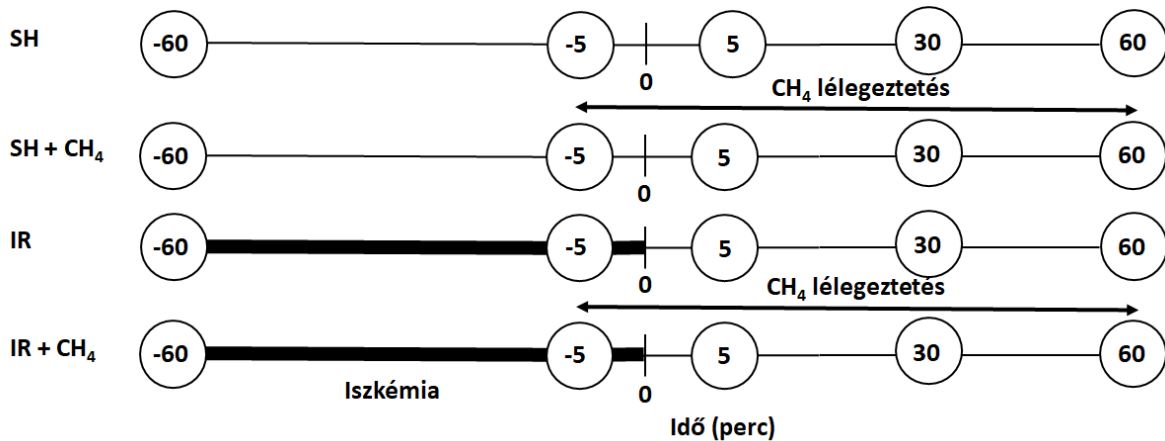
Az állatokat véletlenszerűen négy csoportba osztottuk. A vivóanyaggal kezelt IR-csoportban (n = 6) a patkányokat 60 perces teljes iszkémiának vetettük alá, amelyet 60 perces reperfúzió követett. Az IR + GPC csoportban 16,56 mg/testtömegkg GPC-t (MW: 257,2, Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Németország; 0,5 ml steril sóoldatban 0,064 mM koncentrációban oldva) intravénásan adtunk be 5 perccel az iszkémia vége előtt. Az álműtött, vivóanyaggal kezelt állatok (Álop. csoport, n = 6) ugyanezen a műtéti eljárás on estek át máj iszkémia nélkül, míg egy másik kontroll csoport (Álop. + GPC csoport, n = 6) az IR + GPC csoporttal megegyező időintervallumban GPC-t kapott.

A reperfúzió 60. percében az érintett májlebenyből vett májmintákból készült homogenátumokban vizsgáltuk a mitokondriális légzést, amihez SUIIT és a Leak protokollokat alkalmaztunk.

4.2.1.2. A CH₄ kezelés hatása

Az állatokat véletlenszerűen a következő csoportok egyikébe vagy másikába soroltuk: az IR csoportban (n = 6) a mitokondriális légzési funkciókat vizsgáltuk 60 perces teljes iszkémia és 60 perces normoxiás levegővel történő reperfúzió hatására. A mitokondriális légzési alapváltozók meghatározásához kontroll szövetmintákat vettünk, majd a májartéria bal oldali ágainak és a kapuvéna bal oldali ágának elszorításával iszkémiát idéztünk elő a középső és a

bal májlebenyben. Az iszkémia 55 percében májmintákat vettünk, hogy elemezzük a mitokondriális légzést az iszkémia hatására. Az érelzárások feloldását követően az érintett lebenyekből biopsziát vettünk a reperfúzió 5 percében, 30 és 60 percében. Az IR + CH₄ csoportban (n = 6) a protokoll azonos volt, és emellett a 2,2% CH₄-et (Linde Gas, Budapest, Magyarország) tartalmazó normoxiás mesterséges levegővel való inhalációt 50 perc iszkémia után kezdtük el, amely a reperfúziós időszak alatt végig folytatódott. Az Álop. csoportban az álműtött állatok (n = 6) ugyanezen a műtéti eljárás on estek át, de a máj iszkémia nem volt indukálva, és az állatok normoxiás levegőt inhaláltak, míg az Álop. + CH₄ csoportban az áloperált állatok (n = 6) szintén nem voltak kitéve máj iszkémiának, de CH₄-et inhaláltak az IR + CH₄ csoporttal azonos ideig (11. ábra).

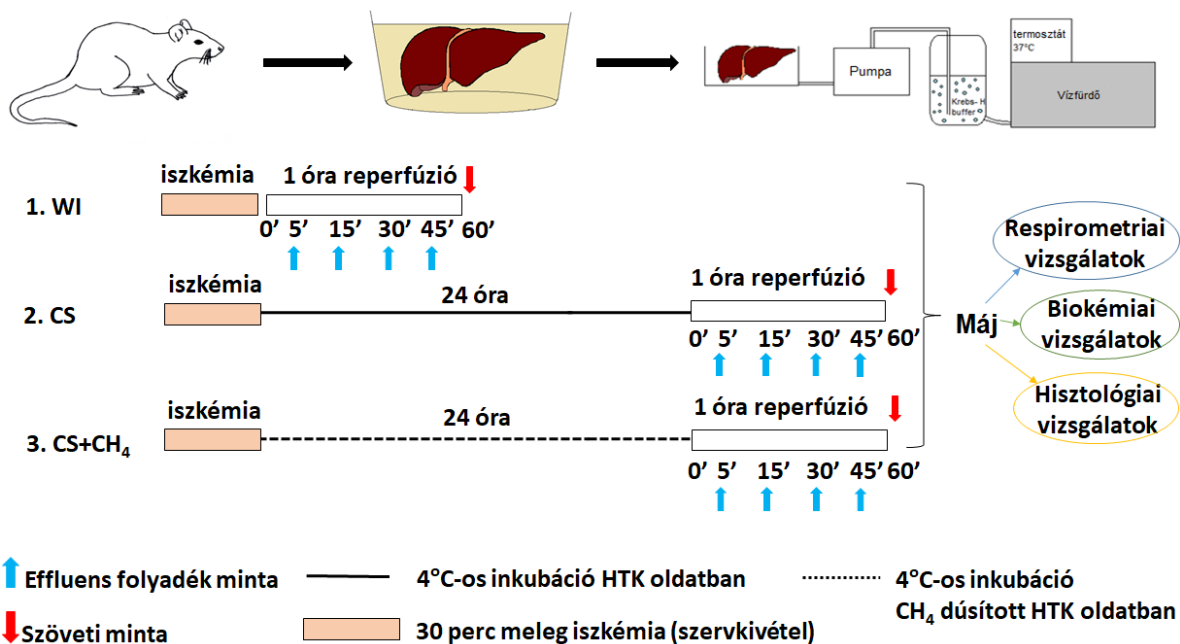


11. ábra. Kísérleti protokoll a CH₄ kezelés hatásának vizsgálatára máj meleg IR-ben. 60 perces részleges hepatikus meleg iszkémiát idéztünk elő, amit ezt követően 60 perces reperfúzió (IR) következett 2,2% CH₄ inhaláció nélkül (IR és IR + CH₄ csoportok). Az áloperált állatokon ugyanazokat a műtéti eljárásokat végezték el, de az azt követő IR nélkül, és részt vettek vagy nem vettek részt 2,2%-os CH₄-inhalációban (SH + CH₄ és SH csoportok). A mitokondriális légzés elemzéséhez májmintákat vettünk a kiindulási állapotban, 55 perc múlva az iszkémia, valamint a reperfúzió 5., 30. és 60. percében. CH₄: metán, IR: iszkémia-reperfúzió.

4.2.2 Máj hideg iszkémia-reperfúziós károsodása

A májtranszplantáció preklinikai modelljében vizsgáltuk a hideg IR mitokondriális következményeit. A kísérleteket hím Sprague-Dawley patkányokból (265-325 g; Charles River, Budapest, Magyarország) eltávolított májakon végeztük, három csoportban. Ketaminnal (45,7 mg/kg i.p.) és xilazinnal (9,12 mg/kg i.p.) történt altatást követően eltávolított máj portális vénáját, a vena cava inferior superior ágát és a közös epevezetékét operációs mikroszkóp alatt kanüláltuk. A transzplantátumokat *ex vivo* szervperfúziós rendszerrel (Central European Biosystem, FALC Instruments, Budapest, Magyarország)

perfundáltuk a portális véna af-ferens ágán keresztül, míg a v. cava a rendszer efferens részeként szolgált. A meleg iszkémiás csoport (WI, n = 24) volt a kontrollcsoport, ahol a graftokat közvetlenül a kiemelés után perfundálták, anélkül, hogy hideg iszkémiának vetették volna alá őket. A hisztidin-triptofán-ketoglutarát (HTK) (n = 24) és a CH₄-nal dúsított HTK (HTK + CH₄, n = 24) csoportokban a graftokat HTK oldatban tároltuk 4 °C-on 24 órán keresztül (12. ábra). CH₄-gyel dúsított HTK előállításához kereskedelmi forgalomban kapható Custodiol-oldatot (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, Németország) 0,4 MPa nyomáson 4 órán keresztül tiszta CH₄-gyel (> 99,9%) telítettük nagynyomású edényben (Messer, Budapest, Magyarország), hogy 4 °C-on 6,57 ± 0,27 μmol/mL CH₄-t tartalmazó oldatot kapjunk (12. ábra).



12. ábra. Vizsgálati protokoll CH₄-gyel dúsított szervtartósító oldat máj hideg IR-károsodásra gyakorolt hatásáról. A donormáj előkészítése és perfúziója. A WI csoportban a transzplantátumokat a kivétel után azonnal perfúzió alá vetették. A többi csoportot HTK, illetve CH₄-gyel dúsított HTK-oldatban (HTK + CH₄) inkubáltuk 4 °C-on 24 órán át a szervperfúzió előtt. A perfúziós mintákat a reperfúzió alatt vettük biokémiai elemzéshez (kék nyilakkal jelölve). A végén szövetmintákat vettünk a további elemzéshez (piros nyilakkal jelölve). WI: meleg iszkémia; HTK: hisztidin-triptofán-ketoglutarát; CH₄: metán; HTK + CH₄: CH₄-mal dúsított HTK.

Szervperfúziós rendszer

A reperfúziót izolált patkánymáj perfúziós rendszerrel (IPRL) végeztük, a korábban részletesen leírtak szerint [168]. A graftokat 300 ml oxigénnel dúsított, módosított Krebs-Henseleit pufferrel perfundáltuk 37 °C-on 60 percen keresztül, 3 ml/g májtömeg/perc állandó

áramlással, görgős szivattyú (Masterflex, L/S, Cole Parmer Instrument Company, Vernon Hills, Ill., USA) segítségével [169]

Mitokondriális funkciók meghatározása respirometriával

A májmintákat a reperfúzió végén vettük, és homogenátumokat készítettünk respirációs médiumban (MiR05). Ezt követően a Leak protokollt alkalmaztunk. Meghatároztuk a RCR-t, (a mitokodrium kapcsoltsági hatékonyságát kifejező OxPhos/Leak arányt, amit légzéskontroll-aránynak is neveznek), ezen kívül meghatároztuk az extramitokondriális Ca^{2+} mozgásokat is. Továbbá a belső membrán sérülését 5 mM citokróm c, a belső mitokondriális membrán külső oldalához lazán kapcsolódó hemefehérje hozzáadásával határoztuk meg.

Hisztológia és immunhisztokémia

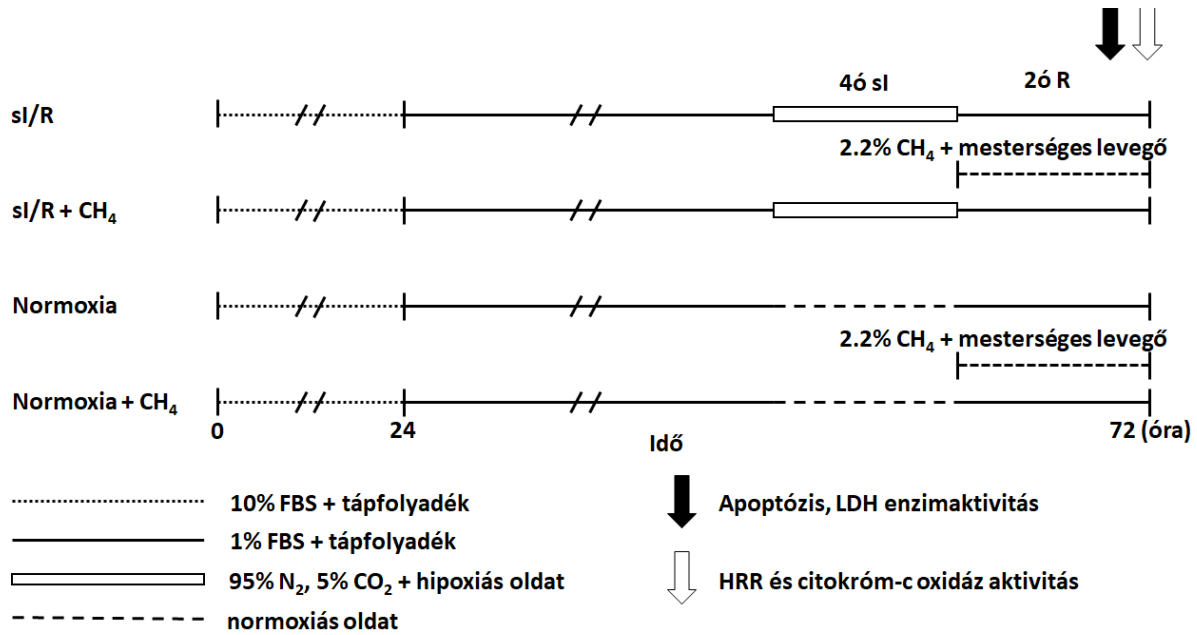
Az ER stressz marker SERCA2b (Endoplazmatikus Retikulum Ca^{2+} -ATPáz) (#PA5-102354, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) kimutatása immunhisztokémiai festéssel történt, a korábban leírtak szerint [69].

4.2.3 Szív iszkémia-reperfúziós károsodása

***In vitro* kísérletek**

1. Szívizomsejtek szimulált IR károsodása

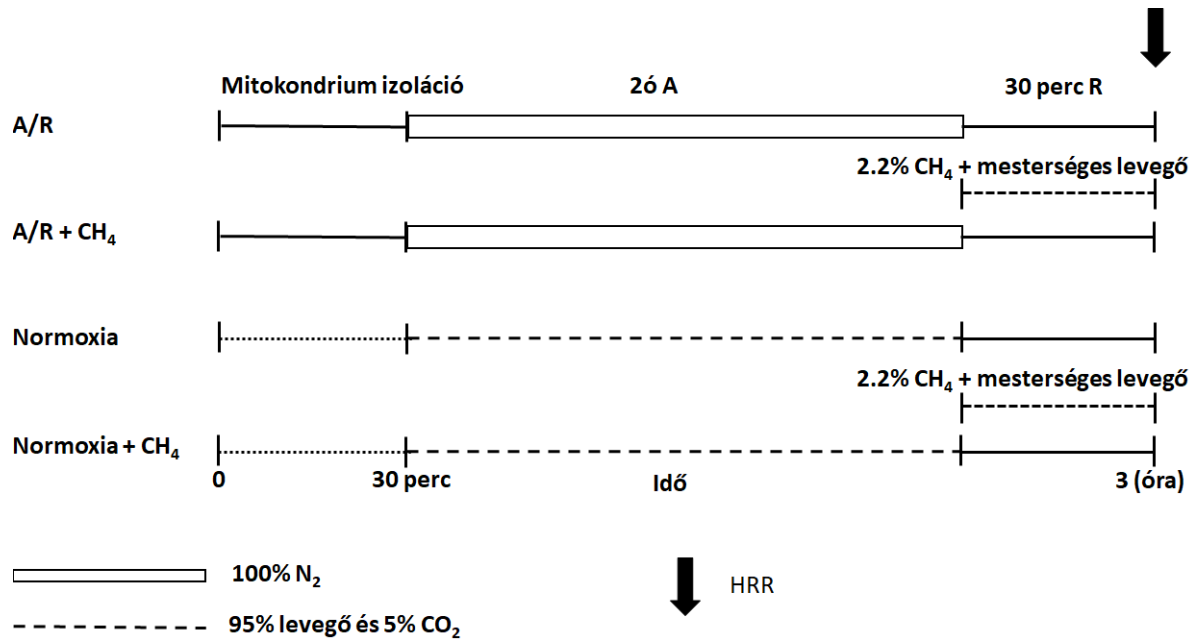
Az első sorozatban újszülött (háromnapos) patkány szívizomsejteket (NRMC-k) 4 órás szimulált iszkémiának (sI) tettünk ki. A sejteket hipoxiás kamrában tartottuk (37° C, 95% N_2 és 5% CO_2), és a táptalajt hipoxiás oldatra cseréltük (mM-ben: NaCl 119, KCl 5,4, MgSO_4 1,3, NaH_2PO_4 1,2, HEPES 5, MgCl_2 0,5, CaCl_2 0,9, Na-laktát 20; BSA 0,1%, 310 mOsm/l, pH = 6,4). Ezt követte egy 2 órás reperfúziós periódus (R) tápoldatban, amikor a sejteket vagy normoxikus körülmények között (37° C, mesterséges levegő), vagy CH_4 -gyel kiegészített normoxikus levegőjű kamrában (37° C, 2,2% CH_4 + mesterséges levegő) tartottuk (sI/R, illetve sI/R + CH_4 csoportok). A kontrollcsoportokat 4 órán keresztül normoxikus inkubátorban tartottuk fiziológiás körülményeket fenntartva, amit 2 órás reperfúziós periódus követett a normoxikus inkubátorban CH_4 -kiegészítéssel vagy anélkül (normoxia és normoxia + CH_4 csoportok). A végén az NRMC-eket HRR és sejtelétképeségi vizsgálatoknak vetettük alá (13. ábra).



13. ábra. A CH₄ hatásának vizsgálata NRMC-k szimulált IR-károsodásában. Az újszülött patkánykardiomiocitákat (NRMC-k) 24 órán át 10% FBS-szel kiegészített növekedési tápfolyadékban inkubáltuk, majd a tápfolyadékot 1% FBS-tartalmú tápfolyadékra cseréltük, ami elősegítette a sejtek differenciálódását. Az NRMC-ket fiziológiás körülmények között, normoxikus inkubátorban (37°C, 5% CO₂ és 95% levegő) tartottuk. A háromnapos NRMC-ket a következőképpen kezeltük: 4 órás normoxia (normoxikus oldat és normoxikus inkubátor), majd 2 órás reperfúzió (CH₄-et tartalmazó vagy nem tartalmazó közeg). Szimulált iszkémia (hipoxiás oldat + hipoxiás kamra) 4 órán keresztül, majd reperfúzió (CH₄-gyel vagy anélkül) 2 órán keresztül. A kísérletek végén a sejtek életképességét és a mitokondriális funkciót vizsgáltuk. NRMCs: újszülött patkány kardiomiociták; CH₄: metán; FBS: magzati szarvasmarha szérum; CO₂: szén-dioxid; N₂: nitrogén.

2. Izolált kardiális mitokondriumok anoxia-reoxigenizációs károsodása

A második sorozatban az izolált szív mitokondriumokat a következőképpen kezeltük: anoxiát 100%-os N₂ perszufflációval idéztünk elő 2 órán keresztül egy 2 ml térfogatú küvettába, amely 1 ml légzőközeget és 1 ml légeteret tartalmazott. Az anoxiát reoxigenizációs periódus követte (95% levegő és 5% CO₂) 2,2% CH₄ kiegészítéssel vagy anélkül 30 percig (A/R, illetve A/R + CH₄ csoportok). A kontrollcsoportokban a mitokondriumokat normoxikus küvettákban tartottuk (95% levegő és 5% CO₂) 2,2% CH₄ kiegészítéssel vagy anélkül (normoxia és normoxia + CH₄ csoportok). Ezután a mitokondriumokat HRR-nek vetettük alá (14. ábra).



14. ábra. A CH₄ hatásának vizsgálata izolált szív mitokondriumok anoxia-reoxigenizációja során. A mitokondriumokat a Gnaiger-módszerrel izoláltuk és a következőképpen kezeltük: 2 órási normoxiát (95% levegő és 5% CO₂) vagy anoxiát (A) (100% N₂) követett 30 perces reoxigenizáció (R) (CH₄-gyel vagy anélkül). A kísérletek végén a mitokondriális funkciót vizsgáltuk. CH₄: metán; CO₂: szén-dioxid; N₂: nitrogén.

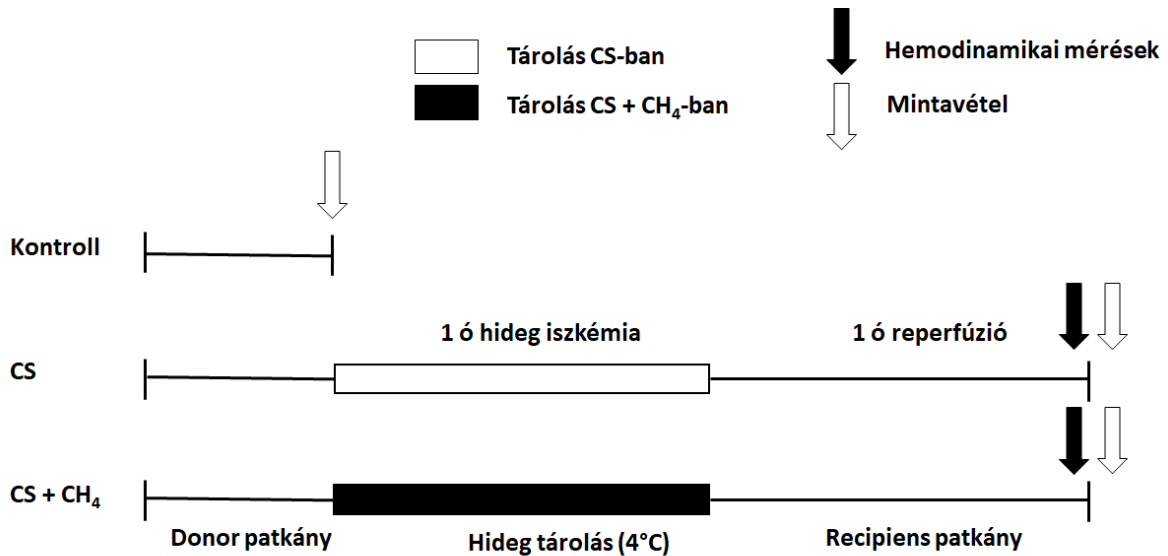
A mitokondriális funkciókat respirometriás vizsgálata során az NRMC-k és az izolált szív mitokondriumok oxigénfogyasztását mértük különböző mitokondriális anyagcsere-állapotokban, valamint meghatároztuk a mitokondriális H₂O₂ termelését és a $\Delta\Psi_m$ változását.

Szív hideg IR károsodása

Heterotróp szívtranszplantációs modellünkben izogén hím Lewis - Lewis patkányokon heterotróp (n=36) transzplantációt végeztünk a korábban leírtak szerint [170]. Röviden, a donorokból történő kivágás után a graftokat 60 perces transzplantációs oldatban hidegen tároltuk (hideg iszkémiás idő), amit heterotópikus transzplantáció és 60 perces reperfúziós periódus követett. A transzplantáció során a donorszív aortáját és tüdőartériáját mikrosebészeti technikával végről-oldalra anasztomosztizáltuk a recipiens patkány hasi aortájához, illetve a vena cava inferiorhoz. A reperfúzió végén *in situ* hemodinamikai méréseket végeztek a recipiensben a korai graftfunkciók értékelésére; ezt követően biopsziákat vettünk a graftok bal kamrájából (LV) mitokondriális funkcionális mérések és biokémiai vizsgálatok céljából.

Az állatokat véletlenszerűen három csoportba osztottuk. Az 1. kontrollcsoportban (n=12) a

donor patkányok ugyanezen a sebészeti eljáráson estek át az explantációig, de a szíveket nem vetettük alá hideg iszkémiának és tárolásnak, és nem transzplantáltuk őket. A 2. csoportban (n=12) az explantált transzplantátumokat a 60 perces hideg iszkémiás periódus alatt 4 °C-on, CS-oldatban tároltuk, míg a 3. csoportban (n=12) a transzplantátumokat a 60 perces hideg iszkémiás periódus alatt CH₄-gyel dúsított CS-oldatban tároltuk (6,57±0,27 μmol/mL CH₄-t tartalmaz, ld. előző kísérlet). Ebben a csoportban a szív leállításához használt hideg kardioplegikus CS-oldatot is CH₄-gyel egészítették ki (15. ábra).



15. ábra. Kísérleti protokoll szívgraft statikus hideg tárolása során alkalmazott CH₄-dúsított szervtartósító oldat hatásának vizsgálatára. A donor Lewis patkányokból eltávolított szívgraftokat a heterotópiás szívtranszplantáció előtt 60 perccel hideg konzerváló oldatban tároltuk. A reperfúzió megkezdése után 60 perccel hemodinamikai méréseket végeztünk a recipienseken a transzplantáció utáni korai grafftunkció értékelésére. Ezt követően a bal kamrából mintákat vettünk mitokondriális funkcionális mérésekhez, biokémiai vizsgálatokhoz, qPCR-analízishez és szövettani vizsgálathoz. A kontrollcsoportban a szívek ugyanolyan műtéti eljáráson estek át, mint a donoroké, de nem kerültek hideg tárolásra és transzplantációra. A CS-csoportban a transzplantátumokat hideg (4 °C) CS-oldatban tárolták a hideg iszkémiás időszak alatt; a CS-CH₄-csoportban a protokoll azonos volt, azzal a különbséggel, hogy CH₄-gyel dúsított CS-oldatot használtak.

A mitokondriális légzést HRR-rel mértük, az I-es és II-es komplex működését a Leak protokollal és a citokróm c felszabadulásának mérésével vizsgáltuk.

A szívizomból az ER-stressz markerek mRNS-expresszióját kvantitatív valós idejű PCR (qPCR) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével elemeztük a következő génekre vonatkozóan: (Ddit3, más néven CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homológ fehérje), hipoxia-indukálható faktor 1-alfa (HIF1α), glikogén-szintáz kináz 3 béta (GSK3β) és nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein receptor (Vldlr).

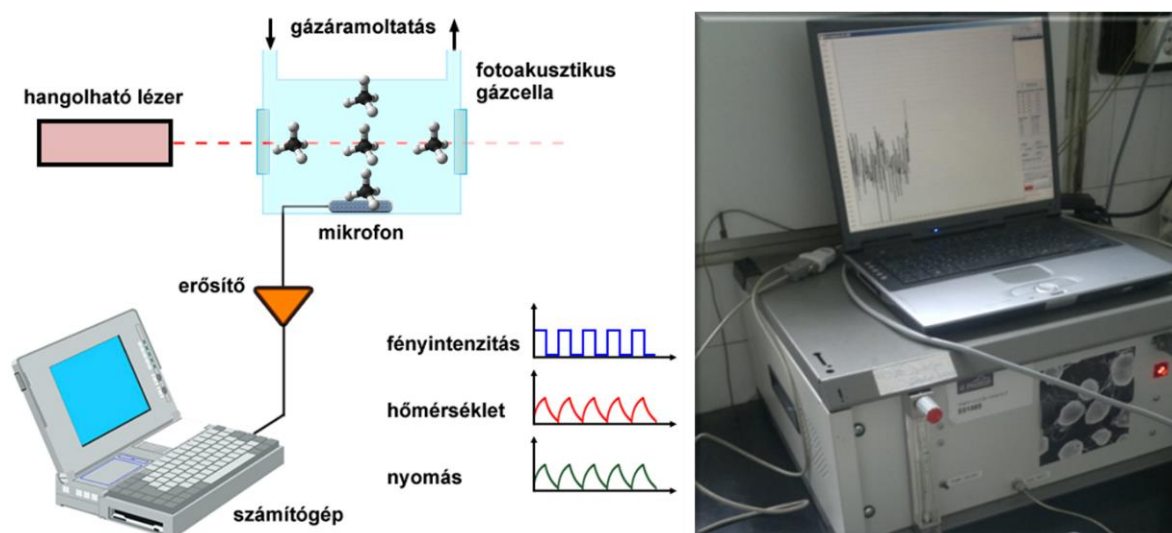
Szövetteni vizsgálatra és immunhisztokémiára a mintákat pufferelt paraformaldehid-oldatban (4%) rögzítettük és paraffinba ágyaztuk. 5 µm vastag metszeteket vágunk, majd hematoxilinnal és eozinnal (H&E) festettük. A szerkezeti károsodás értékelését egy korábban leírt szövetteni pontozási rendszer szerint végeztük [171].

A SERCA a Ca²⁺-homeosztázis és a kontraktilitás fő szabályozója a szív- és vázizomzatban. Emellett az ER stresszválasz a SERCA izoformák, köztük a SERCA1 kifejeződését indukálhatja a posztischemiás szívben. Ebből kiindulva a SERCA1 expresszióját standard immunhisztokémiai festési technikával (anti-SERCA1 antitest, #S1189, Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország) detektáltuk a transzplantált patkányszív-graftok bal kamráiban. A SERCA1 immunreaktivitását nyílt forráskódú képalkotó szoftverrel (ImageJ 1.8 verzió, National Institutes of Health, Maryland, USA) határoztuk meg, és az immunpozitív sejtek százalékos arányában fejeztük ki, látómezőnként számszerűsítve [172].

4.3 Trauma és alkoholfogyasztás okozta stressz biomarkereinek monitorozása

4.3.1 Kilélegzett CH₄ meghatározás fotoakusztikus spektroszkópiával

A kilélegzett levegő CH₄-koncentrációját nagy érzékenységgű analitikai berendezéssel, PAS segítségével mutattuk ki [173]. A PAS a spektroszkópia egy speciális módja, amely az optikai abszorpciót közvetett módon, a CH₄ elnyelt fényenergia akusztikus hullámokká történő átalakítása révén méri. A keletkező hang amplitúdója egyenesen arányos az elnyelő gázkomponens koncentrációjával. A rendszer fényforrása egy közeli infravörös diódalézer, amely a CH₄ abszorpciós vonala körül, 1650,9 nm-en sugároz, 15 mW kimenő teljesítménnyel (NTT Electronics, Tokyo, Japán). A légzés és a környezeti levegő közös összetevőire vonatkozó keresztérzékenységet többször megvizsgáltuk, és több térfogatszázaléknyi CO₂- vagy H₂O-gőz esetén sem találtunk mérhető műszerreakciót. A diódalézer nagy szelektivitást biztosít; a CH₄ abszorbanciája több nagyságrenddel nagyobb, mint a H₂O, CO₂ vagy CO abszorbanciája az általunk használt 1,65 µm-es hullámhosszon. A készüléket 100 ppm CH₄-t tartalmazó szintetikus levegő (Messer, Budapest, Magyarország) hígításával előállított gázkeverékekkel kalibráltuk, és a készülék dinamikus 4 nagyságrendnyi tartományban működik; a szenzor legkisebb detektálható koncentrációja 0,25 ppm (3σ), 12 s integrációs idő mellett [174] (16. ábra).



16. ábra. Fotoakusztikus spektroszkóp működésének sematikus ábrázolása és egy eredeti regisztrátum.

4.3.2 Kilélegzett CH₄ vizsgálata alkoholfogyasztás okozta stresszben

Egészséges, ismert alapsbetegséggel nem rendelkező, 25 és 30 év közötti (átlagos súlyuk $82 \pm 13,1$ kg) férfiakat vontunk be a vizsgálatba. A résztvevők általános egészségügyi vizsgálaton estek át, és ismételt légzésanalízisen vettek részt (lásd később). Kizáró kritériumok voltak: a CH₄-termelői státusz, a dohányzás, a rendszeres alkoholfogyasztás, a versenysport, valamint a máj- és cukorbetegség. A vizsgálatot megelőzően a résztvevőknek 3 napig nem volt megengedett az alkoholfogyasztás, és bevonáskor kilégzési etanolszint mérésen estek át.

A protokoll 1. napján kontroll légzési CH₄-méréseket végeztünk, majd a résztvevők az alábbiakat fogyasztották el: 1,15 g/kg/nap alkoholtartalmú italt (200 ml whisky, 40 térfogat% etanol tartalom), amit este 6 és reggel 6 óra között megismételtek 4 egymást követő napon. A kilélegzett CH₄ méréseket minden nap előre meghatározott időpontban végeztük (reggel 8-9 óra között), éhgyomorral, az első étkezés előtt. A kilégzéses CH₄-elemzést 31 nappal később megismételtük 3 egymást követő napon, amikor a résztvevők a mérések előtt legalább 3 napig nem fogyasztottak alkoholt.

A humán vizsgálatok során a kilélegzett levegő CH₄ koncentrációját PAS segítségével mértük a következőképpen: A résztvevőket arra kérték, hogy lélegezzenek normál módon, és a kilélegzett levegőt egy 200 cm³-es üvegbefecskendező edénybe irányították. Az optimális idő a stabil CH₄ koncentráció elérésére 1 és 3 perc között alakult ki, 30 cm³/perc áramlási sebességgel. A szobalevegő CH₄ szintjét meghatározták, és alapértékként használták az *in*

vivo CH₄ kibocsátás számításaihoz. A CH₄ termelést Δppm-ben adták meg, ami a nettó kilélegzett CH₄ koncentrációra utal, ahol a környezeti levegő CH₄ koncentrációját levonták a kilélegzett CH₄ koncentrációból.

A kapcsolódó állatkísérleteket hím, nem-CH₄-termelő (0,3 ppm-nél alacsonyabb kilélegzett CH₄ értékű) Sprague-Dawley patkányokon (190-300 g testtömeg) végeztük. 24 nem-CH₄-termelő patkányt véletlenszerűen négy csoportra osztottunk. Az 1. csoport (n=6) nem kezelt kontrollként szolgált, a 2. csoportban (n=6) az állatok a humán vizsgálatban alkalmazott 1,15 g/kg/nap alkoholt (40%-os whisky, 2,86 ml/kg/nap adag) kaptak, kiegészítve orális GPC étrenddel (0,8%-os GPC-vel dúsított táplálék, Ssnif Spezialdiäten GmbH, Soest, Németország), a 3. csoportban (n=6) az állatok napi 7,5 ml/kg/nap 40%-os etanol tartalmú oldatot kaptak 8 napon keresztül. Ez 2,7 g/kg/nap etanolbevitelnek felel meg, ami korábbi kísérletekben máj oxido-reduktív stresszt idézett elő patkányokban [175]. A 4. csoportban (n=6) ugyanezt az alkoholdózist kapták (7,5 ml/kg/nap), kiegészítve orális GPC étkezéssel 8 napon keresztül.

A patkányok egész testre vonatkozó CH₄ kibocsátását egy speciálisan kialakított zárt mintavételező kamrában mértük, melynek belső térfogata 2510 cm³ volt [173]. A kísérletek előtt meghatároztuk a kamrában lévő alap CH₄ koncentrációt, majd a patkányt a zárt kamrába helyeztük 10 percre. Az állatok egész testre vonatkozó CH₄ kibocsátását az alap CH₄ koncentráció és a 10 perces minta közötti különbség alapján számoltuk ki, és a testfelülethez ($F \text{ (dm}^2) = 10 \cdot S^0.75 \text{ kg}$) viszonyítottuk.

A mitokondriális funkcionális mérésekhez 50 mg májszövetet 2 ml PBS-alapú homogenizáló pufferbe helyeztük, amely 0,25 M szacharózt, 10 mM Tris-t, 0,5 mM EDTA-t és 0,05%-os BSA-t tartalmazott. Ezt követően 50 μl szövet-homogenizátumot a HRR mérőkamráiba helyeztünk, és a mitokondriális II-III-as állapotú (alaplégzés + OxPhos) légzési protokollt alkalmaztuk.

4.3.3 Vitális paraméterek és a szívfrekvencia prediktív értéke traumás sokkban

Retrospektív kohorszvizsgálatot végeztünk intézetünk I. szintű trauma központjában az ATLS-szerinti sokkosztályozásban használt VS-ek (HR, SBP, GCS a tudatállapot és BD a metabolikus állapot jellemzésére) mortalitás szempontjából prediktív értékének vizsgálatával. Az adatokat 2014. július 11. és 2019. szeptember 11. között gyűjtöttük a

Szegedi Tudományegyetem elektronikus adatbázisából (MedSolution). Az intézményben a sürgősségi traumatológiai ellátás protokolljai, beleértve a masszív transfúziós protokollokat is, a teljes vizsgálati időszak alatt megfeleltek az ATLS elveinek.

A bevonási kritériumok közé tartozott a traumás team aktiválása, a helyszínről történő közvetlen szállítás, ≥ 16 éves életkor, részletes dokumentáció, beleértve a rövidített sérülési skálát (AIS=Abbreviated Injury Severity Score), a sérülés súlyossági pontszámát (ISS=Injury Severity Score), a sérülés pontos mechanizmusát és a megjelenéskor rögzített teljes HR, SBP, GCS és BD adatsort. A fiziológiai változók tekintetében az első kórházi mérések értékeit vették figyelembe és jelentették.

Betegcsoportok

Az ATLS nem határozza meg kifejezetten, hogy a legrosszabb paraméter vagy az összes paraméter kombinációja határozza meg a beteg súlyossági osztályát. A legtöbb traumás beteget nem lehet helyesen besorolni az ATLS IV. súlyossági osztályába (I-IV), ha a vitális paraméterek kombinációját értékeli [121,132]. A résztvevők sokk osztályba történő beosztása ezért a legrosszabb paraméterük alapján történt. Mivel a jelenlegi ATLS sokkosztályozás nem írja le a HR, SBP és GCS pontos értékeit, a kritériumok objektívvé és átláthatóvá tétele érdekében a korábbi ATLS osztályozásból vettük át a HR értékeket, valamint a Dunham és munkatársai tanulmányából az SBP és GCS értékeket [176] (1. táblázat).

Súlyossági Osztályok		I	II	III	IV	
Becsült vérvesztéség		<15%	15-30%	31-40%	>40%	
Fiziológiai változók	VS	HR* (/perc)	<100	100–119	120–139	≥ 140
		SBP* (mmHg)	≥ 110	100–109	90–99	<90
		GCS*	15	15	12–14	<12
	BD** (mEq/L)	0-2 mEq	2-6 mEq	6-10	≥ 10 mEq	
Transzfúzió		Monitorozás	Lehetséges	Igen	Masszív	

1. táblázat. Egyszerűsített sokkosztályozás abszolút értékek felhasználásával. A táblázat az ATLS [6] ajánlásain alapul. A pulzusnyomás, a légzésszám és a vizeletürítés nem szerepel az élettani változók között. A tendenciák helyett abszolút értékeket használtunk, hogy a kritériumokat objektívebbé tegyük. VS: életjel, HR: szívfrekvencia, SBP: szisztolés vérnyomás, GCS: Glasgow-kóma skála, BD: bázishány, bpm: percnkénti ütésszám. *A HR-értékeket a korábbi (9.) ATLS sokkosztályozásból vettük át. Az SBP és a GCS esetében a Dunham és munkatársai által használt értékeket vettük át [176].**A hipovolaemiás sokk jelenlegi ATLS-osztályozása csak a BD-re ad pontos értékeket. A negatív bázisfelesleget (BE) bázisdeficitnek (BD) nevezzük, és metabolikus acidózist jelez.

Kimeneti eredményként megvizsgáltuk az egyes paraméterek (HR, SBP, GCS és BD)

prognosztikai potenciálját, hogy meg tudjuk határozni a legerősebb és leggyengébb előrejelző tényezőket a traumás súlyos sérültek kezdeti értékelése során.

A HR, mint prognosztikai faktor hatékonyságát szisztematikus áttekintés és meta-regresszió keretén belül külön is megvizsgáltuk, hogy frissítsük az ismereteket a szerepéről a trauma során fellépő vérzéses sokk kezdeti értékelésében, figyelembe véve a traumaellátásban az elmúlt évtizedekben bekövetkezett paradigmaváltásokat [177].

Részletes keresést végeztünk az EMBASE, a MEDLINE (PubMed-en keresztül), a Cochrane Kísérleti Vizsgálatok Központi Nyilvántartása (CENTRAL) és a Web of Science adatbázisokban 2020. szeptember 1-jén a következő keresési kifejezésekkel: “trauma” ÉS (“szívfrekvencia” VAGY “pulzusszám” VAGY “tachycardia” VAGY “bradycardia” VAGY “életjel” VAGY “életjelek” VAGY “életparaméter” VAGY “életparaméterek”) ÉS “halálozás” ÉS (“vérzés” VAGY “hemorrhagia” VAGY “hemorrhage” VAGY “hemodinamikai” VAGY “hemodynamic”). A 2010 előtt publikált cikkeket kizártuk a kutatásunkból.

Bevonási kritériumok

A vérző traumás betegek adatait csak akkor vettük figyelembe a beválasztás során, ha tartalmazták a kezdeti szívfrekvencia (HR) értékeket – akár a helyszínen (prehospital, PH), akár a kórházi felvételnél (admission, AD) –, valamint a halálozási adatokat egy legfeljebb 30 napos időintervallumon belül a sérülés időpontjától számítva. Csak teljes szövegű közleményeket vettünk figyelembe. A nem angol nyelvű közleményeket, szakirodalmi áttekintéseket, konferencia-összefoglalókat és alacsony esetszámú (<10) esetismertetőket kizártuk. Figyelembe véve a traumaellátás elmúlt évtizedbeli fejlődését (például a tranexámsav (TXA) bevezetését és a folyadékreszuszcitációs szemléletváltást), kizártuk azokat a tanulmányokat is, amelyek 2010 előtt kezelt betegek adatait tartalmazták.[177].

Egy betegcsoportot akkor tekintettünk vérzőnek, ha az egyes vizsgálatok beválasztási kritériumai között szerepelt a vérkészítmények transfúziója és/vagy pozitív FAST és/vagy hemodinamikai instabilitás trauma után és/vagy hasi lött sérülés. A speciális populációk, például terhesek, gyermekek (<18 év) vagy geriátriai betegek (≥55 év) adatait nem vettük figyelembe. Kizártuk továbbá azokat a tanulmányokat, amelyek égési sérülést, traumás

gerinc- vagy agysérülést elszenvedett betegekre vonatkoztak. A speciális populációk, valamint a gyermek- és időskorú betegek kizárásával célunk az volt, hogy csökkentsük a zavaró tényezők hatását. Mivel a traumát elszenvedett geriátriai betegek vizsgálataiban az életkori határértékek 55 és 80 év között változnak, és a szakirodalomban nincs egyértelmű konszenzus, úgy döntöttünk, hogy az 55 év feletti populációkat kizárjuk az életkorral összefüggő zavaró tényezők hatásának minimalizálása érdekében.

Közlemények kiválasztása

A duplikáltumokat és 2010 előtt megjelent cikkeket referencia menedzser szoftver (EndNote V.X7) segítségével eltávolítottuk. A fennmaradó közlemények cím és absztrakt alapján történő szűrését két szerző végezte. Ezt követően azon közlemények teljes szövegét értékeltük, amelyek megfeleltek az előzőekben ismertetett bevonási kritériumoknak. Az eltéréseket konszenzussal rendeztük.

Adatgyűjtés

A vizsgálatba bevont közleményekből a következő adatok kerültek kivonásra: cím, első szerző neve, publikálás éve, tanulmány típusa (prospektív vagy retrospektív), adatforrás (ország, kórházi adatbázis/regiszter), adatgyűjtési időszak, bevonási kritériumok, al-csoportok, az al-csoportok betegszáma, összes betegszám, HR (átlag \pm SD vagy medián (IQR)), HR értékek rögzítésének fázisa (PH/AD), 30 napon belüli halálozás (n, %). Az átfedő adatokkal rendelkező tanulmányok esetén a kisebb mintával rendelkező, kevésbé átfogó jelentéseket kizártuk. A torzítás (bias) kockázatának értékelésére a Prognosztikai Tanulmányok Minősége (QUIPS) eszközt külön-külön alkalmazta két szerző [178]. Az eltéréseket konszenzussal rendeztük.

4.3.4 A kilélegzett CH₄ kimutatása traumával összefüggő vérzésben

Prospektív, obszervációs vizsgálatot végeztünk a Szegedi Tudományegyetem Traumatológiai Klinikáján (I. szintű trauma központ), amely a kilélegzett CH₄-koncentráció és a vérveszteség mennyiségének összefüggését vizsgálta. A kutatás a ClinicalTrials.gov oldalon NCT04987411 azonosítóval regisztrált, részletes protokollját közzétettük [83]. A vizsgálatba 18 évesnél idősebb, súlyosan sérült (ISS \geq 16), a helyszínen vagy közvetlenül érkezéskor intubált

betegeket vontunk be. Egy beteg esetében, akinek átható sérülése miatt a végső analízisbe nem került bevonásra, a prospektív vizsgálat módszertanával 4 órán keresztül folyamatos monitorozást végeztünk. Az érintett beteg egy 45 éves férfi volt, aki 2021 októberében egy frontális motorbalesetet követően érkezett helikopteres sürgősségi mentőszolgálattal a Szegedi Tudományegyetem Damage Control műtőjébe. A beteg több súlyos sérülést szenvedett, köztük a bal alsó végtag részleges amputációját. A helyszíni ellátás során súlyos vérzés, hemodinamikai instabilitás és 3-as GCS pontszám került megállapításra. Elsődleges ellátásként intravénás folyadékot, epinefrint, tranexámsavat és fibrinogént kapott, valamint endotracheális intubációt, bilaterális thoracosztómiát és vérzéscsillapító tourniquet-et alkalmaztak.

Kórházi kezelés

A Damage Control műtőbe érkezéskor vérnyomása 74/36 mmHg, szívfrekvenciája 76 bpm volt. A trauma team azonnali hemodinamikai monitorozást és noradrenalin-infúziót kezdett. FAST ultrahang negatív eredményt mutatott, míg a teljes test CT-vizsgálat a következő sérüléseket mutatta (2. táblázat).

	Enyhe	Moderált	Komoly	Súlyos	Kritikus	Nem Kezelhető
Fej és nyak		X				
- a II. nyakcsigolya testének elmozdulás nélküli törése						
Arc	X					
- zúzódások az arcon						
Mellkas	X					
- kis pneumothorax mindkét oldalon ≤ 20 mm						
Has és kismedence	X					
- bőr alatti vérömleny a bal lágyéktájékon (25 mm)						
Végtagok és medence						X
- a bal alsó végtag szubtotális amputációja a combcsont proximális és mediális harmadának határán, súlyos vérzéssel, ami kezelhetetlen TIC-et eredményezett.						
- ficam, szilánkos, zárt törés a bal felkarcsont distalis harmadában						
Külsőleges sérülés		X				
- kiterjedt bőrszakadások a háton, amelyek a testfelület 5%-át érintik						

2. táblázat. A sérülés során elszenvedett sérülések és azok súlyossága. 45 éves motorkerékpáros sérülései személygépkocsival való frontális ütközés után. Bár a nyak, az arc, a mellkas, a has és a külső régió területén csak kisebb és közepes mértékű sérülések keletkeztek; a bal alsó végtag kritikus mértékben megsérült, ami nagy vérvesztéséget, vérzéscsokkot és trauma által kiváltott koagulopátiát (TIC) eredményezett.

Érkezés után folyadék-reszuscitációt kezdtek 1000 ml Gelofusine, 500 ml Ringer-laktát és

1000 ml Isolyte-al, és elindították a masszív vértranszfúziós protokollt (MBT). A MBT-t az ATLS szerint úgy definiáltuk, mint 10 egységnél több vörösvérsejt-koncentrátumot a felvételt követő első 24 órában, vagy 4 egységnél több vvt transzfúziót 1 óra alatt. A beteg vérképértékei kritikus állapotot jeleztek (Hb < 4 g/dl, Htc 11,8%). Összesen 6 egység vörösvérsejt-koncentrátumot, 6 egység friss fagyasztott plazmát (FFP) és 6 egység trombocitát kapott, kiegészítve 3 g fibrinogénnel és 1000 IU protrombin komplex koncentráttal. A hipotensio elkerülésére folyamatos epinefrin adás történt. A bal alsó végtag amputációját sebészileg fejezték be, majd az intenzív osztályra helyezték.

A kilélegzett CH₄-szint mérése

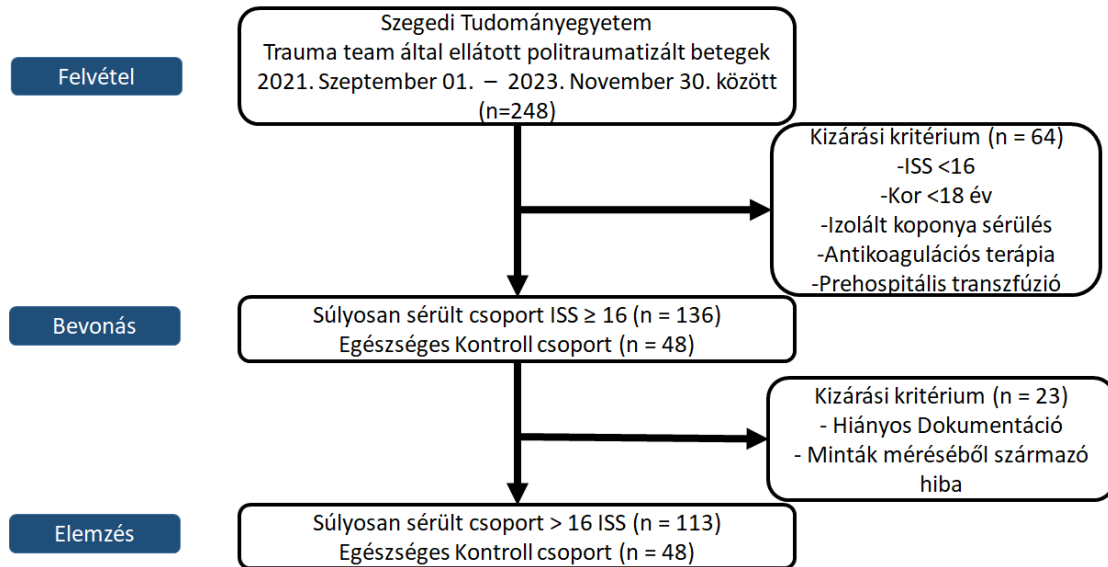
A hagyományos diagnosztikai eszközök (VS, laboratóriumi vizsgálatok, vérgázelemzések, szonográfia, CT-képealkotás) mellett az ellátás első 4 órájában folyamatosan mértük a beteg kilélegzett CH₄-koncentrációját. A humán vizsgálataink során már használt, közeli infravörös lézertechnikán alapuló PAS-készüléket csatlakoztattuk a lélegeztetőgép kilégzési nyílásához, lehetővé téve ezzel a kilélegzett CH₄ folyamatos nyomon követését[179]. A háttérlevegő CH₄-koncentrációját ugyanezzel a technikával mértük.

4.3.5 Mitokondriális diszfunkció trauma-indukált koagulopátiában

A Szegedi Tudományegyetem Traumatológiai Klinikáján (I. szintű trauma központ) prospektív, obszervációs vizsgálatot végeztünk, amelynek célja a TIC során előforduló trombocita mitokondriális diszfunkció vizsgálata volt súlyosan sérült betegek körében. A kutatás regisztrációja a ClinicalTrials.gov oldalon NCT05004844 azonosítószámmal megtörtént, részletes protokollját pedig munkacsoportunk publikálta [116].

Betegbevonási szempontok

A vizsgálat a Szegedi Tudományegyetem Sürgősségi Osztályára 2021. szeptember 1. és 2023. november 30. között, traumás anamnézissel közvetlenül szállított, ≥ 18 éves, CT-vizsgálattal igazolt vérző, súlyosan sérült (ISS ≥ 16) betegek bevonásával zajlott. A ciklooxygenáz-1 vagy adenozin-difoszfát (ADP) receptor (P2Y₁₂) gátlót (aszpirin, klopido-grél, prasugrel és ticagrelor) tartalmazó orális trombocita-gátló szereket szedő betegeket kizártuk a végső elemzésből (17. ábra).



17. ábra. A betegek kiválasztását bemutató ábra. 2021. szeptember 1. és 2023. november 31. között 248 traumás beteget vettek fel akiket a trauma team aktiválásával regisztráltak. A ≥ 18 éves, $ISS \geq 16$ betegek, akiknél vérzés nem igazolódott, az orális antikoagulánsokat szedők, izolált fejsérültek és azok akik transzfúziót kaptak érkezésük előtt, kizárási kritériumokra kerültek. Összesen 136 beteg teljesítette a bevonási kritériumokat, közülük a nem teljes betegdokumentációval rendelkező betegek kizárási kritériumokra kerültek. Kizárási kritériumokra kerültek a hiányos dokumentációval rendelkező betegek kizárási kritériumokra kerültek. Összesen 113 beteget vontunk be a vizsgálatba. Kontrollként véletlenszerűen kiválasztásra került 48 beteg, akiket kisebb, elektív ortopédiai műtétre vettek fel. Az esetükben ugyanazokat a kizárási kritériumokat alkalmazták a traumás esemény kivételével. ISS, sérülés súlyossági pontszám.

Vizsgált paraméterek

A résztvevők demográfiai adatait és társbetegségeit ideális esetben a felvételnél dokumentáltuk. A beteg megérkezésekor hagyományos laboratóriumi vizsgálatokat végeztünk, beleértve a Hb, Ht, trombocitaszám, aktivált parciális tromboplastin idő (aPTT), protrombin idő (PT) és nemzetközi normalizált arány (INR) vizsgálatát. A belső vérzések kimutatására eFAST-ot és CT-vizsgálatot használtunk. Viszkoelasztikus vizsgálatokat (ClotPro, Enicor GmbH, Munich, Germany) és aggregometriát végzünk a koagulopátia értékelésére. Az MBT-t és a 24 órás mortalitást dokumentáltuk.

Viszkoelasztometriai vizsgálatok

A viszkoelasztometriai vizsgálatokhoz a vénás vért 3,2%-os pufferelt nátrium-citrát csövekbe gyűjtötték, és 30 percen belül egy új generációs ClotPro viszkoelasztometriai analizátorral (Enicor GmbH, München, Németország) elemeztük az EX-teszt és a FIB-teszt (standard ClotPro vizsgálatok) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően. Az EX-tesztben (extrinsically activated test) az extrinsic koagulációs útvonalat vizsgáltuk, amelyet szöveti

faktorról aktiválunk és CaCl_2 -vel rekalcinálunk. A fibrinogénszintet és a fibrin-polimerizációt FIB-teszttel (fibrinogen assay) is nyomon követtük, amely az extrinsic koagulációs útvonalat a trombociták citokalazin D-vel, egy glikoprotein IIb-IIIa antagonistával történő gátlásával ábrázolja. A ClotPro által szolgáltatott numerikus paraméterek közé tartozott a véralvadási idő (CT, clotting time), a maximális alvadásszilárdság (MCF) és a maximális lízis (ML).

Aggregációs vizsgálat

A vizsgálathoz multiplate impedancia aggregométert (Multiplate 5.0 Analyzer, Roche, Magyarország) használtunk, amely kvantitatív és kvalitatív információt szolgáltat a trombocita funkcióról antikoagulált teljes vérmintákban. A vizsgálatokat 300 ml teljes vér 300 ml 0,9%-os nátrium-kloriddal történő 3 perces inkubálásával indítottuk el. Ezután 20 μl adozin-difoszfát (ADP, 6,5 μM) vagy arachidonsav (ASPI, 0,5 mM) hozzáadásával vizsgálták a trombociták aggregációját, míg a nátrium-klorid (NaCl) kontrollként szolgált. A thrombocytaaggregációt AU-ban (aggregációs egységekben) mértük, és értékét a görbe alatti terület (AUC) adja meg, amelyet az aggregációs görbe magassága és meredeksége határoz meg [180]

Mitokondriális funkcionális mérések HRR-el

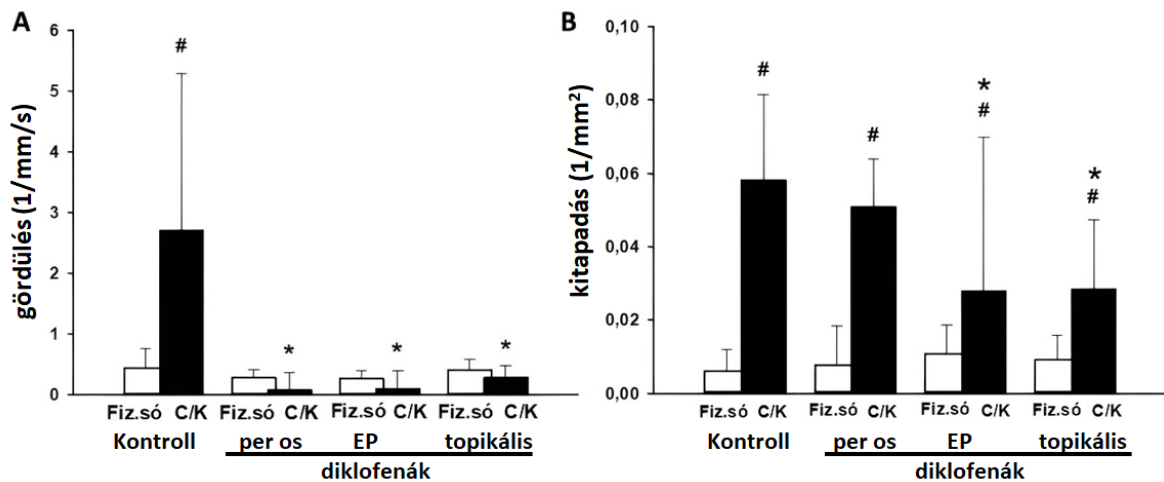
A trombocitákat közvetlenül a beteg érkezésekor vett 4x6 ml-es csövekbe gyűjtött nátrium-citrátos vénás vérmintákból izoláltuk. A vérmintákat először 4 °C-on 15 percig 300 g-vel centrifugáltuk, majd az így kapott trombocitákban gazdag plazmát (PRP) 5 percig 4600 g-vel újra centrifugáltuk. A felülúszót 200 μl MIR05 respirációs médiummal helyettesítettük [181]. Ezt követően 50-50 μl trombocita szuszpenziót a HRR kamráiba mérve egy korábbi kísérletünk során felállított permeabilizációs titrálási protokollt alkalmaztunk, hogy megállapítsuk a mérések során alkalmazott digitonin koncentrációját [69]. A trombociták permeabilizálását követően a mitokondriális légzés hatékonyságát HRR-el vizsgáltuk korábbi kísérletünkben már alkalmazott kapcsoltsági protokoll szerint [182]. Vizsgáltuk továbbá a trombocita mitokondriumok H_2O_2 termelését [182], a $\Delta\Psi\text{m}$ változását, valamint az extramitokondriális Ca^{2+} mozgást, szintén korábbi kísérleteinkben felállított protokollal [183].

5 EREDMÉNYEK

5.1 Mikrokeringés változása gyulladásos modellekben

5.1.1. Szinoviális mikrokeringés akut artritiszben.

Az ízületi gyulladás mikrokeringési következményeit a PMN-endoteliális kölcsönhatások (gördülés és kitapadás) számszerűsítésével határoztuk meg a szinoviális membrán posztkapilláris vénáiban. Kezelésként az ismert nem-szteroid gyulladáscsökkentő diklofenákot alkalmaztuk különböző beviteli formában. A PMN-ek gördülő frakciója a posztkapilláris szinoviális venulákban megnőtt az arthritisztes térdekben, de nagyfokú szórást mutatott, és nem volt megfigyelhető különbség a C/K- és a kontralateralis fiziológiás sóoldattal injektált térdek között a kezelési protokollokban részt vevő csoportok között (18. ábra). A C/K injekciózást azonban a PMN-ek endotél réteghez való tapadásának (kitapadás) statisztikailag szignifikáns növekedése kísérte a kontralateralis oldalhoz képest minden csoportban. Ez a reakció jelentősen csökkent az EP-val felerősített diklofenák-hidrogél és a topikális hidrogél egyszerű helyi alkalmazására adott válaszreakcióban (18. ábra).



18. ábra. A diklofenák-kezelések hatása a gördülő (A) és kitapadó (B) leukociták számára a szinoviális membrán posztkapilláris vénáiban. C/K-val injektált térdek (fekete oszlopok), kontralateralis térdek sóoldatos hordozóanyaggal kezelve (fehér oszlopok). Az adatokat átlag \pm SD ábrázoltuk. # $P \leq 0,05$ vs. Kontralateralis, fiziológiás sóval oltott végtag; * $P \leq 0,05$ vs. Kontroll C/K oltott (kétirányú ANOVA és Holm-Sidak teszt). C/K, karragén/kaolin; SD, szórás.

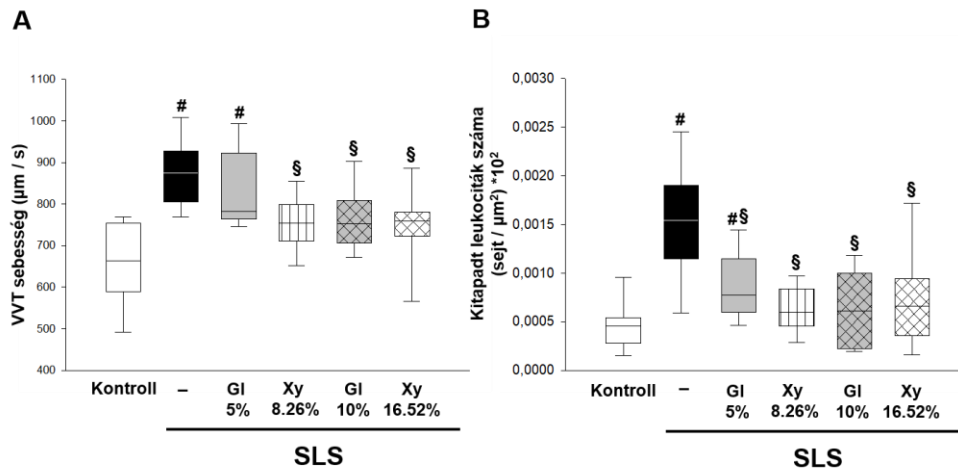
5.1.2. Bőr mikrokeringése bőrirritációban és sebgyógyulásban

A mikrokeringést a bőrredő nem sérült (ép, teljes vastag bőrfelület) és sérült oldalán is megvizsgáltuk IVM-el. Az előbbi helyen a dermisz dermoepidermális vonalhoz közeli ereit

lehetett láthatóvá tenni, míg az utóbbi helyen a bőr alatti harántcsíktolt izomréteg mikrokeringését lehetett vizsgálni. Az RBCV értékei (átlag \pm SD) a következők voltak: $502 \pm 204 \mu\text{m/s}$ ép bőrön és $595 \pm 266 \mu\text{m/s}$ a bőrseb felől. A statisztikai elemzés nem mutatott szignifikáns különbséget az oldalak között. Az adatok azonban nagy szórást mutattak: az ép bőr esetében a minimális és maximális értékek 178 és $957 \mu\text{m/s}$, míg a bőrseb oldalán 225 és $1061 \mu\text{m/s}$ között mozogtak. A másik vizsgált paraméter a PR volt. Mindkét oldalon magas PR-értékeket mértek (ép bőr: $91,41 \pm 2,24$; bőrseb: $91,34 \pm 4,08$), és az oldalak között nem volt szignifikáns különbség.

Bőr mikrokeringése bőriritációban

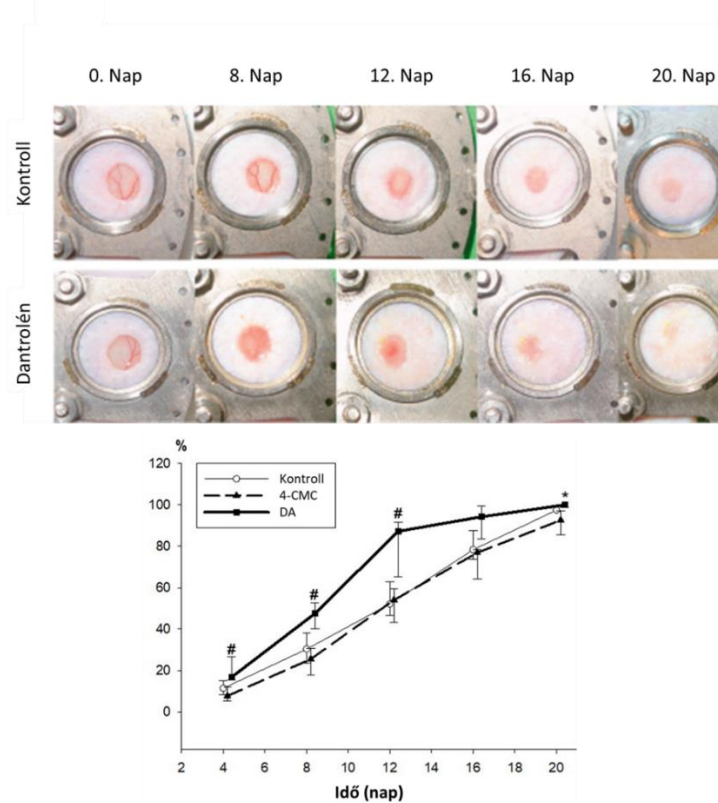
Az SLS által kiváltott bőriritációs modellben a kontrollcsoport kapillárisaiban az RBCV medián értéke $663 \mu\text{m/s}$ volt. Az SLS okozta gyulladás jelentősen fokozta a helyi véráramlást. Hasonlóan magas RBCV-értékeket mértünk a 3. csoportban is, amelyet 5%-os glicerinnel kezeltünk. Ezzel szemben a 10%-os glicerinnel és a xilit mindkét alkalmazott koncentrációban hatékonyan megakadályozta az RBCV emelkedését (19A. ábra). A 19B. ábra a leukocita-endotél interakciók mennyiségét mutatja a különböző csoportokban. A kontrollcsoportban viszonylag kevés kitapadt leukocitát észleltünk. Az SLS-kezelt csoportot szignifikánsan több leukocita-endotél interakció jellemzi. Bár az 5%-os glicerinnel csökkentette a leukociták tapadását az SLS-sel kezelt csoporthoz képest, a kölcsönhatások száma magasabb volt, mint a kontrollcsoportban. A 8,26%-os és 16,52%-os xilit, valamint a 10%-os glicerinnel hatékonyan akadályozta meg a leukocita-endotél interakciókat: a tapadó leukociták száma ezekben a csoportokban nem különbözött szignifikánsan a kontrollcsoporttól.



19. ábra. (A) Vörösvérsejtek (VVT) sebessége a bőrcapillárisokban 3 órás kezelés után a csoportokban. Az értékek µm/s-ban vannak megadva. (B) A kitapadt leukociták száma a dermális posztkapilláris vénákban 3 órás kezelés után. A sejtszámok az érfal területére vonatkoznak, és sejt/µm²-ben vannak megadva. A grafikonok a mediánt mutatják 25. és 75. perzentilisekkel. #P ≤ 0,05 vs. kontroll, §P ≤ 0,05 vs. SLS-kezelt csoport. A csoportok közötti különbséget Kruskal–Wallis-féle egyszempontos rangvariancia-analízissel elemeztük, amelyet a Dunn-módszerrel végzett páronkénti többes összehasonlítás követett. SLS: nátrium-lauril-szulfát, GI: glicerin, Xy: xilit.

Bőr mikrokeringése sebgyógyulásban

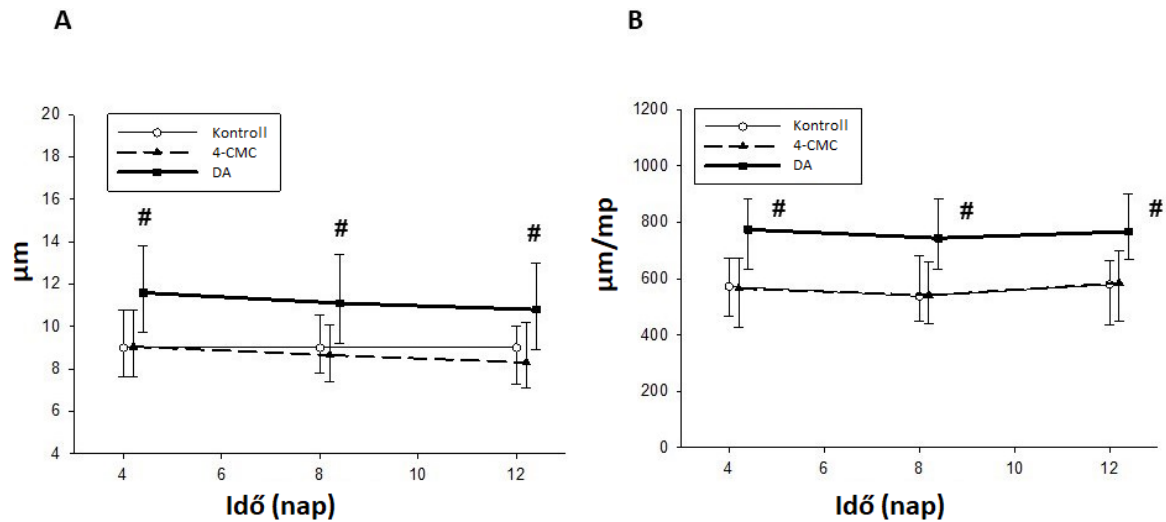
A seb területének digitális képeken végzett planimetrius elemzése folyamatos növekedést mutatott a hámosodásban, a 4. napon körülbelül 20%-os sebfedettséggel, a 8. napon 50%-kal, a 12. napon pedig 80%-kal a DA-val kezelt csoportban (20. ábra). A kísérlet végén, a 20. napon a Ca²⁺-antagonistával kezelt sebek mindegyike teljes sebzáródást ért el, míg a 4 CMC-vel kezelt állatoké nem.



20. ábra. Sebgyógyulás vizsgálata DA-val, 4-CMC-vel vagy sóoldattal történő kezelés hatására. SKH-1 egerek hátán teljes vastagságú, kimetszett bőrszöveteket hoztunk létre, amelyeket naponta kezeltünk, és négy naponként digitális fényképet készítettünk (n=6-6). A felső képen a kontroll és a dantrolén csoportok összehasonlítása látható, amelyből megfigyelhető, hogy a Dantrolén elősegítette a sebgyógyulást. Az alsó grafikon a sebzáródás mértékét százalékos formában mutatja, a sebtérület csökkenését a kiindulási (0. napi) mérethez viszonyítva. #P ≤ 0,05 vs. kontroll, *P ≤ 0,05 vs. 4-CMC. A csoportok közötti különbségeket Kruskal–Wallis-féle egyszempontos rangvariancia-analízissel elemeztük, amelyet Dunn-módszerrel végzett páronkénti többes összehasonlítás követett. 4-CMC: 4-klór-m-krezol, DA: dantrolén

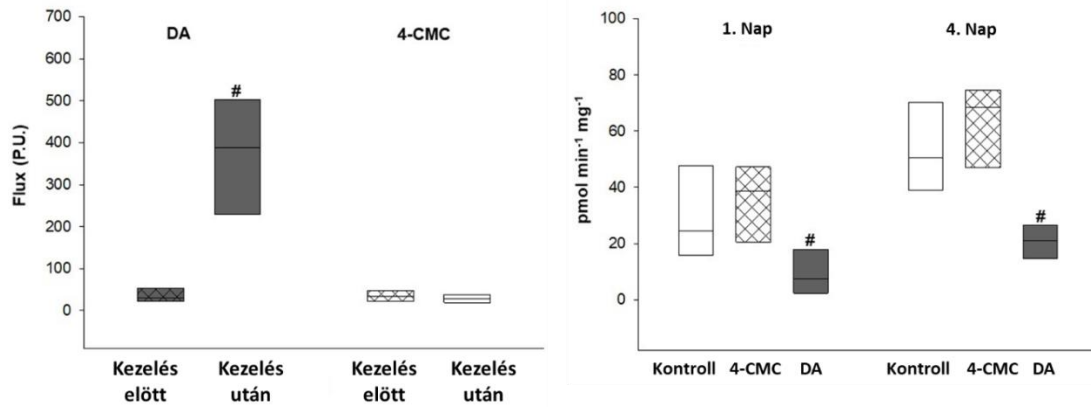
Az IVM-videófelvételek elemzése kimutatta, hogy az érátmérők nem változtak a 4-CMC és a kontrollcsoportban a megfigyelési időszak alatt, míg a Ca²⁺-csatorna-antagonista a 4. napon 25%-kal növelte az érátmérőket a kontrollcsoportéhoz képest. Ez a jelentős különbség a 8. napon (17%) és a 12. napon (22%) is megfigyelhető volt (21A. ábra).

Az is kiderült, hogy az RyR-ok gátlása a mérések minden időpontjában kb. 25%-kal növelte a vörösvértetek sebességét a kapillárisokban, míg a 4-CMC és a kontrollcsoport között nem volt különbség (21B. ábra).



21. ábra. A mikrokeringés IVM vizsgálata DA-val, 4-CMC-vel vagy sóoldattal történő sebkezelés hatására. A mikrokeringési paramétereket a háti bőrredőben lévő, fluoreszcein-izotiocianát-jelölt dextransal perfundált erekből határoztuk meg. (A) Az erek átmérője (μm) a regeneráció során a sebzés utáni 4., 8. és 12. napon a DA-val kezelt egereknél jelentős növekedését mutat a kontrollcsoportéhoz képest. (B) A kalciumantagonistával kezelt egerek mikroereiben a vörösvértestek sebessége elérte a $800 \mu\text{m}/\text{sec}$ -ot, ami jelentősen különbözik a kontrollcsoport értékeihez képest. $\#P \leq 0,05$ vs. kontroll, $n=6-6$. A csoportok közötti különbséget Kruskal-Wallis-féle egyszempontos rangvariancia-analízissel elemeztük, amelyet a Dunn-módszerrel végzett páronkénti többes összehasonlítás követett. 4-CMC: 4-klór-m-krezol, DA: dantrolén.

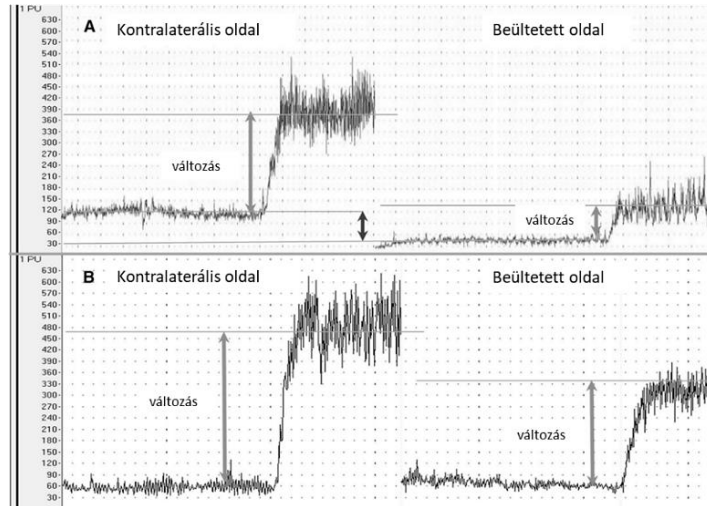
A lézer-Doppler-áramlásmérés eredményei megerősítették az IVM-ből nyert adatokat. Az áramlási görbék a véráramlás konzisztens, szignifikáns növekedését mutatták a kiindulási szintről a kezelés utáni szintre, átlagosan 15-szörös növekedéssel a DA-val kezelt csoportban (22A. ábra). Az MPO-aktivitást, a gyulladásos sejtek felhalmozódásának általánosan használt indexét a sebgyógyulás gyulladásos fázisában, a sebzés utáni első és negyedik napon mértük. Eredményeink szerint nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között (az adatok nem láthatóak). Ezzel szemben a ROS-termelés kritikus forrását jelentő XOR-aktivitás jelentős csökkenését figyeltük meg a DA-val kezelt csoportban az első és a negyedik napon a kontrollcsoportéhoz képest, míg a 4-CMC nem változtatta meg az enzimaktivitást (22B. ábra).



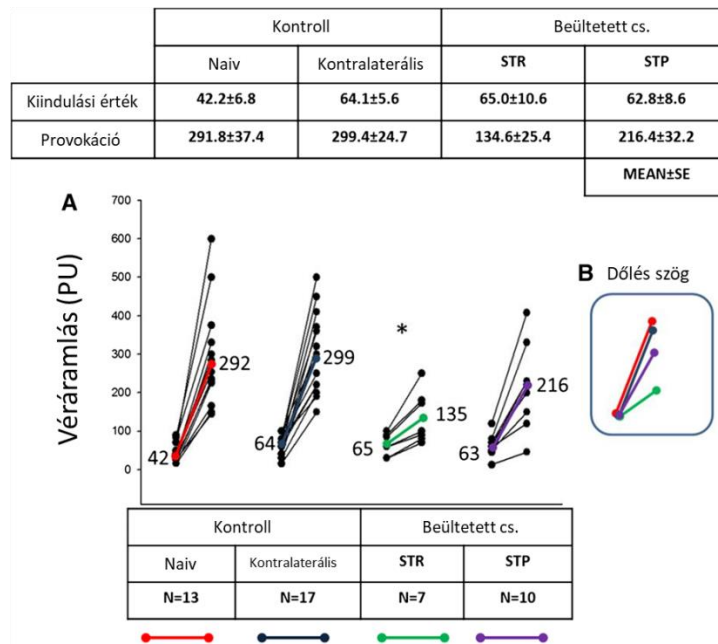
22. ábra. (A) A különböző kezelések véráramlásra gyakorolt hatásának vizsgálata LDF-fel, a sebkezelés előtt és után DA-val, 4-CMC-vel vagy sóoldattal kezelt egerekben. A kalciumantagonista DA-val kezelt egerek véráramlása a kezelés után 10 perccel 200 és 500 P.U. között mozgott, ami szignifikánsan eltért a kiindulási értékektől (20–30 P.U.). #: $p < 0,05$ a kezelés előtti értékekhez viszonyítva, $n=6-6$. (B) A XOR-aktivitás meghatározása a bőrsebben. A mintavétel a seb kialakítását követően az 1. és a 4. napon történt. Az állatokat naponta egyszer kezeltük 4-CMC-vel (0,5 mM, pH=6,5), DA-val (100 μ M, pH=7,1) vagy sóoldattal (kontroll). A kontrollcsoporthoz képest a DA a sebgyógyulás gyulladásos fázisában szignifikánsan csökkentette a XOR-aktivitást a szövetben. # $P \leq 0,05$ vs. kontroll, $n=6-6$. A csoportok közötti különbséget Kruskal–Wallis-féle egyszempontos rangvariancia-analízissel elemeztük, amelyet a Dunn-módszerrel végzett páronkénti többes összehasonlítás követett. 4-CMC: 4-klór-m-krezol, DA: dantróln.

Bőr mikrokeringése szövetbarát implantátum közelében

Az LDF-el a helyi hőprovokációval kombinálva a bőr mikrocirkulációjának provokáció utáni tartalékkapacitás-funkcióját becsültük meg betegenként. Az eredeti regisztrátumon látható, hogy izoterm körülmények között az alapvonal véráramlás minden beültetett csoportban stabil maradt (az átlagok 63 és 65 PU között változtak) (23. ábra). A jellegzetes áramlási görbék azonban a véráramlásnak a kiindulási szintről a hőprovokáció utáni szintre történő következetes, szignifikáns növekedését mutatták minden csoportban (24. ábra).



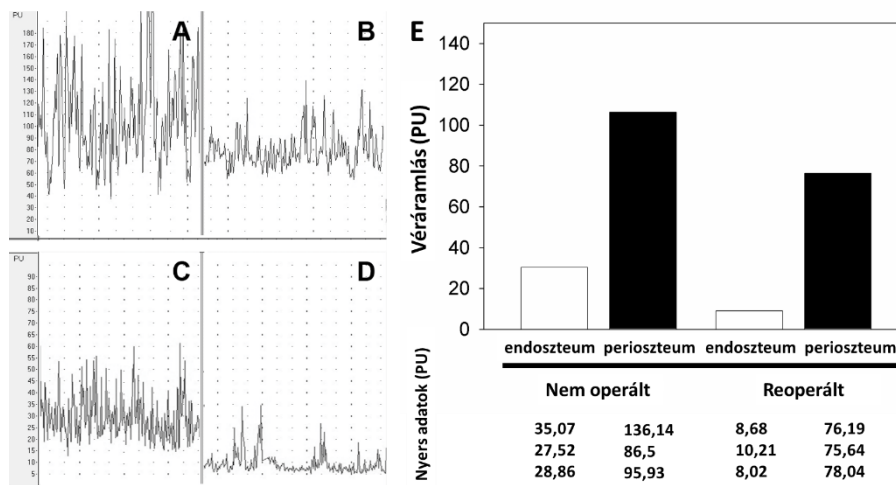
23. ábra. Két beteg reprezentatív LDF regisztrátumai különböző műtéti beavatkozások hatására. A görbék a bőr mikrovaszkuláris rezerv kapacitását mutatják a kiindulási értéken és a hőprovokációt követően, hagyományos STR (A) és az STP (B) műtéti technika után, valamint a kontralaterális oldalon. Kék kettős nyíl az A. betegnél a jelentősen csökkent mikrokeringési alapállapotot jelzi az implantált régióban a kontralaterális retroaurikuláris régióhoz képest.



24. ábra. A pontdiagram az egyén bőrének véráramlás (PU-ban megadva) változását ábrázolja a hőprovokációt követően. (A) Az összekapcsolt pontok a melegítés előtti és utáni perfúziós egységeket jelölik minden alany esetében. Az összekötő vonalak mutatják a megfelelő párokat. A szaggatott vonalak az átlagos hőprovokációt követő eredményt ábrázolják a csoportokban (B) Az ábra az átlagos csoportos PU-gradienseket és a jelentősen csökkent reakciót mutatja az STR csoport esetében a többi csoporthoz képest (csillag). Alsó táblázat: Átlagos kiindulási és hőprovokáció utáni véráramlási értékek a különböző csoportokban. Az adatok ábrázolása átlag ± SEM. Nincs szignifikáns különbség a kiindulási értékekben a különböző csoportok között.

5.1.3 A perioszteum és endoszteum keringése kiterjedt oszteosztézist követően

A kontralaterális, nem operált végtaghoz képest (25A. ábra) a reoperált tibia perioszteumában (25B. ábra) lényegesen alacsonyabb perioszteális áramlás értékeket mértünk (átlagosan 106 PU, illetve 76PU) (25E. ábra). Az endoszteum közelében nagymértékben alacsonyabb perfúzió volt megfigyelhető; a nem operált tibiában azonban átlagosan 30 PU endoszteális perfúziót találtunk (25C. ábra). A reoperált tibia endoszteális régiójában még alacsonyabb perfúziós szintet mértünk (átlagosan 9 PU; 25D. ábra), még a jellegzetesen jó jelminőség mellett is (25E. ábra).



25. ábra. A lézer-Doppler áramlásmérés felvételei a perioszteális (A és B) és endoszteális régiókról (C és D) a nem operált (A és C) és az operált (B és D) tibiában. A fenti kompartmentek perfúziójával kapcsolatos adatokat az (E) rész tartalmazza.

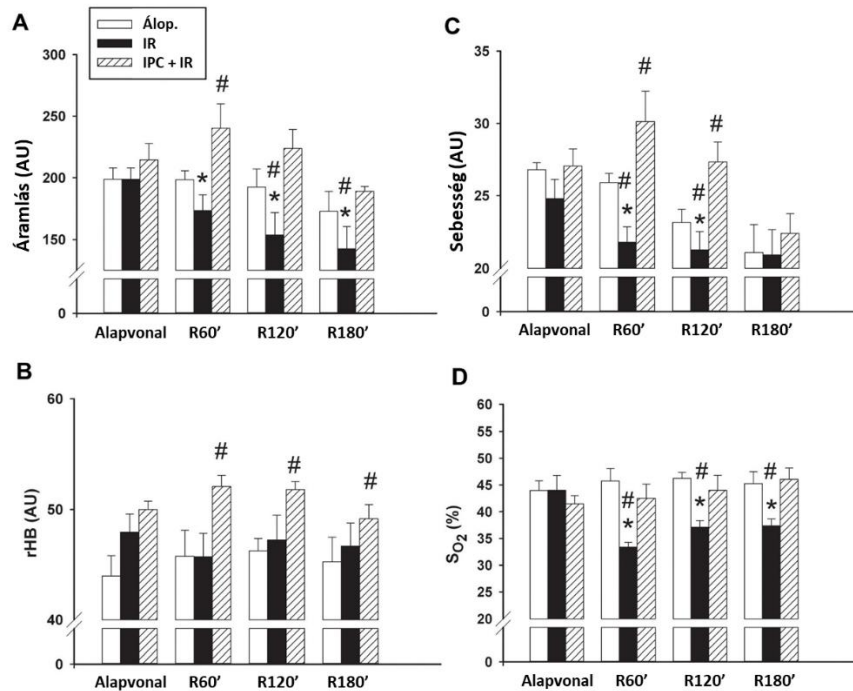
5.1.4 A távoli iszkémiás prekondicionálás és a L- α -glicerilfoszforilkolin hatása a máj iszkémia-reperfúziós mikrokeringésére

5.1.4.1 A távoli iszkémiás prekondicionálás hatása a mikrokeringésére

O₂C mérések

A mérések során a mikrohemodinamikai paraméterek, a kapilláris véráramlás, RBCV, SO₂ és rHb-tartalom egyidejű meghatározása történt a bal májlebenyben (26. ábra). A 60 perces iszkémiát követő reperfúzió nem járt a májon belüli véráramlás szignifikáns változásával az Áloperált csoporthoz képest. Ha azonban az IR-t távoli IPC előzte meg, akkor a posztischemiás máj véráramlás szignifikánsan magasabb volt, mint az iszkémiát megelőző értékek az egész vizsgálati időszakban. Az IR csoportban a RBCV szignifikánsan alacsonyabb volt a reperfúzió során az iszkémiát megelőző értékekhez képest, és a vizsgálati

időszak alatt nem volt megfigyelhető helyreállítás (26B. ábra). A távoli IPC azonban visszafordította az RBCV-változásokat a Áloperált csoportban mért szintre. Összességében a 60 perces részleges iszkémia által okozott áramlási és sebességváltozások a szöveti SO_2 és rHb szintek romlásában nyilvánultak meg, amelyeket a távoli IPC protokoll helyreállított (26C., D. ábra).

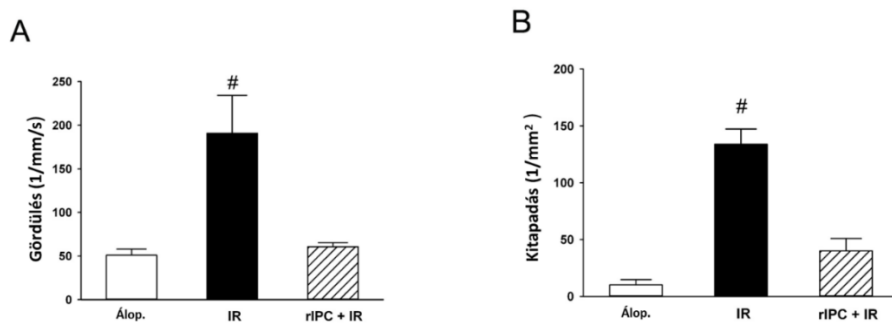


26. ábra. A hepaticus mikrokeringési paraméterek változásai. Hím Sprague Dawley patkányokon áloperációt végeztek (Álop. csoport, fehér oszlopok), vagy 60 perces részleges hepaticus iszkémia, majd 180 perces reperfúzió következett (IR csoport, fekete oszlopok), vagy 2 ciklus 10 perces teljes hátsó végtag iszkémia, majd 10 perces reperfúziós időszakot alkalmaztak prekondicionáló triggerként a máj iszkémia előtt (távoli IPC+IR csoport, csíkos oszlopok). A mérési időpontok a reperfúzió 60., 120. és 180. percében történtek. (A) Kapilláris véráramlás (önkényes egységben, AU-ban megadva), (B) sebesség a kapillárisokban (RBCV, AU-ban megadva), (C) szöveti oxigéntelítettség (SO_2 , %-ban megadva), (D) szöveti hemoglobin (rHb, AU-ban megadva). Az adatokat átlag \pm SEM ábrázoltuk. * $P \leq 0,05$ a kiindulási értékhez képest; # $P \leq 0,05$ az Áloperált csoporthoz képest (kétirányú ANOVA, Bonferroni-teszt).

IVM mérések

A szelektinmolekulák hiánya miatt a poszt-szinuszoidális endotéliumban a „klasszikus gördülés” nem volt megfigyelhető, azonban a gördülési jelenséget mutató PMN-ek száma továbbra is meghatározható volt a centrális vénákban. Máj-IR esetén a gördülő leukociták száma körülbelül négyszeresére növekedett az áloperált állatokhoz képest (27A. ábra). Ezzel összhangban a tapadó sejtek száma is jelentősen emelkedett a máj-IR-re adott válaszként

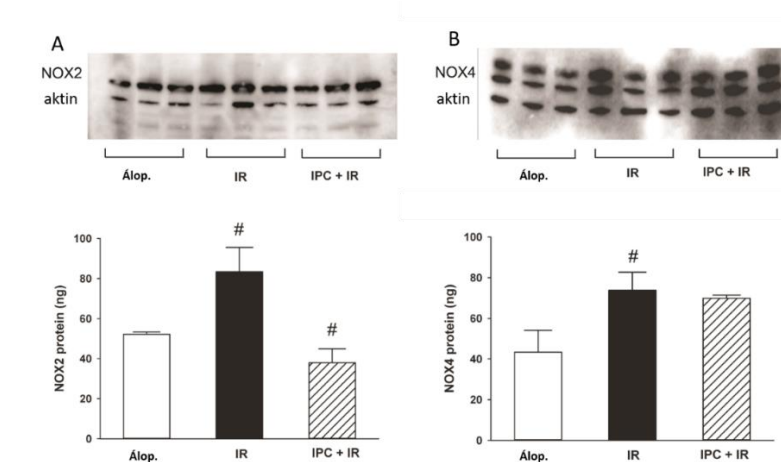
(27B. ábra). A távoli IPC mindkét sejt-sejt kölcsönhatás tekintetében jelentős javulást eredményezett.



27. ábra. A távoli IPC hatása a máj IR-károsodásában a PMN-endotél interakciókra (A) A gördülő PMN-ek száma a máj központi vénáiban (gördülés, mm⁻¹ s⁻¹ -ben megadva). (B) a kitapadó PMN-ek száma (kitapadás, mm⁻²-ben megadva). Az adatok átlag ± SEM értékben vannak feltüntetve. [#]P ≤ 0,05 vs. Áloperált csoporthoz képest (egyirányú ANOVA, Holm-Sidak-teszt).

NOX2 és NOX4 fehérje expresszió

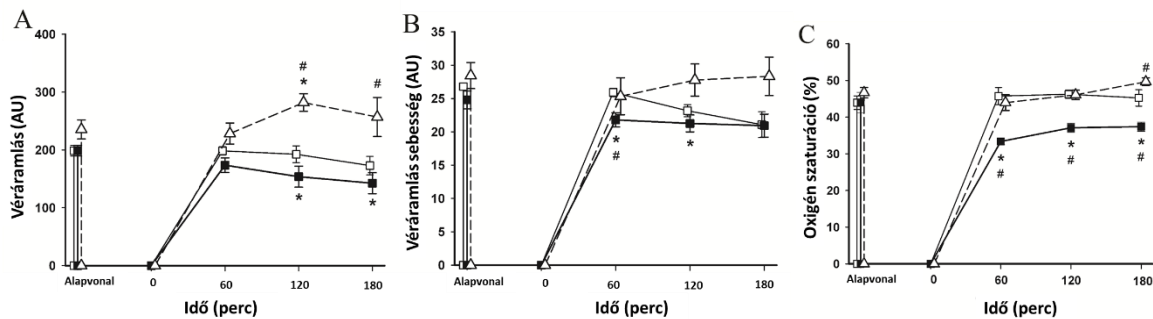
A NOX2 és NOX4 fehérjék Western blot analízise jelentős növekedést mutatott a részleges máj IR után az Áloperált állatokhoz képest. A távoli IPC alkalmazása az IR előtt szignifikánsan csökkentette az NOX2 expresszióját (28A. ábra), de nem befolyásolta az NOX4 expressziójának szintjét (28B. ábra). A következtetés tehát az, hogy az IR szignifikánsan növeli a NOX2 expresszióját, viszont az IPC hatékonyan csökkenti a fehérje szintjét, ami arra utal, hogy az IPC védőhatást fejt ki a NOX2 okozta oxidatív stressz ellen. A NOX4-nél ez a hatás nem figyelhető meg, így valószínűleg más mechanizmussal okoz oxidatív stresszt.



28. ábra. A távoli IPC hatása a máj IR-károsodásában a NOX2 és NOX4 fehérjék hepatikus expressziójára. A. NOX2 expresszió; B. NOX4 expresszió. Az adatokat medián \pm SD-ben ábrázoljuk. # $P \leq 0,05$ vs. Álop.csoport (Mann-Whitney-teszt). SD: szórá

5.1.4.2 GPC hatása a máj mikrokeringésre iszkémia-reperfúzióban

A máj mikrocirkulációjának átfogó értékeléséhez a szöveti véráramlást, a RBCV-t és a SO_2 -t a bal májlebenyben egyszerre vizsgáltuk (29. ábra). A 60 perces iszkémiát követő reperfúziós fázis (IR + vivőanyag csoport) nem járt együtt a máj kapilláris véráramlásának szignifikáns változásával az Áloperált (Álop + vivőanyag) csoporthoz képest, míg a kapilláris véráramlás a reperfúzió 120 és 180 percében szignifikánsan alacsonyabb volt a kiindulási értéknél (29A. ábra), amikor a GPC-t 5 perccel az iszkémiás periódus vége előtt adtuk be (IR + GPC csoport). Az IR + vivőanyag csoportban az RBCV szignifikánsan alacsonyabb volt az iszkémiát megelőző értékhez képest a reperfúzió 60 és 120 percében, és jelentősen különbözött a vizsgált időszak 60 percében mért értéktől az Áloperált csoportban mért értéktől (29B. ábra). A GPC szignifikáns növekedést eredményezett 120 és 180 percben az áloperált csoportban mért szintekhez képest. Összességében a 60 perces részleges iszkémia által okozott áramlási és sebességváltozások a szöveti oxigénszaturáció romlásában nyilvánultak meg a vizsgálati időszak alatt (IR + vivőanyag csoport), amit a GPC adása teljesen megakadályozott (IR + GPC csoport; 29C. ábra).

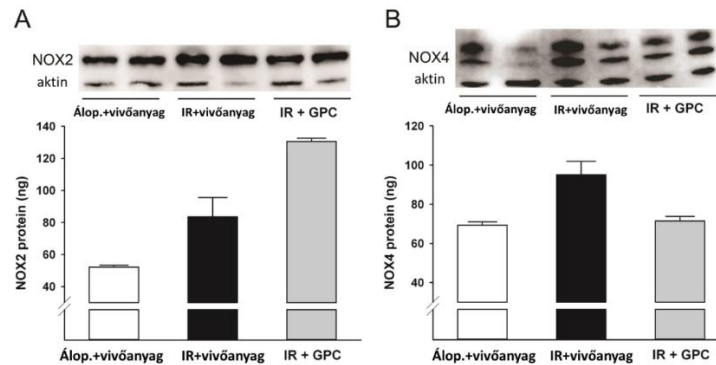


29. ábra. A mikrokeringési értékek változásai a bal májlebenyben 60 perc részleges máj iszkémia és 180 perc reperfúzió hatására. Hím Sprague Dawley patkányokat GPC-vel (50 mg/kg i.v.; 5 perccel az iszkémia vége előtt; szürke háromszögek) vagy hordozóval (fekete négyzetek) kezelték, illetve Al-operációt végeztünk rajtuk (fehér négyzetek). (A) Kapilláris véráramlás (Kapilláris véráramlás, önkényes egységekben megadva), (B) sebesség a kapillárisokban (Véráramlási sebesség, önkényes egységekben megadva), (C) szöveti oxigéntelítettség (SO_2 százalékban megadva). Az adatok átlag \pm az átlag standard hibája alapján vannak prezentálva. * $P \leq 0,05$ a kiindulási értékhez (Alapvonal) képest; # $P \leq 0,05$ az Alop. csoporthoz képest (kétirányú varianciaanalízis, Bonferroni-teszt).

NOX2 és NOX4 fehérje expresszió

A reperfúziós periódus végén mind a NOX2, mind a NOX4 fehérje expressziója emelkedett

a májszövetben (30A. és B. ábra). Amikor a GPC-t 5 perccel az iszkémiás periódus vége előtt adtuk be (IR + GPC csoport), az NOX4 expressziója csökkent, míg a NOX2 szintjében nem észleltünk változást.

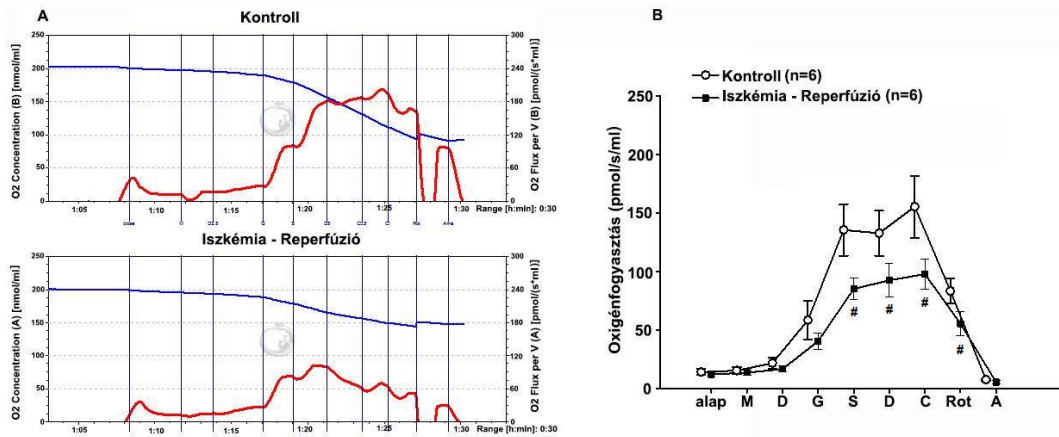


30. ábra. A NOX2 és NOX4 fehérjék expresszióját a májban Western blottal határoztuk meg 60 perces részleges máj iszkémia és 180 perces reperfúzió hatására. Az állatokat GPC-vel (50 mg/kg i.v. 5 perccel az iszkémia vége előtt; IR + GPC) vagy hordozóval (IR) kezelték, vagy Álóperációnak vetették alá (Álop.). (A) NOX2 expresszió; (B) NOX4 expresszió. Az adatok átlag \pm az átlag standard hibája alapján ábrázoltuk.

5.2 Mitokondriális diszfunkció

5.2.1 Mitokondriális diszfunkció máj meleg iszkémia-reperfúziós károsodásában

Az iszkémia/reperfúzió hatására jelentősen csökkent a légzési lánc kapacitása vagyis az elektron transzport hatékonysága, valamint szignifikánsan alacsonyabb OxPhos kapacitást észleltünk a kontroll csoporthoz képest ($12,7 \pm 6,2$ pmol/ml/sec-ről $8,6 \pm 2,8$ pmol/ml/sec-ra csökkent). A mitokondriumok kapcsoltsága romlott ($14,9 \pm 65,9$ pmol/ml/sec-ről $9,2 \pm 3,09$ pmol/ml/sec-ra), ami megnövekedett ROS termelődésre és membrán károsodására utal. A légzési komplexek szelektív vizsgálatával az iszkémia/reperfúzió alatt kialakuló elektron transzportlánc zavara mögötti oki tényezőként, az I-es komplex kiemelt szerepe igazolódott, a respiráció ($7,77 \pm 2,39$ pmol/ml/sec-ről $4,9 \pm 2,05$ pmol/ml/sec-ra) csökkent a kontrollhoz képest (31. ábra).

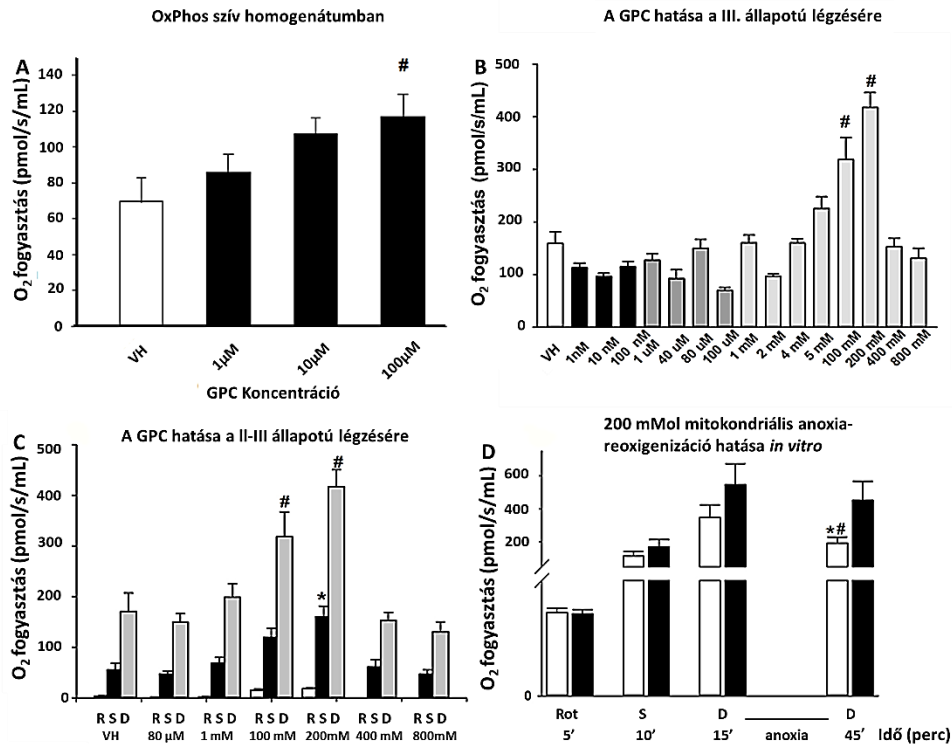


31. ábra. Iszkémia-reperfúzió során károsodott és áloperált, kontroll állat májmitokondriumainak respirációs aktivitása. (A): eredeti regisztrátumok és (B): SUIIT (szubsztrát-szétkapcsolószér-gátlószér) protokoll bemutatásával. Az adatokat átlag \pm SEM értékben adjuk meg. # $P \leq 0,05$ a kontroll csoporthoz képest (egyirányú ANOVA, Bonferroni-teszt). alap: alapvonal; M: malát; D: ADP; G: Glutamát; S: Szukcinát; C: karbonil cianid 3-klorofenilhidrazon (CCCP) szétkapcsolószér; Rot: Rotenon; A: Antimicin-A.

5.2.1.1 GPC kezelés hatása a máj iszkémia-reperfúziós károsodására

1. GPC mitokondriális hatásának dózis függése

In vitro kísérleteket végeztünk annak érdekében, hogy elemezzük a GPC dózis-válasz hatását a mitokondriumainak légzési aktivitására. NRMC mitokondriumokon a GPC dózisfüggő módon fokozta a mitokondriális légzést. A mitokondriumok komplex II-hez kötött OxPhos kapacitása szignifikánsan megnőtt, amikor 100 μ M GPC-t alkalmaztunk a respirometriát megelőzően a kezeletlen kontrollhoz képest (32A. ábra). Emiatt a patkánymáj mitokondriumain egy nagyságrenddel kisebb (nM-os) és nagyobb (mM-os) koncentrációtartományban vizsgáltuk a GPC hatását normoxiás és anoxiás körülmények között. A GPC fokozta a mitokondriumok oxigénfogyasztását az 5-200 mM koncentrációtartományokban (32B. ábra). A mitokondriumok ETC és OxPhos kapacitását szignifikánsan növelte, amikor a GPC-t 200 mM koncentrációban alkalmaztunk (32C. ábra). Ezenkívül a GPC jelentősen mérsékelte a 30 perces anoxia káros hatásait az izolált mitokondriumok oxigénfogyasztására (32D. ábra).

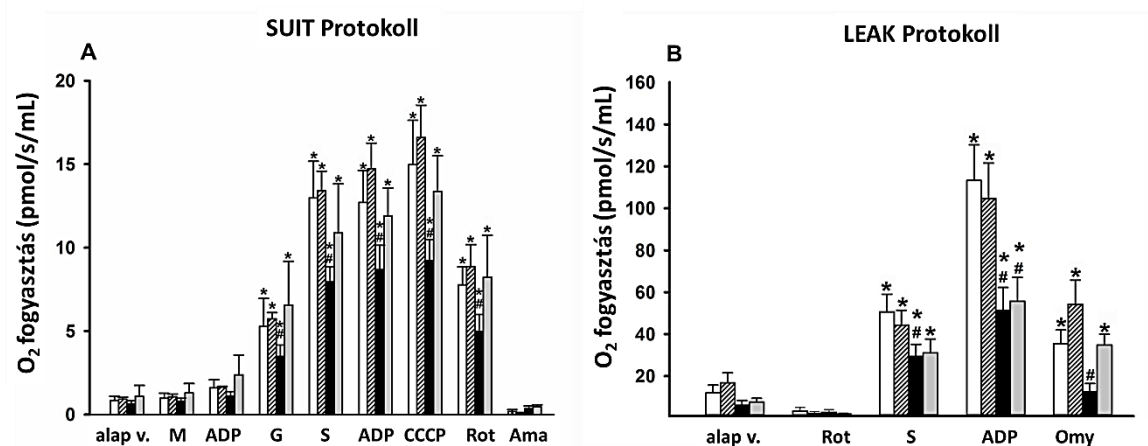


32. ábra. Különböző koncentrációban alkalmazott GPC hatására a mitokondriumok nagyfelbontású respirometriával mért oxigénfogyasztására (pmol/s/ml-ben). (A) Az oszlopok a különböző GPC-koncentrációk hatását mutatják NRMC-k oxidatív foszforilációjára. Az adatokat átlag ± SEM értékben adjuk meg. Az adatok statisztikai elemzését egyirányú ANOVA-val, majd Dunnett többszörös összehasonlító teszttel végeztük, #P ≤ 0,05 vs. VH. (B) A különböző GPC-koncentrációk hatása a máj mitokondriumainak oxidatív foszforilációjára. Az adatok átlagok ± SEM. #P ≤ 0,05 vs. VH csoport (egyirányú ANOVA, Holm-Sidak teszt). (C) A GPC hatása a II. és III. állapotú légzésre. Az adatokat átlagok ± SEM-ként ábrázoljuk. #P ≤ 0,05 vs VH II. állapot (fekete S oszlop); *P ≤ 0,05 vs VH csoport III. légzési állapot (szürke D oszlop) (egyirányú ANOVA, Holm-Sidak teszt). (D) 200 mM GPC hatása a mitokondriális anoxia-reoxigenizációra *in vitro*. A máj homogenátumait 30' anoxiának tettük ki 200 mM GPC jelenlétében (fekete oszlop: GPC csoport) vagy GPC előkezelés nélkül (fehér oszlop: VH csoport). Az adatokat átlag ± SEM értékben adtuk meg. #P ≤ 0,05 vs 5'; *P ≤ 0,05 vs VH csoport (kétirányú ANOVA, Bonferroni-teszt). VH: Vivőanyag; R: Rotenon; S: Szukcinát; D: ADP.

2. GPC kezelés *in vivo* hatása

A GPC IR által kiváltott mitokondriális diszfunkcióra gyakorolt hatását a SUIT és Leak protokollal vizsgáltuk (33A. ábra). A III. állapotú oxigénfogyasztás szignifikánsan alacsonyabb volt az IR-ben, mint az áloperált állatokban. Emellett a maximális légzési kapacitás is szignifikánsan alacsonyabb volt az IR stresszre adott válaszként. Ezzel szemben a GPC-vel történő kezelés fokozta az oxigénfogyasztás hatékonyságát. Ezek a hatások alapvetően az I. komplexhez, nem pedig a II. komplexhez kapcsolódtak, amint azt a komplex I. inhibitor beadását követő nagymértékű csökkenés is jelezte. A Leak protokoll (33B. ábra) az IR-sérülésre válaszul a IV. állapotú oxigénfogyasztás jelentős csökkenését mutatta az

áloperált állatokhoz képest. GPC beadása visszaállította az oxigénfogyasztás szintjét az álműtött állatokéra.



33. ábra. Patkány májmitokondriumok oxigénfogyasztása nagy felbontású respirometriával mérve (pmol/s/ml-ben). (A) SUIT protokoll. (B) Leak protokoll. Az állatokat 60 perc máj iszkémia, majd 60 perc reperfüziónak vetették alá (IR csoport, fekete oszlop), vagy áloperációt végeztek rajtuk (SH csoport, fehér oszlop). A 16,56 mg/kg GPC beadását 5 perccel az iszkémia vége előtt kezdtük el (IR+GPC csoport, szürke oszlop), vagy azonos időpontban az áloperált állatoknál (SH+GPC csoport, fehér csíkozott oszlop). Az adatok átlag \pm SEM értékben vannak feltüntetve. # $P \leq 0,05$ vs. SH csoport; * $P \leq 0,05$ vs. kiindulási érték (kétirányú ANOVA, Bonferroni-teszt). bsl: kiindulási érték; M: malát; D: ADP; G: Glutamát; S: Szukcinát; CCCP: az OxPhos kémiai inhibitora (uncoupler); Rot: Rotenone; Ama: Antimicin A; Omy: Olygomycin

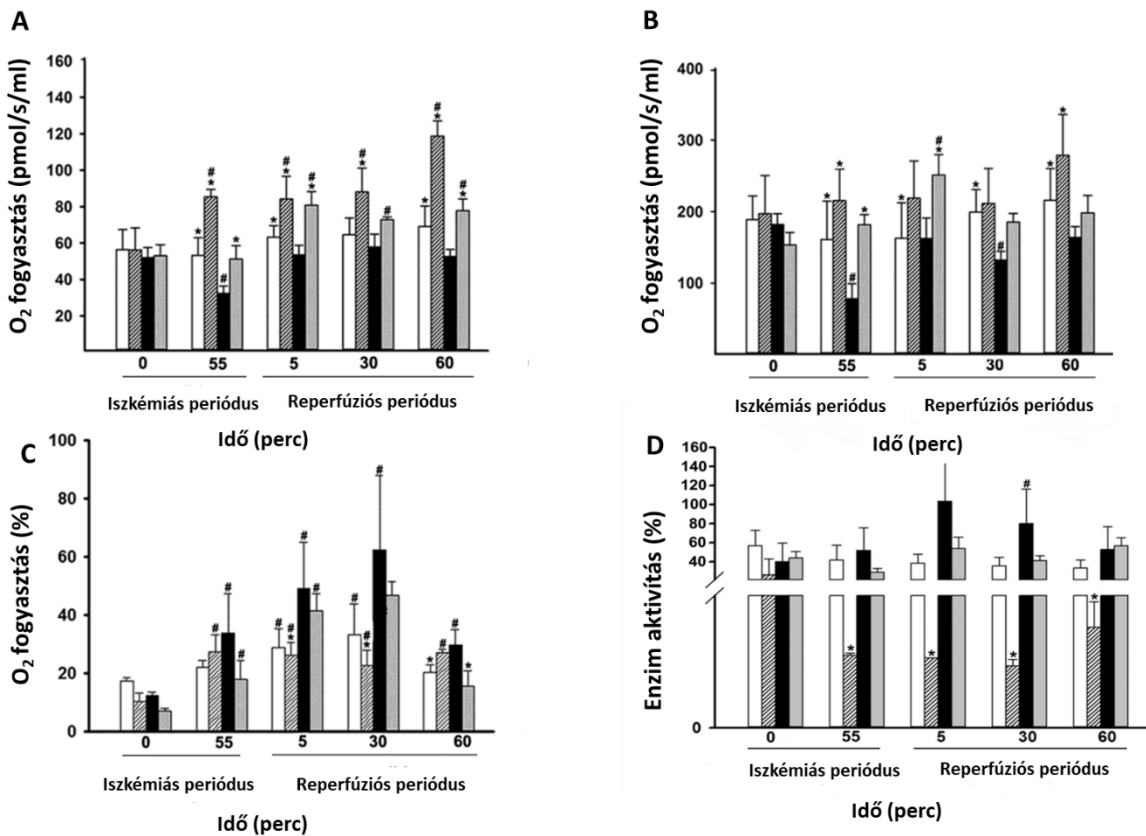
5.2.1.2 A CH₄ kezelés hatása

A mitokondriális légzési lánc hatékonyságát a CH₄-kezelésre adott válaszként májhomogenizátumokból származó alapprotokoll segítségével értékeltük. A komplex II-hez kötött légzési fluxus értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint az Álop. állatoké az iszkémia 55. percében és a reperfüzió 60. percében. Az IR által lecsökkent bazális fluxus a CH₄ kezelés hatására megfordult. Érdekes módon a CH₄-kezelés önmagában is (Álop. + CH₄) növelte az alap oxigénfogyasztást a megfigyelési időszakban (34A. ábra).

Az Áloperált csoporttal összehasonlítva az IR a mitokondriumok alacsonyabb OxPhos kapacitását (komplex II-kapcsolt III. állapotú légzés) eredményezte a vizsgálati periódus során. Ha azonban CH₄-inhalációt alkalmaztunk, a légzési kapacitás az iszkémia 55. percében és a reperfüzió 30. percében is megmaradt (34B. ábra).

A citokróm c hem-csoportja elektronokat továbbít a III-as komplexről a IV-es komplexre, a citoplazmába történő felszabadulása az apoptózissal hozható összefüggésbe. Az IR következményeként a belső mitokondriális membrán külső oldalához lazán kapcsolódó citokróm c enzim leválik, amit HRR során vizsgálhatunk exogén enzimmel történő pótlással.

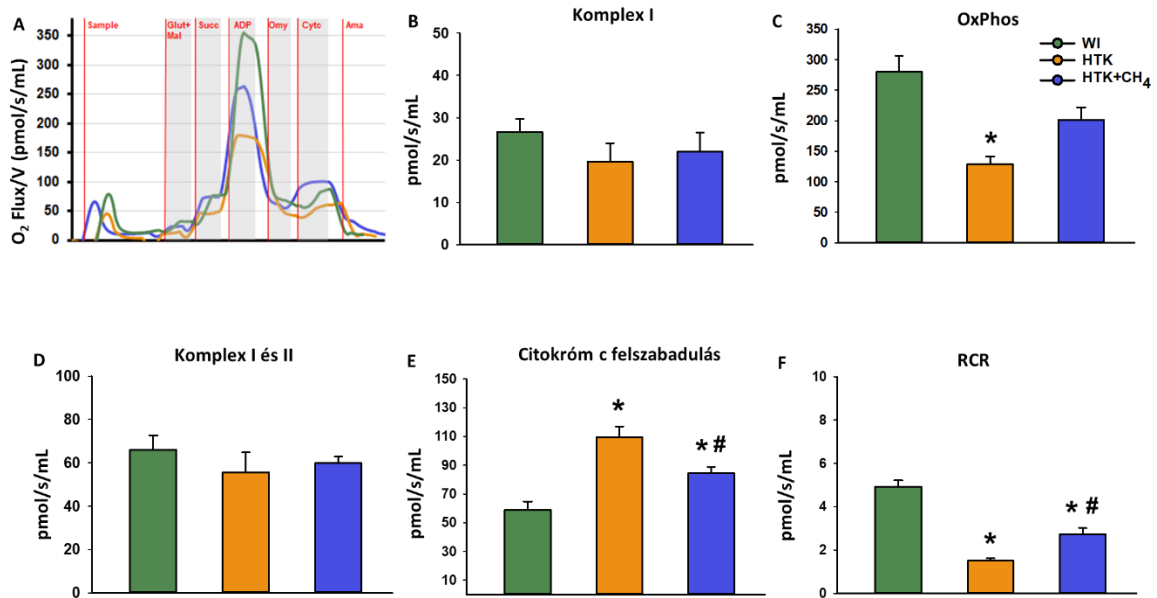
Meghatározható az úgynevezett citokróm c kontrollhatékonyaság, ami membránkárosodás esetén az exogén enzim hatására az oxigénfogyasztás növekedését jelzi (34C. ábra), amit a CH₄ kezelés visszaállított az alapszintre. A mitokondriális citokróm c oxidáz aktivitása szintén a mitokondriális membrán károsodásának indikátora, amit spektrofotometriás analízissel határoztunk meg (34D. ábra). Az Áloperált állatokban a citokróm c szint minimálisan emelkedett az alapvonalhoz képest a kísérleti protokoll alatt. Az Álop. + CH₄ csoportban az enzimaktivitás csökkent a CH₄ inhaláció hatására. Ezzel szemben az IR csoport szignifikánsan magasabb citokróm-c-oxidáz aktivitást mutatott a reperfúziós periódus alatt, ami a funkcionális állapot jele. Az IR + CH₄ csoportban a citokróm c aktivitás nem nőtt az IR által kiváltott károsodás hatására (34D. ábra).



34. ábra. Patkány májhomogenizátumok oxigénfogyasztása nagyfelbontású respirometriával mérve. Az állatokat 60 perces máj ischaemiának, majd 60 perces reperfúzióknak vetettük alá (IR csoport, fekete oszlop), vagy áloperált (SH csoport, fehér oszlop). A 2,2%-os CH₄ inhalációt 10 perccel az iszkémia vége előtt kezdtük és folytattuk a reperfúzió teljes időtartama alatt (IR+CH₄ csoport, szürke oszlop), vagy azonos időtartam alatt áloperált állatoknál (SH+CH₄ csoport, csíkos oszlop). (A) Alaplégzés (komplex II-kapcsolt állapotú II légzés) (pmol/s/ml-ben). (B) Oxidatív foszforiláció (komplex II-kapcsolt állapotú III légzés) (pmol/s/ml-ben). (C) Citokróm c helyettesítés (III. állapotú légzés, amelyet citokróm c táptalajhoz adunk) (a III. állapotú légzés %-ában). (D) Citokróm c oxidáz aktivitás (%). Az adatokat átlag ± SEM formában adjuk meg. #P ≤ 0,05 az alapvonalhoz képest; *P ≤ 0,05 vs IR csoport (kétirányú ANOVA, Bonferroni teszt).

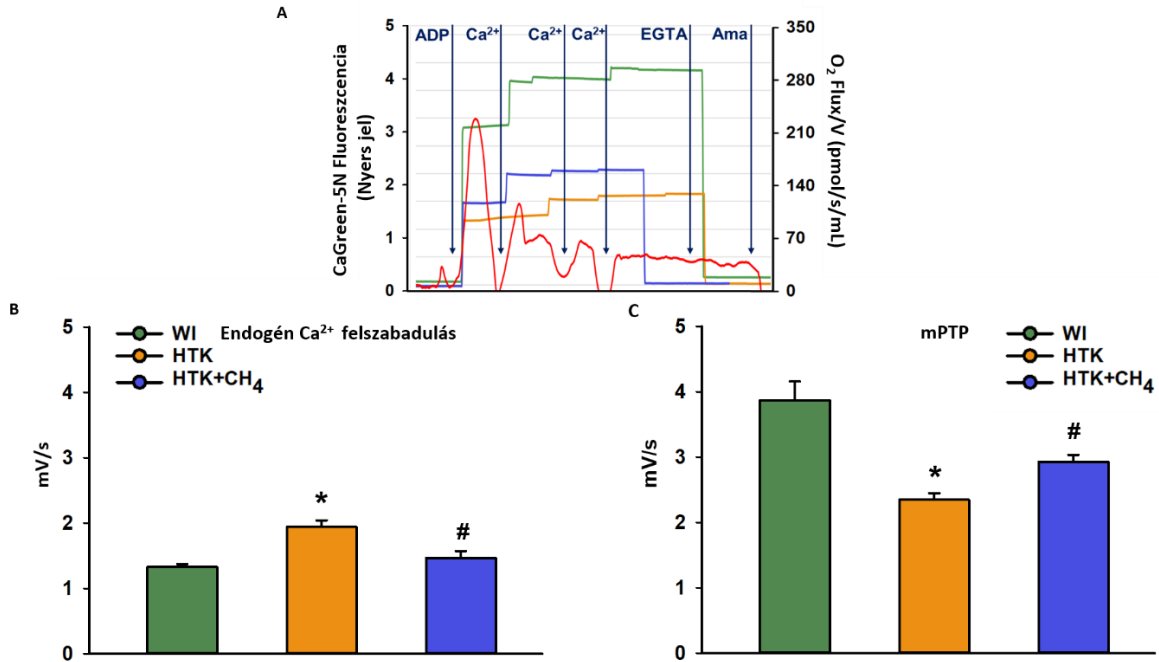
5.2.2 Máj hideg iszkémia-reperfúzió mitokondriális hatása

A mitokondriális légzési funkciók változásait glutamát és malát vagy szukcinát jelenlétében értékeltük, hogy különbséget tegyünk az I-es és a II-es komplexen alapuló aktivitás között. A hidegen iszkémián átesett csoportok szignifikánsan csökkent komplex I aktivitást ($19,6 \pm 11,7$ pmol/s/ml a HTK-ban és $22,0 \pm 10,9$ pmol/s/ml a HTK + CH₄-ben) és csökkent OxPhos-t mutattak ($128,8 \pm 31,5$ pmol/s/ml a HTK-ban és $201,3 \pm 54,8$ pmol/s/ml a HTK + CH₄-ben) telítő koncentrációjú ADP jelenlétében a kontrollcsoportéhoz képest (WI; $26,7 \pm 7,6$ pmol/s/ml és $280,2 \pm 64,5$ pmol/s/ml). A komplex I aktivitás csökkenése és az ehhez kapcsolódó OxPhos szignifikánsan nagyobb volt a HTK-graftok hepaticus mitokondriumaiban, mint a HTK + CH₄-konzervált graftokéban. A komplex II szubsztrát szukcinát jelenlétében azonban a máj mitokondriumok hasonló légzési aktivitást mutattak minden vizsgálati csoportban ($65,9 \pm 16,2$ pmol/s/ml a kontrollban, $55,5 \pm 24,6$ pmol/s/ml a HTK-ban és $59,8 \pm 7,6$ pmol/s/ml a HTK + CH₄-ben). Az ETC csatolásában bekövetkező változások számszerűsítésére kiszámítottuk az RCR-t, amelyet az OxPhos/oligomicin leak arányként fejezünk ki. A WI csoporttal összehasonlítva az RCR a HTK csoportban az ETC jelentős károsodását jelezte ($1,4 \pm 0,2$). A HTK + CH₄ és a WI csoportok között azonban nem találtunk szignifikáns különbséget a mitokondriumok kapcsoltsági arányában ($2,7 \pm 0,6$ és $4,9 \pm 0,6$) (35. ábra).



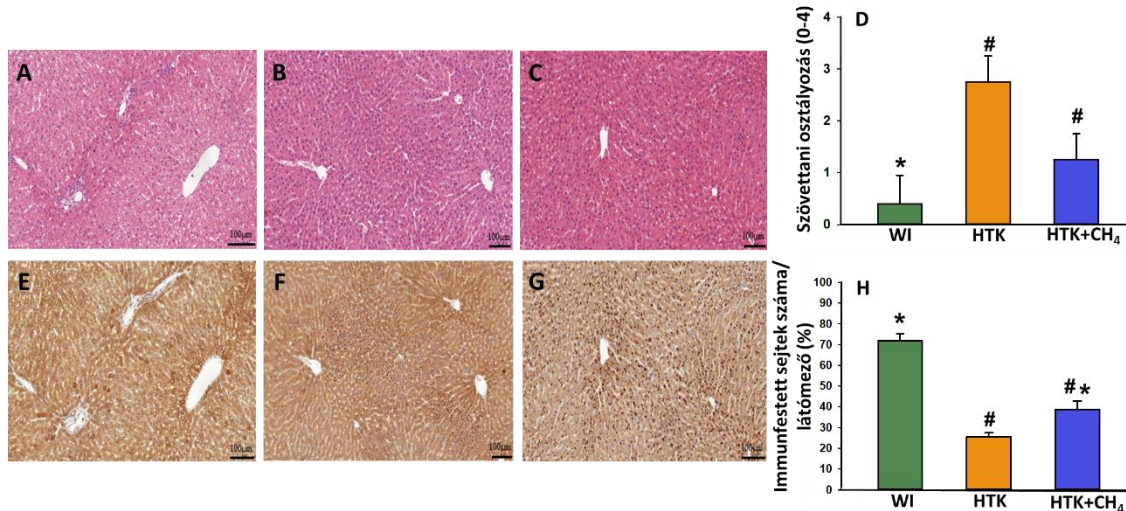
35. ábra. Májhomogenátumok mitokondriális légzésének vizsgálata a májgraft hagyományos HTK-oldatban és CH₄-dúsított HTK-oldatban (HTK + CH₄) történő hideg (4 °C-os) tárolása, valamint a reperfüziót követően. (A) A mitokondriális oxigénfogyasztás reprezentatív felvételei nagy felbontású respirometriával mérve. (B) Komplex I-hez kötött (NADH-termelő szubsztrátok: glutamát- és malát-függő) légzés, (C) Oxidatív foszforiláció (ADP-függő légzés) telítődő szubsztrátszintek jelenlétében. (D) Komplex I-hez és II-hez kötött (hozzáadott szukcinát-függő légzés). (E) A citokróm c felszabadulását exogén citokróm c hozzáadásával értékeltük glutamát és malát vagy szukcinát jelenlétében. (F) Az ADP-függő oxidatív foszforiláció és az ADP-független Leak-légzés arányaként kifejezett légzéskontroll-arány (RCR). A hideg iszkémia nélküli WI csoportot zölddel, a HTK csoportot sárgával, a HTK + CH₄ csoportot késsel jelöltük. Az adatok átlag ± SD értékben vannak feltüntetve. *P < 0,05 vs. WI; # P < 0,05 vs. HTK (egyirányú ANOVA és Tukey-teszt). HTK: hisztidin-triptofán-ketoglutarát oldat.

A hideg iszkémia okozta endogén Ca²⁺-felszabadulást először a minták alapszintű Ca²⁺-áramlásaként értékeltük. A HTK csoportban a CaGreen-5N fluoreszcens intenzitás szignifikáns növekedést mutatott (1,9 ± 0,1 mV/s) a kontrollcsoporthoz (WI; 1,3 ± 0,04 mV/s, illetve 1,4 ± 0,1 mV/s) képest. A HTK + CH₄ csoportban CH₄ adalék hozzáadása a tartósító oldathoz a fluoreszcencia intenzitásának jelentős csökkenését eredményezte (36B. ábra). Ezt követően az exogén Ca²⁺ által kiváltott Ca²⁺ fluxust vizsgáltuk telítődő mennyiségű CaCl₂ hozzáadásával, így indukálva az mPTP nyitást. Az elhúzóóó hideg iszkémia eredményeként a HTK csoport mitokondriumai kevésbé reagáltak a fluoroforra az exogén Ca²⁺-ra (2,3 ± 0,09 mV/s), mint a WI csoport hepatikus mitokondriumai (3,8 ± 0,2 mV/s). A HTK + CH₄ csoportban szignifikánsan magasabb Ca²⁺ fluxust észleltünk (2,9 ± 0,1 mV/s) a CH₄ kiegészítés hatására (36. ábra).



36. ábra. Májhomogénátumokban mitokondriális Ca^{2+} -áramlás vizsgálata a májgraft hagyományos HTK-oldatban és CH_4 -dúsított HTK-oldatban (HTK + CH_4) történő hideg ($4\text{ }^\circ\text{C}$ -os) tárolása, valamint a reperfüziót követően. (A) A WI (zöld vonal), HTK (sárga vonal) és HTK + CH_4 csoportok (kék vonal) extramitokondriális Ca^{2+} fluxusainak reprezentatív felvételei a mitokondriális oxigénfogyasztásra (piros vonal) szuperponálva. (B) Hideg iszkémia során mért endogén Ca^{2+} felszabadulás a 3. légzési állapotban. (C) Exogén Ca^{2+} által kiváltott maximális Ca^{2+} -áramlás CaCl_2 -titrálást követően, ami az mPTP megnyitását jelzi. A hideg iszkémia nélküli WI csoportot zölddel, a HTK csoportot sárgával, a HTK+ CH_4 csoportot kézzel jelöltük. Az adatok átlag \pm SD értékben vannak feltüntetve. * $P \leq 0,05$ vs. WI; # $P \leq 0,05$ vs. HTK (egyirányú ANOVA és Tukey-teszt). HTK: hisztidin-triptofán-ketoglutarát oldat, Ama: antimicin-A.

A máj morfológiai vizsgálata életképes hepatocitákat mutatott a kontrollcsoportban (WI). A HTK csoport esetében a májsejtek károsodása kifejezettebb volt. A HTK + CH_4 csoport esetében a károsodás mértéke szintén emelkedett, bár kisebb mértékben, mint a HTK csoportban, ami fokozott szöveti védelmet jelez. Az endotélkárosodás minden csoportban megtalálható volt, különösen a nagy erekben. Figyelemre méltó, hogy a HTK csoportban a kis erekben endotél leválást is mutattak (37A-D. ábra). A SERCA2b immunreaktív hepatociták száma jelentősen csökkent a HTK-tartalmú graftokból származó metszetekben a kontrollokhoz (a WI csoporthoz) képest (37E,F. ábra). Ezzel szemben a HTK + CH_4 csoportban az immunreaktív sejtek száma jelentősen megnőtt (37. ábra).



37. ábra. Hisztológia és immunhisztokémia májszövetből a májgraft hagyományos HTK-oldatban és CH₄-dúsított HTK-oldatban (HTK + CH₄) történő hideg (4 °C-os) tárolása, valamint a reperfúziót követően. (A,E) A WI csoport, (B,F) a HTK csoport és (C,G) a HTK+CH₄ csoport. A sáv 100 µm-t jelöl. (D) A csoportok szövettani osztályozása a sérült hepatociták számának összetett értékét mutatja (n = 15-18). A szövettani metszeteket hematoxilinnal és eozinnal festettük. A morfológiai májintegritást az IPRL-májakra kidolgozott kritériumok szerint osztályoztuk az 1-től (kiváló) 5-ig (rossz) terjedő skálán, az alábbiak szerint: (1) normális négyszögletes szerkezet, (2) lekerekített hepatociták megnövekedett szinuszoidális terekkel, (3) vakuolizáció, (4) nukleáris pyknózis és (5) nekrozis. Az endotélsejtek sérülését az érmátrixról való leválás mértéke alapján osztályoztuk, megkülönböztetve az arteriolákat, a nagy vénákat és a kis vénákat (H). A SERCA2b immunfestett sejtek a látómezőben százalékban ábrázolva. A WI csoportot zölddel, a HTK csoportot sárgával, a HTK+CH₄ csoportot pedig kézzel jelöltük. Az adatok átlag ± SD értékben vannak feltüntetve. *P ≤ 0,05 vs. WI; # P ≤ 0,05 vs. HTK (Kruskal–Wallis egyszempontos rangvariancia-analízissel, Dunn-teszt).

5.2.3 Iszkémia-reperfúzió szívmitokondriumokra gyakorolt hatása

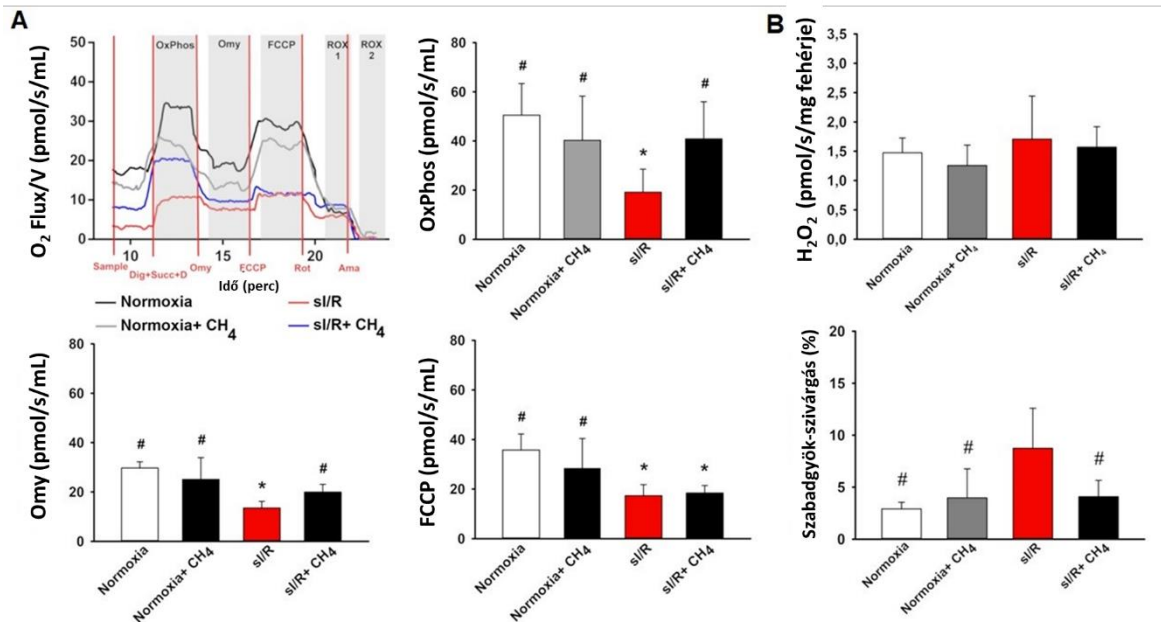
5.2.3.1 Szív meleg iszkémia-reperfúziós károsodása

In vitro eredmények

1. NRMC-k szimulált iszkémia-reperfúziós károsodása

A CH₄ hatását az NRMC-k mitokondriális funkcióira kapcsolási kontroll protokollal vizsgáltuk, mely lehetőséget biztosít a mitokondriumok Leak respirációjának elemzésére. Ennek eredményeképpen a sI/R csoportban szignifikánsan alacsonyabb OxPhos-t mértünk a normoxia csoporthoz képest ($19,17 \pm 9,37$ pmol/s*ml vs. $50,51 \pm 12,87$ pmol/s*ml; P < 0,001) (38A. ábra). A CH₄-kezelés az sI/R + CH₄ csoportban jelentősen növelte az oxigénfogyasztást ($40,88 \pm 15,08$ pmol/s*ml-re; P = 0,004) (38A. ábra). A Leak légzés csökkent az sI/R alatt ($13,54 \pm 2,66$ pmol/s*ml; P < 0,001); ez azonban javult a CH₄ adagolás eredményeként az sI/R + CH₄ csoportban ($19,94 \pm 3,15$ pmol/s*ml; P < 0,001) (38A. ábra). Az sI/R szignifikánsan csökkentette a maximális légzési kapacitást a normoxikus csoporthoz

képest ($17,35 \pm 4,46$ pmol/s*ml vs. $35,72 \pm 6,55$ pmol/s*ml; $P < 0,001$) (38A. ábra). A CH₄-kezelés nem volt hatással a maximális légzési kapacitásra sI/R alatt ($18,41 \pm 2,99$ pmol/s*ml; $P = 0,986$) (39A. ábra). A különböző állapotokban mért fluxusértékeket korigáltuk a ROX-ra (az adatok nem láthatóak). Az I/R csoportban a mitokondriális H₂O₂-szintek szignifikánsan emelkedtek a normoxiás csoporthoz képest. A CH₄-nal való inkubáció a reperfúzió alatt csökkentette a H₂O₂-termelés mennyiségét (38B. ábra). A szabadgyök-szivárgás megnövekedett a sI/R csoportban; ez az emelkedés azonban a CH₄ beadása következtében javult a sI/R + CH₄ csoportban ($8,74 \pm 3,85$ vs. $4,09 \pm 1,57$; $P < 0,05$) (38B. ábra). A CH₄ inkubáció nem volt hatással a szabadgyök-szivárgásra a normoxia + CH₄ csoportban a normoxia csoporthoz képest ($3,97 \pm 2,80$ vs. $2,91 \pm 0,64$; $P < 0,05$) (38B. ábra).

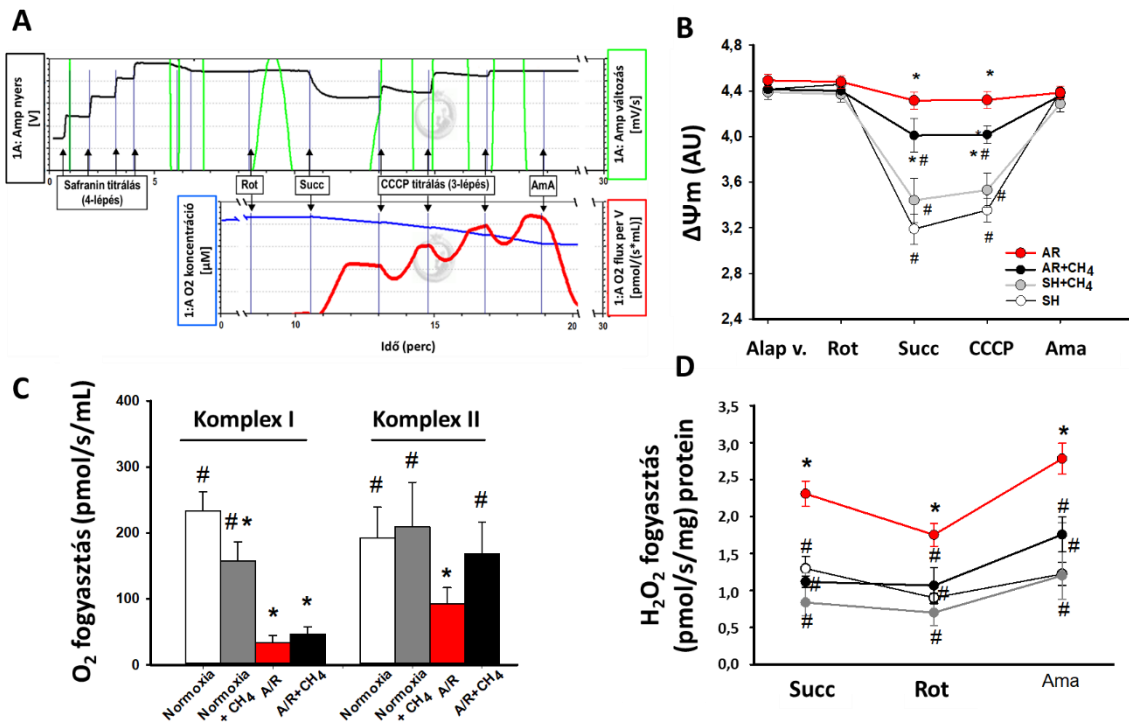


38. ábra. A CH₄ inkubáció hatása az újszülött patkányok szívizomsejtjeire (NRMC). (A) Az NRMC-k oxigénfogyasztása (pmol/s/ml⁻¹). A bal felső ábra a mitokondriális oxigénfogyasztás nagy felbontású respirometriával mért reprezentatív felvételeit mutatja. A jobb felső diagram az oxidatív foszforilációt (OxPhos), a bal alsó diagram az oligomicinszivárgást (Omy), a jobb alsó diagram pedig a maximális légzési kapacitást (FCCP) mutatja. (B) Az NRMC-k hidrogén-peroxid (H₂O₂) termelése. A felső diagram az NRMC-k mitokondriális H₂O₂-termelését mutatja pmol/s/ml-ben. Az alsó diagram a szabadgyök-szivárgást mutatja, a H₂O₂-termelés által eltérített oxigénfogyasztás százalékában kifejezve a III. légzési állapotban.

sI/R: szimulált iszkémia/reperfúzió; CH₄: metán; Dig+Succ+D: 1μl digitonin+10 mM szukcinát+5 mM ADP; Omy: 0,5 μM oligomicin; FCCP: 1μM karbonil-cianid p-trifluor-metoxi-fenil-hidrazin; Rot: 1 μM rotenon; Ama: 1 μM antimicin-A; OxPhos: oxidatív foszforiláció; ROX: maradék oxigénfogyasztás; fehér oszlopok: normoxia csoport; szürke oszlopok: normoxia + CH₄ csoport; piros oszlopok: sI/R csoport; fekete oszlopok: sI/R + CH₄ csoport. Az adatok átlag ± SEM értékben vannak feltüntetve. *P ≤ 0,05 vs. normoxia; #P ≤ 0,05 vs. sI/R (egyirányú ANOVA, Tukey's-teszt).

2. Izolált szív mitokondriumok anoxia-reoxigenizációs károsodása

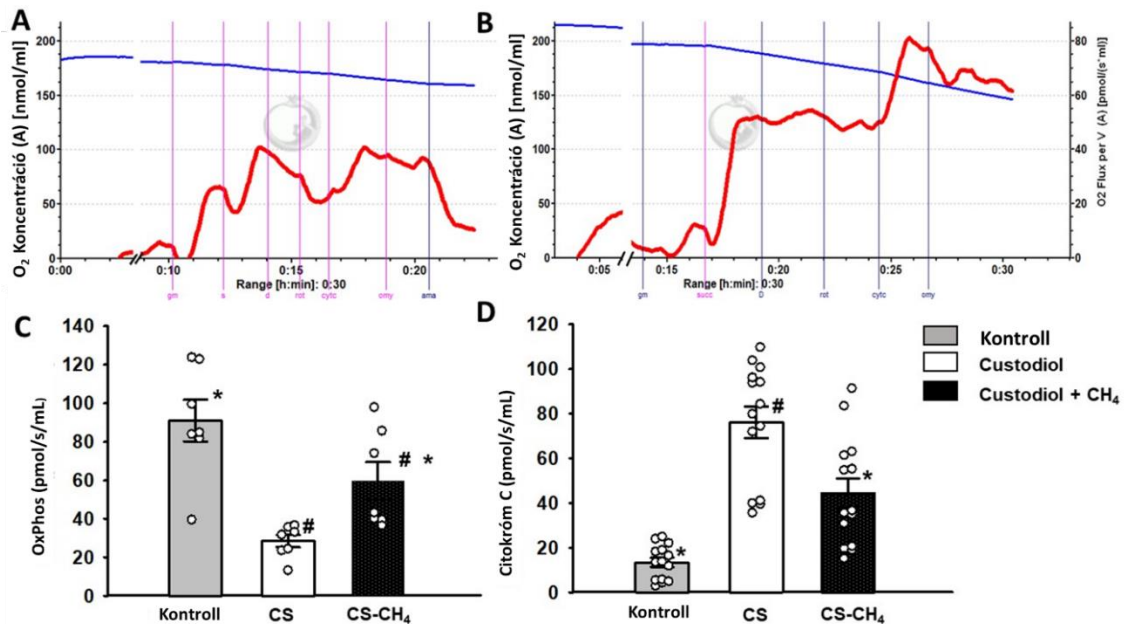
Az izolált patkány szív mitokondriumok anoxia-reoxigenizációra adott válaszát és a CH₄ hatását vizsgáltuk. A $\Delta\Psi_m$ változásait a potenciálérzékeny fluorofór, a Safranin O segítségével jellemeztük. A légzőkomplexek szubsztrátjai normoxikus körülmények között jelentős hiperpolarizációt indukáltak a mitokondriális membránban (39A. ábra). Ezzel szemben a hiperpolarizáció megszűnt az A/R-csoportban. A $\Delta\Psi_m$ szubsztrát által kiváltott változásait a CH₄-kezelés részben konzerválta (39A. ábra). Az anoxiás periódus alatt alkalmazott CH₄ csökkentette a H₂O₂-termelés mennyiségét (39B. ábra). Az oxigénfogyasztás szempontjából külön vizsgáltuk a komplex I-hez és a komplex II-hez kötött légzést. A CH₄ jelentősen csökkentette az I-es komplex oxigénfogyasztását, míg a II-es komplexhez kötött légzésre normoxikus körülmények között nem volt hatása. Ezzel ellentétben a CH₄-kezelés az A/R+CH₄ csoportban szignifikánsan csökkentette a komplex II oxigénfogyasztását, szemben a komplex I-vel (39B. ábra).



39. ábra. A CH₄ hatása izolált patkány szív mitokondriumokra. (A) A bal felső diagram a mitokondriális membránpotenciál reprezentatív görbéit mutatja, amelyet fluorometriásan, HRR-rel mértünk. A folyamatos fekete vonal a $\Delta\Psi_m$ -t jelzi, míg a piros vonal a szubsztrát által hajtott respirációt ábrázolja. (B) A jobb felső diagram az egyes kísérleti csoportok $\Delta\Psi_m$ -t mutatja. Az A/R csoportot piros vonal, az A/R + CH₄ csoportot fekete vonal jelöli, míg a normoxia és a normoxia + CH₄ csoportokat világos- és sötétszürke vonalak képviselik. (C) A bal alsó diagram a komplex I- és II-vezérelt mitokondriális oxigénfogyasztást szemlélteti. (D) A jobb alsó diagram a fordított elektrontranszfer (RET) során keletkező H₂O₂-termelést mutatja. *P ≤ 0,05 vs. A/R; #P ≤ 0,05 vs. Normoxia (kétirányú ANOVA, Bonferroni teszt). $\Delta\Psi_m$: mitokondriális membránpotenciál

5.2.3.2 Szív hideg iszkémia-reperfúziós károsodása

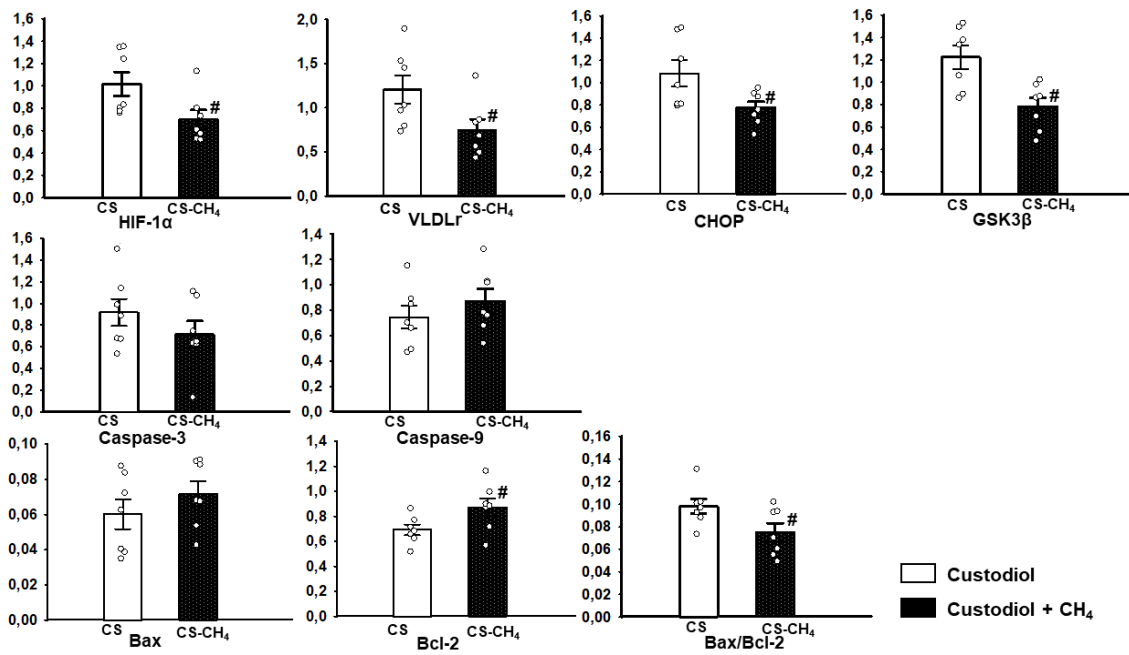
A komplex II-höz kötött alaplégzés szignifikánsan magasabb volt a CS - CH₄ graftokban, mint a CS csoportban 60 perccel a reperfúzió után (az adatok nem láthatóak). Telítő mennyiségű ADP hozzáadása után az OxPhos kapacitás szignifikánsan magasabb volt a CS - CH₄ csoportban (40C. ábra). A mitokondriális légzést citokróom c hatására (40D. ábra) vizsgáltuk, hogy meghatározzuk, hogy az exogén citokróom c képes-e helyettesíteni az enzimet a mitokondriális membránban. A CS csoporthoz képest a CS - CH₄ csoportban a citokróom c felszabadulása szignifikánsan alacsonyabb volt.



40. ábra. Patkány szív mitokondriumok oxigénfogyasztása (pmol/s/mL^{-1}) a szívgraft CH₄-dúsított Custodiol-oldatban vagy hagyományos Custodiolban történő 60 perces tárolását 4 °C-on, majd beültetését követően. A kontroll csoportban a szíveket nem vetettük alá hideg iszkémiának és tárolásnak, és nem transzplantáltuk őket. A felső ábrák (A; B) a mitokondriumok oxigénfogyasztásának reprezentatív felvételeit mutatják (A) Custodiolban tárolt vagy (B) Custodiol-CH₄-tárolt minták nagyfelbontású respirometriával mért értékeit. A kék vonal a légzőkamrában lévő pillanatnyi oxigénkoncentrációt, míg a piros vonal a minta egyidejű oxigénfogyasztását jelzi. A jobb alsó diagram az oxidatív foszforilációs (OxPhos) kapacitást, a bal alsó diagram pedig a citokróom c felszabadulási adatokat mutatja. Az adatokat az oszlopokban átlag \pm SEM-ként ábrázoljuk, az egyes adatpontokat egyéni adatokként ábrázoljuk ($n = 7-7$, a citokróom c felszabadulásának mérése duplikátumban történt). * $P \leq 0,05$ vs. CS; # $P \leq 0,05$ vs. kontroll (egyirányú ANOVA, Tukey-teszt).

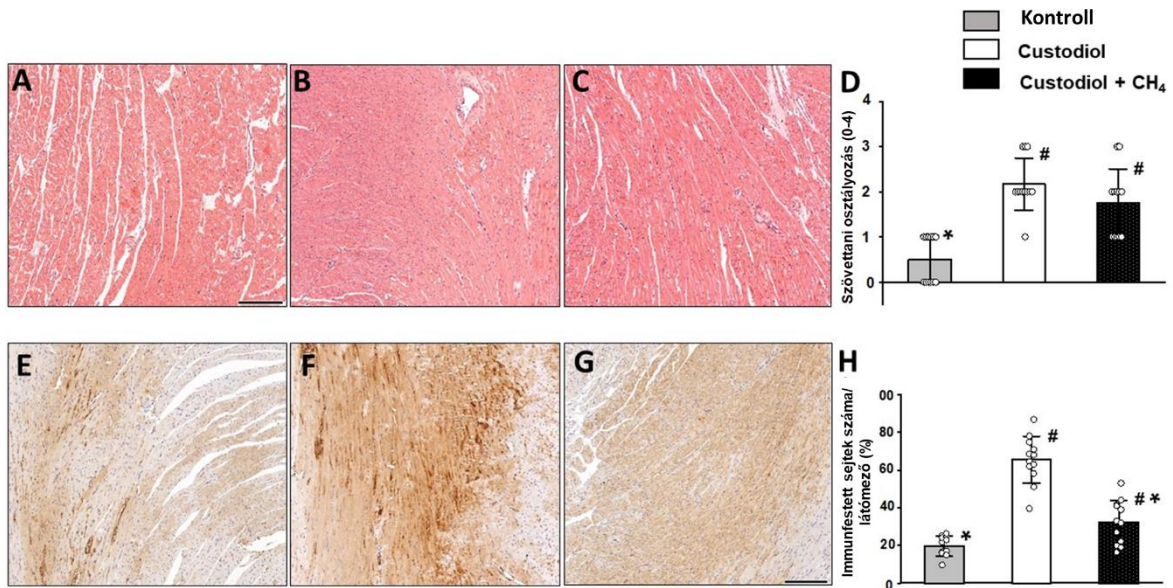
A szívizom ER stressz- és apoptózissal összefüggő génexpressziója hipoxia- és ER stressz-asszociált gének (HIF-1 α , CHOP, GSK3 β és Vldlr) relatív mRNS-expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a CS - CH₄ csoportban (41. ábra). A kaszpáz-3 és kaszpáz-9, valamint a pro-apoptotikus Bax expressziója nem csökkent szignifikánsan. Az anti-apoptotikus Bcl2 és a Bax/Bcl2 expresszió aránya azonban jelentősen különbözött a CS-CH₄

csoportban, ami az anti-apoptotikus útvonalak relatív dominanciáját jelzi (41. ábra).



41. ábra. Génexpressziós változások patkány szívgraftban CH₄-dúsított Custodiol-oldatban (Custodiol + CH₄) vagy hagyományos Custodiolban történő 60 perces tárolását 4 °C-on, majd beültetését követően. Az adatokat átlag ± SEM, az egyes adatpontokat egyéni adatokként ábrázoljuk (n=7-7). #P ≤ 0,05 vs. CS (egyirányú ANOVA, Tukey-teszt). HIF1α: hipoxia-indukálható faktor 1-alfa; VLDLr: nagyon alacsony sűrűségű lipoprotein receptor; CHOP: CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homológ fehérje; GSK3β: glikogén-szintáz kináz-3 béta. Bcl-2: B-sejtes limfóma 2; Bax: bcl-2-like protein 4.

A H&E festés a CS-csoportban a kontrollokhöz képest csak enyhe dezorganizációt mutatott a myofibrillumokban, a barázdák elvesztésével, valamint hullámosság, kontrakciós sávok és a myociták plazmamembránjának felbomlásával (42A-B. ábra). A CS - CH₄ tároló csoportban a szívizomsejtek architektúrája közel normális volt (42C. ábra). Ezek a változások nem különböztek szignifikánsan a CS-csoportban tapasztaltaktól, így közel azonos szövetvédelmi potenciált jeleztek (42D. ábra). A SERCA1 immunreaktív szívizomsejtek száma jelentősen megnőtt a CS-tárolt graftokból származó metszetekben a kontrollokhöz képest (42E-F. ábra). Ezzel szemben az immunreaktív sejtek száma jelentősen csökkent a CS - CH₄ csoportban (42G-H. ábra).

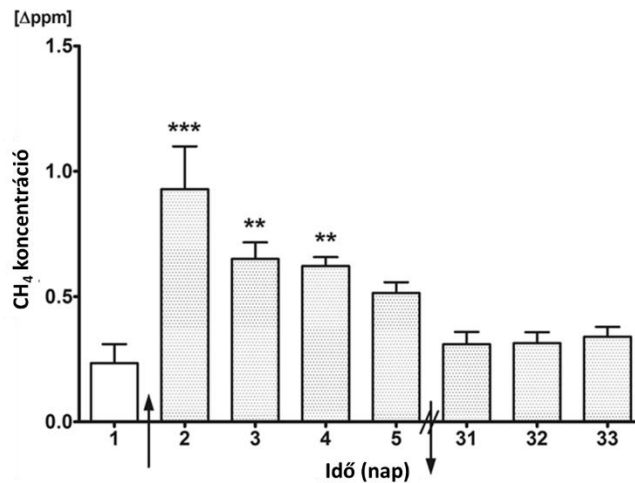


42. ábra. Patkány szívgraftok hisztológia és immunhisztokémia vizsgálata CH₄ gyel dúsított Custodiol-oldatban vagy hagyományos Custodiolban történő 60 perces tárolását 4 °C-on, majd beültetését követően. Hematoxinilín és eozin festés (A-C) szívmetszeteken. (A) Kontroll csoport, (B) CS csoport és (C) CS-CH₄ csoport. (D) A csoportok szövettani osztályozása a károsodott szívizomsejtek számának és a károsodási fókuszok számának összetett értékét jelenti. SERCA1 immunfestés (E-G) a szívmetszeteken. (E) Kontroll csoport, (F) CS csoport, (G) CS-CH₄ csoport és (H) A SERCA1 immunreaktivitás az immunpozitív sejtek százalékos arányában, látómezőnként számszerűsítve; az adatokat átlag ± SD-ben mutatjuk be (az oszlopoknál egyedi adatpontok (n=12-12) szerepelnek). *P ≤ 0,05 vs. CS; #P ≤ 0,05 vs. kontroll (ANOVA rangvariancia analízis, Tukey-Kramer). Jelölés: 200 μm.

5.3 Trauma és alkoholfogyasztás okozta stressz biomarkerei

5.3.1 Kilélegzett CH₄ alkoholfogyasztás okozta stresszben

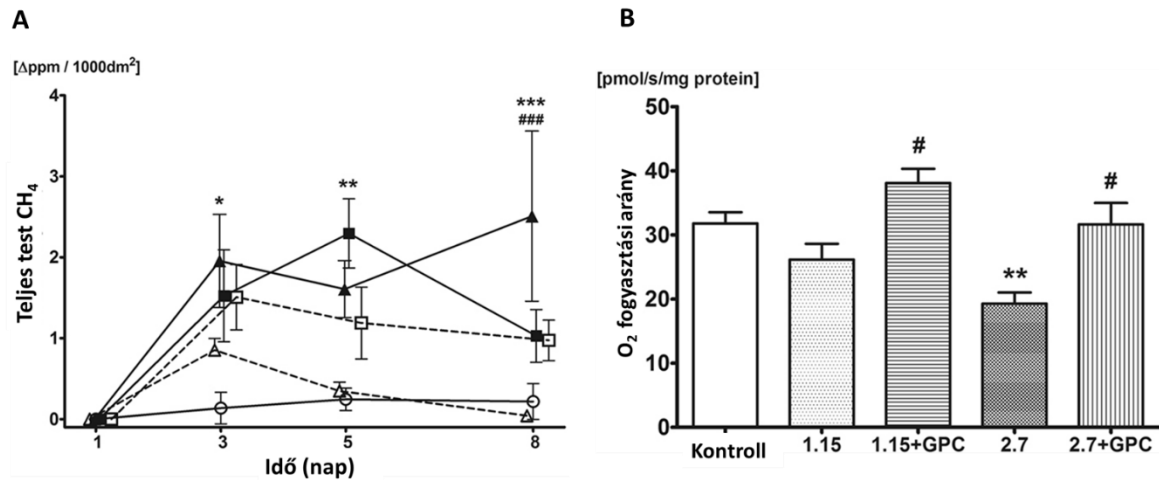
Humán vizsgálatokban az etanol által indukált metanogenezist a korábban nem CH₄-termelőnek bizonyult résztvevőknél standardizált körülmények között vizsgáltuk. A kilélegzett levegő CH₄-koncentrációja a 2. napon (0,93 ± 0,17 Δppm), a 3. napon (0,65 ± 0,07 Δppm) és a 4. napon (0,62 ± 0,04 Δppm) szignifikánsan, kb. 0,9 Δppm-rel emelkedett a kiindulási értékhez (1. nap, 0,23 ± 0,08 Δppm) képest. A CH₄-kibocsátás az 5. napra csökkent (0,51 ± 0,04 Δppm), de továbbra is jelentősen magasabb maradt a kiindulási értéknél. Amikor 31 nappal később megismételtük a légzési CH₄-elemzést, statisztikailag szignifikáns CH₄-termelés nem volt kimutatható (lásd az 43. ábrát).



43. ábra. Kilélegzett CH₄ koncentráció emberben alkoholfogyasztás okozta stresszben a vizsgálati napok során. A vizsgálat 1-5. és 31-33. napján a kilélegzett CH₄-termelés látható. Az 1. napi első mérés során minden önkéntes kezeletlen volt. Az alkoholfogyasztás a 2. napra az 1. naphoz képest jelentős CH₄-termelést indukált, és ez a szint az 5. napra jelentősen csökkent. Az átlagértékeket és az átlag standard hibáját (SEM) adjuk meg; **P < 0,01 és ***P < 0,001 az 1. naphoz képest (Egyirányú ANOVA, Dunnett többszörös összehasonlító teszttel). A felfelé és lefelé mutató nyilak az alkoholfogyasztás kezdetét, illetve végét jelzik.

Az állatkísérletekben a patkányok egész testére vonatkozó CH₄ profilt követtük több napon keresztül, alkoholfogyasztás alatt (45. ábra). A vizsgálat azt mutatta, hogy a 1,15 g/kg/nap etanol bevitelét követően 3 nappal a CH₄ kibocsátás ($1,85 \pm 0,48 \Delta\text{ppm}/1000 \text{ dm}^2$) megnövekedett a kontrollcsoportéhoz képest, és ez a szint egészen a 8 napos megfigyelési időszak végéig fennmaradt ($2,47 \pm 1,29 \Delta\text{ppm}/1000 \text{ dm}^2$). Ugyanakkor, a 1,15 g/kg/nap etanol + GPC kezeléssel nem tapasztaltak emelkedést a CH₄ szintjében a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. A 8. napra már szignifikáns különbség alakult ki a 1,15 g/kg/nap etanolt GPC nélkül kapó csoport ($2,47 \pm 1,29 \Delta\text{ppm}/1000 \text{ dm}^2$) és a GPC kezelt csoport ($0,04 \pm 0,04 \Delta\text{ppm}/1000 \text{ dm}^2$) között. Az 5. napra a 2,7 g/kg/nap etanol terhelés növelte az egész test CH₄ termelést ($2,3 \pm 0,43 \Delta\text{ppm}/1000 \text{ dm}^2$), és a magas CH₄ kibocsátás fennmaradt a 8 napos kísérletek végéig ($1,03 \pm 0,33 \Delta\text{ppm}/1000 \text{ dm}^2$). A kis dózisú etanol+GPC csoportéhoz hasonlóan, a 2,7 g/kg/nap etanol + GPC kezelt csoportban sem volt különbség a kontrollcsoportéhoz képest. A kezeletlen kontroll csoportban nem történt változás a megfigyelési időszak alatt (8. nap: $0,23 \pm 0,18 \Delta\text{ppm}/1000 \text{ dm}^2$) az első napi alapértékekhez képest (44A. ábra). A májban a 1,15 g/kg/nap etanol bevitel nem befolyásolta a mitokondriális oxigénfogyasztást a kontrollcsoportéhoz képest ($26,17 \pm 2,45 \text{ pmol/s/mg}$

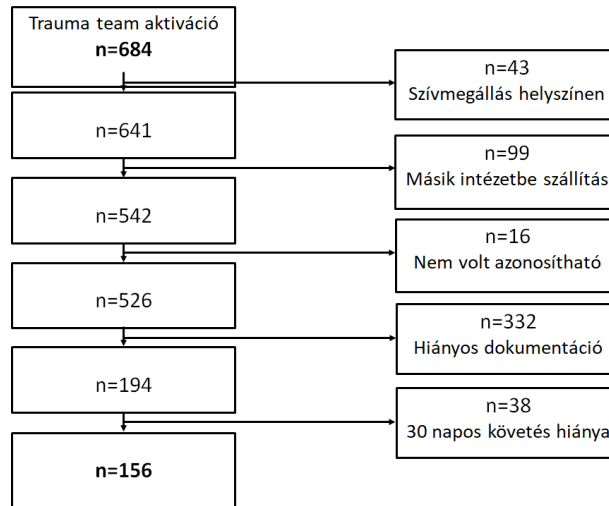
fehérje vs. $31,79 \pm 1,74$ pmol/s/mg fehérje), míg a 2,7 g/kg/nap etanol terhelés szignifikáns csökkenést eredményezett az OxPhos kapacitásban ($19,29 \pm 1,73$ pmol/s/mg). A GPC-vel történő táplálékkiegészítés mindkét csoportban növelte a légzést a nem GPC-kezelésű csoportokhoz képest (1,15 g/kg/nap etanol + GPC: $38,08 \pm 4,99$ pmol/s/mg fehérje; 2,7 g/kg/nap etanol + GPC: $31,66 \pm 8,11$ pmol/s/mg fehérje) (44B. ábra).



44. ábra. A patkányok etanol terhelésének a CH₄ termelésre és mitokondriális funkciókra gyakorolt hatása. (A) Az egész testre vonatkozó CH₄ termelést az 1., 3., 5. és 8. napon mértük a vizsgálat során. Az üres körök folytonos vonallal a kontrollcsoportot, a fekete háromszögek folytonos vonallal az 1,15 g/kg/nap etanollal kezelt csoportot, az üres háromszögek szaggatott vonallal az 1,15 g/kg/nap etanol + GPC-kezeléssel ellátott csoportot, a fekete négyzetek folytonos vonallal a 2,7 g/kg/nap etanollal kezelt csoportot, és az üres négyzetek szaggatott vonallal a 2,7 g/kg/nap etanol + GPC-kezeléssel ellátott csoportot jelölik. Az átlagértékeket és az átlag hibáját (SEM) adjuk meg; *P ≤ 0,05, **P < 0,01 és ***P < 0,001 a kontrollcsoporthoz képest, ####P < 0,001 a megfelelő GPC-kezelésű csoportokhoz képest (Kétutas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt). (B) A patkány máj mitokondriumainak oxigénfogyasztása. A mitokondriumok O₂ fogyasztási sebességét a máj homogenizátumában mértük, miután 0,5 μM rotenont, 10 mM szukcinátot és 2,5 mM ADP-t adtak hozzá a vizsgálat 9. napján. A 2,7 g/kg/nap etanollal etetett csoportban csökkent mitokondriális funkciót figyeltek meg a kontrollcsoporthoz képest, míg a GPC-kezelés megakadályozta a mitokondriális oxigénfogyasztás csökkenését, amit a nem GPC-kezelésű csoportokhoz képest magasabb szintek is mutattak. Az átlagértékeket és az átlag hibáját (SEM) adjuk meg; **P < 0,01 a kontrollcsoporthoz képest, #P ≤ 0,05 a megfelelő GPC-kezelésű csoportokhoz képest (Egyirányú ANOVA Bonferroni post-hoc teszt).

5.3.2. Vitális paraméterek prediktív értéke traumás sokk osztályozásban

A retrospektív kohorszvizsgálat eredménye szerint intézményünkbe összesen 684 beteget észleltek a trauma team aktiválásával. Végül 156 résztvevő felelt meg a bevonási kritériumoknak. A betegek felvételének folyamatábráját a 45. ábra mutatja be.



45. ábra. A retrospektív kohorszелеmzésbe történő betegbevonás folyamatábrája. A folyamatábra bemutatja, hogy az adott időszakban összesen 684 trauma team aktiváció történt. Azokat a betegeket, akik a baleset helyszínén vagy egy másik intézményben végzett elsődleges vizsgálat során szívmegállás állapotában voltak, kizárták, így 542 beteg maradt. Tizenhat esetben a részletes orvosi dokumentáció nem volt beazonosítható a személyes adatok hiánya miatt. 332 esetben hiányoztak bizonyos változók (HR/SBP/GCS/BD), vagy nem volt rögzítve az Injury Severity Score, az Abbreviated Injury Scale, illetve a pontos sérülési mechanizmus. További 38 esetben a 30 napos utánkövetés nem állt rendelkezésre. Végül 156 beteget vontak be a végső elemzésbe. HR: szívfrekvencia, SBP: szisztolés vérnyomás, GCS: Glasgow-kóma skála, BD: bázis deficit.

A résztvevők átlagéletkora $49,4 \pm 20,7$ év volt, és a betegeknek csak 26,7%-a volt nő. A leggyakoribb sérülési mechanizmusok a közúti balesetek (56,4%) és az esések (29,5%) voltak. A leginkább érintett testrészek a fej és a nyak (74,4%), a mellkas (53,9%) és a végtagok (48,1%) voltak. Mivel a legtöbb beteg nagy energiájú traumát szenvedett, több esetben több testrész is érintett volt. A betegpopuláció jellemzőit a 3. táblázat mutatja. Minden beteget besoroltunk a régi (VS) és az új, BD bevonásával módosított (VS + BD) ATLS sokk osztályba.

Változók	Minden Osztály	Osztály I		Osztály II		Osztály III		Osztály IV	
		VS	VS + BD	VS	VS + BD	VS	VS + BD	VS	VS + BD
kor (év)	49,4 ± 20,7	48,0 ± 18,7	46,4 ± 15,2	39,7 ± 14,8	48,2 ± 19,9	47,0 ± 24,3	44,2 ± 23,9	52,1 ± 21,2	52,2 ± 21,3
Nő (%)	26,9	30,6	33,3	20,0	23,3	23,8	26,1	26,3	26,6
Férfi (%)	73,1	69,4	66,6	80,0	76,7	76,2	73,7	73,7	73,4
HR (/perc)	82,3 ± 21,4	78,0 ± 11,1	79,3 ± 9,4	90,7 ± 21,3	81,5 ± 15,5	88,0 ± 18,5	84,4 ± 20,5	82,4 ± 26,4	82,9 ± 26,0
SBP (Hgmm)	125,7 ± 33,5	142,4 ± 22,5	144,2 ± 22,1	119,5 ± 16,2	137,0 ± 23,9	130,0 ± 27,8	127,4 ± 22,7	114,5 ± 37,9	115,3 ± 38,3
GCS	9,8 ± 5,5	15,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	13,7 ± 1,0	14,0 ± 1,0	4,7 ± 3,3	5,0 ± 3,6
BD (mmol/L)	4,1 ± 4,9	2,2 ± 2,1	0,6 ± 1,0	3,3 ± 3,6	3,0 ± 1,7	4,7 ± 5,6	3,9 ± 3,2	5,3 ± 5,6	5,7 ± 6,0
Vazopresszor	36 (23,1)	2 (4,1)	0 (0)	0 (0)	1 (3,3)	5 (23,8)	5 (21,7)	29 (38,2)	30 (38,0)

3. táblázat. A vizsgálatba bevont súlyos sérülteket besoroltunk a régi (VS) és az új, BD bevonásával módosított (VS + BD) ATLS sokk osztályba. Az I.-IV. osztályig megfigyelhető a csökkenő SBP és növekvő tendencia az átlagos BD értékekben. A II., III. és IV. osztály között nagymértékű csökkenés tapasztalható az átlagos GCS-értékekben, ami arra utal, hogy a GCS-nek lehetett a legerősebb hatása a betegek elosztására. A vazopresszorok szükségessége főként a III-IV. osztályban fordult elő. Az értékek átlag ± SD-ként vannak megadva, kivéve a

Hartmann Petra_154_23

vasopresszort igénylő betegek számát és százalékát, valamint a férfi és női betegek százalékát. HR: szívfrekvencia, SBP: szisztolés vérnyomás, GCS: Glasgow-kóma skála, BD: bázis deficit, SD: szórás.

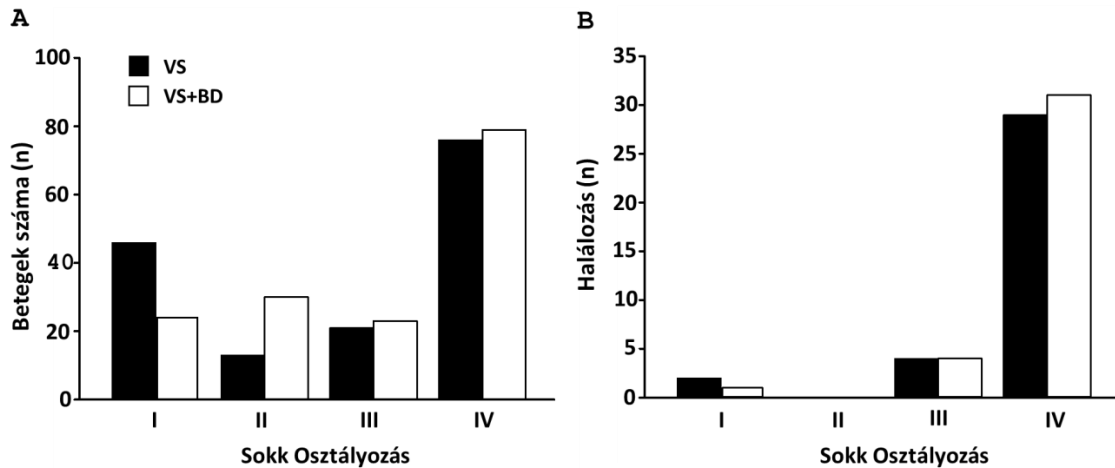
A sérülési mechanizmusok, az érintett testrészek és a klinikai eredmények megoszlását a 4. táblázat tartalmazza.

Beteg populáció (n=156)	
Sérülés súlyossága, n (%)	
ISS medián (IQR)	29 (20-34)
AIS _{fej,nyak} ≥ 3 n (%)	47 (30,1)
AIS _{arc} ≥ 3 n (%)	6 (3,9)
AIS _{mellkas} ≥ 3 n (%)	44 (28,2)
AIS _{hasi és kismedence} ≥ 3 n (%)	24 (15,4)
AIS _{végtagok, medenceöv} ≥ 3 n (%)	51 (32,7)
AIS _{külső sérülés} ≥ 3 n (%)	3 (1,9)
Sérülés mechanizmusa n (%)	
Közlekedési balesetek	88 (56,4)
Járókelő	18 (20,5)
Kerékpár	16 (18,2)
Motorkerékpár	17 (19,3)
Gépjármű	37 (42,1)
Esés	46 (29,5)
Támadás	6 (3,9)
Önkárosítás	3 (1,9)
Egyéb	13 (8,3)
Eredmények n (%)	
Vérkészítmények beadása	97 (62,2)
Tömeges transfúzió	27 (17,3)
Vasopresszorok alkalmazása	36 (23,1)
Az intenzív osztályra való felvétel	111 (71,2)
Műtét az első 24 órában	89 (57,1)
Halálozás az első 24 órában	16 (10,3)
Halálozás az első 30 napban	34 (21,8)

4. táblázat. A sérülés súlyossága és mechanizmusai, érintett testrészek, kimenetel. ISS: Sérülés súlyossági pontszám, AIS: rövidített sérülési pontszám, IQR: interquartilis tartomány. Az AIS-kódolás az AIS 2008 szótár alapján történt. A közúti közlekedési balesetek és az esések voltak a leggyakoribb sérülési mechanizmusok, amelyek a traumatológus csapat aktiválását igényelték. Az esetek nagy számában a fej és a nyak, a mellkas és a végtagok régiói voltak érintettek. A résztvevők több mint felénél az első 24 órában műtétet hajtottak végre. Vérkészítményeket 97 esetben adtak be. 34 beteg halt meg 30 napon belül, ami 21,8%-os halálozási arányt jelent.

A VS szerint a betegek 31,4%-a az I. osztályba, 6,4%-a a II. osztályba, 13,5%-a a III. osztályba és 48,7%-a a IV. osztályba tartozott. A VS + BD kritériumok alapján a betegek

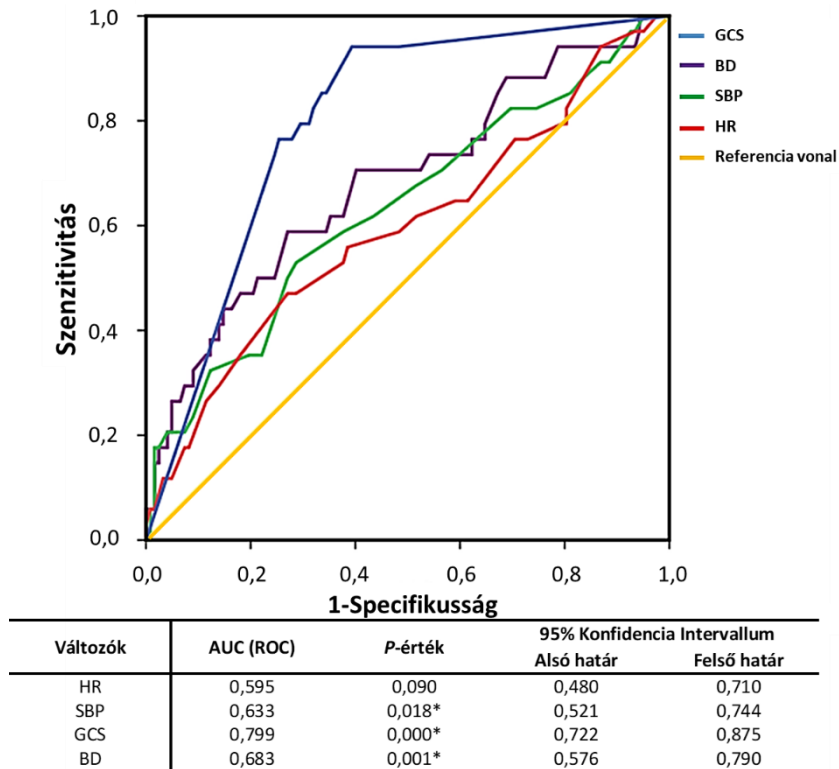
16,0%-a a következő, magasabb osztályba tartozott; ez az eltolódás azonban főként az alacsony kockázatú osztályokat (I. és II.) érintette. Harmincnégy beteg halt meg az első 30 napon belül, ami 21,8%-os halálozási arányt jelent. A betegek és a halálozás osztályok közötti megoszlását a 46. ábra mutatja.



46. ábra. A betegek (A) és a halálozás (B) eloszlása a sokk súlyossági osztályai között a VS és VS + BD alapú osztályozás szerint. A betegbesorolásbeli eltérés elsősorban az alacsony kockázatú osztályokban (I és II) figyelhető meg. Az A. diagram arra utal, hogy a BD nem volt kulcsfontosságú paraméter a súlyossági osztály meghatározásában. A B. diagram azt mutatja, hogy a halálos esetek túlnyomó többsége a IV. osztályban található.

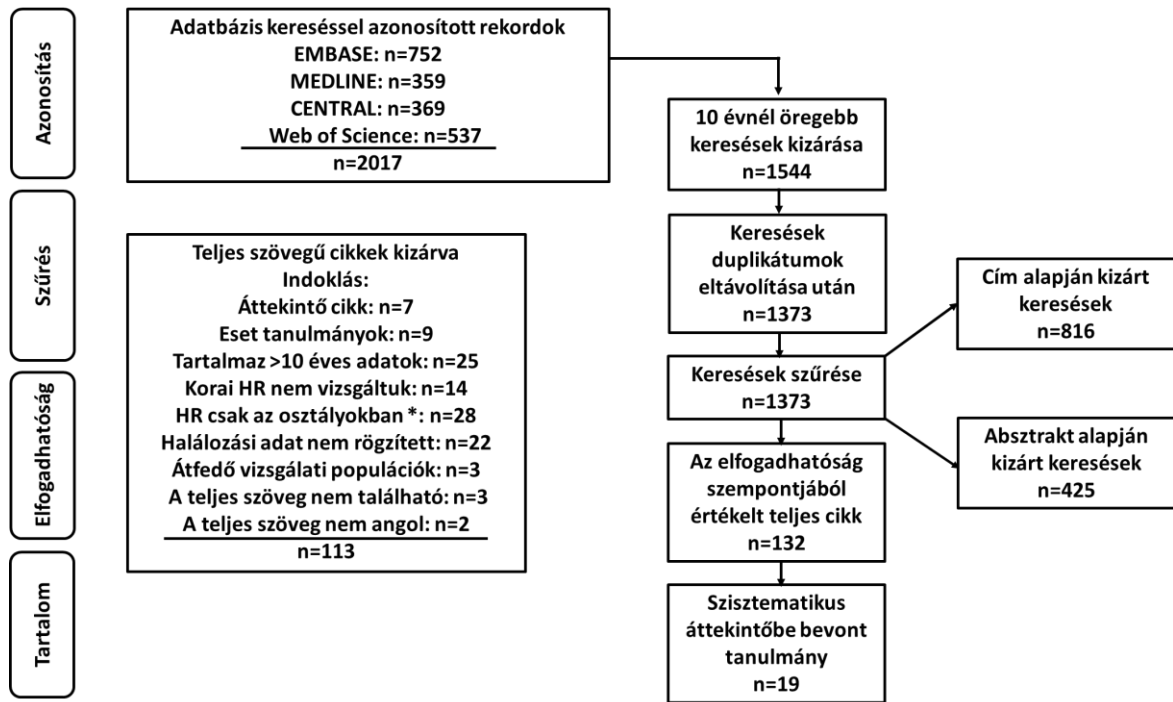
Mind a VS, mind a VS + BD osztályozás erős kapcsolatot mutatott a halálozással (χ^2 és Fisher pontos tesztje $P_{VS} = 0,0001$ vs. $P_{VS+BD} = 0,000009$, illetve). A 2-arányos Z teszt szerint azonban nem volt szignifikáns különbség a mortalitást előrejelző teljesítményükben ($P = 0,9808$).

A HR, SBP, GCS és BD külön elemzésével azt találtuk, hogy a GCS-nek van a legnagyobb prognosztikai ereje (AUC GCS = 0,799, $P < 0,001$; CI [0,722, 0,875]). A BD és az SBP eltérései szignifikáns, de gyenge prediktora volt a halálozásnak (AUCBD = 0,683, $P = 0,001$, CI [0,576, 0,790]; AUCSB $P = 0,633$, $P = 0,018$, CI [0,521, 0,744]). A HR hatástalannak bizonyult a prognózis tekintetében (AUCHR = 0,595, $P = 0,090$, CI [0,480, 0,710]). A ROC-elemzés eredményeit a változók ROC-görbéivel az 47. ábra mutatja.



47. ábra. Az egyes változók ROC-elemzése. HR: szívfrekvencia, SBP: szisztolés vérnyomás, GCS: Glasgow-kóma skála, BD: bázis deficit.

A HR, mint prognosztikai faktor hatékonyságát vizsgáló szisztematikus áttekintés és meta-regresszió keretén belül 2017 közleményt azonosítottunk az alkalmazott keresési stratégiával, amiből végül 19 közlemény felelt meg a bevonási kritériumoknak (48. ábra).



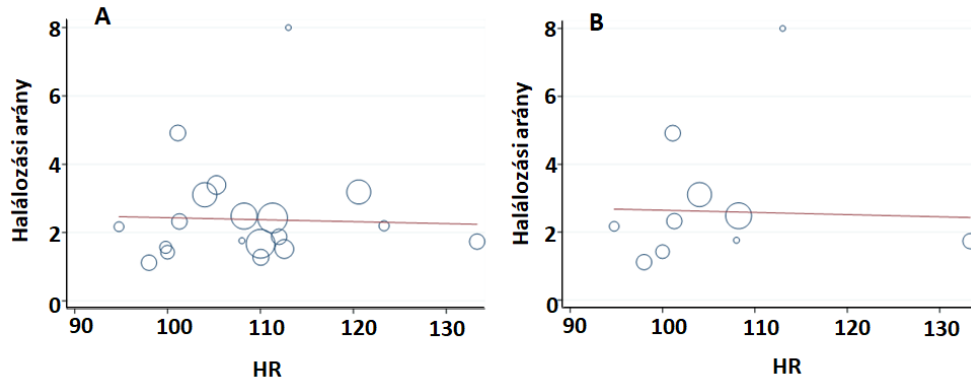
48. ábra. A keresési stratégia folyamatábrája. Keresési stratégiánk 2017 közleményt eredményezett. A 2010 előtt megjelent közlemények és a duplikációk kizárása után 1373 cikket szűrtünk ki a cím és az absztrakt alapján. 79 esetben a cím egyértelműen jelezte, hogy a vizsgálat nem bevonható, mert áttekintő közlemény vagy szisztematikus áttekintés. Huszonnégy közleményben a cím utalt arra, hogy a közlemény egyetlen esetről szóló esetriport. 124 esetben a cím egyértelműen jelezte, hogy a vizsgálat populáció alapján nem bevonható, például terhes vagy gyermekpopuláció. Ötszáztizenthat cím alapján a közlemény nem kapcsolódik szorosan a kutatási témánkhoz. 73 esetben a közlemény cím alapján egyértelműen állatkísérlet. Huszonegy közleményt az absztrakt alapján kizártunk, mert áttekintő közlemény vagy szisztematikus áttekintés. Absztrakt alapján 94 esetben a vizsgálat populációja nem volt bevonható, 110 esetben az Absztrakt alapján a közlemény nem kapcsolódott szorosan a kutatási témánkhoz. Harminckilenc állatkísérlet került kiszűrésre az absztrakt alapján. Nyolc tanulmánynak nem volt angol nyelvű összefoglalója. 112 esetben az Absztrakt részből kiderült, hogy a tanulmány több mint 10 éves adatokat tartalmaz. Negyvenegy <10-es betegszámmal rendelkező közleményt az absztrakt alapján kizártuk. Miután a cím alapján 816, az absztrakt alapján pedig 425 tanulmányt kizártunk, 132 teljes terjedelmű közleményt vizsgáltunk meg a bevonhatóság szempontjából. A teljes terjedelmű közlemények kizárásának okait a fenti ábra részletezi. Végül 19 közleményt vontunk be a metaregresszióba.*A szívfrekvencia (HR) átlag vagy medián értékei nem álltak rendelkezésre, csak a betegek száma adott HR-tartományokban (pl. 100-120/perc).

Metaregresszió

Elsődleges metaregresszióink a HR és a halálozás közötti kapcsolatot vizsgálta a vérzéssel járó traumán átesett betegek esetében mind a 19 közlemény adatai alapján. Nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a HR és a kimenetel között ($p = 0,847$), így lineáris összefüggést nem tudtunk megállapítani. Az eredményeket a számított regressziós vonallal az 49A. ábra mutatja be.

Az egyes tanulmányok betegbevonási kritériumainak viszonylagos heterogenitása miatt egy 10 közleményből álló alcsoportot alakítottunk ki, amelyben a kezdeti vérkészítmény adását

határoztuk meg bevonási kritériumként. Eredményeink ismét azt mutatták, hogy a HR és a halálzási arány között nincs szignifikáns kapcsolat és lineáris összefüggés (49B. ábra).

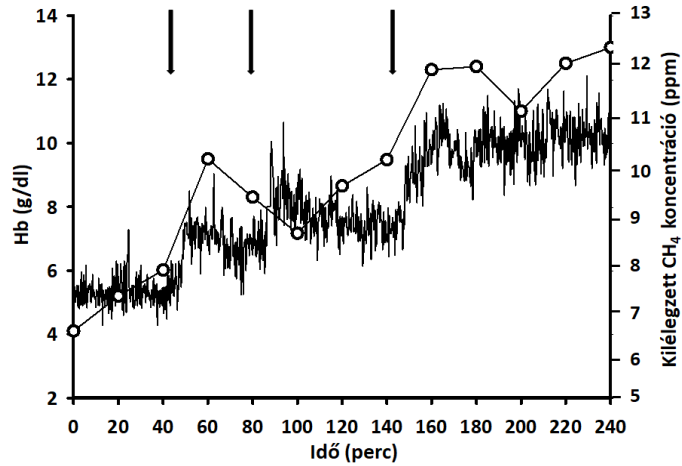


49. ábra. Metaregresszió a szívfrekvencia (HR) és a halálzás közötti kapcsolat vizsgáltára a vérzéssel járó traumán átesett betegek esetében. (A) A HR és a halálzás közötti kapcsolat a bevont összes közlemény alapján. Lineáris összefüggés a HR és a halálzás között nem volt azonosítható. (B) Alcsoportelemzés kezdeti vérkészítményt kapott betegek HR és mortalitás adataiból. Lineáris összefüggés a HR és a betegek halálzási aránya között nem volt azonosítható.

5.3.3 A kilélegzett CH₄ kimutatása traumával összefüggő vérzésben

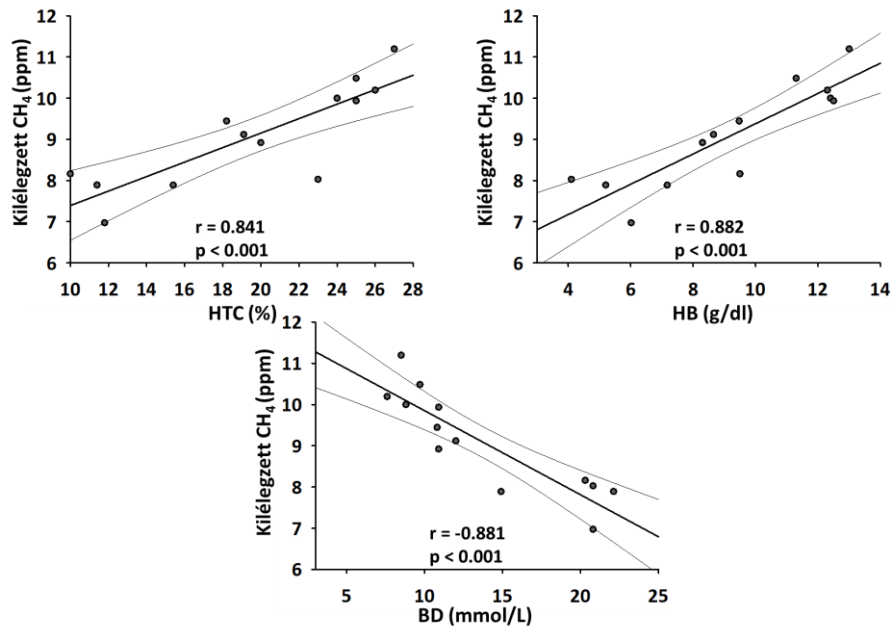
A vérzéscsillapítás és az MBT eredményeként a Hb értékek normalizálódtak, míg a BD csökkenő tendenciát mutatott. Ezzel összhangban a kilélegzett CH₄ szintek növekvő tendenciát mutattak. Az érkezéskori kezdeti Hb kevesebb, mint 4 g/dl volt, a BD értéke 20,8 mmol/l, és a kilélegzett CH₄-koncentráció 22800 PAU volt (2840 PAU egyenlő 1 ppm-mel, a háttér-CH₄ szintje körülbelül 1912 ppb). Az első 4 óra végére a Hb értéke 13 g/dl-re, a CH₄-koncentráció 31800 PAU-ra emelkedett, míg a BD 8,5 mmol/l-re csökkent.

Az 50. ábra bemutatja az vizsgált paraméterek változásait a beadott vértranszfúziók fényében, valamint ezek eredményeként a Hb egyidejű növekedését és a kilélegzett CH₄-koncentráció folyamatos emelkedését. A vizsgálat szignifikáns korrelációt talált a Htc és a CH₄-koncentráció, a Hb és a CH₄-koncentráció, valamint a BD és a CH₄-koncentráció változásai között.



50. ábra. A súlyosan sérült beteg reprezentív fotoakusztikus spektroszkópiás (PAS) felvétele, amire a vérgázmérések során meghatározott hemoglobin koncentrációk görbáját ráillesztettük. A nyilak 2 egység vörösvérsejt-koncentrátum beadását jelzik. Megfigyelhető, hogy minden transfúziót a kilégzett CH₄ szint növekedése követ. Hb: hemoglobin

A 51. ábra szemlélteti a Hb (A), a Hct (B) és a BD (C) korrelációját a kilégzett CH₄-szintekkel.



51. ábra. A Hct-értékek, Hb-szintek, BD-szintek és a kilégzett CH₄-koncentrációk összefüggése a súlyosan sérült beteg esetében. A fekete pontok az egyéni adatokat mutatják a szórási diagrammon. Pearson korrelációs elemzéssel készült grafikon ábrázolja a regressziót (egyenes fekete vonal) és az ahhoz tartozó r értékeket, amelyek a lineáris összefüggések erősségét jelzik, valamint a szignifikanciát (P < 0,001).

Az EtCO₂ szintek 27 és 40 mmHg között mozogtak, ami azt mutatja, hogy nem volt jelentős ventilációs károsodás, amely befolyásolhatta volna a kilélegzett CH₄-koncentrációkat.

5.3.4. Mitokondriális diszfunkció trauma-indukált koagulopátiában

Betegpopuláció és demográfiai adatok

A súlyos traumás sérültek (n = 113) medián életkora 38 év (IQR, 20-51), medián ISS értéke 28 (IQR, 20-48) megfelelt a bevonási kritériumoknak, és a betegek csupán 23,9%-a volt nő. Az életkorban és nemből megegyező kontrollcsoport tagjai nem különböztek a polytraumás betegektől ezekben a jellemzőkben, kivéve a trauma előzményeit. A súlyos traumás sérültek többsége tompa sérülést szenvedett (68%), és a leggyakoribb sérülési mechanizmusok közé tartoznak a közúti balesetek (52,6%) és a leesések (18,7%). A leggyakoribb sérült testrészek az extremitások (35,2%), a thorax (25,25%) és a fej és nyak (28,4%) voltak. A résztvevők kétharmada a első 24 órán belül műtéten esett át. Vérkészítményeket az esetek 68,7%-ában alkalmaztak. 22 beteg halt meg 30 napon belül, ami 19,4%-os halálozási arányt eredményezett (5. táblázat).

Demográfia	Súlyos traumás beteg (n=113)	Kontroll beteg (n=48)	P érték
Nem			
<i>férfi n (%)</i>	86 (76)	40 (83)	
<i>nő n (%)</i>	27 (24)	8 (17)	
Kor medián (IQR)	38 (26-59)	43 (29-62)	0,18
BMI medián (IQR)	27 (19-34)	25 (18-31)	0,54
Sérülés			
Tompa <i>n (%)</i>	77 (68)		
Átható <i>n (%)</i>	36 (32)		
Sérülés súlyosság			
ISS medián (IQR)	28 (20-48)		
<i>AIS_{fej, nyak} ≥ 3 n (%)</i>	32 (28)		
<i>AIS_{arc} ≥ 3 n (%)</i>	5 (4)		
<i>AIS_{mellkas} ≥ 3 n (%)</i>	29 (26)		
<i>AIS_{hasi, kismedencei rész} ≥ 3 n (%)</i>	20 (18)		
<i>AIS_{végtagok, medence öv} ≥ 3 n (%)</i>	40 (35)		
<i>AIS_{végtagok} ≥ 3 n (%)</i>	3 (2.7)		
Sérülés Mechanizmusa n (%)			
Közlekedési baleset	59 (52)		
Esés	21 (19)		
Támadás	7 (6)		
Baleset	4 (4)		
Egyéb	22 (20)		
Kimeneteli eredmények n (%)			
Vérkészítmény alkalmazása	77 (68)		
Masszív transfúzió	26 (23)		
Vazopresszorok alkalmazása	52 (46)		
Intenzív osztályra való felvétel	74 (66)		
Műtét az első 24 órában	76 (67)		
Halálozás az első 24 órában	14 (12)		
Halálozás az első 30 napban	22 (19)		

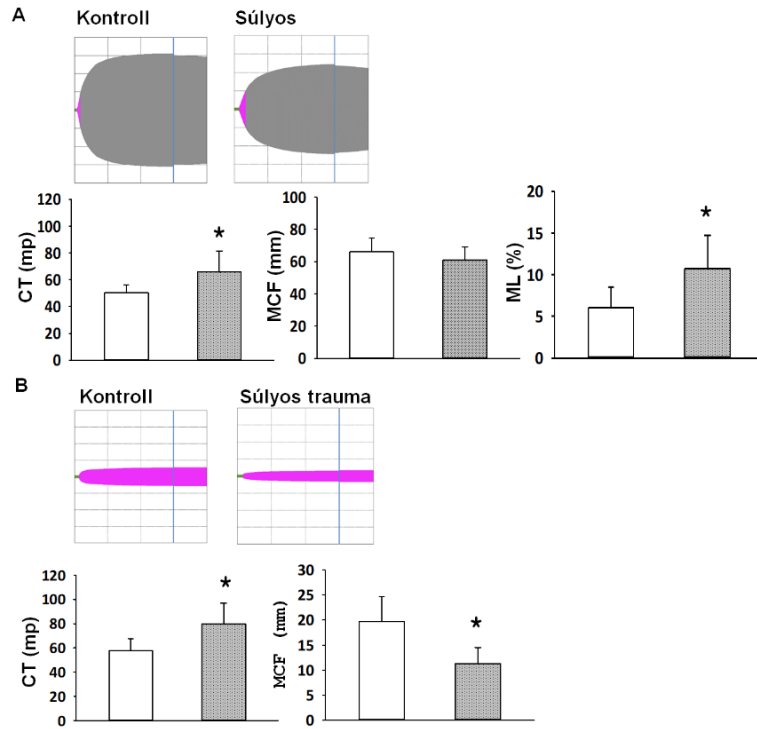
5. táblázat. A súlyos traumás sérültek jellemzői, a sérülések súlyossága és mechanizmusa, az érintett testrészek és kimeneti eredmények. IQR: interkvartilis tartomány, BMI: testtömegindex, ISS: sérülés súlyossági pontszám, AIS: rövidített sérülési skála.

A súlyos traumás sérültek életfontosságú paraméterei, mint a HR és a SBP, szinte normálisak voltak, akárcsak a Hb, Ht és trombocitaszám csökkenése. Azonban a BD és a standard koagulációs teszt értékei, amelyek képesek mérni a hemosztázis egyes komponenseit, szignifikánsan eltértek a polytrauma csoportban (6. táblázat).

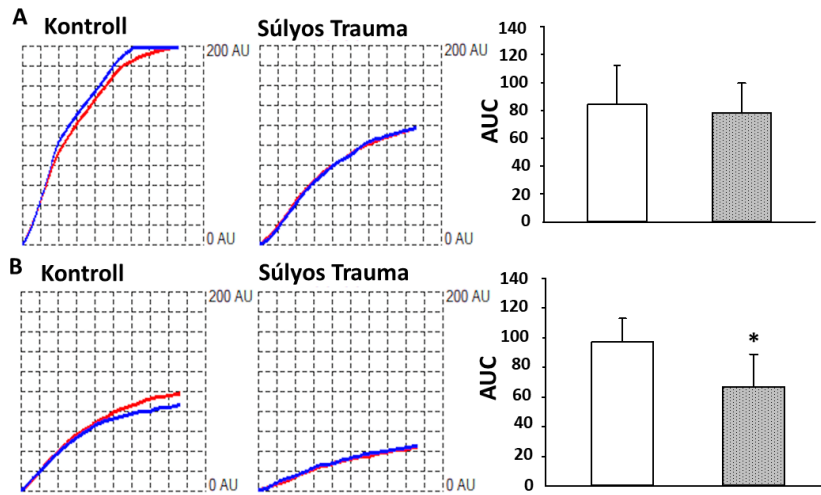
Diagnosztika (átlag ± SD)	Súlyos traumás beteg (n=113)	Kontroll beteg (n=48)	P érték
HR (/perc)	99 ± 16	81 ± 16	0,661
SBP (mmHg)	124 ± 29	122 ± 20	0,784
BD (mmol/L)	4,3 ± 5,3	1 ± 0,4	<0,001
Lac (mmol/L)	3,5 ± 1,7	1 ± 0,3	<0,001
Hb (mmol/L)	6,7 ± 1,5	6,7 ± 1,6	0,915
Ht (%)	36 ± 6	36 ± 7	0,904
Plt (10 ⁹ /L)	244 ± 44	256 ± 71	0,412
PT (másodperc)	16 ± 2	14 ± 0,5	<0,05
INR	1,3 ± 0,2	1,0 ± 0,1	<0,001
aPTT (másodperc)	35 ± 5	28 ± 2	<0,001

6. táblázat. A súlyos traumás és kontroll betegek vitális paraméterei és laboratóriumi értékei. HR: szívfrekvencia, SBP: szisztolés vérnyomás, GCS: Glasgow Kóma Skála, BD: bázishiány, Lac: laktát, Hb: hemoglobin, Ht: hematokrit, Plt: trombocitaszám, aPTT: aktivált parciális tromboplasztin idő, PT: protrombin idő, INR: nemzetközi normalizált arány, SD: standard deviáció.

Az extrinszik koagulációs útvonal működését a szöveti faktor és CaCl₂ jelenlétében értékeltük. A CT (66 ± 16 másodperc vs. 50 ± 6 másodperc) és az ML szignifikánsan nőtt (11 ± 4% vs. 6 ± 2%), miközben a MCF értéke jelentős csökkenést mutatott (61 ± 8 mm vs. 66 ± 9 mm) a súlyos sérült csoportban a kontroll csoporthoz képest. A fibrin polimerizációját a trombocita inhibitor citochalaszin D jelenlétében jellemeztük. Az EX-teszttel kapott eredményekkel összhangban hasonló változásokat találtunk a CT-ben (80 ± 17 mp vs. 58 ± 10 mp) és az MCF-ben (11 ± 3 mm vs. 20 ± 5 mm) a súlyos sérült csoportban a kontroll csoporthoz képest (52. ábra). A trombociták aggregációját először ADP jelenlétében (ADP-teszt) mértük. Az aggregáció szintje jelentősen csökkent a polytraumatizált csoportban (38 ± 12 AUC vs. 112 ± 14 AUC). Ez a csökkenés arachidonsav jelenlétében is megfigyelhető volt (ASPI-teszt) (78 ± 22 AUC vs. 84 ± 28 AUC), azonban nem volt szignifikáns (53. ábra).

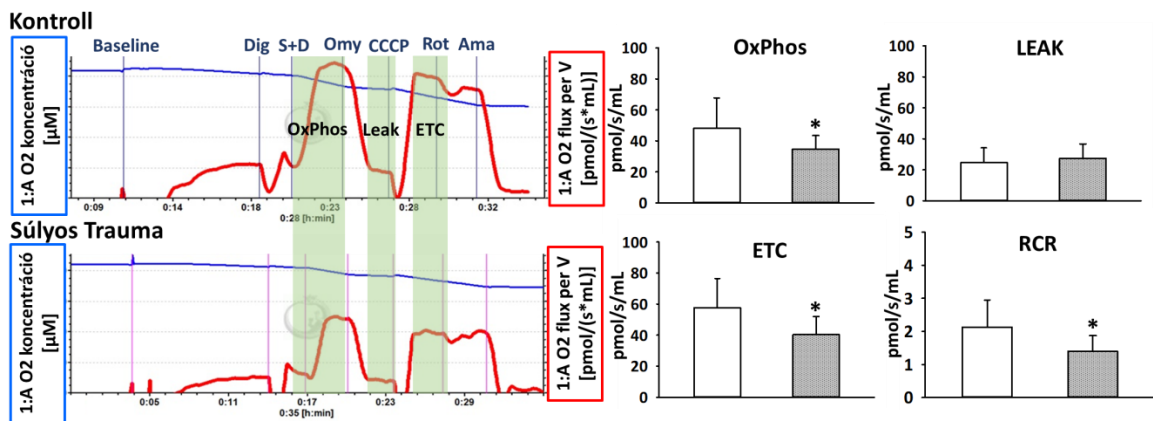


52. ábra. Viszkoelasztometriai vizsgálatok súlyos traumás és kontroll betegek vérmintáiból. (A) A súlyos traumás sérülés hatása az extrinsic koagulációs útvonalra. (B) A polytrauma hatása a fibrin polimerizációjára. Fehér oszlopok: kontroll csoport; szürke oszlopok: polytrauma csoport; CT: alvadási idő (másodperc); MCF: maximális alvadékszilárdság (milliméter); ML: az MCF-et követő maximális lízis szintje. (a teljes vérrögképződés százalékában); Az adatokat átlag \pm SD-ben adjuk meg. * $P \leq 0,05$ vs. kontroll (kétmintás t-próba, kontroll: $n = 48$, súlyos trauma: $n = 113$).



53. ábra. Aggregációs vizsgálatok súlyos traumás és kontroll betegek vérmintáiból. (A) ASPI-teszt. A trombocita-aggregáció mérése prokoaguláns arachidonsav jelenlétében. (B) ADP-teszt. A trombocita-aggregáció mérése a véralvadást elősegítő adenosin-difoszfát (ADP) jelenlétében. A piros és a kék görbe két párhuzamos mérést ábrázol különálló elektrodákkal, azonos körülmények között, 6 percen keresztül. Fehér oszlop: kontrollcsoport; szürke oszlop: polytraumás csoport; AU: önkényes egység; AUC: görbe alatti terület; az adatok átlag \pm SD-ben vannak feltüntetve, * $P \leq 0,05$ vs. kontroll (kétmintás t-próba, kontroll: $n = 48$, súlyos trauma: $n = 113$).

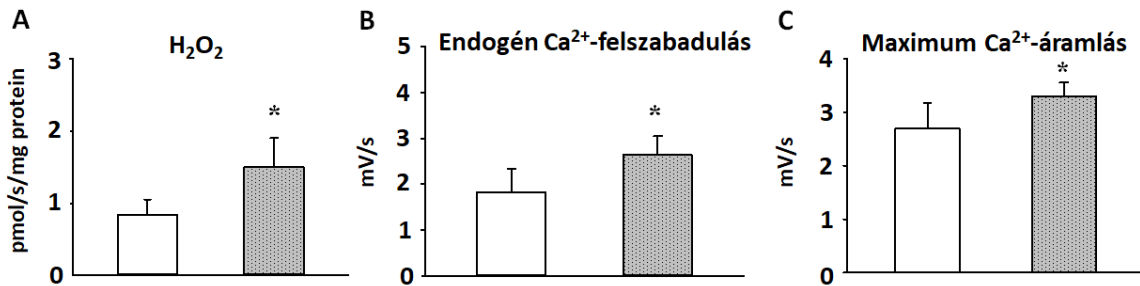
Mitochondriális oxigénfogyasztás vizsgálatakor azt találtuk, hogy az OxPhos ($34,7 \pm 8,8$ pmol/s/mL vs. $48,0 \pm 19,7$ pmol/s/mL), a Leak légzés ($27,3 \pm 9,4$ pmol/s/mL vs. $24,6 \pm 9,6$ pmol/s/mL) és az ETC ($40,3 \pm 11,8$ pmol/s/mL vs. $57,7 \pm 18,7$ pmol/s/mL) jelentősen romlott a súlyos traumát szenvedett betegekben a kontroll betegekhez képest. Az ETC minőségének ellenőrzésére meghatároztuk az RCR-t, amely az OxPhos és Leak hányadosa. Az RCR szignifikáns különbsége ($1,3 \pm 0,8$ vs. $2,1 \pm 0,8$) arra utal, hogy megfigyeléseink nem csupán az alanyok szubsztrátokhoz való hozzáféréseinek hiányából erednek, hanem a mitokondriális membránnal kapcsolatos károsodásból is (54. ábra).



54. ábra. Mitochondriális oxigénfogyasztás különböző állapotokban, HRR-rel mérve. Bal oldalon a trombocita mitokondriumok oxigénfogyasztásának (piros vonal) reprezentatív mérései a Kontroll és a Súlyos Trauma csoportokban. A kék vonal a mérési kamrákban található mitokondriális légzőközeg oxigénkoncentrációját ábrázolja. Jobb oldalon a mitokondriális mérések eredményei. Az oxidatív foszforiláció (OxPhos; ADP-függő légzés) a Komplex II szubsztrát szukcinát (S), Komplex V szubsztrát adenzin-difoszfát (D) és Complex I inhibitor rotenon (Rot) jelenlétében volt mérve. A Leak légzést az ATP szintézis (ADP-független légzés) gátlására használt Komplex V inhibitor Oligomicinnel (Omy) mérték. A maximális elektrontranszport kapacitást (ETC) a dekapcsolót, a Carbonyl-cianid m-klór-fenil-hidrazon (CCCP) hozzáadását követően mérték. Dig: Digitonin; S+D: szukcinát és ADP egyidejű hozzáadása; Rot: Rotenon; Ama: Antimicin-A; C-F: A trombocita mitokondriumok mitokondriális légzése. Fehér oszlop: Kontrollcsoport; Szürke oszlop: Súlyos Trauma csoport; Az adatok átlag ± SD formájában kerülnek bemutatásra. * $P \leq 0,05$ vs. kontroll (kétmintás t-próba, kontroll: $n = 48$, súlyos trauma: $n = 113$) szignifikánsnak tekintendő. RCR: Respirációs akceptor kontroll arány, amely az OxPhos és Leak hányadosaként van meghatározva. HRR: magas felbontású respirometria

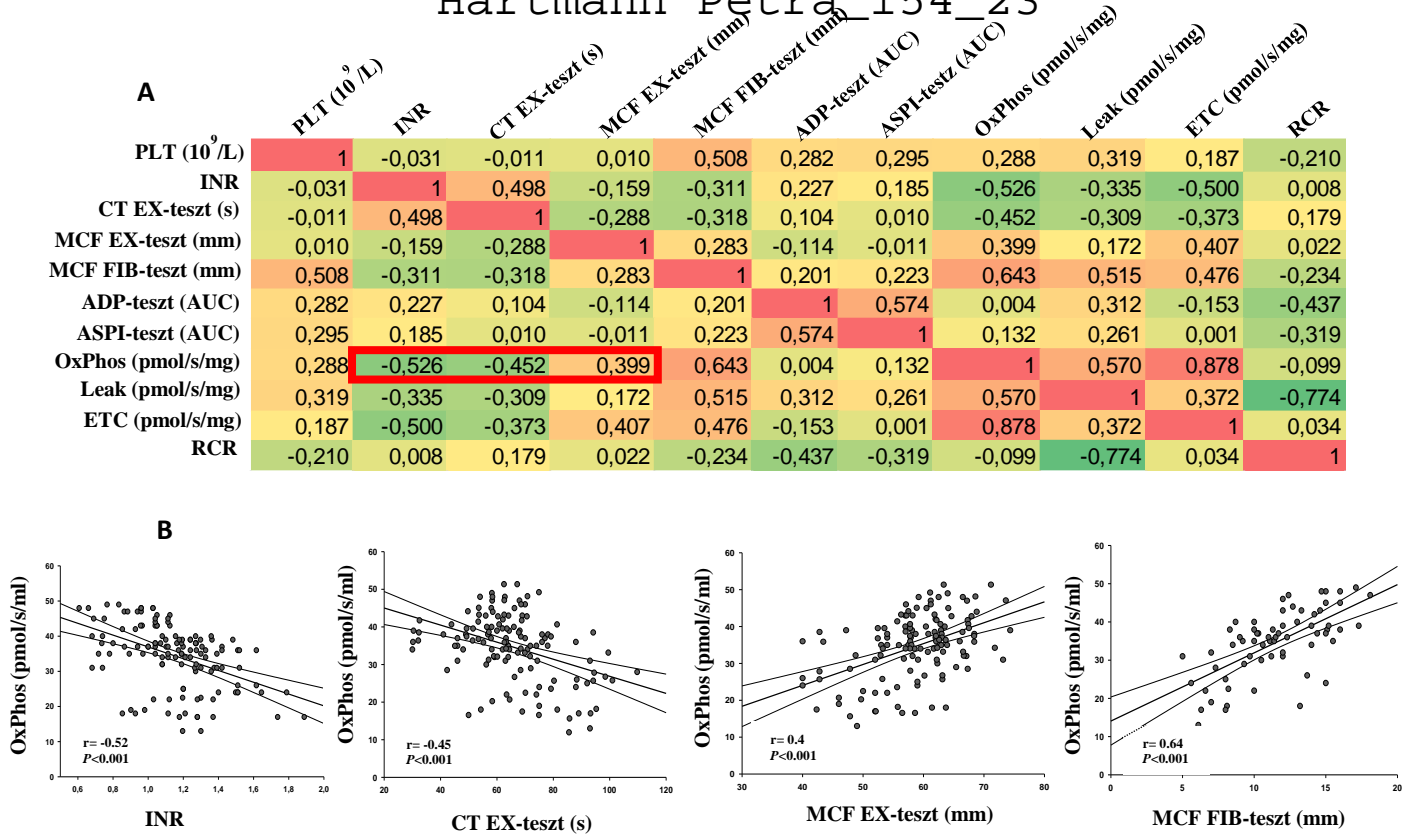
A mitokondriális H_2O_2 kibocsátás, mint a mitokondriális eredetű ROS termelésének markere, szignifikánsan megnövekedett a súlyos traumás sérült csoport trombocitáiban a kontroll csoporthoz képest ($1,6 \pm 0,3$ pmol/s/mg vs. kontroll $0,8 \pm 0,2$ pmol/s/mg). Először az alap Ca^{2+} fluxust értékeltük, ami az endogén Ca^{2+} felszabadulásra utal. Szignifikáns növekedést figyeltünk meg a CaGreen-5N fluoreszcens intenzitásában a polytraumás csoportban ($2,6 \pm$

0,4 mV/s) a kontroll csoporthoz képest ($1,8 \pm 0,5$ mV/s). Ezt követően az exogén Ca^{2+} -triggerelt Ca^{2+} fluxust vizsgáltuk, amelyet a CaCl_2 telítő mennyiségének hozzáadásával indukáltunk, ezáltal megnyitva az mPTP-t a mitokondrium belső membránján. A polytrauma következtében a trombocita mitokondriumok kevesebb fluoreszcens választ mutattak az exogén Ca^{2+} iránt ($3,3 \pm 0,3$ mV/s), mint a kontroll csoport mitokondriumai ($2,7 \pm 0,5$ mV/s) (55. ábra).



55. ábra. A trombociták mitokondriumaihoz köthető hidrogén-peroxid (H_2O_2) termelés és Ca^{2+} áramlások. (A) H_2O_2 termelés a trombocita mitokondriumokban (B) Endogén Ca^{2+} felszabadulás OxPhos során. (C) Exogén Ca^{2+} -triggerelt maximális Ca^{2+} fluxus a CaCl_2 titrálás után. A súlyos traumás sérült csoport szürkével, a kontroll csoport fehérrel van jelölve. Az adatok átlag \pm szórás formájában kerülnek bemutatásra. * $P \leq 0,05$ vs. kontroll (kétmintás t-próba, kontroll: $n = 48$, súlyos trauma: $n = 113$).

A mitokondriális funkcionális paraméterek és a rendelkezésre álló klinikai paraméterek közötti összefüggések vizsgálatára korrelációs elemzést végeztünk. A mitokondriális mérések, a betegdemográfiai adatok, a sérülési információk, a hagyományos alvadási paraméterek és koagulációs vizsgálatok adatait bevonva egy korrelációs mátrixot képeztünk (56A. ábra). Erős negatív korreláció figyelhető meg az OxPhos és az ISS között a trombocita mitokondriumokban ($R^2 = 0,448$; $P < 0,05$), az ICU tartózkodás időtartama, a 30 napos mortalitás és a masszív transzfúzió iránti szükséglet között, míg a FIB-teszt MCF és a Ht pozitív korrelációt mutattak. Nyilvánvaló, hogy az OxPhos az egyéb mitokondriális paraméterekkel is korrelált (Leak légzés, ETC, RCR) (56B. ábra).



56. ábra. Korreláció analízis, amely a trombocita mitokondriális diszfunkcióját mutatja klinikai paraméterekhez kapcsolódóan polytrauma esetén. (A) A korrelációs mátrix pozitív (piros) és negatív (zöld) Pearson r értékeket jelöl. (B) A mitokondriális diszfunkcióval szignifikánsan kapcsolódó korrelációk. ISS: sérülés súlyossági pontszám, HR: szívfrekvencia a felvételkor, SBP: szisztolés vérnyomás a felvételkor, SaO₂: oxigén szaturáció, PT: prothrombin idő, PTT: részleges tromboplastin idő, FGN: fibrinogén, Hgb: hemoglobín, Hct: hematokrit, PLT: trombocita. OxPhos: oxidatív foszforiláció, Leak: leak légzés, RCR: respirációs kontroll arány, ETC: elektrontranszfer kapacitás, H₂O₂: hidrogén-peroxid.

6 MEGBESZÉLÉS

6.1 Mikrokeringési kutatások

A gyulladás mikrokeringési változásainak vizsgálatát C/K-indukált arthritisz modellben végeztük [184], amely az oszteoarthritiszhez hasonló, akut kezdetű monoarthritisz jól ismert modellje [185]. Ebben a modellben az ízületi gyulladás az ízületi hártya mechanikai károsodása nyomán indul, gyulladásos választ váltva ki, és aktiválva a vér-izület gát endotélsejtjeit [186]. A C/K injekció után a PMN-ek kitapadása szignifikánsan nőtt a szinoviális membrán posztkapilláris venuláiban, amit a β 2-integrinek és endotél-ligandjaik (ICAM, VCAM) szabályoznak [187]. Korábbi eredményeink szerint az endotél adhéziós molekulák jó markerei a gyulladásos aktivitásnak, és IVM-mel kvantitatívan értékelhetők, objektív módon mérve terápiás beavatkozások hatékonyságát [188]. EP alkalmazása során a diclofenac szérumszintje szignifikánsan magasabb volt, mint hagyományos topikális alkalmazásnál. Míg hagyományos alkalmazás után a szinoviális folyadékban a diclofenac nem volt kimutatható, EP-vel a szinoviális koncentrációja hasonló volt a szérumszinthez. Az EP elősegítve a diclofenac hatékonyabb bejutását a szinoviális térbe csökkentette a leukocita-endotél interakciókat és a gyulladást. Eredményeink azt sugallják, hogy az EP alkalmazása ígéretes módszer a transzdermális gyógyszeradagolás hatékonyságának növelésére, mivel képes ideiglenes pórusokat nyitni a membránokon, elősegítve a gyógyszerek hatékonyabb bejutását a célzott szövetekbe [189]

A transzdermális gyógyszerbevitel hatékonyságának fokozása mellett kiemelten fontos annak biztonságossá tétele is. Ennek érdekében egy új *in vivo* kísérleti modellt dolgoztunk ki, amely lehetővé teszi a penetrált gyógyszer mennyiség pontos mérését [190]. A vizsgálatokhoz SKH-1 szőrtelen egereken háti bőrredőt hoztunk létre. A bőrredő sebzetlen oldalát ibuprofénal kezeljük, míg a sebzett oldalon egy fémhengerben lévő puffer oldatban mértük a gyógyszer megjelenő koncentrációját HPLC-technikával. A módszer újdonsága, hogy a korábbi *in vitro* rendszerekkel (pl. Franz-cella) szemben itt *in vivo* vizsgálhattuk a gyógyszer farmakokinetikáját [191]. A mikrokeringési vizsgálatokat annak érdekében végeztük, hogy megállapítsuk, a sebészeti technika befolyásolja-e a gyógyszer felszívódását és penetrációját. IVM alkalmazásával mértük a véráramlás sebességét és a perfúziós arányt.

Eredményeink alapján a mikrokeringési paraméterek a sebzett és a nem sebzett oldalon nem mutattak szignifikáns eltérést, vagyis a mikrokeringés nem változott meg a kísérlet során. Ez azt jelzi, hogy a kísérleti modell megbízható, és nem okoz mikrokeringési károsodást, ami zavarhatná a gyógyszerfelszívódást, így alkalmas a transzdermális gyógyszerbevitel további vizsgálatára.

A bőrredő modell alkalmazását kiterjesztettük az ICD vizsgálatára, amelyet SLS-sel indukáltunk [192]. A gyulladás kezelésére természetes poliolokat, glicerint és xilitet használtunk. Az SLS által kiváltott lokális véráramlás-növekedést és fokozott perfúziós arányt a poliolok alkalmazása normalizálta. Emellett csökkentették a leukocita-endotél interakciókat, ami a gyulladás mérséklődését jelezte. A poliolok nemcsak a bőr hidratáltságát javították, hanem kedvezően befolyásolták a mikrokeringési paramétereket is, így potenciális terápiás szerekké válhatnak az ICD kezelésében.

A bőrredő modellt további vizsgálatokhoz is alkalmaztuk, amelyek a bőr mikrokeringésére és a sebgyógyulás folyamatára összpontosítottak [193]. A kísérlet fókuszában a RyR szerepe állt, amely kulcsszerepet játszik a Ca^{2+} felszabadításban és ezáltal a mikrokeringés és a gyulladás szabályozásában. A kísérlet során teljes vastagságú bőrsebek gyógyulását RyR agonista és antagonistákkal befolyásoltuk. Ismert, hogy a RyR-ek számos szerv különböző kaliberű ereiben expresszálódnak, például a vesében és az agyban, ahol kulcsszerepet játszanak az érrendszeri tónus szabályozásában [194,195]. A bőrben betöltött szerepük azonban eddig kevésbé volt feltárva. IVM vizsgálati eredményeink szerint a RyR antagonistákkal helyi alkalmazása 25%-al növelte a sebszélek kapillárisaiban a véráramlás sebességét és az érátmérőt. Ez a növekedés az arteriolák vazodilatációjának és a prekapilláris sphincterek relaxációjának volt tulajdonítható, ami jobb oxigén- és tápanyagellátást biztosított a sérült szövetek számára [196]. Az LDF mérések eredményei egyaránt alátámasztották, hogy a RyR antagonistákkal jelentősen javította a sebterület perfúzióját ezáltal gyorsítva a regenerációt. A Dantrolén alkalmazása során kapott mikrokeringési eredmények azt mutatják, hogy a RyR-ek gátlása hatékonyan csökkenti a gyulladásos reakciókat, amit más szervekben korábban leírt farmakológiai megfigyelések is alátámasztanak [197,198]. Ezek az eredmények tovább bővítik a transzdermális kezelések lehetőségeit, hangsúlyozva a mikrokeringési paraméterek pontos mérésének és optimalizálásának jelentőségét az akut és krónikus gyulladásos állapotok kezelésében. A

gyulladásos modellek és transzdermális gyógyszeradagolás vizsgálatából származó eredményeink egyaránt rámutattak a mikrokeringés szerepére a gyulladás és a regeneráció szabályozásában. Ezek a megfigyelések tovább erősítik azt a felismerést, hogy a mikrokeringési folyamatok pontos monitorozása és befolyásolása kulcsfontosságú lehet nemcsak gyulladásos betegségek, hanem implantátumok körüli szöveti regeneráció szempontjából is.

Ezen megközelítés szellemében végeztük el az osseointegrált implantátumok peri-implant területeinek mikrokeringési vizsgálatát, amelyben különböző műtéti technikáik, félvastag bőr (STR) és lágyrészkímélő (STP), hatását hasonlítottuk össze [199]. A mikrokeringési paraméterek mérésekor a bőr PR és a RBCV voltak a fő mutatók. Ebben a vizsgálatban az LDF-et helyi hőhatással kombináltuk, amely során a hő hatására bekövetkező áramlásváltozások a bőr mikrokeringésének reaktivitását mutatják. Amíg a véráramlás abszolút értékei jelentős változékonyságot mutattak különböző testfelületeken, az áramlásváltozás elfogadott paraméterként szolgál a mikrokeringési funkció minőségének meghatározásában [200].

Eredményeink szerint a hőprovokáció után az STP technika alkalmazása javította a véráramlást, míg az STR csoportban a perfúzió és az RBCV csökkent. Bár a szövődmények előfordulása nem mutatott szignifikáns különbséget a két implantációs technika között, az STP technika megőrizte a bőr vaszkularizációját, elősegítve a regenerációs folyamatokat és csökkentve a szövődmények kockázatát. Az implantátumok körüli mikrokeringési folyamatok vizsgálata során kapott eredményeink hangsúlyozzák a megfelelő technikai megközelítések fontosságát a szöveti regeneráció elősegítésében. Az STP technika által biztosított jobb vascularizáció rávilágított arra, hogy a lokális mikrokeringés optimalizálása jelentős szerepet játszik a regenerációs folyamatokban és a szövődmények csökkentésében [201]. Ezt a megközelítést tovább erősítik a következő vizsgálataink, amelyekben az endoszteum és a periosteum keringését elemeztük egy törés utáni állízülettel rendelkező beteg reoperációja során. A beteg több korábbi oszteosintézis műtéten esett át, és különféle implantátumokkal rendelkezett az érintett területen. Az eredmények alátámasztották, hogy a mikrokeringés zavara közvetlenül összefügg az elhúzódó törésgyógyulással. Kiemelnénk a perioszteális és endoszteális rendszerek integritásának megőrzésének kritikus jelentőségét a csontgyógyulásban. A mikrokeringési mérések így új perspektívát kínálnak az állízületek

kezelésében, különösen azokban az esetekben, ahol az etiológiát nehéz pontosan meghatározni. [202]. Az eredmények első ízben nyújtottak bizonyítékot arra, hogy a mikrokeringési zavarok, különösen a perioszteális és endoszteális rendszerek együttes károsodása, jelentősen befolyásolhatja a klinikai kimenetelt kiterjedt oszteosztézisek esetén. Ennek megfelelően a preoperatív tervezés és a lokális mikrokeringés fenntartása döntő fontosságú a sikeres reoperáció érdekében [203,204].

Mikrokeringési kutatásaink következő célpontja az IR által kiváltott mikrokeringési károsodások mérséklése volt. Az IR során fokozódik a ROS termelése, amely gyulladással válaszokat vált ki, mint a leukociták aktivációja és endotéliális adhéziója, súlyosan károsítva a mikrokeringés integritását [21]. A ROS fő sejtes forrásai az erek símaizom és endothélszéljében a NADPH-oxidázok, különösen a NOX2 és NOX4, amelyek aktivitása az IR hatására nő [205,206].

Kutatásaink során két kezelés hatását vizsgáltunk a máj IR-re: a távoli IPC-t és a GPC adását [207]. Az IPC alkalmazása, amely rövid, ismétlődő iszkémiás periódusokból áll, jól megalapozott megközelítés a különböző szövetek iszkémiás toleranciájának növelésére. Érdekes módon a távoli szervek közötti IPC szintén védelmet nyújt a későbbi IR sérülésekkel szemben [208]. Az IPC távoli jótékony hatásainak megvalósulásában a sejtek redox homeosztázisát befolyásoló gének expressziójának változása az egyik kulcsfontosságú védelmi mechanizmus, amelyen keresztül alacsonyabb szintű ROS képződés érhető el az endotél szövetben [208,209]. Vizsgálatunkban az IPC szignifikánsan csökkentette a NOX2 expresszióját, mérsékelte az oxidatív stresszt és a gyulladással kapcsolatos reakciókat, javította a máj véráramlását és a RBCV-t, valamint csökkentette a leukociták endotéliális tapadását. A NOX4 expressziója azonban változatlan maradt, ami továbbra is hozzájárult a mikrokeringési diszfunkció fenntartásához. Ez rávilágít a NOX4 célzott gátlásának szükségességére az IR sérüléseinek további csökkentése érdekében. Az IPC hatása elsősorban a NOX2 szabályozásához kapcsolódhat, mivel a NOX2 expresszióját leukociták és endotél sejtek mediálják, amelyek érzékenyek az IPC által aktivált gyulladáscsökkentő mechanizmusokra. A NOX4 konstans expressziója viszont azt sugallja, hogy ez az izoforma az endotél sejtekben és más parenchimális sejtekben konstitutív aktivitással bír, és nem könnyen befolyásolható az IPC által.

A GPC kezelés antioxidáns és membránvédő tulajdonságai révén csökkentette a NOX4

expresszióját, javította a kapilláris véráramlást és a szöveti oxigéntelítettséget, valamint mérsékelte a gyulladásos enzimek, például az MPO és a HMGB1 aktivitását [210]. Ezáltal csökkentette a leukociták endotéliumhoz való tapadását és a mikrokeringési gyulladást. A NOX2 szintjét nem befolyásolta, ami arra utal, hogy a GPC hatása elsősorban a NOX4-hez kapcsolódik. A GPC foszfolipid prekuzorként fontos szerepet játszik a sejthártya stabilitásának és a sejtek antioxidáns védekezésének fenntartásában [89–91]. Ez különösen a NOX4 expresszió csökkentésében nyilvánul meg, mivel a konstitutívan is expresszálódó NOX4 aktivitása erősen függ a sejtek ROS-termelésre adott válaszáától és a membránstruktúrák stabilitásától [211,212]. Ezen kívül más NOX-októl eltérően a NOX4 a sejtplazmában és a mitokondriumokon is megtalálható [213]. A NOX2 aktivitásának változatlansága valószínűleg annak köszönhető, hogy a GPC elsősorban a parenchimális sejtekre gyakorolt hatásán keresztül fejt ki hatását, míg a NOX2 túlnyomórészt leukocitákban expresszálódik.

6.2 Mitokondriális kutatások

Elsőként a mitokondriális légzés IR hatására bekövetkező változásait írtuk le, amihez részleges máj IR modellt használtunk [60]. A máj homogenátumok respirációs aktivitását SUIE protokollal vizsgáltuk, amivel az ETC egyes elemei, a légzési lánc komplexei szelektíven vizsgálhatók. Kísérleteink során 60 perc iszkémiát és 60 perc reperfúziót követően vizsgálva a máj mitokondriumok ETC hatékonysága csökkent, ami alacsonyabb OxPhos kapacitásban nyilvánult meg a kontroll csoporthoz képest. A mitokondriumok kapcsoltsága is romlott, ami megnövekedett ROS termelésre és membrán károsodására utalt. A légzési komplexek szelektív vizsgálatával az IR alatt kialakuló ETC zavara mögött pedig oki tényezőként, az I-es komplex kiemelt szerepe igazolódott. Az IR során jelentkező mitokondriális zavarok enyhítésére a GPC és a CH₄ egyaránt ígéretes terápiás megközelítésnek bizonyult ugyanebben a modellben alkalmazva a mitokondriális stressz hatásainak csökkentésére. Elsőként a GPC mitokondriális légzésre gyakorolt hatásait is értékeltük az IR modellben [167]. Annak ellenére, hogy a membránban akár jelentős mennyiségben is jelen lehet, a máj endogén GPC-koncentrációja a vérzéses sokk után jelentősen csökken. Ez az állapot a szisztémás IR-sérülés egyik jól ismert modellje [214]. Korábbi kutatások azt sugallták, hogy az exogén GPC kedvezően befolyásolhatja a szöveti

reakciókat IR-esetekben [88,90,99]. Ezen tulajdonságai alapján a GPC különösen ígéretes terápiás szerként merült fel az IR által kiváltott májkárosodás kezelésére, amit a fent említett részleges máj-IR modellben is vizsgáltunk [94].

Kísérleteink során a GPC molekula egy új hatásmechanizmusát azonosítottuk, amely megmagyarázza a mitokondriális szinten kifejtett gyulladáscsökkentő hatását. *In vitro* vizsgálatok során kimutattuk, hogy 100 μmol GPC már közvetlenül javítani képes a mitokondriális OxPhos kapacitást NRMC mitokondriumokban [215]. Emiatt májhomogenátumokon dózis-hatás kísérleteket végeztünk *in vitro* anoxia-reoxigenizációs modellben, és igazoltuk a bazális oxigénfogyasztás dóziszfüggő fokozódását 100 és 200 mM közötti koncentrációkban. A 200 mM GPC alkalmazása pedig, mitokondriális ETC és OxPhos kapacitásának növekedéséhez vezetett mind normoxiás, mind anoxiás körülmények között [167].

A mitokondriális bazális oxigénfogyasztás növekedésének pontos mechanizmusa még nem ismert, de két lehetséges módot vetettünk fel: 1) a GPC kölcsönhatásba léphet bizonyos fehérjékkel, módosítva azok működését, vagy 2) befolyásolhatja a redoxkörnyezetet. Fontos megjegyezni, hogy az OxPhos szerveződése valószínűleg nem áll meg a légzési komplexek I-V sorrendjénél. A fluxuskontroll-kísérletek azt mutatják, hogy a légzési lánc egyetlen funkcionális egységként működik [75,216].

A "fluid-state modell" szerint az ETC egyes fehérjekomplexei szabadon diffundálnak a membránban, és az elektrontranszport véletlenszerű ütközéseken alapul. Újabb kutatások viszont azt sugallják, hogy az OxPhos enzimek szupramolekuláris struktúrákba rendeződnek [217]. Kimutatták például, hogy egy OxPhos-komplex alegységeit kódoló gének mutációi más komplexek stabilitását is befolyásolhatják; így a III. és IV. komplex elengedhetetlen az I. komplex összeállításához és stabilitásához [217,218].

Továbbá úgy tűnik, hogy a szuperkomplexek még nagyobb, húszerű struktúrákba szerveződnek. Például az ATP-szintáz komplex (V. komplex) hosszú oligomer láncokat alkot [219]. Bizonyos szuperkomplexek kialakulásához pedig megfelelő ozmotikus környezet szükséges [98,220], vizsgálataink pedig felvetik, hogy a GPC befolyásolja ennek a rendszernek a konformációját.

A GPC kezelés további hatása kísérleti modellünkben, hogy csökkentette az IR károsodás következtében fellépő Leak respiráció mértékét, ami összhangban a korábbi eredményekkel,

csökkent ROS-termeléssel járt együtt [93,214,221]. Ezen kívül az exogén GPC fokozta a mitokondriális oxigénfogyasztást mind normoxiás, mind hipoxiás körülmények között, ami egyértelműen bizonyítja, hogy a GPC képes növelni a mitokondriális aktivitást. Ennek további tisztázására egy másik protokollt alkalmaztunk, amely során az egyes ETC-komplexek szubsztrátjait és gátlóit adtuk hozzá. A komplex I inhibitora, a rotenon hatására az oxigénfogyasztás jelentősen csökkent, ami azt sugallja, hogy a komplex I a GPC által közvetített hatás célpontja.

Az IR okozta mitokondriális károsodás következő terápiás megközelítése az altatott, részleges máj iszkémiának kitett állatok 2,2%-os CH₄-tartalmú normoxiás mesterséges levegővel történő lélegeztetése volt [67]. Hagyományosan a reperfúziós károsodást vizsgálják ebben a modellben, de mi nem csak a reperfúziót követően, hanem az iszkémiás periódus végén is szövetmintát is vettünk HRR vizsgálatra. Eredményeink szerint a CH₄-tartalmú normoxiás levegő belélegzése megőrizte a máj mitokondriumok OxPhos aktivitását a szöveti iszkémia után, és jelentősen javította a bazális (II-es állapotú) mitokondriális légzést a reperfúzió megkezdése után. Ezen kívül az IR által indukált ROS termelést, a citokróm c felszabadulást és a hepatocita apoptózist is jelentősen csökkentette. A CH₄ hatása révén a mitokondriális membránok stabilizálódtak, ami csökkentette az oxidatív stresszt és segítette a mitokondriális funkció fenntartását. Érdekes módon a CH₄ az áloperált állatokban is növelte a bazális légzést, anélkül, hogy az a ROS termelődés fokozódásával járt volna. A bazális légzés a fiziológiásan nem kapcsolt ("uncoupled") vagy pathológiás esetben szétkapcsolt ("dyscoupled") mitokondriális légzés, amikor az oxigén áramlás fenntartódik a proton szivárgás kompenzálására magas kémiai ozmotikus potenciál mellett, amikor az ATP-szintáz nem aktív. Áloperált állapotban pedig a CH₄ fokozta a bazális légzést, ami arra utal, hogy a metán közvetlenül hatott a mitokondriális membránok védelmére és a proton szivárgás kompenzálásával.

Eddigi vizsgálataink a meleg iszkémia-reperfúzió (IR) által kiváltott mitokondriális hatásokra összpontosultak, azonban a klinikumban a szervtranszplantációk során a hideg IR legalább olyan jelentőséggel bír. Számos tanulmány rávilágított a hideg és a meleg IR közötti különbségekre a sejtszintű és molekuláris mechanizmusok tekintetében [222,223]. Kutatásaink során a hideg IR mitokondriumokra gyakorolt hatását különböző transzplantációs modellekben vizsgáltuk [183,224]. Szívtranszplantációs modellünkben a

donor szívet 1 órán át 4 °C-os HTK szervtartósító oldatban tároltuk, majd heterotóp transzplantációval ültettük át a recipiensbe [224]. Preklinikai májátültetési modellünkben a májgraftot 24 órán keresztül hideg HTK-ban tartósítottuk, ezt követően pedig egy *ex vivo* szervkád rendszerben reperfundáltuk [183]. Eredményeink szerint a hideg IR jelentős hatással van a mitokondriális funkciókra, amelyek alapvetően befolyásolják az allograftok poszttranszplantációs működését [59,225]. A szívgraftok statikus hideg tárolása csökkent mitokondriális OxPhos kapacitással, fokozott citokró-m-c felszabadulással és a proapoptotikus fehérjék transzkripciójának fokozódásával járt. E változásokkal párhuzamosan a szívizom kontraktilitás is csökkent [224]. A hideg IR hatására a májgraftokban a mitokondriális metabolikus aktivitás csökkenésén és a szövettani elváltozásokon kívül portális nyomásfokozódást, és az epe kiválasztásának csökkenését is meg lehetett figyelni.

Az említett mitokondriális metabolikus változásokról kimutatták, hogy jelentősen rontják a poszttranszplantációs grafft funkciókat, ezért az utóbbi időkben a graftok hideg tároláshoz használt szervtartósító oldatok fejlesztésének középpontjába került a mitokondriális védelem [225,226]. Kísérleteinkben a HTK-oldatot használtuk, ami a májátültetésben rutinszerűen használt megoldás, különösen hatékony az epeúti szövődmények megelőzésében, alacsony viszkozitása miatt gyorsabb hűtést tesz lehetővé. A HTK-t mint cardioplégias oldatot előszeretettel használják szív-műtétek során is, mivel a hideg HTK egyszeri beadása a koronáriákba legalább 2 órán át megbízható védelmet nyújt a szív IR sérülésével [227]. Ami a HTK számunkra legkedvezőbb tulajdonsága volt vizsgálataink során, hogy sikeresen dúsítható CH₄-gyel [224,228].

A mitokondriális folyamatok háttérében a graft eltávolítását követően a keringés megszakadása áll, ami az oxigén, mint a légzési lánc utolsó elektronakceptorának hiányát idézi elő. Ez az elektrontranszport károsodásához vezet, amely során a légzési komplexek szubsztrátjai, például a NADH és a szukcinát, felhalmozódnak, míg az OxPhos révén történő ATP-termelés megszűnik [67,69,229]. Oxigén hiányában a szukcinát-dehidrogenáz (II. komplex) a CoQ-állomány magas redukált szintje miatt megfordítja működését, elektronokat adva át a fumarátnak, ami szukcinát-felhalmozódást eredményez. Ez utóbbi az iszkémia egyik jellegzetes metabolikus markere [57]. Az ATP kimerülése diszfunkciót okoz a membrán nátrium-kálium pumpák (Na⁺/K⁺-ATPázok) és Ca²⁺-pumpák (Ca²⁺-ATPázok)

működésében, akadályozva a Ca^{2+} -ionok visszavételét, és zavart keltve a sejten belüli enzimikus reakciókban. A reperfúzió további mitokondriális károsodásokkal jár, amikor a felhalmozódott szukcinát gyors oxidációja révén szuperoxid képződik.

A reperfúziós károsodás korai szakaszában a szuperoxid-termelés túlnyomórészt az I-es komplexhez kötött [230–233]. Ezt a feltételezést alátámasztják olyan tanulmányok, amelyek kimutatták, hogy az iszkémiás prekondicionálás vagy az I-es komplex reverzibilis gátlóival végzett előkezelés csökkenti a ROS-termelést és a szív IR sérülését [231,233]. Iszkémia során a szubsztrátok hiánya miatt az I-es komplex működése gátlódik, és légzési aktivitása a reperfúzió korai szakaszában is gátolt marad, miközben túlzott mértékű ROS-termelés zajlik. A reperfúzió alatti mitokondriális szabadgyöktermelés vizsgálatára NRMC mitokondriumokon végeztünk *in vitro* vizsgálatokat [69]. A CH_4 -kezelés során az I-es komplexhez kötött légzés mind a kontroll, mind az iszkémiásan károsodott mitokondriumokban csökkent, azonban nem változott, ha a rendszert rotenonnal, az I-es komplex irreverzibilis gátlószerével kezelték. Ez arra utalt, hogy a CH_4 részleges elektrontranszport-blokád révén csökkenti az I-es komplex által termelt ROS-t.

Az I-es komplexen belül két szuperoxid-termelő helyet azonosítottak: az ubikinon (Q)-kötő helyet és a flavin helyet [232]. A flavin helyen a szuperoxid-termelés az előrehaladó elektrontranszport-hoz kapcsolódik, amelynek sebességét a mátrixban lévő nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) kötő hely redukciós állapota szabályozza. Ezzel szemben a Q-kötő hely sokkal gyorsabb ütemben termel szuperoxidot, amit az elektronok reverz áramlása, a RET okoz, amikor a II-es komplexből az I-es komplexbe irányul az elektronáramlás a reoxigenáció során [57].

Az NRMC mitokondriumokban a RET mechanizmusának alapját a hipoxia alatti szukcinát-felhalmozódás és annak gyors oxidációja képezi a reoxigenáció alatt, amit a magas $\Delta\Psi_m$ tesz lehetővé [234]. A rotenon, amely az elektrontranszport irreverzibilis gátlója a Q-kötő helyen, kimutathatóan kardioprotektív hatást fejt ki azért, hogy csökkenti a RET-et a reperfúzió korai szakaszában [231]. Eredményeink szerint a CH_4 hatásmechanizmusa a flavin helyen túli aktív területre koncentrálódik, hasonlóan a rotenonéhoz. Ez azért valószínűsíthető, mert a CH_4 fokozza a mitokondriális ROS-termelést, amikor az elektronok NADH-ból lépnek be az I-es komplexbe, miközben gátolja a ROS-termelést a II-es komplexből az I-es komplexbe irányuló RET révén. A nagy $\Delta\Psi_m$ kulcsfontosságú ahhoz, hogy az elektronok a

redoxpotenciál-gradiens ellenében haladjanak a II-es komplexből az I-es komplexbe. Kimutatták, hogy izolált mitokondriumokban már a $\Delta\Psi_m$ mindössze 5%-os csökkenése is 95%-kal mérsékli a peroxid-termelést [235]. Kísérletünkben a CH_4 enyhén mérsékelte a szubsztrát által kiváltott hiperpolarizációt a kontroll mitokondriumokban, miközben védő hatást mutatott az anoxiás károsodott membránok esetében.

Kutatásainkban kimutattuk, hogy az I-es komplex aktivitása jelentősen csökkent az IR hatására, míg a II-es komplex aktivitása között nem mutatkozott szignifikáns különbség a csoportok között. A továbbiakban részletesen vizsgáltuk az I-es és II-es mitokondriális komplexek szerepét a reperfüzió során, specifikus szubsztrátokat alkalmazva, szintén NRMC-modellben. A CH_4 -kezelés hatására csökkent a légzés, amikor glutamátot és malátot alkalmaztunk az I-es komplex szubsztrátjaiként, azonban szukcinát, mint a II-es komplex szubsztrátja esetében nem történt változás. Ez arra utal, hogy a CH_4 csökkenti az elektronáramlást az I-es komplexen keresztül, miközben nem befolyásolja a szukcinát oxidációját a II-es komplexben. Ezek az eredmények azt valószínűsítik, hogy a CH_4 jelenléte az I-es komplex gátlásán keresztül csökkenti a mitokondriális ROS-termelést, miközben megőrzi a II-es komplex szukcinát-oxidációját. Ugyanakkor a CH_4 hatása az elektrontranszport részleges blokádjában rejlik az I-es komplexen belül, nem pedig az oxidatív anyagcsere teljes gátlásában a reoxigenáció során.

Az I-es mitokondriális komplex két konformációban fordul elő: aktív (A) és deaktivált (D) állapotban, amelyek élettani körülmények között nagyjából 9:7 arányban vannak jelen [236]. Az A/D átmenet iszkémia vagy anoxia során következik be, gyorsan reagálva az oxigénhiányra [237]. Ezt az átmenetet különböző tényezők, például az oxigén elérhetősége, a mátrix NAD-készlete, a hőmérséklet és a pH befolyásolják. Az anoxia alatt felhalmozódó D-forma azért lehet jelentős, mert csökkenti a reoxigenáció során fellépő gyors légzés által kiváltott ROS-termelést [230,238]. A D-forma megőrzése hatékony stratégiának bizonyult poszt-iszkémiás agyi és szívsérülések elleni védekezésben [230,239,240]. Iszkémiás vagy anoxiás körülmények között a NAD teljes készlete redukálódik, de a flavin kötőhelyen lévő nukleotid gyorsan csökkenhet a reoxigenáció kezdetén a RET révén. Azonban az I-es komplex D-formája nem képes katalizálni a RET-et, így védelmi mechanizmusként működhet az enzim downstream redukációjának megakadályozásával. Mind a D-forma, mind a rotenonnal gátolt enzim korlátozza az ubikinon-kötő zsebhez való hozzáférést, amely a vas-

kén klaszter közelében található. Ennek eredményeként az előrehaladó elektrontranszport blokkolódik, és az ubikinol nem jut el a vas-kén klaszterhez, ezáltal a RET-ből eredő ROS-termelés is kiküszöbölhető [237,241]. Vizsgálatainkban a CH₄-kezelés gátolta az előrehaladó elektrontranszportot az I-es komplexben kontroll mitokondriumok esetében, miközben hatékonyan korlátozta a RET-et a poszt-iszkémiás mitokondriumokban. Eredményeink alapján az I-es komplex konformációs változásai kulcsszerepet játszanak a CH₄-kezelés védő mechanizmusában az IR okozta károsodásokkal szemben. Ez a hatás nem a membránhoz kötött kötőhely közvetlen kölcsönhatásának eredménye, hanem az I-es komplex szerkezeti változásaiból adódik.

Eredményünk megerősíti az I-es komplex központi szerepét a hideg tárolás során kialakuló mitokondriális diszfunkcióban, és egyben a jövőbeli graftmegőrzési terápiák fő célpontjává teszi [59,242].

Az I-es komplex aktivitásával való kölcsönhatás mellett a CH₄ nem specifikus hatásai is megfigyelhetők voltak, amelyek a fokozott OxPhos kapacitásban és a Leak légzés javulásában nyilvánultak meg. Ezeket a hatásokat a mitokondriális membrán integritásának megőrzésével és az elektrontranszport kapacitásának fenntartásával hozták összefüggésbe, amit a citokróm-c felszabadulás csökkenése is alátámasztott, utalva a membrán épségének megőrzésére.

Korábbi tanulmányok már sugallták, hogy a CH₄ hatással van a mitokondriális fiziológiára és a Ca²⁺-homeosztázisra [243]. Az iszkémia során a mitokondriális szubsztrátok kimerülése jelentős tényező az intracelluláris hiperkalcémia okozta sejtkárosodás kialakulásában [57]. A hideg iszkémia által kiváltott sejtkárosodás mechanizmusában az endoplazmás retikulum (ER) Ca²⁺-transzportjának aktiválása jól ismert [244]. A hipoxia Ca²⁺-felszabadulást idéz elő az ER-ből, míg a visszavételét a SERCA-pumpák szabályozzák, amelyek expressziója csökken a máj IR-károsodása után [245]. A kísérletek során az IR csökkent SERCA expressziót okozott, amelyet a CH₄-dúsított HTK mérsékelte. Az ennek következtében megemelkedett citoszolikus Ca²⁺-szintek fokozott mitokondriális Ca²⁺-felvételt eredményeznek, ami az mPTP megnyílásához, mitokondriális depolarizációhoz és a sejthalál beindulásához vezet [246,247]

A Ca²⁺-beáramlás által kiváltott membrán diszfunkció mögött álló mechanizmus magában foglalhatja a mitokondriális Na⁺/Ca²⁺-pumpát, a H⁺/Ca²⁺-pumpát és az mPTP-eket, valamint

ezek kombinált működését [248,249]. Modellkísérletünkben a 24 órás iszkémia jelentős emelkedést idézett elő az endogén Ca^{2+} -forrásokból származó extramitochondriális Ca^{2+} -szintben. A CH_4 -kiegészítés hatékonyan mérsékelte ezt a Ca^{2+} -felszabadulást azáltal, hogy elősegítette a visszavételt az ER-be, helyreállította a mitokondriális membrán integritását és közvetetten megőrizte az energiaigényes, membránhoz kötött Ca^{2+} -csatornák működését. Az mPTP-k funkcióját is értékelték ebben a tanulmányban, amikor a máj mitokondriumait exogén Ca^{2+} -túlterhelésnek tették ki, amely az mPTP megnyílásának kiváltó tényezője. A hideg IR hatására a mitokondriumok alacsony szintű Ca^{2+} -kibocsátást mutattak, ami az mPTP korai vagy már meglévő megnyílására utalt. Az CH_4 -dúsított szervtartósító oldatok alkalmazása megakadályozta a graftokban az iszkémia által kiváltott mPTP-megnyílást, amit magasabb Ca^{2+} -kibocsátás is alátámasztott.

6.3 Trauma és alkoholfogyasztás okozta stressz biomarkerei

Kutatásaink elsőként mutatták ki, hogy a magas etanolbevitel átmeneti, jelentős CH_4 -termelést eredményezett olyan embereknél, akik korábban nem termeltek CH_4 -et. Hasonlóan magas CH_4 -termelés volt megfigyelhető etanolt fogyasztó patkányokban, összefüggésben a máj mitokondriális diszfunkciójával [179].

A laktulóz kilélegzett levegő tesztet már alkalmazzák a SIBO diagnózisában, ahol a kilélegzett H_2 és CH_4 koncentráció változásai segítenek a diagnózis felállításában. A nem felszívódott laktulóz baktériális fermentációja során ugyanis H_2 és CH_4 keletkezik, melyek a kilélegzett levegőben találhatóak [114]. Ugyanakkor Keppler és munkatársai stabil szén-izotópos vizsgálatokkal azt mutatták, hogy minden vizsgált emberben keletkezik CH_4 , ami azt jelzi, hogy a CH_4 a mikrobiomtól függetlenül, endogén módon is keletkezik [250].

A bél mikrobiomjának és az alkohol fogyasztásának kapcsolatát már vizsgálták, a metanogén baktériumok válaszára még nincsenek konkrét adatok [251]. Saját eredményeink azt sugallják, hogy a CH_4 -termelés nemcsak a mikrobiom, hanem más tényezők, például az etanol hatására is kialakulhat, mivel alkoholfogyasztás után etanolt nem termelő állatoknál és emberi alanyoknál is jelentős CH_4 -kibocsátást figyeltünk meg. A légúti CH_4 szintet gázkromatográfiás (GC) és GC-massza spektrometriai módszerekkel mérik a klinikai gyakorlatban, de az általunk használt PAS rendszer alkalmazása lehetővé tette a CH_4

változások online, nagy specifikussággal történő nyomon követését széles dinamikus tartományban [173].

Korábbi tanulmányok alapján a kilélegzett levegőben mért CH₄ koncentrációja alapján nagyok az egyéni különbségek, az embereket 30–60%-ban CH₄ termelőkre (1 ppm feletti CH₄) és nem termelőkre kategorizálják. Adataink arra utalnak, hogy a kilélegzett gázok analízisében megfigyelt nagy különbségek valószínűleg nemcsak az egyéni háttér, mikrobiom összetétel, mintavételi és analitikai technikák eltéréseiből adódnak, hanem más tényezők is befolyásolhatják a CH₄ szintjét, amely az etanol hatására, dózisfüggően növekedhet [252] Az etanolbevitel a máj mitokondriális diszfunkciójával összefüggésben csökkentette a II-es komplexhez kapcsolódó alap oxigénfogyasztást és az OxPhost is, ami azt sugallja, hogy a CH₄ biomarkerként szolgálhat az oxidatív stressz és az alkoholos metabolizmus állapotának felmérésére.

A traumás sérültek ellátása során a sokk felismerése és kezelése kiemelkedő fontossággal bír, mivel a megfelelő beavatkozás időben történő alkalmazása jelentősen javíthatja a betegek túlélési esélyeit. Ennek érdekében, következő retrospektív kohorsz vizsgálatunkban a trauma okozta hipovolémiás sokk osztályozásának hatékonyságát vizsgáltuk, összehasonlítva a korábbi, VS-alapú (ATLS 9. kiadás) és a jelenleg érvényes (ATLS 10. kiadás) rendszert, amely már a BD-t is figyelembe veszi [253]. Az előző VS-alapú osztályozás a HR, SBP és GCS értékeket használta a sokk felismerésére és a vérvesztés becslésére [121,254]. Azonban 2013-ban a Német Trauma Regiszter (Trauma Register DGU®) elemzése arra mutatott rá, hogy a VS-alapú osztályozás nem tükrözi pontosan a klinikai állapotot, ezért javasolták a BD, mint metabolikus paraméter bevonását az osztályozásba [129,132].

A tanulmány eredményei alapján mindkét osztályozási rendszer képes volt előre jelezni a halálozási arányt, és statisztikailag nem volt jelentős különbség a prediktív teljesítményük között. A ROC elemzések alapján a GCS, BD és SBP voltak a legfontosabb prognosztikai paraméterek, míg a HR változása nem bírt prediktív értékkel a prognózis szempontjából. Ez a megállapítás összhangban áll a korábbi kutatásokkal, amelyek szintén kiemelik a BD alapú osztályozás előnyeit a hipovolémiás sokk kezelésében [121].

Ezen felül kutatásunkban megvizsgáltuk a hipovolemiás sokk osztályozásának különböző aspektusait is, különös figyelmet fordítva a vérzés és a koagulopátia összefüggéseire, amelyek kulcsfontosságú hatással vannak a betegek kimenetelére. A trauma okozta

koagulopátia és a vérzés kezelése során a BD alapú osztályozás segíthet a transzfúziós igények és a halálozási arány előrejelzésében [121]. Mindezek alátámasztják a trauma ellátásának folyamatos fejlődését és az osztályozási rendszerek finomításának szükségességét a betegek jobb kezelése érdekében [121,253].

Ezeket az eredményeket figyelembe véve tovább vizsgáltuk a HR szerepét a hipovolémiás sokk előrejelzésében [255] amely bár egy hasznos indikátornak tűnhet, de valójában több problémát is felvethet a pontos prognózis szempontjából. A HR használata a hipovolémiás sokk kezdeti értékelése során kézenfekvőnek tűnhet, valójában azonban a hasznossága megkérdőjelezhető az elégtelen érzékenysége és specificitása miatt. A HR vérzés közbeni komplex válasza félreértelmezéshez, a hemodinamikai stabilitás hamis érzetéhez, és ennek következtében a megfelelő terápia késlekedéséhez vezethet. A tachycardia, mint gyakran vérzéssel társuló reakció, felvetheti a vérzés gyanúját, de nem feltétlenül alkalmas arra, hogy a terápia döntések, például a vérkészítmények alkalmazásának egyik meghatározó tényezője legyen. Tanulmányunk igazolta, hogy a HR nem mutat lineáris összefüggést a mortalitással, ami tovább erősíti a szakirodalomban már ismert, vérzésre adott többfázisú válasz tényét [124,125]. A HR csökkenése vagy stagnálása a vérzés két különböző szakaszában fordulhat elő. Az első esetben, körülbelül 30%-os vérvesztés környékén – amely az ATLS II-es és III-as sokkosztályának felel meg –, a Bezold-Jarisch-reflex által kiváltott fokozott vagus-aktivitás csökkentheti a HR-t, annak ellenére, hogy az ATLS osztályozás itt egyértelmű HR-emelkedést feltételez. A második esetben, a vérzés végstadiumában, bradycardia jelentkezik, amelyet a szívmegállás előz meg. Ezek alapján javasoljuk az ATLS sokkosztályozás kisebb módosítását, amely a HR-változások mintázatának beépítésével pontosabban tükrözheti a klinikai állapotot (8. táblázat).

Súlyossági Osztályok		I	II	III	IV
Becsült vérvesztéség		<15%	15-30%	31-40%	>40%
Fiziológiai változók	HR	↔	↔/↑	↑	↑/↑↑
	HR*	↔	↑	↔/↑	↓/↑
	SBP	↔	↔	↔/↓	↓
	GCS	↔	↔	↓	↓
	légzésszám	↔	↔	↑	↑
	vizelet	↔	↔	↓	↓↓
	BD	0-2 mEq	2-6 mEq	6-10 mEq	≥10 mEq
Transzfúzió		Monitorozás	Lehetséges	Igen	Masszív transzfúzió

8. táblázat. A hipovolémiás sokk Advanced Trauma Life Support (ATLS) osztályozása, beleértve a szívfrekvencia (HR) eltérések javasolt módosításait. A táblázat az ATLS 10. kiadásán alapul. A becült vérvesztés a teljes vérmennyiség százalékában van feltüntetve. *A javasolt módosítások félkövérrel vannak kiemelve: a HR-érték lehetséges stagnálását a 30%-os vérvesztés körül jelzik a fokozott vagális aktivitás miatt. A IV. osztályba tartozó mély vérzés esetén a bradycardia lehetősége ki van emelve. BD: bázishiány, GCS: Glasgow Coma Scale, HR: szívfrekvencia, SBP: szisztolés vérnyomás.

A hemodinamikai állapot felmérésének és nyomon követésének másik ígéretes eszköze a kilélegzett gázok monitorozása, amely új perspektívákat nyújt a vérzéssel betegek kezelése során. Bár a kilélegzett levegő összetételének vizsgálatát már régóta alkalmazzák a gastrointesztinális betegségek, például peptikus fekély és laktóz-intolerancia diagnosztikájában [114,256,257]. hemodinamikai monitorozás céljára történő felhasználása teljesen új megközelítést jelent. Ez a módszer a kilélegzett gázok, a mesenterialis perfúzió és a szisztémás keringési állapot közötti összefüggésen alapul. A mesenterialis perfúzió monitorozására vonatkozó légzésvizsgálati lehetőségek még feltárássra várnak, de a CH₄ ígéretes biomarkernek tűnik [111,258]. A CH₄-t anaerob bélbaktériumok termelik [252], és alacsony véroldhatóságának köszönhetően gyorsan ürül ki a tüdőn keresztül [115]. Egy nagyállat-modellen végzett kutatás kimutatta, hogy a kilélegzett CH₄-szintek szoros összefüggést mutatnak a vékonybél mikrokeringéssel és a SMA véráramlásával. Ezek az értékek már 5%-os vérvesztésnél jelentős csökkenést mutattak [115,139].

A CH₄ monitorozása több szempontból is előnyös lehet vérző betegek hemodinamikai állapotának felmérésében és folyamatos követésében, különösen rejtett vérzések esetén. A hagyományos markerekkel (Hb, BD) szemben a PAS-technológián alapuló valós idejű CH₄-elemzés nem igényel sorozatos, invazív mintavételezést. A delta-pulzusnyomás monitorozásával ellentétben a CH₄-mérés noninvazív, nem igényel artériás kanült vagy intubációt, és bármilyen életkorú vagy állapotú betegen kockázatmentesen elvégezhető.

Ugyanakkor a módszernek vannak korlátai is. A CH₄-termelés egyéni különbségeket mutat, amelyeket befolyásolhatnak tényezők, például alkohol fogyasztása vagy a bél mikrobiom összetétele. Továbbá traumás sérülések, különösen mellkasi sérülések, befolyásolhatják a légzésfolyamatokat, ami hatással lehet a CH₄-mérések pontosságára. Fontos kiemelni, hogy jelenlegi ismereteink főként sertéseken végzett kísérleteken alapulnak, és bár a sertések kardiovaszkuláris rendszere hasonlóságot mutat az emberével [259], a bél érrendszeri anatómiája jelentősen eltér [260]. Ezért további humán vizsgálatok szükségesek a módszer klinikai alkalmazhatóságának megerősítésére.

Vizsgálatunk a kilélegzett CH₄-koncentrációk és a vérzés hagyományos indikátorai közötti összefüggéseket elemezte egy súlyosan sérült beteg esetén keresztül [261]. A kórházi ellátás első négy órájában a CH₄-szintek szignifikáns kapcsolatot mutattak a hematokrit Htc, Hb és bázisdeficit BD értékekkel. Ezenkívül azt tapasztaltuk, hogy a CH₄-koncentráció azonnal reagált a beadott vérkészítményekre. Eredményeink alapján a PAS-alapú CH₄-elemzés ígéretes módszer lehet a vérveszteség gyors felmérésére és folyamatos monitorozására a sürgősségi és traumatológiai ellátás során.

A CH₄-monitorozás mellett külön figyelmet kell fordítanunk a vérzés és a koagulopátia összefüggéseire, amelyek jelentős hatással vannak a súlyosan sérült betegek kimenetelére. Ezen összefüggések pontosabb megértése érdekében egy prospektív esettanulmány-kontroll vizsgálat során elemeztük a súlyosan sérült betegek trombocitáinak mitokondriális működését [262]. Eredményeink koagulációs zavarokat és trombocita diszfunkciót mutattak a betegek felvételekor vett vérmintákban, akik traumás vérzésben szenvedtek. Emellett elsőként igazoltuk a mitokondriális légzési lánc diszfunkcióját és az ATP-termelés csökkenését a trombociták mitokondriális funkciójának elemzésével.

A súlyos sérültek csoportjában (medián ISS = 28) az olyan paraméterek, mint a HR, SBP, Hb, Ht és trombocita szám, közel álltak az egészséges kontroll csoporthoz. Azonban a BP és laktát szignifikánsan eltértek, jelezve metabolikus rendellenességeket. Korábbi kutatásaink szerint ezen eltérések súlyos vérveszteség idején finomak lehetnek, és csak a kompenzációs mechanizmusok kimerülése után válnak nyilvánvalóvá. A koagulációs zavarokat mind a hagyományos (emelkedett PT, aPTT, INR), mind a viszkoelasztikus tesztek (emelkedett CT, csökkent MCF EX és FIB) megerősítették. A koagulációs zavar valószínűleg a koagulációs faktorok és fibrinogén hiányának következménye, de a trombociták aktivációjának zavara is hozzájárulhat. Kutatásunkban a súlyos sérültek ADP-tesztje szignifikánsan csökkent, ami összhangban áll egy korábbi multicentrikus tanulmány eredményével, ahol azt találták, hogy a súlyos trauma, amely vérveszteséggel jár, megváltoztatja a trombociták ADP- és arachidonsav-aggregációs kapacitását [263]. A csökkent ADP-reaktivitás egyik oka a trombociták kezdeti hiperaktivációja miatt következhet be, amely csökkenti a trombociták válaszát a további ADP-expozícióra [144].

A posztraumás trombocita diszfunkció mechanizmusát több kutatás próbálta feltárni. Az egyik elmélet szerint a trombociták korai hiperaktivációja és kimerülése okozza a

diszfunkciót, amit a rendszerszintű trombocita agonisták emelkedett szintjei és a sérüléshez kapcsolódó molekuláris mintázatok, például a DAMP és a Ca^{2+} -mobilizáció zavarai magyaráznak [148,264]. Emellett egyre több bizonyíték utal arra, hogy a TIC összefügg a mitokondriális diszfunkcióval [146].

A traumás sérülés ROS-t generál és oxidatív stresszt indukál amivel jelentős szerepet játszik a posztraumás mitokondriális diszfunkció kialakulásában [265]. Mivel a mitokondriumok különösen érzékenyek az oxidatív károsodásra, az emelkedett ROS-termelés károsíthatja működésüket, ami tovább fokozza az oxidatív stresszt. A jelen tanulmányban a traumás betegcsoportban jelentős növekedést mutattunk ki a Leak légzésben és mitokondriális H_2O_2 képződésben a kontroll csoporthoz képest, melyek együttesen hozzájárultak a trauma által indukált oxidatív károsodáshoz. Ezen túlmenően a traumával kapcsolatos metabolikus zavarok, mint a laktát acidózis és a glükóz anyagcsere változásai szintén hatással vannak a trombociták mitokondriális működésére. A súlyos sérülések gyakran energia kimerüléshez vezetnek az akut fázis fehérjék, immunmolekulák és szöveti reparáció szintéziséhez szükséges megnövekedett metabolikus igények miatt. A posztraumás metabolikus változások az emelkedett katabolizmus jellemzői, ami a fehérjék aminosavakká történő lebontását eredményezi [266] és metabolikus acidózist hiperlaktémiával [267]. Az emelkedett laktát szint a súlyos traumás betegekben jelezheti, hogy a sejtek energiaigényei nincsenek megfelelően kielégítve, ami potenciálisan az ATP-termelés változásaira utalhat. Az anaerob anyagcsereére való átállás és az azt követő laktát szint emelkedése akkor következhet be, amikor a sejtek ATP igényeit nem elégíti ki az elérhető oxigén és az OxPhos. Ezen kívül a polytrauma beteg megnövekedett oxigénigénye fokozza a hypermetabolikus állapotot a mitokondriumok fokozott oxigénfogyasztásával [268,269].

Bőséges bizonyítékok vannak arra, hogy az ADP és az ATP kulcsszerepet játszanak a vérrögződésben, amelyek fő forrása az eukarióta sejtekben a mitokondriumok [270]. A mitokondriumok elsősorban ATP-t termelnek az OxPhos során, amely a mi tanulmányunkban szignifikánsan károsodott a traumás betegek trombocitáiban. Az OxPhos károsodásával összefügg a trombociták mitokondriális ETC és RCR csökkenése is. Az OxPhos megfelelő működéséhez szükséges a mitokondriális membrán ETC-je, mivel az elektront a végső elektronakceptor oxigén molekulához szállítja. Az ETC csökkenése a mitokondriális belső membrán károsodását jelzi, amely esetben az OxPhos nem lehet hatékony [258]. Az RCR

szintén közvetlenül jelzi a mitokondriális légzési lánc fiziológiai működését, mint az OxPhos hatékonyságát [59]. Az alacsony RCR az alacsony szubsztrát-oxidációs és ATP-csere képességet jelzi a mitokondriumokban, és nagy proton szivárgást.

Az ATP és az ADP magas koncentrációban találhatóak a trombociták sűrű granulumjaiban, és aktiváláskor együtt szabadulnak fel. Ezen adenilnukleotid készletek pótlása a granulumokban akár 24 órát is igénybe vehet, ideiglenes trombocita diszfunkciót eredményezve [143,271]. Azonban az evakuáció sebessége nem közvetlenül arányos a trauma mértékével, akár kisebb sérülés után is bekövetkezhet. Ezért az ATP/ADP-kimerülés jelezheti a koagulációs kaskád közlő működési zavarát sérülés után [272]. Az ATP/ADP, amely felszabadul, specifikus purinerg receptorokhoz kötődik a trombociták felszínén, elősegítve további trombociták toborzását és aggregálódását [273]. Az energiahányos állapot és a mitokondriális diszfunkció következtében fellépő pótlás zavara trombocita aggregációs zavart eredményez, amelyet súlyosbít a csökkent ADP-ellenállás és az ADP receptor diszfunkciója [144,272,274]. A trombociták felszínén két fő osztályú purinerg receptor található: a G-fehérjéhez kötött P2Y1, P2Y12 receptorok az ADP számára és az ioncsatorna P2X receptorok az ATP számára. A P2Y12 receptor kulcsfontosságú célpont az antitrombocita gyógyszerek, például a clopidogrel számára, és aktiválása fokozza a trombocita aggregációt és elősegíti a fenntartott trombocitaaktivációt [275]. A P2Y1 és P2X1 receptorok aktiválása a Ca^{2+} -beáramlásával és az intracelluláris Ca^{2+} -felszabadulással társul, és részt vesznek a trombocita alakváltozásában és az aggregáció kezdeti fázisában [276,277]. Ezekre az eredményekre alapozva a jelen tanulmányban a trombociták extramitokondriális Ca^{2+} mozgásait is vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy a traumás betegek mitokondriális mintái magasabb bazális Ca^{2+} -szinteket mutattak, ami egy előzetes aktivációra és az endogén Ca^{2+} -raktárak felszabadulására utalt. Szubsztrátok alkalmazásakor, amelyek hiperpolarizálják a mitokondriális membránt, a Ca^{2+} -aktiváció fokozódott. Azonban exogén Ca^{2+} -bevitel esetén, a kontroll betegek esetében magasabb fluoreszcencia intenzitást mértek, míg a traumás betegek mitokondriumaiiban alig történt változás, ami ismét egy túltelített, refrakter állapotot jelez.

Eredményeink alapján megerősítést nyert, hogy a súlyos trauma összefügg a trombociták mitokondriális diszfunkciójával, amely csökkent ATP-szintézist és a Ca^{2+} -mobilizáció zavart működését eredményezi. Mivel ezek a tényezők szükségesek a trombocitaaktivációhoz, -

Hartmann Petra_154_23

toborzáshoz és vérrög stabilitásához, a mitokondriális diszfunkció hozzájárulhat a traumás koagulopátia kialakulásához.

7 ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

Mikrokeringési kutatások eredményei

1. Gyulladásos modellek mikrokeringési változásainak vizsgálata

- Az EP technika szignifikánsan növelte a diklofenák plazmaszintjét és csökkentette az ízületi gyulladás során fellépő leukocita-endotél interakciókat patkány C/K arthritisz modellben, javítva a helyi gyulladáscsökkentő hatékonyságot.
- Az EP-vel fokozott diklofenák adagolás jól tolerálható, és hatékonyabb, mint a hagyományos topikális alkalmazás az akut arthritisz kísérleti modelljében. Az EP alkalmazása lehetővé teszi a diklofenák hatékonyabb bejuttatását a szinoviális térbe, ami kedvező hatással van a gyulladásos reakciókra. A további kutatások célja az EP optimális paramétereinek meghatározása és a diclofenac plazmaszintjének csökkentése.

2. Bőrirritáció és sebgyógyulás mikrokeringési mechanizmusainak feltárása

- Az SKH-1 szőrtelen egereken kifejlesztett háti bőrredő kamra penetrációs modell lehetővé tette a transzdermális gyógyszerpenetráció pontos mérését, és a bőr mikrokeringési változásainak részletes *in vivo* vizsgálatát.
- A glicerin és xilit csökkentette a bőr mikrokeringési stresszreakcióit, stabilizálta a hidratációt és megelőzte a gyulladásos sejtek felhalmozódását az irritált területeken.
- A RyR gátlása dantrolénnal gyorsította a sebgyógyulást és javította a bőr kapilláris véráramlását.
- A LDF-fel kimutatható különbséget találtunk az alkalmazott sebészeti technikák mikrokeringésre gyakorolt hatása között, ezáltal a mérések új perspektívát nyújtanak a periimplantáris szövetek posztoperatív mikrokeringési változásainak monitorozásában.
- A lágyrészmegőrző technika (STP) jobb posztoperatív mikrokeringési integritást eredményezett a csökkentett lágyrész technikához (STR) képest.

3. A perioszteum és endoszteum keringése kiterjedt oszteosztézist követően

- Az első human intraoperatív LDF-mérés, ami kimutatta, hogy a hosszú csöves csontok belső (endoszteális) és külső (perioszteális) vérellátásának iatrogén megszüntetése avaszkuláris álizület kialakulásával jár.

4. Távoli IPC és gyulladáscsökkentő szerek hatásának elemzése

- A távoli végtagi IPC és a GPC egyaránt jelentősen javította a máj mikrokeringési

paramétereit IR sérülések után, melyek hatásai a NOX enzimek közreműködésével valósultak meg. Az IPC csökkentette a NOX2 expresszióját, ezáltal javítva a szöveti oxigéntelítettséget és a kapilláris keringést, miközben a NOX4 expressziójára nem gyakorolt hatást. Ezzel szemben a membránstabilizáló GPC a NOX4 expressziójának csökkentésével mérsékelte a gyulladáshoz vezető enzimek aktivitását és az oxidatív szövetkárosodást, ami a kapilláris véráramlás és az LE-interakciók javulásához vezetett.

Mitokondriális kutatások eredményei

5. Máj meleg és hideg IR során a mitokondrium célzott védelmének lehetőségei bioaktív molekulákkal

- Kimutattuk, hogy az IR során a máj mitokondriális diszfunkciója jelentős mértékben a légzési lánc komplexeinek működési zavaraihoz kapcsolódik. Az IR hatására a mitokondriális respirációs aktivitás csökkent, különösen az I. komplex aktivitása, amely az OxPhos csökkenését eredményezte. A mitokondriális diszfunkció következményeként megnövekedett szabadgyöktermelés és membránkárosodás volt megfigyelhető, ami tovább rontja a máj működését. normoxic air containing 2.2% methane lélegeztetés a iszkémia végétől a reperfúzió alatt ezt kivédte.
- A GPC rövid távú alkalmazása védelmet biztosított a májsejtek számára IR által kiváltott sejtpusztulás ellen, miközben nem befolyásolta negatívan az oxidatív stressz mértékét. A GPC jótékony hatása kifejezetten az I. komplex mitokondriális respirációs aktivitásának fenntartásában mutatkozott meg, csökkentve a ROS termelést és a gyulladáshoz vezető válaszokat.
- A CH₄ inhalációja a meleg IR alatt jelentős védelmet nyújtott a máj mitokondriális diszfunkciója ellen. Az oxigénfogyasztás és a respirációs kapacitás megmaradt, miközben a ROS-termelés csökkent.
- A CH₄-dúsított tartósító oldatok alkalmazása hideg iszkémiai állapotban javította a máj transzplantációs eredményeit. A mitokondriális OxPhos kapacitás megőrzése mellett a Ca²⁺-homeosztázis is stabil maradt, ami hozzájárult a szerv jobb működéséhez és kevesebb sejtkárosodáshoz.

6. Szív IR mitokondriális következményeinek enyhítése exogén CH₄ adásával

- A CH₄ alkalmazása szív IR modellben csökkentette az oxidatív stresszt és a mitokondriális

ROS termelést. Az I-es komplex aktivitása jelentősen csökkent, míg a II-es komplex aktivitása megmaradt, ami jelzi, hogy a CH₄ képes blokkolni az ETC zavart működését. A szívizomsejtek apoptózisa is csökkent, ami a CH₄ védő hatásait bizonyítja a szívben.

- Patkány heterotóp szívtranszplantációs modellben a CH₄-dúsított szervtartósító oldatok alkalmazása a graft hideg tárolása során javította annak funkcióit. A mitokondriális OxPhos kapacitás megőrződött, és a cytochrome c felszabadulás csökkent, ami a szívizomsejtek károsodásának csökkenését eredményezte és összességében javította a szív átültetési eredményeit

Trauma és alkoholfogyasztás okozta stressz vizsgálata során kapott eredményeink

7. A kilélegzett CH₄ mint biomarker szerepének vizsgálata traumában és alkohol okozta stresszben

- Sürgősségi körülmények között elsőként végeztünk ágy melletti méréseket embereken a kilélegzett CH₄ koncentráció vizsgálatára traumával összefüggő vérzésben.
- A magas etanol bevitel átmeneti, jelentős CH₄-termelést eredményezett korábban nem CH₄-termelő embereknél, és hasonlóan magas CH₄-termelés figyelhető meg etanolt fogyasztó patkányokban, a máj mitokondriális diszfunkciójával összefüggésben.
- A kilélegzett CH₄ szintje szoros kapcsolatban volt a Hb szinttel és a BD értékekkel, jelezve a potenciális alkalmazhatóságát a vérzéses sokk korai felismerésében.
- A kilélegzett CH₄ szintjének monitorozása a vérvesztés és az oxidatív károsodás korai indikátora lehet, így elősegítve a gyors klinikai döntéshozatalt.

8. Traumás sokk és vérzés prediktív paramétereinek elemzése

- A jelenlegi és korábbi ATLS-sokkosztályozási rendszer egyaránt hatékonynak bizonyult a 30 napos mortalitás prediktív értéke szempontjából. A vitális paraméterek (GCS, a BD és az SBP) fontos prognosztikai értéket képviselnek, míg a HR-változás nem mutatott szoros összefüggést a túlélési eséllyel.
- Eredményeink megerősítik, hogy a korábbi osztályozás a gyakorlatban továbbra is alkalmazható, és BD-nek nincs hozzáadott értéke/ nem módosít számottevően a mortalitás becsülésén.
- Kimutattuk, hogy a HR nem párhuzamosan emelkedik a súlyosan sérült vérző betegek

halálozási arányával.

- Eredményeink alapján a HR változásait az ATLS protokollban újra kell értékelni, mivel nem mindig egyértelműen prediktív a túlélés szempontjából, ezért módosításokat javasoltunk a hipovolémás sokk ATLS osztályozásában.

9. A kilélegzett CH₄ kimutatása traumával összefüggő vérzésben

- Klinikai vizsgálatunk részeként egy vérző, súlyos sérült reszuszitációját és MBT protokollját 4 órán keresztül monitorozva kimutattuk a Hb szintek és a kilélegzett CH₄ koncentrációk közötti összefüggést. A vérkészítmények adása és a CH₄ koncentrációk emelkedése közötti időbeli összefüggést is ábrázoltuk.

- Eredményeink alapján a valós idejű CH₄ koncentrációjának monitorozása jól alkalmazható a vérvesztés mértékének becslésére és a reszuszitáció dinamikus monitorozásra is.

10. Mitokondriális diszfunkció és trauma-indukált koagulopátia (TIC) összefüggéseinek feltárása

- Kimutattuk a trombociták mitokondriális diszfunkciójának és a TIC-nek együttes előfordulását súlyosan vérző, traumás betegeknél. A trombociták mitokondriális diszfunkciója az OxPhos romlásában és a Leak respiráció fokozódásában, a mitokondriális H₂O₂-termelés növekedésében volt megfigyelhető, összefüggésben a fokozott véralvadási idővel és csökkent MCF értékekkel.

- A mitokondriális diszfunkció és a koagulopátia közötti erős korreláció alátámasztja, hogy a mitokondriális működés zavarai szerepet játszanak a TIC kialakulásában, és potenciális célpontot kínálhatnak a jövőbeli kezelési lehetőségek számára.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

Mikrokeringési kutatásaink során számos gyulladáshoz és IR modellt vizsgáltunk, amelyek során a mikrokeringési paraméterek, mint a sebesség, áramlás és a perfúzió heterogenitása, érzékenyen reagáltak a gyulladáshoz és az IR-károsodásra. A leukocita-endotélsejt interakciók szintén fontos mutatói a gyulladáshoz, és ezek változásai jól nyomon követhetők voltak a különböző kezelések alkalmazásával.

A kutatás során számos új modellt és vizsgálómódszert fejlesztettünk, amelyek lehetővé tették a mikrokeringési folyamatok pontos mérését és a kezelések hatékonyságának optimalizálását. Ezen módszerek nemcsak a gyógyszerbevitelnél, implantátumok alkalmazásánál és új sebészeti technikák vizsgálatakor, hanem a szövetek életképességének és regenerációs képességének pontos értékelésében is diagnosztikai jelentőséggel bírnak.

A diclofenac alkalmazása a mikrokeringési paraméterek optimalizálásával javította a gyógyszerhatást és csökkentette a gyulladáshoz aktivitást. Az EP révén a transzdermális gyógyszerbevitel hatékonysága nőtt, mivel a pórusok átmeneti megnyitása segítette a gyógyszer jobb penetrációját a szövetekbe. A GPC antioxidáns és membránvédő hatásai segítettek csökkenteni az oxidatív stresszt és javítani a mikrokeringést, különösen a NOX4 aktivitásának csökkentésével. A CH₄ alkalmazása is pozitívan befolyásolta a mikrokeringést, különösen az IR-károsodás kezelésében.

Ezek az eredmények kiemelik a mikrokeringés szerepét a gyulladáshoz és regeneráció szabályozásában, és diagnosztikai jelentőséggel bírhatnak a gyógyszerbevitel, implantátumok alkalmazása és új sebészeti technikák vizsgálata során. A mikrokeringési paraméterek pontos mérése és optimalizálása lehetővé teszi a szövetek életképességének objektív értékelését, amely elengedhetetlen a hatékony kezelési stratégiák kidolgozásához, különösen a gyulladáshoz és regenerációs folyamatok monitorozása során.

Mitokondriális kutatásaink során elsősorban az IR által kiváltott mitokondriális diszfunkció mechanizmusait és a különböző kezelések hatásait vizsgáltuk. Eredményeink szerint az IR következtében az ETC működése zavart szenvedett, amiben különösen az I-es komplex szerepe volt meghatározó. Az I-es komplex aktivitásának csökkenése alacsonyabb OxPhos-t eredményezett, miközben az ETC kapcsoltsága romlott, ami fokozott szabadgyöktermelést és mitokondriális membránkárosodást idézett elő. Kutatásaink szerint a szuperoxid-termelést két fő mechanizmus irányítja az I-es komplexben: a flavin- és Q-kötő helyek. Emellett az I-

es komplexbe irányuló RET fontos szerepet játszik a szuperoxid képződésében, amelyet a magas $\Delta\Psi_m$ segít elő, és a szukcinát-felhalmozódás gyors oxidációja révén szuperoxid keletkezik.

Az alkalmazott GPC és CH₄ kezelések különböző mechanizmusokon keresztül hatnak a mitokondriális működésre. A GPC képes javítani a mitokondriális oxigénfogyasztást, fokozva az OxPhos kapacitást, csökkentve a ROS-termelést és javítva a mitokondriális aktivitást mind normoxiás, mind anoxiás környezetben. A GPC emellett befolyásolhatja a mitokondriális szuperkomplexek szerveződését és a redoxkörnyezetet is. Ezzel szemben a CH₄ kezelés csökkentette a mitokondriális membránok diszfunkcióját a ROS-termelés mérséklésével és a mitokondriális légzési aktivitás fenntartásával. A CH₄ gátolta a RET mechanizmusát, és fokozta a bazális mitokondriális légzést anélkül, hogy megnövelte volna a ROS-termelést. Az I-es komplexen történő elektrontranszport blokkolásával a CH₄ csökkentette a szuperoxid-termelést, különösen a RET során.

Összességében megállapítottuk, hogy az I-es komplex aktivitásának csökkenése és a RET szerepe kulcsfontosságú tényezők az IR által kiváltott mitokondriális diszfunkcióban. A GPC és CH₄ kezelések pedig ígéretes terápiás lehetőségeket kínálnak az IR következményeinek enyhítésére, csökkentve a szabadgyök-termelést és fenntartva a mitokondriális funkciót. Klinikai vizsgálataink során különböző mérési módszerek alkalmazásával sikerült feltérképezni a mitokondriális működés és a klinikai paraméterek közötti kapcsolatokat. Az alkohol indukálta metanogenezist a nem-CH₄ termelő résztvevők körében is sikerült igazolni, jelentős CH₄ kibocsátást észlelve a 4 napos alkoholfogyasztás után, amely a mitokondriális diszfunkcióval hozható összefüggésbe. A kilélegzett CH₄ szignifikáns emelkedését mértük, amely az etanol hatására megjelenik, és a mitokondriális diszfunkcióval kapcsolatban biomarkerként is szerepet kaphat.

A vérzésem sokk osztályozását vizsgáló kutatásaink alapján nem találtunk szignifikáns különbséget a jelenleg érvényes 9. kiadású ATLS osztályozás és a korábbi, csak VS-re alapozott ATLS osztályozás között, azonban az osztályozások alapjait képező paraméterek, mint a GCS, BD és SBP fontos prognosztikai értékkel bírnak a mortalitás előrejelzésében. A HR változása nem mutatott szoros összefüggést a túlélési eséllyel, alátámasztva a tachycardia nem-lineáris válaszát a vérzésem sokkban.

A kilélegzett CH₄ szintje és a vérveszteség közötti összefüggést egy súlyos sérült (ISS ≥ 16) esetben vizsgáltuk. Az kilélegzett CH₄ szintje szoros kapcsolatban volt a Hb szinttel és a BD értékekkel, jelezve azok potenciális alkalmazhatóságát a vérzésem sokk korai felismerésében. A mitokondriális funkciók szintén zavarokat mutattak a TIC esetén, ahol az OxPhos csökkenése és a mitokondriális H₂O₂-termelés növekedése volt megfigyelhető, összefüggésben a fokozott véralvadási idővel és csökkent MCF értékekkel. A mitokondriális diszfunkció és a koagulopátia közötti erős korreláció alátámasztotta, hogy a mitokondriális működés zavarai szerepet játszanak a TIC kialakulásában, és potenciális célpontot kínálnak a jövőbeli kezelési lehetőségek számára.

A kutatás eredményei fontos betekintést nyújtanak a traumás események utáni mitokondriális működés zavaraira, különös figyelmet fordítva a CH₄-kibocsátásra mint potenciális biomarkerre, valamint a vitális paraméterek és a mitokondriális diszfunkció közötti összefüggésekre, melyek hozzájárulhatnak a politrauma és a vérzésem sokk korai felismeréséhez és kezeléséhez.

9 IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Munoz CJ, Lucas A, Williams AT, Cabrales P. A Review on Microvascular Hemodynamics. *Crit Care Clin* 2020;36:293–305. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.011>.
- [2] Dewhirst MW. Concepts of oxygen transport at the microcirculatory level. *Semin Radiat Oncol* 1998;8:143–50. [https://doi.org/10.1016/S1053-4296\(98\)80040-4](https://doi.org/10.1016/S1053-4296(98)80040-4).
- [3] Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med* 2003;31:S221–30. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000057847.32590.C1>.
- [4] Ellsworth ML. The red blood cell as an oxygen sensor: what is the evidence? *Acta Physiol Scand* 2000;168:551–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201x.2000.00708.x>.
- [5] Hill MA, Meininger GA. Arteriolar vascular smooth muscle cells: Mechanotransducers in a complex environment. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:1505–10. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.021>.
- [6] Ronald F. Tuma WNDKL. *Handbook of Physiology: Microcirculation*. 2nd ed. Academic Press; 2008.
- [7] Miller FJ, Dellsperger KC, Gutterman DD. Myogenic constriction of human coronary arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1997;273:H257–64. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1997.273.1.H257>.
- [8] COHEN M V., KIRK ES. Differential Response of Large and Small Coronary Arteries to Nitroglycerin and Angiotensin. *Circ Res* 1973;33:445–53. <https://doi.org/10.1161/01.RES.33.4.445>.
- [9] Penny WF, Rockman H, Long J, Bhargava V, Carrigan K, Ibriham A, et al. Heterogeneity of vasomotor response to acetylcholine along the human coronary artery. *J Am Coll Cardiol* 1995;25:1046–55. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)00537-Z](https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)00537-Z).
- [10] Brookes PS, Kraus DW, Shiva S, Doeller JE, Barone M-C, Patel RP, et al. Control of Mitochondrial Respiration by NO., Effects of Low Oxygen and Respiratory State. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:31603–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211784200>.
- [11] Miranda M, Balarini M, Caixeta D, Bouskela E. Microcirculatory dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2016;311:H24–35. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00034.2016>.
- [12] Goldsmith HL, Cokelet GR, Gaehtgens P. Robin Fahraeus: evolution of his concepts in cardiovascular physiology. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1989;257:H1005–15. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1989.257.3.H1005>.
- [13] Secor D, Li F, Ellis CG, Sharpe MD, Gross PL, Wilson JX, et al. Impaired microvascular perfusion in sepsis requires activated coagulation and P-selectin-mediated platelet adhesion in capillaries. *Intensive Care Med* 2010;36:1928–34. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-1969-3>.
- [14] De Backer D, Creteur J, Preiser J-C, Dubois M-J, Vincent J-L. Microvascular Blood Flow Is Altered in Patients with Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:98–104. <https://doi.org/10.1164/rccm.200109-016OC>.
- [15] Wester T, Häggblad E, Awan ZA, Barratt-Due A, Kvernebo M, Halvorsen PS, et al.

- Assessments of skin and tongue microcirculation reveals major changes in porcine sepsis. *Clin Physiol Funct Imaging* 2010;no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.2010.00994.x>.
- [16] Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2004;286:G769–76. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00275.2003>.
- [17] De Backer D, Orbegozo Cortes D, Donadello K, Vincent J-L. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence* 2014;5:73–9. <https://doi.org/10.4161/viru.26482>.
- [18] Doerschug KC, Delsing AS, Schmidt GA, Haynes WG. Impairments in microvascular reactivity are related to organ failure in human sepsis. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2007;293:H1065–71. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01237.2006>.
- [19] Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 1999;46 Suppl 2:1452–7.
- [20] Nemeth N, Peto K, Magyar Z, Klarik Z, Varga G, Oltean M, et al. Hemorheological and Microcirculatory Factors in Liver Ischemia-Reperfusion Injury—An Update on Pathophysiology, Molecular Mechanisms and Protective Strategies. *Int J Mol Sci* 2021;22:1864. <https://doi.org/10.3390/ijms22041864>.
- [21] Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1989;257:G683–8. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1989.257.5.G683>.
- [22] WINN RK, RAMAMOORTHY C, VEDDER NB, SHARAR SR, HARLAN JM. Leukocyte—Endothelial Cell Interactions in Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann N Y Acad Sci* 1997;832:311–21. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb46259.x>.
- [23] Muller WA. Leukocyte-Endothelial Cell Interactions in the Inflammatory Response. *Laboratory Investigation* 2002;82:521–33. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780446>.
- [24] Ishikawa M, Cooper D, Arumugam T V., Zhang JH, Nanda A, Granger DN. Platelet–Leukocyte–Endothelial Cell Interactions after Middle Cerebral Artery Occlusion and Reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2004;24:907–15. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000132690.96836.7F>.
- [25] Tachon G, Harrois A, Tanaka S, Kato H, Huet O, Pottecher J, et al. Microcirculatory Alterations in Traumatic Hemorrhagic Shock*. *Crit Care Med* 2014;42:1433–41. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000223>.
- [26] Sakr Y, Dubois M-J, De Backer D, Creteur J, Vincent J-L. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock*. *Crit Care Med* 2004;32:1825–31. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000138558.16257.3F>.
- [27] Ospina-Tascon G, Neves AP, Occhipinti G, Donadello K, Büchele G, Simion D, et al. Effects of fluids on microvascular perfusion in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010;36:949–55. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-1843-3>.
- [28] Morelli A, Donati A, Ertmer C, Rehberg S, Lange M, Orecchioni A, et al. Levosimendan for resuscitating the microcirculation in patients with septic shock: a randomized controlled study. *Crit Care* 2010;14:R232. <https://doi.org/10.1186/cc9387>.

- [29] De Backer D, Creteur J, Dubois M-J, Sakr Y, Koch M, Verdant C, et al. The effects of dobutamine on microcirculatory alterations in patients with septic shock are independent of its systemic effects*. *Crit Care Med* 2006;34:403–8. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000198107.61493.5A>.
- [30] de Bruin AFJ, Tavy ALM, van der Sloot K, Smits A, Ince C, Boerma EC, et al. Can sidestream dark field (SDF) imaging identify subtle microvascular changes of the bowel during colorectal surgery? *Tech Coloproctol* 2018;22:793–800. <https://doi.org/10.1007/s10151-018-1872-4>.
- [31] Boerma EC, Kaiferová K, Konijn AJM, De Vries JW, Buter H, Ince C. Rectal microcirculatory alterations after elective on-pump cardiac surgery. *Minerva Anesthesiol* 2011;77:698–703.
- [32] Pennings FA, Bouma GJ, Ince C. Direct Observation of the Human Cerebral Microcirculation During Aneurysm Surgery Reveals Increased Arteriolar Contractility. *Stroke* 2004;35:1284–8. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000126039.91400.cb>.
- [33] Schraven SP, Kossack B, Strüder D, Jung M, Skopnik L, Gross J, et al. Continuous intraoperative perfusion monitoring of free microvascular anastomosed fasciocutaneous flaps using remote photoplethysmography. *Sci Rep* 2023;13:1532. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28277-w>.
- [34] Kastelein AW, Vos LMC, van Baal JOAM, Koning JJ, Hira VV V., Nieuwland R, et al. Poor perfusion of the microvasculature in peritoneal metastases of ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis* 2020;37:293–304. <https://doi.org/10.1007/s10585-020-10024-4>.
- [35] Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989;49:6449–65.
- [36] West GB, Brown JH, Enquist BJ. A General Model for the Origin of Allometric Scaling Laws in Biology. *Science* (1979) 1997;276:122–6. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.122>.
- [37] Contreras-Sánchez HA, Zabel WJ, Fluerau C, Lilge L, Taylor E, Vitkin A. Characterizing Normal and Tumour Blood Microcirculatory Systems Using Optical Coherence Tomography. *Photonics* 2024;11:891. <https://doi.org/10.3390/photonics11090891>.
- [38] Taher R, Sara JD, Toya T, Shepherd R, Moder K, Lerman LO, et al. Secondary Raynaud’s phenomenon is associated with microvascular peripheral endothelial dysfunction. *Microvasc Res* 2020;132:104040. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2020.104040>.
- [39] Baltzis D, Eleftheriadou I, Veves A. Pathogenesis and Treatment of Impaired Wound Healing in Diabetes Mellitus: New Insights. *Adv Ther* 2014;31:817–36. <https://doi.org/10.1007/s12325-014-0140-x>.
- [40] Ruaro B, Sulli A, Smith V, Pizzorni C, Paolino S, Alessandri E, et al. Advances in nailfold capillaroscopic analysis in systemic sclerosis. *J Scleroderma Relat Disord* 2018;3:122–31. <https://doi.org/10.1177/2397198318757699>.
- [41] Valentini G, Marcoccia A, Cuomo G, Vettori S, Iudici M, Bondanini F, et al. Early Systemic Sclerosis: Analysis of the Disease Course in Patients With Marker Autoantibody and/or Capillaroscopic Positivity. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2014;66:1520–7. <https://doi.org/10.1002/acr.22304>.
- [42] Maldonado G, Chacko A, Lichtenberg R, Ionescu M, Rios C. Nailfold capillaroscopy

- in diabetes mellitus: a case of neo-angiogenesis after achieving normoglycemia. *Oxf Med Case Reports* 2022;2022. <https://doi.org/10.1093/omcr/omac088>.
- [43] Davis RP, Surewaard BGJ, Turk M, Carestia A, Lee W-Y, Petri B, et al. Optimization of In vivo Imaging Provides a First Look at Mouse Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) Using Intravital Microscopy. *Front Immunol* 2020;10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02988>.
- [44] Handschuh J, Amore J, Müller AJ. From the Cradle to the Grave of an Infection: Host-Pathogen Interaction Visualized by Intravital Microscopy. *Cytometry Part A* 2020;97:458–70. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23938>.
- [45] Groner W, Winkelmann JW, Harris AG, Ince C, Bouma GJ, Messmer K, et al. Orthogonal polarization spectral imaging: A new method for study of the microcirculation. *Nat Med* 1999;5:1209–12. <https://doi.org/10.1038/13529>.
- [46] Jansen SM, de Bruin DM, van Berge Henegouwen MI, Bloemen PR, Strackee SD, Veelo DP, et al. Quantitative change of perfusion in gastric tube reconstruction by sidestream dark field microscopy (SDF) after esophagectomy, a prospective in-vivo cohort study. *European Journal of Surgical Oncology* 2021;47:1034–41. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2020.09.006>.
- [47] De Backer D, Hollenberg S, Boerma C, Goedhart P, Büchele G, Ospina-Tascon G, et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care* 2007;11:R101. <https://doi.org/10.1186/cc6118>.
- [48] Bezemer R, Bartels SA, Bakker J, Ince C. Clinical review: Clinical imaging of the sublingual microcirculation in the critically ill - where do we stand? *Crit Care* 2012;16:224. <https://doi.org/10.1186/cc11236>.
- [49] De Backer D, Ospina-Tascon G, Salgado D, Favory R, Creteur J, Vincent J-L. Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches. *Intensive Care Med* 2010;36:1813–25. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-2005-3>.
- [50] STERN MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 1975;254:56–8. <https://doi.org/10.1038/254056a0>.
- [51] Shepherd AP, Riedel GL. Continuous measurement of intestinal mucosal blood flow by laser-Doppler velocimetry. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1982;242:G668–72. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1982.242.6.G668>.
- [52] Boas DA, Dunn AK. Laser speckle contrast imaging in biomedical optics. *J Biomed Opt* 2010;15:011109. <https://doi.org/10.1117/1.3285504>.
- [53] Brandl A, Egner C, Reisser U, Lingenfelder C, Schleip R. Influence of high-energy laser therapy to the patellar tendon on its ligamentous microcirculation: An experimental intervention study. *PLoS One* 2023;18:e0275883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0275883>.
- [54] Thomas R, Möllmann C, Ziebart A, Liu T, David M, Hartmann EK. Cyclic PaO₂ oscillations assessed in the renal microcirculation: correlation with tidal volume in a porcine model of lung lavage. *BMC Anesthesiol* 2017;17:92. <https://doi.org/10.1186/s12871-017-0382-7>.
- [55] Bosselmann T, Kolbenschlag J, Goertz O, Zahn P, Prantl L, Lehnhardt M, et al. Improvement of Superficial and Deep Cutaneous Microcirculation Due to Axillary Plexus Anesthesia Impaired by Smoking. *J Clin Med* 2021;10:2114. <https://doi.org/10.3390/jcm10102114>.
- [56] Ferrari M, Muthalib M, Quaresima V. The use of near-infrared spectroscopy in

- understanding skeletal muscle physiology: recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 2011;369:4577–90. <https://doi.org/10.1098/rsta.2011.0230>.
- [57] Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 2014;515:431–5. <https://doi.org/10.1038/nature13909>.
- [58] Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C, et al. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell Metab* 2016;23:254–63. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.009>.
- [59] Horváth T, Jász DK, Baráth B, Poles MZ, Boros M, Hartmann P. Mitochondrial Consequences of Organ Preservation Techniques during Liver Transplantation. *Int J Mol Sci* 2021;22:2816. <https://doi.org/10.3390/ijms22062816>.
- [60] Strifler G, Mészáros A, Pécz D, Ficzer Á, Baráth B, Boros M, et al. A májfunkció vizsgálata respirometriával. *Magyar Sebészet (Hungarian Journal of Surgery)* 2016;69:194–8. <https://doi.org/10.1556/1046.69.2016.4.8>.
- [61] Vartak R, Porras CA-M, Bai Y. Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell* 2013;4:582–90. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3032-y>.
- [62] CHANCE B, WILLIAMS GR, HOLMES WF, HIGGINS J. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. V. A mechanism for oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 1955;217:439–51.
- [63] Kiss DS, Toth I, Jocsak G, Sterczer A, Bartha T, Frenyo L V., et al. Preparation of purified perikaryal and synaptosomal mitochondrial fractions from relatively small hypothalamic brain samples. *MethodsX* 2016;3:417–29. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2016.05.004>.
- [64] Ling B, Peng F, Alcorn J, Lohmann K, Bandy B, Zello GA. D-Lactate altered mitochondrial energy production in rat brain and heart but not liver. *Nutr Metab (Lond)* 2012;9:6. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-6>.
- [65] Tan KN, Simmons D, Carrasco-Pozo C, Borges K. Triheptanoin protects against status epilepticus-induced hippocampal mitochondrial dysfunctions, oxidative stress and neuronal degeneration. *J Neurochem* 2018;144:431–42. <https://doi.org/10.1111/jnc.14275>.
- [66] Nijholt KT, Sánchez-Aguilera PI, Mahmoud B, Gerding A, Wolters JC, Wolters AHG, et al. A Kinase Interacting Protein 1 regulates mitochondrial protein levels in energy metabolism and promotes mitochondrial turnover after exercise. *Sci Rep* 2023;13:18822. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45961-z>.
- [67] Strifler G, Tuboly E, Szél E, Kaszonyi E, Cao C, Kaszaki J, et al. Inhaled Methane Limits the Mitochondrial Electron Transport Chain Dysfunction during Experimental Liver Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS One* 2016;11:e0146363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146363>.
- [68] Yeh A, Marcinek DJ, Meador JP, Gallagher EP. Effect of contaminants of emerging concern on liver mitochondrial function in Chinook salmon. *Aquatic Toxicology* 2017;190:21–31. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.011>.
- [69] Jász DK, Szilágyi ÁL, Tuboly E, Baráth B, Márton AR, Varga P, et al. Reduction in hypoxia-reoxygenation-induced myocardial mitochondrial damage with exogenous methane. *J Cell Mol Med* 2021;25:5113–23. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16498>.
- [70] Gnaiger E. Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and

- phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol* 2001;128:277–97. [https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00307-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00307-3).
- [71] CHANCE B, WILLIAMS GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* 1955;217:383–93.
- [72] CHANCE B, WILLIAMS GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 1955;217:409–27.
- [73] CHANCE B, WILLIAMS GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J Biol Chem* 1955;217:429–38.
- [74] Bhalla N, Jolly P, Formisano N, Estrela P. Introduction to biosensors. *Essays Biochem* 2016;60:1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- [75] Chen X, Tian X, Shin I, Yoon J. Fluorescent and luminescent probes for detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Chem Soc Rev* 2011;40:4783. <https://doi.org/10.1039/c1cs15037e>.
- [76] Zhdanov A V., Waters AHC, Golubeva A V., Dmitriev RI, Papkovsky DB. Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2014;1837:51–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.07.008>.
- [77] Gnaiger E, Steinlechner-Maran R, Méndez G, Eberl T, Margreiter R. Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr* 1995;27:583–96. <https://doi.org/10.1007/BF02111656>.
- [78] Plitzko B, Loesgen S. Measurement of Oxygen Consumption Rate (OCR) and Extracellular Acidification Rate (ECAR) in Culture Cells for Assessment of the Energy Metabolism. *Bio Protoc* 2018;8. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2850>.
- [79] Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12:685–98. <https://doi.org/10.1038/nrc3365>.
- [80] Reers M, Smith TW, Chen LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 1991;30:4480–6. <https://doi.org/10.1021/bi00232a015>.
- [81] Wlodkowic D, Skommer J. SYTO Probes: Markers of Apoptotic Cell Demise. *Curr Protoc Cytom* 2007;42. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0733s42>.
- [82] Doerrier C, Garcia-Souza LF, Krumschnabel G, Wohlfarter Y, Mészáros AT, Gnaiger E. High-Resolution FluoRespirometry and OXPHOS Protocols for Human Cells, Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Muscle, and Isolated Mitochondria, 2018, p. 31–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7831-1_3.
- [83] Jávora P, Rárosi F, Horváth T, Török L, Varga E, Hartmann P. Detection of exhaled methane levels for monitoring trauma-related haemorrhage following blunt trauma: study protocol for a prospective observational study. *BMJ Open* 2022;12:e057872. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-057872>.
- [84] Rontoyanni VG, Malagaris I, Herndon DN, Rivas E, Capek KD, Delgado AD, et al. Skeletal Muscle Mitochondrial Function is Determined by Burn Severity, Sex, and Sepsis, and is Associated With Glucose Metabolism and Functional Capacity in Burned Children. *Shock* 2018;50:141–8. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001074>.
- [85] Greenwood JC, Talebi FM, Jang DH, Spelde AE, Kilbaugh TJ, Shofer FS, et al. Protocol for the MicroRESUS study: The impact of circulatory shock and resuscitation on microcirculatory function and mitochondrial respiration after cardiovascular surgery. *PLoS One* 2022;17:e0273349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273349>.

- [86] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981;290:457–65. <https://doi.org/10.1038/290457a0>.
- [87] Zhao H, Sun L, Chen H, Xiang L, Chen D. Intrinsic stability study of L- α -glycerylphosphorylcholine with HPLC method development and validation. *J Pharm Biomed Anal* 2020;188:113468. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113468>.
- [88] Tökés T, Tuboly E, Varga G, Major L, Ghyczy M, Kaszaki J, et al. Protective effects of 1- α -glycerylphosphorylcholine on ischaemia–reperfusion-induced inflammatory reactions. *Eur J Nutr* 2015;54:109–18. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0691-2>.
- [89] Traini E, Bramanti V, Amenta F. Choline alphoscerate (alpha-glyceryl-phosphorylcholine) an old choline- containing phospholipid with a still interesting profile as cognition enhancing agent. *Curr Alzheimer Res* 2013;10:1070–9. <https://doi.org/10.2174/15672050113106660173>.
- [90] Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway— *De novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 2010;62:414–28. <https://doi.org/10.1002/iub.337>.
- [91] Farber SA, Slack BE, Blusztajn JK. Acceleration of phosphatidylcholine synthesis and breakdown by inhibitors of mitochondrial function in neuronal cells: a model of the membrane defect of Alzheimer’s disease. *The FASEB Journal* 2000;14:2198–206. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0853>.
- [92] Aon MA, Cortassa S, O’Rourke B. Redox-optimized ROS balance: A unifying hypothesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2010;1797:865–77. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.016>.
- [93] Rose S, Frye RE, Slattery J, Wynne R, Tippett M, Melnyk S, et al. Oxidative stress induces mitochondrial dysfunction in a subset of autistic lymphoblastoid cell lines. *Transl Psychiatry* 2014;4:e377–e377. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.15>.
- [94] Patel RP, Lang JD, Smith AB, Crawford JH. Redox therapeutics in hepatic ischemia reperfusion injury. *World J Hepatol* 2014;6:1. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i1.1>.
- [95] Human Metabolome Database: GPC metabolite profile. <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000086> n.d.
- [96] Roy P, Tomassoni D, Nittari G, Traini E, Amenta F. Effects of choline containing phospholipids on the neurovascular unit: A review. *Front Cell Neurosci* 2022;16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.988759>.
- [97] Scapicchio PL. Revisiting choline alphoscerate profile: a new, perspective, role in dementia? *International Journal of Neuroscience* 2013;123:444–9. <https://doi.org/10.3109/00207454.2013.765870>.
- [98] Pineau B, Bourge M, Marion J, Mauve C, Gilard F, Maneta-Peyret L, et al. The Importance of Cardiolipin Synthase for Mitochondrial Ultrastructure, Respiratory Function, Plant Development, and Stress Responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2013;25:4195–208. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.118018>.
- [99] Tökés T, Erős G, Bebes A, Hartmann P, Várszegi S, Varga G, et al. Protective Effects of a Phosphatidylcholine-Enriched Diet in Lipopolysaccharide-Induced Experimental Neuroinflammation in the Rat. *Shock* 2011;36:458–65. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31822f36b0>.
- [100] Howarth RW. Ideas and perspectives: is shale gas a major driver of recent increase in global atmospheric methane? *Biogeosciences* 2019;16:3033–46.

- <https://doi.org/10.5194/bg-16-3033-2019>.
- [101] Casey JA, Cushing L, Depsky N, Morello-Frosch R. Climate Justice and California's Methane Superemitters: Environmental Equity Assessment of Community Proximity and Exposure Intensity. *Environ Sci Technol* 2021;55:14746–57. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04328>.
- [102] Jou F-Y, Mather AE, Schmidt KAG. Solubility of Methane in Propylene Carbonate. *J Chem Eng Data* 2015;60:1010–3. <https://doi.org/10.1021/je500849m>.
- [103] McAnulty MJ, G. Poosarla V, Kim K-Y, Jasso-Chávez R, Logan BE, Wood TK. Electricity from methane by reversing methanogenesis. *Nat Commun* 2017;8:15419. <https://doi.org/10.1038/ncomms15419>.
- [104] Moissl-Eichinger C, Pausan M, Taffner J, Berg G, Bang C, Schmitz RA. Archaea Are Interactive Components of Complex Microbiomes. *Trends Microbiol* 2018;26:70–85. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.004>.
- [105] Zhang S, Ning R, Zeng B, Deng F, Kong F, Guo W, et al. Gut Microbiota Composition and Metabolic Potential of Long-Living People in China. *Front Aging Neurosci* 2022;14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.820108>.
- [106] Borrel G, Brugère J-F, Gribaldo S, Schmitz RA, Moissl-Eichinger C. The host-associated archaeome. *Nat Rev Microbiol* 2020;18:622–36. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0407-y>.
- [107] Volmer JG, McRae H, Morrison M. The evolving role of methanogenic archaea in mammalian microbiomes. *Front Microbiol* 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1268451>.
- [108] Pimentel M, Lin HC, Enayati P, van den Burg B, Lee H-R, Chen JH, et al. Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2006;290:G1089–95. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00574.2004>.
- [109] Jo JY, Kwon YS, Lee JW, Park JS, Rho BH, Choi W-I. Acute Respiratory Distress Due to Methane Inhalation. *Tuberc Respir Dis (Seoul)* 2013;74:120. <https://doi.org/10.4046/trd.2013.74.3.120>.
- [110] Boros M, Ghyczy M, Érces D, Varga G, Tóké T, Kupai K, et al. The anti-inflammatory effects of methane*. *Crit Care Med* 2012;40:1269–78. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31823dae05>.
- [111] Jia Y, Li Z, Liu C, Zhang J. Methane Medicine: A Rising Star Gas with Powerful Anti-Inflammation, Antioxidant, and Antiapoptosis Properties. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1912746>.
- [112] Poles MZ, Juhász L, Boros M. Methane and Inflammation - A Review (Fight Fire with Fire). *Intensive Care Med Exp* 2019;7:68. <https://doi.org/10.1186/s40635-019-0278-6>.
- [113] Rezaie A, Buresi M, Lembo A, Lin H, McCallum R, Rao S, et al. Hydrogen and Methane-Based Breath Testing in Gastrointestinal Disorders: The North American Consensus. *American Journal of Gastroenterology* 2017;112:775–84. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.46>.
- [114] Lee KN, Lee OY, Koh DH, Sohn W, Lee SP, Jun DW, et al. Association between Symptoms of Irritable Bowel Syndrome and Methane and Hydrogen on Lactulose Breath Test. *J Korean Med Sci* 2013;28:901. <https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.6.901>.
- [115] Szabó A, Unterkofler K, Mochalski P, Jandacka M, Ruzsanyi V, Szabó G, et al.

- Modeling of breath methane concentration profiles during exercise on an ergometer. *J Breath Res* 2016;10:017105. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/1/017105>.
- [116] Jávora P, Donka T, Horváth T, Sándor L, Török L, Szabó A, et al. Impairment of Mesenteric Perfusion as a Marker of Major Bleeding in Trauma Patients. *J Clin Med* 2023;12:3571. <https://doi.org/10.3390/jcm12103571>.
- [117] Fröhlich M, Driessen A, Böhmer A, Nienaber U, Igressa A, Probst C, et al. Is the shock index based classification of hypovolemic shock applicable in multiple injured patients with severe traumatic brain injury?—an analysis of the TraumaRegister DGU®. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2016;24:148. <https://doi.org/10.1186/s13049-016-0340-2>.
- [118] Lui CT, Wong OF, Tsui KL, Kam CW, Li SM, Cheng M, et al. Predictive model integrating dynamic parameters for massive blood transfusion in major trauma patients: The Dynamic MBT score. *Am J Emerg Med* 2018;36:1444–50. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2018.01.009>.
- [119] Vishwanathan K, Chhajwani S, Gupta A, Vaishya R. Evaluation and management of haemorrhagic shock in polytrauma: Clinical practice guidelines. *J Clin Orthop Trauma* 2021;13:106–15. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2020.12.003>.
- [120] Zhu Y, Ma S, Deng H-Y, Wu Y, Zhang J, Xiang X-M, et al. The Characteristics of Organ Function Damage of Hemorrhagic Shock in Hot Environment and the Effect of Hypothermic Fluid Resuscitation. *Shock* 2022;57:526–35. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001873>.
- [121] Mutschler M, Paffrath T, Wölfl C, Probst C, Nienaber U, Schipper IB, et al. The ATLS® classification of hypovolaemic shock: A well established teaching tool on the edge? *Injury* 2014;45:S35–8. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2014.08.015>.
- [122] Brasel KJ, Guse C, Gentilello LM, Nirula R. Heart Rate: Is It Truly a Vital Sign? *Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care* 2007;62:812–7. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31803245a1>.
- [123] Secher NH, Van Lieshout JJ. Heart rate during haemorrhage: time for reappraisal. *J Physiol* 2010;588:19–19. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.184499>.
- [124] Guly HR, Bouamra O, Spiers M, Dark P, Coats T, Lecky FE. Vital signs and estimated blood loss in patients with major trauma: Testing the validity of the ATLS classification of hypovolaemic shock. *Resuscitation* 2011;82:556–9. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2011.01.013>.
- [125] Victorino GP, Battistella FD, Wisner DH. Does Tachycardia Correlate with Hypotension After Trauma? *J Am Coll Surg* 2003;196:679–84. [https://doi.org/10.1016/S1072-7515\(03\)00128-5](https://doi.org/10.1016/S1072-7515(03)00128-5).
- [126] Henry S BKS. Henry S, Brasel K, Stewart RM. American College of Surgeons. "Shock". In: Henry S, Brasel K, Stewart Rm *Advanced trauma life support: student course manual*. 2018: 42–61 2018.
- [127] Jacobsen J, Secher NH. Heart rate during haemorrhagic shock. *Clinical Physiology* 1992;12:659–66. <https://doi.org/10.1111/j.1475-097X.1992.tb00369.x>.
- [128] Mizushima Y, Ueno M, Watanabe H, Ishikawa K, Matsuoka T. Discrepancy Between Heart Rate and Makers of Hypoperfusion Is a Predictor of Mortality in Trauma Patients. *Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care* 2011;71:789–92. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31822f7bbd>.
- [129] Mutschler M, Nienaber U, Brockamp T, Wafaisade A, Wyen H, Peiniger S, et al. A critical reappraisal of the ATLS classification of hypovolaemic shock: Does it really

- reflect clinical reality? Resuscitation 2013;84:309–13.
<https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2012.07.012>.
- [130] Ley EJ, Singer MB, Clond MA, Ley HC, Mirocha J, Bukur M, et al. Admission heart rate is a predictor of mortality. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2012;72:943–7. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3182465527>.
- [131] Ageron F-X, Gayet-Ageron A, Steyerberg E, Bouzat P, Roberts I. Prognostic model for traumatic death due to bleeding: cross-sectional international study. *BMJ Open* 2019;9:e026823. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-026823>.
- [132] Mutschler M, Nienaber U, Brockamp T, Wafaisade A, Fabian T, Paffrath T, et al. Renaissance of base deficit for the initial assessment of trauma patients: a base deficit-based classification for hypovolemic shock developed on data from 16,305 patients derived from the TraumaRegister DGU®. *Crit Care* 2013;17:R42. <https://doi.org/10.1186/cc12555>.
- [133] Figueiredo S, Taconet C, Harrois A, Hamada S, Gauss T, Raux M, et al. How useful are hemoglobin concentration and its variations to predict significant hemorrhage in the early phase of trauma? A multicentric cohort study. *Ann Intensive Care* 2018;8. <https://doi.org/10.1186/S13613-018-0420-8>.
- [134] Acker SN, Petrun B, Partrick DA, Roosevelt GE, Bensard DD. Lack of utility of repeat monitoring of hemoglobin and hematocrit following blunt solid organ injury in children. *J Trauma Acute Care Surg* 2015;79:991–4. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000791>.
- [135] Zehtabchi S, Sinert R, Goldman M, Kapitanyan R, Ballas J. Diagnostic performance of serial haematocrit measurements in identifying major injury in adult trauma patients. *Injury* 2006;37:46–52. <https://doi.org/10.1016/J.INJURY.2005.09.015>.
- [136] Shahi V, Shahi V, Mower WR. Using Serial Hemoglobin Levels to Detect Occult Blood Loss in the Early Evaluation of Blunt Trauma Patients. *J Emerg Med* 2018;55:307–12. <https://doi.org/10.1016/J.JEMERMED.2018.06.017>.
- [137] Opreanu RC, Arrangoiz R, Stevens P, Morrison C, Mosher BD, Kepros JP. Hematocrit, Systolic Blood Pressure and Heart Rate are not Accurate Predictors for Surgery to Control Hemorrhage in Injured Patients. <https://doi.org/10.1177/000313481007600311> 2010;76:296–301.
- [138] Wang PH, Lin HY, Chang PY, Lien WC. Focused Assessment with Sonography for Trauma. *J Med Ultrasound* 2023;29:151–3. https://doi.org/10.4103/jmu.jmu_128_21.
- [139] Bársony A, Vida N, Gajda Á, Rutai A, Mohácsi Á, Szabó A, et al. Methane Exhalation Can Monitor the Microcirculatory Changes of the Intestinal Mucosa in a Large Animal Model of Hemorrhage and Fluid Resuscitation. *Front Med (Lausanne)* 2020;7. <https://doi.org/10.3389/FMED.2020.567260>.
- [140] Jakob SM, Tenhunen JJ, Laitinen S, Heino A, Alhava E, Takala J. Effects of systemic arterial hypoperfusion on splanchnic hemodynamics and hepatic arterial buffer response in pigs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.2001.280.5.G819>.
- [141] Corbett EJ, Barry BN, Pollard SG, Lodge JPA, Bellamy MC. Laser Doppler flowmetry is useful in the clinical management of small bowel transplantation. The Liver Transplant Group. *Gut* 2000;47:580–3. <https://doi.org/10.1136/GUT.47.4.580>.
- [142] Ince C. Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation. *Crit Care* 2015;19:S8. <https://doi.org/10.1186/CC14726>.

- [143] Jacoby RC, Owings JT, Holmes J, Battistella FD, Gosselin RC, Paglieroni TG. Platelet Activation and Function after Trauma. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 2001;51:639–47. <https://doi.org/10.1097/00005373-200110000-00003>.
- [144] Kutcher ME, Redick BJ, McCreery RC, Crane IM, Greenberg MD, Cachola LM, et al. Characterization of platelet dysfunction after trauma. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2012;73:13–9. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318256deab>.
- [145] Innes D, Sevitt S. Coagulation and fibrinolysis in injured patients. *J Clin Pathol* 1964;17:1–13. <https://doi.org/10.1136/jcp.17.1.1>.
- [146] Moore EE, Moore HB, Kornblith LZ, Neal MD, Hoffman M, Mutch NJ, et al. Trauma-induced coagulopathy. *Nat Rev Dis Primers* 2021;7:30. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00264-3>.
- [147] Zanza C, Romenskaya T, Racca F, Rocca E, Piccolella F, Piccioni A, et al. Severe Trauma-Induced Coagulopathy: Molecular Mechanisms Underlying Critical Illness. *Int J Mol Sci* 2023;24:7118. <https://doi.org/10.3390/ijms24087118>.
- [148] Sloos PH, Vulliamy P, van 't Veer C, Gupta A Sen, Neal MD, Brohi K, et al. Platelet dysfunction after trauma: From mechanisms to targeted treatment. *Transfusion (Paris)* 2022;62. <https://doi.org/10.1111/trf.16971>.
- [149] Sloos PH, Maas MAW, Hollmann MW, Juffermans NP, Kleinveld DJB. The effect of shock duration on trauma-induced coagulopathy in a murine model. *Intensive Care Med Exp* 2022;10:1. <https://doi.org/10.1186/s40635-021-00428-1>.
- [150] Zong Y, Li H, Liao P, Chen L, Pan Y, Zheng Y, et al. Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2024;9:124. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01839-8>.
- [151] Shi Y, Greven J, Guo W, Luo P, Xu D, Wang W, et al. Trauma-Hemorrhage Stimulates Immune Defense, Mitochondrial Dysfunction, Autophagy, and Apoptosis in Pig Liver at 72 h. *Shock* 2021;55:630–9. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001556>.
- [152] Hiebert JB, Shen Q, Thimmesch AR, Pierce JD. Traumatic Brain Injury and Mitochondrial Dysfunction. *Am J Med Sci* 2015;350:132–8. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0000000000000506>.
- [153] Ruh J, Ryschich E, Secchi A, Gebhard MM, Glaser F, Klar E, et al. Measurement of Blood Flow in the Main Arteriole of the Villi in Rat Small Intestine with FITC-Labeled Erythrocytes. *Microvasc Res* 1998;56:62–9. <https://doi.org/10.1006/mvre.1998.2082>.
- [154] Beckman JS, Parks DA, Pearson JD, Marshall PA, Freeman BA. A sensitive fluorometric assay for measuring xanthine dehydrogenase and oxidase in tissues. *Free Radic Biol Med* 1989;6:607–15. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(89\)90068-3](https://doi.org/10.1016/0891-5849(89)90068-3).
- [155] Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE. Measurement of Neutrophil Content in Brain and Lung Tissue by a Modified Myeloperoxidase Assay. *International Journal of Microcirculation* 1996;16:89–97. <https://doi.org/10.1159/000179155>.
- [156] Abrahám S, Szabó A, Kaszaki J, Varga R, Eder K, Duda E, et al. Kupffer cell blockade improves the endotoxin-induced microcirculatory inflammatory response in obstructive jaundice. *Shock* 2008;30:69–74. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31815dceea>.
- [157] Gera L, Varga R, Török L, Kaszaki J, Szabó A, Nagy K, et al. Beneficial Effects of Phosphatidylcholine During Hindlimb Reperfusion. *Journal of Surgical Research* 2007;139:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.08.004>.
- [158] Tökés T, Varga G, Garab D, Nagy Z, Fekete G, Tuboly E, et al. Peripheral inflammatory activation after hippocampus irradiation in the rat. *Int J Radiat Biol*

- 2014;90:1–6. <https://doi.org/10.3109/09553002.2013.836617>.
- [159] Schneeberger S, Kuznetsov A V., Seiler R, Renz O, Meusbürger H, Mark W, et al. MITOCHONDRIAL ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY OF THE TRANSPLANTED RAT HEART. *Shock* 2008;30:365–71. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e318164f09f>.
- [160] Kuznetsov A V., Strobl D, Ruttman E, Königsrainer A, Margreiter R, Gnaiger E. Evaluation of Mitochondrial Respiratory Function in Small Biopsies of Liver. *Anal Biochem* 2002;305:186–94. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5658>.
- [161] Kuznetsov A V, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS. Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat Protoc* 2008;3:965–76. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.61>.
- [162] Gnaiger E, Méndez G, Hand SC. High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000;97:11080–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.11080>.
- [163] Hütter E, Skovbro M, Lener B, Prats C, Rabøl R, Dela F, et al. Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell* 2007;6:245–56. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00282.x>.
- [164] Szarka A, Horemans N, Bánhegyi G, Asard H. Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 2004;428:73–80. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.05.011>.
- [165] Nászai A, Terhes E, Kaszaki J, Boros M, Juhász L. Ca²⁺ N It Be Measured? Detection of Extramitochondrial Calcium Movement With High-Resolution Fluorescence Respirometry. *Sci Rep* 2019;9:19229. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55618-5>.
- [166] Taniguchi M, Uchinami M, Doi K, Yoshida M, Sasaki H, Tamagawa K, et al. Edaravone Reduces Ischemia-Reperfusion Injury Mediators in Rat Liver. *Journal of Surgical Research* 2007;137:69–74. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2006.06.033>.
- [167] Striffler G, Tuboly E, Görbe A, Boros M, Pécz D, Hartmann P. Targeting Mitochondrial Dysfunction with L-Alpha Glycerylphosphorylcholine. *PLoS One* 2016;11:e0166682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166682>.
- [168] Minor T, Akbar S, Tolba R, Dombrowski F. Cold preservation of fatty liver grafts: prevention of functional and ultrastructural impairments by venous oxygen persufflation. *J Hepatol* 2000;32:105–11. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80196-8](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80196-8).
- [169] Otto-Ślusarczyk D, Graboń W, Mielczarek-Putna M. Aminotransferaza asparaginianowa – kluczowy enzym w metabolizmie ogólnoustrojowym człowieka. *Postepy Hig Med Dosw* 2016;70:219–30. <https://doi.org/10.5604/17322693.1197373>.
- [170] Benke K, Sayour AA, Mátyás C, Ágg B, Németh BT, Oláh A, et al. Heterotopic Abdominal Rat Heart Transplantation as a Model to Investigate Volume Dependency of Myocardial Remodeling. *Transplantation* 2017;101:498–505. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001585>.
- [171] Yeh T, Hanan SA, Johnson DE, Rebeyka IM, Abd-Elfattah AS, Lee KF, et al. Superior myocardial preservation with modified UW solution after prolonged ischemia in the rat heart. *Ann Thorac Surg* 1990;49:932–9. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(90\)90869-8](https://doi.org/10.1016/0003-4975(90)90869-8).
- [172] Vattemi G, Tonin P, Mora M, Filosto M, Morandi L, Savio C, et al. Expression of

- protein kinase C isoforms and interleukin-1 β in myofibrillar myopathy. *Neurology* 2004;62:1778–82. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000125197.70310.8E>.
- [173] Tuboly E, Szabó A, Erős G, Mohácsi Á, Szabó G, Tengölics R, et al. Determination of endogenous methane formation by photoacoustic spectroscopy. *J Breath Res* 2013;7:046004. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/7/4/046004>.
- [174] Tuboly E, Szabó A, Garab D, Bartha G, Janovszky Á, Ero's G, et al. Methane biogenesis during sodium azide-induced chemical hypoxia in rats. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2013;304:C207–14. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00300.2012>.
- [175] Althoff F, Jugold A, Keppler F. Methane formation by oxidation of ascorbic acid using iron minerals and hydrogen peroxide. *Chemosphere* 2010;80:286–92. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.04.004>.
- [176] Dunham MP, Sartorius B, Laing GL, Bruce JL, Clarke DL. A comparison of base deficit and vital signs in the early assessment of patients with penetrating trauma in a high burden setting. *Injury* 2017;48:1972–7. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2017.06.011>.
- [177] Shakur H. Effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events, and blood transfusion in trauma patients with significant haemorrhage (CRASH-2): a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* 2010;376:23–32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60835-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60835-5).
- [178] Hayden JA, van der Windt DA, Cartwright JL, Côté P, Bombardier C. Assessing Bias in Studies of Prognostic Factors. *Ann Intern Med* 2013;158:280. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-158-4-201302190-00009>.
- [179] Tuboly E, Molnár R, Tókécs T, Turányi RN, Hartmann P, Mészáros AT, et al. Excessive alcohol consumption induces methane production in humans and rats. *Sci Rep* 2017;7:7329. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07637-3>.
- [180] Dugan G, O'Donnell L, Hanbury DB, Cline JM, Caudell DL. Assessment of Multiplate platelet aggregometry using citrate, heparin or hirudin in Rhesus macaques. *Platelets* 2015;26:730–5. <https://doi.org/10.3109/09537104.2014.988694>.
- [181] wiki.oroboros.at/index.php/MiR05-Kit n.d.
- [182] Baráth B, Jász DK, Horváth T, Baráth B, Maróti G, Strifler G, et al. Mitochondrial Side Effects of Surgical Prophylactic Antibiotics Ceftriaxone and Rifaximin Lead to Bowel Mucosal Damage. *Int J Mol Sci* 2022;23:5064. <https://doi.org/10.3390/ijms23095064>.
- [183] Horváth T, Sándor L, Baráth B, Donka T, Baráth B, Mohácsi Á, et al. Methane Admixture Protects Liver Mitochondria and Improves Graft Function after Static Cold Storage and Reperfusion. *Antioxidants* 2023;12:271. <https://doi.org/10.3390/antiox12020271>.
- [184] Hartmann P, Butt E, Fehér Á, Szilágyi Á, Jász K, Balázs B, et al. Electroporation-enhanced transdermal diclofenac sodium delivery into the knee joint in a rat model of acute arthritis. *Drug Des Devel Ther* 2018;Volume 12:1917–30. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S161703>.
- [185] Hansra P, Moran EL, Fornasier VL, Bogoch ER. Carrageenan-induced arthritis in the rat. *Inflammation* 2000;24:141–55. <https://doi.org/10.1023/A:1007033610430>.
- [186] Day RO, McLachlan AJ, Graham GG, Williams KM. Pharmacokinetics of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Synovial Fluid. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:191–210. <https://doi.org/10.2165/00003088-199936030-00002>.

- [187] Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301–14. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90337-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90337-9).
- [188] Hartmann P, Erős G, Varga R, Kaszaki J, Garab D, Németh I, et al. Limb ischemia–reperfusion differentially affects the periosteal and synovial microcirculation. *Journal of Surgical Research* 2012;178:216–22. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.03.001>.
- [189] Alkilani A, McCrudden MT, Donnelly R. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics* 2015;7:438–70. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438>.
- [190] Erős G, Hartmann P, Berkó S, Csizmazia E, Csányi E, Sztojkov-Ivanov A, et al. A Novel Murine Model for the *In Vivo* Study of Transdermal Drug Penetration. *The Scientific World Journal* 2012;2012:1–9. <https://doi.org/10.1100/2012/543536>.
- [191] Franz TJ. Percutaneous Absorption. On the Relevance of *in Vitro* Data. *Journal of Investigative Dermatology* 1975;64:190–5. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12533356>.
- [192] Szél E, Polyánka H, Szabó K, Hartmann P, Degovics D, Balázs B, et al. Anti-irritant and anti-inflammatory effects of glycerol and xylitol in sodium lauryl sulphate-induced acute irritation. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 2015;29:2333–41. <https://doi.org/10.1111/jdv.13225>.
- [193] Degovics D, Hartmann P, Németh IB, Árva-Nagy N, Kaszonyi E, Szél E, et al. A novel target for the promotion of dermal wound healing: Ryanodine receptors. *Toxicol Appl Pharmacol* 2019;366:17–24. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.021>.
- [194] Arendshorst WJ, Thai TL. Regulation of the renal microcirculation by ryanodine receptors and calcium-induced calcium release. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:40–9. <https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32831cf5bd>.
- [195] Westcott EB, Jackson WF. Heterogeneous function of ryanodine receptors, but not IP₃ receptors, in hamster cremaster muscle feed arteries and arterioles. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2011;300:H1616–30. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00728.2010>.
- [196] Weistenhöfer W, Uter W, Bernet F, Drexler H. The tissue viability imaging system—Suitable method for discovering minimal skin changes in occupational screenings? Results of a cross-sectional field study. *Skin Research and Technology* 2019;25:553–63. <https://doi.org/10.1111/srt.12686>.
- [197] Salomone S, Soydan G, Moskowitz MA, Sims JR. Inhibition of Cerebral Vasoconstriction by Dantrolene and Nimodipine. *Neurocrit Care* 2009;10:93–102. <https://doi.org/10.1007/s12028-008-9153-0>.
- [198] Muehlschlegel S, Rordorf G, Bodock M, Sims JR. Dantrolene Mediates Vasorelaxation in Cerebral Vasoconstriction: A Case Series. *Neurocrit Care* 2009;10:116–21. <https://doi.org/10.1007/s12028-008-9132-5>.
- [199] Jarabin J, Bere Z, Hartmann P, Tóth F, Kiss JG, Rovó L. Laser-Doppler microvascular measurements in the peri-implant areas of different osseointegrated bone conductor implant systems. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 2015;272:3655–62. <https://doi.org/10.1007/s00405-014-3429-0>.
- [200] Roustit M, Cracowski J-L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol Sci* 2013;34:373–84. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.05.007>.

- [201] Greksa F, Butt E, Csonka E, Jávör P, Tuboly E, Török L, et al. Periosteal and endosteal microcirculatory injury following excessive osteosynthesis. *Injury* 2021;52:S3–6. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2020.11.053>.
- [202] Menger MM, Laschke MW, Orth M, Pohlemann T, Menger MD, Histing T. Vascularization Strategies in the Prevention of Nonunion Formation. *Tissue Eng Part B Rev* 2021;27:107–32. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2020.0111>.
- [203] Nowicki C, Ganse B. Near-Infrared Spectroscopy Allows for Monitoring of Bone Fracture Healing via Changes in Oxygenation. *J Funct Biomater* 2024;15:384. <https://doi.org/10.3390/jfb15120384>.
- [204] Stegen S, van Gastel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 2015;70:19–27. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.017>.
- [205] Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Modulation of Protein Kinase Activity and Gene Expression by Reactive Oxygen Species and Their Role in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2175–83. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.10.2175>.
- [206] Bayraktutan U, Blayney L, Shah AM. Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1903–11. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.8.1903>.
- [207] Garab D, Fet N, Szabó A, Tolba RH, Boros M, Hartmann P. Remote ischemic preconditioning differentially affects NADPH oxidase isoforms during hepatic ischemia–reperfusion. *Life Sci* 2014;105:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.04.014>.
- [208] Koti R. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Liver Transplantation* 2002;8:1182–91. <https://doi.org/10.1053/jlts.2002.36846>.
- [209] Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischaemic preconditioning improves microvascular perfusion and oxygenation following reperfusion injury of the intestine. *Br J Surg* 2005;92:1169–76. <https://doi.org/10.1002/bjs.4988>.
- [210] Hartmann P, Fet N, Garab D, Szabó A, Kaszaki J, Srinivasan PK, et al. L- α -glycerylphosphorylcholine reduces the microcirculatory dysfunction and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase type 4 induction after partial hepatic ischemia in rats. *J Surg Res* 2014;189:32–40. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.12.025>.
- [211] Anilkumar N. Redox sensitive signaling pathways in cardiac remodeling, hypertrophy and failure. *Frontiers in Bioscience* 2009;Volume:3168. <https://doi.org/10.2741/3443>.
- [212] Ma DJ, Hwang JS, Noh KB, Oh S-H, Kim KW, Shin YJ. Role of NADPH Oxidase 4 in Corneal Endothelial Cells Is Mediated by Endoplasmic Reticulum Stress and Autophagy. *Antioxidants* 2023;12:1228. <https://doi.org/10.3390/antiox12061228>.
- [213] Touyz RM, Montezano AC. Vascular Nox4. *Circ Res* 2012;110:1159–61. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.269068>.
- [214] Scribner DM, Witowski NE, Mulier KE, Luszczek ER, Wasiluk KR, Beilman GJ. Liver metabolomic changes identify biochemical pathways in hemorrhagic shock. *J Surg Res* 2010;164:e131-9. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.07.046>.
- [215] Tuboly E, Gáspár R, Ibor MO, Gömöri K, Kiss B, Strifler G, et al. l-Alpha-glycerylphosphorylcholine can be cytoprotective or cytotoxic in neonatal rat cardiac myocytes: a double-edged sword phenomenon. *Mol Cell Biochem* 2019;460:195–203.

- <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03580-1>.
- [216] Magalon A, Alberge F. Distribution and dynamics of OXPHOS complexes in the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2016;1857:198–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.015>.
- [217] Enriquez JA, Lenaz G. Coenzyme Q and the Respiratory Chain: Coenzyme Q Pool and Mitochondrial Supercomplexes. *Mol Syndromol* 2014;5:119–40. <https://doi.org/10.1159/000363364>.
- [218] Winter L, Wittig I, Peeva V, Eggers B, Heidler J, Chevessier F, et al. Mutant desmin substantially perturbs mitochondrial morphology, function and maintenance in skeletal muscle tissue. *Acta Neuropathol* 2016;132:453–73. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1592-7>.
- [219] Habersetzer J, Larrieu I, Priault M, Salin B, Rossignol R, Brèthes D, et al. Human F1F0 ATP Synthase, Mitochondrial Ultrastructure and OXPHOS Impairment: A (Super-)Complex Matter? *PLoS One* 2013;8:e75429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075429>.
- [220] Genova ML, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2014;1837:427–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.11.002>.
- [221] Kenneth B. Storey. *Functional Metabolism*. Wiley; 2004. <https://doi.org/10.1002/047167558X>.
- [222] Huet P-M, Giroux L, Laurens M, Crenesse D. Effect of cold ischemia–warm reperfusion on the cirrhotic rat liver. *Liver Transplantation* 2008;14:486–93. <https://doi.org/10.1002/lt.21392>.
- [223] Hofmann J, Otarashvili G, Meszaros A, Ebner S, Weissenbacher A, Cardini B, et al. Restoring Mitochondrial Function While Avoiding Redox Stress: The Key to Preventing Ischemia/Reperfusion Injury in Machine Perfused Liver Grafts? *Int J Mol Sci* 2020;21:3132. <https://doi.org/10.3390/ijms21093132>.
- [224] Benke K, Jász DK, Szilágyi ÁL, Baráth B, Tuboly E, Márton AR, et al. Methane supplementation improves graft function in experimental heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2021;40:183–92. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.11.003>.
- [225] Saeb-Parsy K, Martin JL, Summers DM, Watson CJE, Krieg T, Murphy MP. Mitochondria as Therapeutic Targets in Transplantation. *Trends Mol Med* 2021;27:185–98. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.08.001>.
- [226] Ferng AS, Schipper D, Connell AM, Marsh KM, Knapp S, Khalpey Z. Novel vs clinical organ preservation solutions: improved cardiac mitochondrial protection. *J Cardiothorac Surg* 2017;12:7. <https://doi.org/10.1186/s13019-017-0564-x>.
- [227] Minasian SM, Galagudza MM, Dmitriev Y V., Karpov AA, Vlasov TD. Preservation of the donor heart: from basic science to clinical studies. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015;20:510–9. <https://doi.org/10.1093/icvts/ivu432>.
- [228] Karakoyun R, Romano A, Nordström J, Ericzon B-G, Nowak G. Type of Preservation Solution, UW or HTK, Has an Impact on the Incidence of Biliary Stricture following Liver Transplantation: A Retrospective Study. *J Transplant* 2019;2019:1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/8150736>.
- [229] Halestrap AP, Clarke SJ, Khaliulin I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2007;1767:1007–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.05.008>.

- [230] Chouchani ET, Methner C, Nadtochiy SM, Logan A, Pell VR, Ding S, et al. Cardioprotection by S-nitrosation of a cysteine switch on mitochondrial complex I. *Nat Med* 2013;19:753–9. <https://doi.org/10.1038/nm.3212>.
- [231] Teixeira G, Abrial M, Portier K, Chiari P, Couture-Lepetit E, Tourneur Y, et al. Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia–reoxygenation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2013;56:55–62. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.11.023>.
- [232] Treberg JR, Quinlan CL, Brand MD. Evidence for Two Sites of Superoxide Production by Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I). *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:27103–10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252502>.
- [233] Xu A, Szczepanek K, Maceyka MW, Ross T, Bowler E, Hu Y, et al. Transient complex I inhibition at the onset of reperfusion by extracellular acidification decreases cardiac injury. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2014;306:C1142–53. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00241.2013>.
- [234] Korge P, John SA, Calmettes G, Weiss JN. Reactive oxygen species production induced by pore opening in cardiac mitochondria: The role of complex II. *Journal of Biological Chemistry* 2017;292:9896–905. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.768325>.
- [235] Votyakova T V., Reynolds IJ. $\Delta\Psi_m$ -Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 2001;79:266–77. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00548.x>.
- [236] Gorenkova N, Robinson E, Grieve DJ, Galkin A. Conformational Change of Mitochondrial Complex I Increases ROS Sensitivity During Ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2013;19:1459–68. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4698>.
- [237] Babot M, Birch A, Labarbuta P, Galkin A. Characterisation of the active/de-active transition of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2014;1837:1083–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.02.018>.
- [238] Lesnefsky EJ, Chen Q, Moghaddas S, Hassan MO, Tandler B, Hoppel CL. Blockade of Electron Transport during Ischemia Protects Cardiac Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 2004;279:47961–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409720200>.
- [239] Kim M, Stepanova A, Niatsetskaya Z, Sosunov S, Arndt S, Murphy MP, et al. Attenuation of oxidative damage by targeting mitochondrial complex I in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Free Radic Biol Med* 2018;124:517–24. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.040>.
- [240] Methner C, Chouchani ET, Buonincontri G, Pell VR, Sawiak SJ, Murphy MP, et al. Mitochondria selective S-nitrosation by mitochondria-targeted S-nitrosothiol protects against post-infarct heart failure in mouse hearts. *Eur J Heart Fail* 2014;16:712–7. <https://doi.org/10.1002/ejhf.100>.
- [241] Dröse S, Stepanova A, Galkin A. Ischemic A/D transition of mitochondrial complex I and its role in ROS generation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2016;1857:946–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.12.013>.
- [242] Parajuli N, Shrum S, Tobacyk J, Harb A, Arthur JM, MacMillan-Crow LA. Renal cold storage followed by transplantation impairs expression of key mitochondrial fission and fusion proteins. *PLoS One* 2017;12:e0185542. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185542>.
- [243] Ye Z, Chen O, Zhang R, Nakao A, Fan D, Zhang T, et al. Methane Attenuates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury in Rats Through Antiapoptotic, Anti-Inflammatory, and Antioxidative Actions. *Shock* 2015;44:181–7.

<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000385>.

- [244] Görlach A, Bertram K, Hudcová S, Krizanová O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol* 2015;6:260–71. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>.
- [245] Feng M, Wang Q, Wang H, Guan W. Tumor necrosis factor- α preconditioning attenuates liver ischemia/reperfusion injury through preserving sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase function. *Journal of Surgical Research* 2013;184:1109–13. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.04.019>.
- [246] Halestrap AP. Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans* 2006;34:232. <https://doi.org/10.1042/BST20060232>.
- [247] Baumgartner HK, Gerasimenko J V., Thorne C, Ferdek P, Pozzan T, Tepikin A V., et al. Calcium Elevation in Mitochondria Is the Main Ca^{2+} Requirement for Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Opening. *Journal of Biological Chemistry* 2009;284:20796–803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025353>.
- [248] Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, De Stefani D, et al. Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 2009;1787:1342–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.03.015>.
- [249] Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, et al. NCLX is an essential component of mitochondrial $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:436–41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908099107>.
- [250] Keppler F, Schiller A, Eehalt R, Greule M, Hartmann J, Polag D. Stable isotope and high precision concentration measurements confirm that all humans produce and exhale methane. *J Breath Res* 2016;10:016003. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/10/1/016003>.
- [251] Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol Res* 2015;37:223–36.
- [252] Levitt MD, Furne JK, Kuskowski M, Ruddy J. Stability of Human Methanogenic Flora Over 35 Years and a Review of Insights Obtained From Breath Methane Measurements. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006;4:123–9. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2005.11.006>.
- [253] Jávora P, Csonka E, Butt E, Rárosi F, Babik B, Török L, et al. Comparison of the Previous and Current Trauma-Related Shock Classifications: A Retrospective Cohort Study from a Level I Trauma Center. *European Surgical Research* 2021;62:229–37. <https://doi.org/10.1159/000516102>.
- [254] Kortbeek JB, Al Turki SA, Ali J, Antoine JA, Bouillon B, Brasel K, et al. Advanced Trauma Life Support, 8th Edition, The Evidence for Change. *Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care* 2008;64:1638–50. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181744b03>.
- [255] Jávora P, Hanák L, Hegyi P, Csonka E, Butt E, Horváth T, et al. Predictive value of tachycardia for mortality in trauma-related haemorrhagic shock: a systematic review and meta-regression. *BMJ Open* 2022;12:e059271. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-059271>.
- [256] Calvet X, Sánchez-Delgado J, Montserrat A, Lario S, Ramírez-Lázaro MJ, Quesada M, et al. Accuracy of Diagnostic Tests for *Helicobacter pylori*: A Reappraisal. *Clinical Infectious Diseases* 2009;48:1385–91. <https://doi.org/10.1086/598198>.

- [257] Law D, Conklin J, Pimentel M. Lactose Intolerance and the Role of the Lactose Breath Test. *American Journal of Gastroenterology* 2010;105:1726–8. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.146>.
- [258] Mészáros AT, Szilágyi ÁL, Juhász L, Tuboly E, Érces D, Varga G, et al. Mitochondria As Sources and Targets of Methane. *Front Med (Lausanne)* 2017;4. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00195>.
- [259] Billig S, Zayat R, Ebeling A, Steffen H, Nix C, Hatam N, et al. Transesophageal echocardiography in swine: evaluation of left and right ventricular structure, function and myocardial work. *Int J Cardiovasc Imaging* 2021;37:835–46. <https://doi.org/10.1007/s10554-020-02053-7>.
- [260] von Trotha K-T, Butz N, Grommes J, Binnebösel M, Charalambakis N, Mühlenbruch G, et al. Vascular anatomy of the small intestine—a comparative anatomic study on humans and pigs. *Int J Colorectal Dis* 2015;30:683–90. <https://doi.org/10.1007/s00384-015-2163-4>.
- [261] Jávör P, Donka T, Solli HS, Sándor L, Baráth B, Perényi D, et al. Could exhaled methane be used as a possible indicator for hemodynamic changes in trauma induced hemorrhagic shock? Scientific basis supported by a case study. *Injury* 2024;55:111456. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2024.111456>.
- [262] Sándor L, Donka T, Baráth B, Jávör P, Jász DK, Perényi D, et al. Mitochondrial dysfunction in platelets from severe trauma patients - A prospective case-control study. *Injury* 2024;55:111481. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2024.111481>.
- [263] Wohlaer M V., Moore EE, Thomas S, Sauaia A, Evans E, Harr J, et al. Early Platelet Dysfunction: An Unrecognized Role in the Acute Coagulopathy of Trauma. *J Am Coll Surg* 2012;214:739–46. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2012.01.050>.
- [264] Brohi K, Cohen MJ, Ganter MT, Matthay MA, Mackersie RC, Pittet J-F. Acute Traumatic Coagulopathy: Initiated by Hypoperfusion. *Ann Surg* 2007;245:812–8. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000256862.79374.31>.
- [265] Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009;47:333–43. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004>.
- [266] Hasenboehler E, Williams A, Leinhase I, Morgan SJ, Smith WR, Moore EE, et al. Metabolic changes after polytrauma: an imperative for early nutritional support. *World Journal of Emergency Surgery* 2006;1:29. <https://doi.org/10.1186/1749-7922-1-29>.
- [267] Corwin G, Sexton K, Beck W, Taylor J, Bhavaraju A, Davis B, et al. Characterization of acidosis in trauma patient. *J Emerg Trauma Shock* 2020;13:213. https://doi.org/10.4103/JETS.JETS_45_19.
- [268] DUNHAM CM, SIEGEL JH, WEIRETER L, FABIAN M, GOODARZI S, GUADALUPI P, et al. Oxygen debt and metabolic acidemia as quantitative predictors of mortality and the severity of the ischemic insult in hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 1991;19:231–43. <https://doi.org/10.1097/00003246-199102000-00020>.
- [269] Rixen D, Siegel JH. Metabolic Correlates of Oxygen Debt Predict Posttrauma Early Acute Respiratory Distress Syndrome and the Related Cytokine Response. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 2000;49:392–403. <https://doi.org/10.1097/00005373-200009000-00003>.
- [270] Kühlbrandt W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol* 2015;13:89. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0201-x>.
- [271] Pareti FI, Capitanio A, Mannucci L, Ponticelli C, Mannucci PM. Acquired dysfunction

- due to the circulation of “exhausted” platelets. *Am J Med* 1980;69:235–40. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(80\)90383-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(80)90383-6).
- [272] Sirajuddin S, Valdez C, DePalma L, Maluso P, Singhal R, Schroeder M, et al. Inhibition of platelet function is common following even minor injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2016;81:328–32. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000001057>.
- [273] Koupnova M, Ravid K. Biology of Platelet Purinergic Receptors and Implications for Platelet Heterogeneity. *Front Pharmacol* 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00037>.
- [274] Ramsey MT, Fabian TC, Shahan CP, Sharpe JP, Mabry SE, Weinberg JA, et al. A prospective study of platelet function in trauma patients. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2016;80:726–33. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000001017>.
- [275] Schrör K. The Basic Pharmacology of Ticlopidine and Clopidogrel. *Platelets* 1993;4:252–61. <https://doi.org/10.3109/09537109309013225>.
- [276] Mahaut-Smith MP, Jones S, Evans RJ. The P2X1 receptor and platelet function. *Purinergic Signal* 2011;7:341–56. <https://doi.org/10.1007/s11302-011-9224-0>.
- [277] Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP. Molecular Basis for ADP-induced Platelet Activation. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:2024–9. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2024>.

10 SAJÁT KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos szócikkek listája

Hartmann P, Butt E, Feher A, Szilagy AL, Jasz KD, Balazs B, Bakonyi M, Berko S, Eros G, Boros M, Horvath G, Varga E, Csanyi E: Electroporation-enhanced transdermal diclofenac sodium delivery into the knee joint in a rat model of acute arthritis. *DRUG DESIGN DEVELOPMENT AND THERAPY* 2018; 12:1917-1930.

IF: 3.208 Citáció: 15; független: 14

Erős G, **Hartmann P**, Berkó S, Csizmazia E, Csányi E, Sztojkov-Ivanov A, Nemeth I, Szabó-Révész P, Zupko I, Kemény L: A novel murine model for the in vivo study of transdermal drug penetration. *SCIENTIFIC WORLD JOURNAL* 2012; 2012:543536.

IF: 1.730 Citáció: 9; független: 6

Szél E, Polyánka H, Szabó K, **Hartmann P**, Degovics D, Balázs B, Németh I B, Korponyai C, Csányi E, Kaszaki J, Dikstein S, Nagy K, Kemény L, Erős G: Anti-irritant and anti-inflammatory effects of glycerol and xylitol in sodium lauryl sulphate-induced acute irritation. *JOURNAL OF THE EUROPEAN ACADEMY OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY* 2015; 29(12): 2333-2341.

IF: 3.029 Citáció: 32; független: 29

Degovics D, **Hartmann P**, Németh IB, Árva-Nagy N, Kaszonyi E, Szél E, Strifler G, Bende

B, Krenács L, Kemény L, Erős G: A novel target for the promotion of dermal wound healing: Ryanodine receptors. TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY 2019; 366: 17-24.

IF: 3.347 Citáció: 10; független: 10

Jarabin J, Bere Z, **Hartmann P**, Toth F, Kiss JG, Rovo L: Laser-Doppler microvascular measurements in the peri-implant areas of different osseointegrated bone conductor implant systems. EUROPEAN ARCHIVES OF OTO-RHINO-LARYNGOLOGY 2015; 272(12): 3655-3662.

IF: 1.627 Citáció: 16; független: 10

Greksa F, Butt E, Csonka E, Jávör P, Tuboly E, Török L, Szabo A, Varga E, **Hartmann P**: Periosteal and endosteal microcirculatory injury following excessive osteosynthesis. INJURY: INTERNATIONAL JOURNAL OF THE CARE OF THE INJURED 2021; 52(S1): S3-S6.

IF: 2.687 Citáció: 4; független: 3

Garab D, Fet N, Szabó A, Tolba RH, Boros M, **Hartmann P**: Remote ischemic preconditioning differentially affects NADPH oxidase isoforms during hepatic ischemia-reperfusion. LIFE SCIENCES 2014; 105(1-2): 14-21.

IF: 2.702 Citáció: 8; független: 7

Hartmann P, Fet N, Garab D, Szabó A, Kaszaki J, Srinivasan PK, Tolba RH, Boros M L-alpha-glycerolphosphorylcholine reduces the microcirculatory dysfunction and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase type 4 induction after partial hepatic ischemia in rats. JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH 2014; 189(1): 32-40.

IF: 1.936 Citáció: 16; független: 12

Strifler G, Mészáros A, Pécz D, Ficzer Á, Baráth B, Boros M, **Hartmann P**: A májfunkció vizsgálata respirometriával. MAGYAR SEBÉSZET 2016; 69(4): 194-198.

IF: - Citáció: -; független: -

Tuboly E, Gáspár R, Ibor MO, Gömöri K, Kiss B, Strifler G, **Hartmann P**, Ferdinandy P Bartekova M, Boros M, Görbe A: L-Alpha-glycerolphosphorylcholine can be cytoprotective or cytotoxic in neonatal rat cardiac myocytes: a double-edged sword phenomenon. MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY 2019; 460(1-2): 195-203.

IF: 2.795 Citáció: 17; független: 16

Strifler G, Tuboly E, Görbe A, Boros M, Pécz D, **Hartmann P**: Targeting mitochondrial dysfunction with L-alpha glycerolphosphorylcholine. PLOS ONE 2016; 11(11): e0166682

IF: 2.806 Citáció: 31; független: 28

Strifler G, Tuboly E, Szél E, Kaszonyi E, Cao C, Kaszaki J, Mészáros A, Boros M, **Hartmann P**: Inhaled Methane limits the mitochondrial electron transport chain dysfunction during experimental liver ischemia-reperfusion injury. PLOS ONE 2016; 11(1): e0146363

IF: 2.806 Citáció: 44; független: 26

Horváth T, Sándor L, Baráth B, Donka T, Baráth B, Mohácsi Á, Jász KD, **Hartmann P**, Boros M: Methane Admixture Protects Liver Mitochondria and Improves Graft Function after Static Cold Storage and Reperfusion. *ANTIOXIDANTS* 2023; 12(2): 271
IF: 5.9 Citáció: 6; független: 5

Jász DK, Szilágyi ÁL, Tuboly E, Baráth B, Márton AR, Varga P, Varga G, Érces D, Mohácsi Á, Szabó A, Bozó ., Gömöri K, Görbe A, Boros M, **Hartmann P**: Reduction in hypoxia-reoxygenation-induced myocardial mitochondrial damage with exogenous methane. *JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE* 2021; 25(11): 5113-5123.
IF: 5.295 Citáció: 9; független: 4

Benke K, Jász DK, Szilágyi ÁL, Baráth B, Tuboly E, Márton AR, Varga P, Mohácsi Á, Szabó A, Széll Z, Ruppert M, Radovits T, Szabó G, Merkely B, **Hartmann P**, Boros M: Methane supplementation improves graft function in experimental heart transplantation *JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION* 2021; 40(3): 183-192.
IF: 13.569 Citáció: 8; független: 3

Tuboly E, Molnar R, Tokes T, Turanyi RN, **Hartmann P**, Meszaros AT, Strifler G, Foldesi I, Siska A, Szabo A, Mohacsi A, Szabo G, Boros M: Excessive alcohol consumption induces methane production in humans and rats. *SCIENTIFIC REPORTS* 2017; 7(1): 7329
IF: 4.122 Citáció: 20; független: 12

Jávor P, Csonka E, Butt E, Rárosi F, Babik B, Török L, Varga E, **Hartmann P**: Comparison of the Previous and Current Trauma-Related Shock Classifications: A Retrospective Cohort Study from a Level I Trauma Center. *EUROPEAN SURGICAL RESEARCH* 2021; 62(4): 229-237.
IF: 1.114 Citáció: 6; független: 2

Jávor P, Hanák L, Hegyi P, Csonka E, Butt E, Horváth T, Góg I, Lukacs A, Soós A, Rumbus Z, Pákai E, Toldi J, **Hartmann P**: Predictive value of tachycardia for mortality in trauma-related haemorrhagic shock: a systematic review and meta-regression. *BMJ OPEN* 2022; 12(10): e059271
IF: 2.9 Citáció: 7; független: 5

Jávor P, Donka T, Solli HS, Sándor L, Baráth B, Perényi D, Mohácsi Á, Török L, **Hartmann P**: Could exhaled methane be used as a possible indicator for hemodynamic changes in trauma induced hemorrhagic shock? Scientific basis supported by a case study. *INJURY: INTERNATIONAL JOURNAL OF THE CARE OF THE INJURED* 2024; 55(Suppl. 3): 111456
IF: 2.2 Citáció: -; független: -

Sándor L, Donka T, Baráth B, Jávor P, Jász DK, Perényi D, Babik B, Varga E, Török L, **Hartmann P**: Mitochondrial dysfunction in platelets from severe trauma patients - A prospective case-control study. *INJURY: INTERNATIONAL JOURNAL OF THE CARE OF THE INJURED* 2024; 55(Suppl. 3): 111481
IF: 2.2 Citáció: 2; független: 2

A dolgozatban nem szereplő in extenso közlemények

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Török L, **Hartmann P**, Szabó A, Varga R, Kaszaki J, Greksa F, Boros M. A csonthártya mikrokeringésének kísérletes vizsgálata intravitális fluoreszcens videó-mikroszkópiával. MAGYAR TRAUMATOLÓGIA, ORTOPÉDIA, KÉZSEBÉSZET, PLASZTIKAI SEBÉSZET 2008; 51(3): 239-246
IF: - Citáció: -; független: -

Hartmann P, Szabó A, Erős G, Gurabi D, Horváth G, Németh I, Ghyczy M, Boros M. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine in neutrophil leukocyte-dependent acute arthritis in rats. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 2009; 622: 58-64
IF: 2.737 Citáció: 85; független: 77

Hartmann P, Varga R, Zobolyák Z, Héger J, Csósz B, Németh I, Rázga Z, Vizler C, Garab D, Sántha P, Jancsó G, Boros M, Szabó A. Anti-inflammatory effects of limb ischaemic preconditioning are mediated by sensory nerve activation in rats. NAUNYNSCHMIEDEBERG'S ARCHIVES OF PHARMACOLOGY 2011; 383: 179-189
IF: 2.647 Citáció: 8; független: 6

Hartmann P, Garab D, Erős G, Kaszaki J, Boros M, Szabó A. Limb ischemia-reperfusion differentially affects the periosteal and synovial microcirculation. J SURG RES 2012; 178(1):216-22.
IF: 2.018 Citáció: 5; független: 2

Egyéb témában írt első- vagy társszerzős szakcikkek

Török L, **Hartmann P**, Szabó A, Varga R, Kaszaki J, Greksa F, Boros M: A csonthártya mikrokeringésének kísérletes vizsgálata intravitális fluoreszcens videó-mikroszkópiával. MAGYAR TRAUMATOLÓGIA ORTOPÉDIA KÉZSEBÉSZET PLASZTIKAI SEBÉSZET 2008; 51(3): 239-246.
IF: - Citáció: -; független: -

Hartmann P, Greksa F, Garab D, Varga R, Széll M, Keresztes M, Boros M, Szabó A: Microcirculatory consequences of osteoporosis. TIMISOARA MEDICAL JOURNAL 2010; 60(Suppl 2): 100-106.
IF: - Citáció: -; független: -

Tokes T, Eros G, Bebes A, **Hartmann P**, Varszegi S, Varga G, Kaszaki J, Gulya K, Ghyczy M, Boros M: Protective effects of a phosphatidylcholine-enriched diet in lipopolysaccharide-induced experimental neuroinflammation in the rat. SHOCK 2011; 36(5):. 458-465.
IF: 2,848 Citáció: 39; független: 32

Szabo A, **Hartmann P**, Varga R, Janvari K, Lendvai Z, Szalai I, Gomez I, Varga G, Greksa F, Nemeth I, Razga Z, Keresztes M, Garab D, Boros M

Periosteal microcirculatory action of chronic estrogen supplementation in osteoporotic rats challenged with tourniquet ischemia. LIFE SCIENCES 2011; 88(3-4): 156-162.

IF: 2,527 Citáció: 8; független: 4

Járomi P, Szabó A, Garab D, Bodnár D, Uhercsák G, Boros M, **Hartmann P**: A húgyhólyag gyulladássos mikrokeringési reakcióinak kísérletes vizsgálata. MAGYAR SEBÉSZET 65 : 4 pp. 184-190. , 7 p. (2012)

IF: - Citáció: 2; független: 2

Berkó S, Maroda M, Bodnár M, Erős G, **Hartmann P**, Szentner K, Szabó-Révész P, Kemény L, Borbély J, Csányi E: Advantages of cross-linked versus linear hyaluronic acid for semisolid skin delivery systems. EUROPEAN POLYMER JOURNAL 2013; 49(9): 2511-2517.

IF: 3,242 Citáció: 36; független: 31

Meszaros AT, Szilagyi AL, Juhasz L, Tuboly E, Erces D, Varga G, **Hartmann P**: Mitochondria As Sources and Targets of Methane. FRONTIERS IN MEDICINE 2017; 4:195.

IF: 4,019 Citáció: 20; független: 11

Varga G, Ugocsai M, **Hartmann P**, Lajkó N, Molnár R, Szűcs S, Jász DK, Érces D, Ghyczy M, Tóth G, Boros M: Acetylsalicylic acid-tris-hydroxymethyl-aminomethane reduces colon mucosal damage without causing gastric side effects in a rat model of colitis. INFLAMMOPHARMACOLOGY 2018; 26(1): 261-271.

IF: 3,061 Citáció: 7; független: 6

Tenk J, Mátrai P, Hegyi P, Rostás I, Garami A, Szabó I, **Hartmann P**, Pétervári E, Czopf L, Hussain A, Simon M, Szujó S, Balaskó M: Perceived stress correlates with visceral obesity and lipid parameters of the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY 95 pp. 63-73. , 11 p. (2018)

IF: 4,013 Citáció: 68; független: 68

Szilagyi AL, Matrai P, Hegyi P, Tuboly E, Pecz D, Garami A, Solymar M, Petervari E, Balasko M, Veres G, Czopf L, Wobbe B, Szabo D, Wagner J, **Hartmann P**: Compared efficacy of preservation solutions on the outcome of liver transplantation: Meta-analysis. WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 2018; 24(16): 1812-1824.

IF: 3,411 Citáció: 33; független: 32

Solymár M, Ivic I, Pótó L, Hegyi P, Garami A, **Hartmann P**, Pétervári E, Czopf L, Hussain A, Gyöngyi Z, Sarlós P, Simon M, Mátrai P, Bérczi B, Balaskó M: Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and LDL levels in the elderly - A meta-analysis 2018; PLOS ONE 13(11): e0207947

IF: 2,776 Citáció: 86; független: 86

Olah E, Poto L, Hegyi P, Szabo I, **Hartmann P**, Solymar M, Petervari E, Balasko M, Habon T, Rumbus Z, Tenk J, Rostas I, Weinberg J, Romanovsky AA, Garami A: Therapeutic Whole-Body Hypothermia Reduces Death in Severe Traumatic Brain Injury if the Cooling Index Is Sufficiently High: Meta-Analyses of the Effect of Single Cooling Parameters and Their Integrated Measure. *JOURNAL OF NEUROTRAUMA* 2018; 35(22): 2407-2417.

IF: 3.754 Citáció: 41; független: 34

Németh N, Mátrai P, Hegyi P, Czéh B, Czopf L, Hussain A Pammer J, Szabó I, Solymár M, Kiss L, **Hartmann P**, Szilágyi ÁL, Kiss Z, Simon M: Theory of mind disturbances in borderline personality disorder: A meta-analysis. *PSYCHIATRY RESEARCH* 2018; 270: 143-153.

IF: 2,208 Citáció: 79; független: 77

Jaromi P, Garab D, **Hartmann P**, Bodnar D, Nyiri S, Santha P, Boros M, Jancso G, Szabo A: Capsaicin-induced rapid neutrophil leukocyte activation in the rat urinary bladder microcirculatory bed. *NEUROUROLOGY AND URODYNAMICS* 2018; 37(2): 690-698.

IF: 2,360 Citáció: 13; független: 12

Demcsák A, Lantos T, Bálint ER, **Hartmann P**, Vincze Á, Bajor J, Czopf L, Alizadeh H, Gyöngyi Z, Márta K, Mikó A, Szakács Z, Pécsi D, Hegyi P, Szabó IL: PPIs Are Not Responsible for Elevating Cardiovascular Risk in Patients on Clopidogrel—A Systematic Review and Meta-analysis. *FRONTIERS IN PHYSIOLOGY* 2018; 9: 1550

IF: 2,129 Citáció: 32; független: 32

Varga P, Vida N, **Hartmann P**, Szabó A, Mohácsi Á, Szabó G, Boros M, Tuboly E: Alternative methanogenesis - Methanogenic potential of organosulfur administration *PLOS ONE* 2020; 15(7): e0236578

IF: 3,240 Citáció: 1; független: -

Váncsa S, Hegyi PJ, Zádori N, Szakó L, Vörhendi N, Ocskay K, Földi M, Dembrovszky F, Dömötör RZ, Jánosi KF, Rakonczay Z, **Hartmann P**, Horváth T, Eröss B, Kiss S, Szakács Z, Németh D, Hegyi P, Pár G, Szakó L, KETLAK Study Group (Kollaborációs szervezet): Pre-existing liver diseases and on-admission liver-related laboratory tests in COVID-19: a prognostic accuracy meta-analysis with systematic review. *FRONTIERS IN MEDICINE* 21020; 7: 572115

IF: 5,640 Citáció: 22; független: 21

Jávor P, Varga E, Fekete K, Toth F, **Hartmann P**: Novel coronavirus and trauma surgery: successful infection control from a level I trauma centre. *EUROPEAN JOURNAL OF TRAUMA AND EMERGENCY SURGERY* 2020; 46(4):. 737-741.

IF: 3,693 Citáció: -; független: -

Horváth T, Hanák L, Hegyi P, Butt E, Solymár M, Szűcs Á, Varga O, Thien BQ, Szakács Z, Csonka E, **Hartmann P**: Hydroxyapatite-coated implants provide better fixation in total knee arthroplasty. A meta-analysis of randomized controlled trials. *PLOS ONE* 2020; 15:5 e0232378

IF: 3,240 Citáció: 16; független: 16

Földi M, Farkas K, Kiss S Zádori N, Váncsa S, Szakó L, Dembrowszky F, Solymár M, Bartalis E, Szakács Z, **Hartmann P**, Pár G, Eröss B, Molnár Z, Hegyi P, Szentesi A, KETLAK Study Group (Kollaborációs szervezet): Obesity is a Risk Factor for Developing Critical Condition in COVID-19 Patients: a Systematic Review and Meta-analysis. OBESITY REVIEWS 2020; 21:10 e13095

IF: 9,213 Citáció: 202; független: 198

Erös A, Soós A, Hegyi P, Szakács Z, Benke M, Szűcs Á, **Hartmann P**, Eröss B, Sarlós P: Sarcopenia as an independent predictor of the surgical outcomes of patients with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. SURGERY TODAY 2020; 50(10): 1138-1150.

IF: 2,549 Citáció: 52; független: 52

Wobbe B, Wagner J, Szabó DK, Rostás I, Farkas N, Garami A, Balaskó M, **Hartmann P**, Solymár M, Tenk J, Ottóffy M, Nagy A, Habon T, Hegyi P, Czopf L: Ultrafiltration is better than diuretic therapy for volume-overloaded. HEART FAILURE REVIEWS 2021; 26(3): 577-585. 9 p.

IF: 4,654 Citáció: 26; független: 26

Török L, Jávör P, **Hartmann P**, Bánki L, Varga E: Should we abandon the patient-specific instrumentation ship in total knee arthroplasty? Not quite yet! BMC MUSCULOSKELETAL DISORDERS 2021; 22(1): 730

IF: 2,562 Citáció: 7; független: 7

Jávör P, Csonka E, Török L, **Hartmann P**, Varga E: Trauma regiszterek tervezésének áttekintése: Javaslatok egy magyar trauma regiszter létrehozásához. MAGYAR TRAUMATOLÓGIA ORTOPÉDIA KÉZSEBÉSZET PLASZTIKAI SEBÉSZET 2021; 64(1-4): 7-16.

IF: - Citáció: -; független: -

Horváth T, Jász DK, Baráth B, Poles MZ, Boros M, **Hartmann P**: Mitochondrial Consequences of Organ Preservation Techniques During Liver Transplantation. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2021; 22(6): 2816

IF: 6,208 Citáció: 17; független: 15

Török L, Jávör P, Török K, Ráosi F, **Hartmann P**: Early Return to Play After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: Is It Worth the Risk? ANNALS OF REHABILITATION MEDICINE 2022; 46(2): 97-107.

IF: - Citáció: 5; független: 4

Lantos J, Németh T, Barta Z, Szabó Z, Paróczai D, Varga E, **Hartmann P**: Pathophysiological Advantages of Spontaneous Ventilation. FRONTIERS IN SURGERY 2022; 9: 822560

IF: 3,8 Citáció: 7; független: 6

Lantos J, Furák J, Zombori-Tóth N, Zombori T, Bihari K, Varga E, **Hartmann P**: A csecsemőmirigy T-sejtjeinek összetételében létrejövő változások a COVID-19-pandémia

alatt [Changes of the T cell composition in the thymus during the COVID-19 pandemic].
ORVOSI HETILAP 2022; 163(52) 2062-2066.

IF: 0,6 Citáció: -; független: -

Jávor P, Mácsai A, Butt E, Baráth B, Jász DK, Horváth T, Baráth B, Csonka Á, Török L, Varga E, **Hartmann P**: Mitochondrial Dysfunction Affects the Synovium of Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis Differently. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2022; 23(14): 7553

IF: 5,6 Citáció: 7; független: 7

Jávor P, Rárosi F, Horváth T, Török L, Varga E, **Hartmann P**: Detection of exhaled methane levels for monitoring trauma-related haemorrhage following blunt trauma: study protocol for a prospective observational study. BMJ OPEN 2022; 12(7): e057872

IF: 2,9 Citáció: 4; független: 2

Baráth B, Jász DK., Horváth T, Baráth B, Maróti G, Strifler G, Varga G, Sándor L, Perényi D, Tallósy S, Donka T, Jávor P, Boros M, **Hartmann P**: Mitochondrial Side Effects of Surgical Prophylactic Antibiotics Ceftriaxone and Rifaximin Lead to Bowel Mucosal Damage. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 2022; 23(9): 5064

IF: 5,6 Citáció: 3; független: 2

Jávor P, Rárosi F, Horváth T, Török L, **Hartmann P**: Mitochondrial Dysfunction in Trauma-Related Coagulopathy: Is There Causality? Study Protocol for a Prospective Observational Study. EUROPEAN SURGICAL RESEARCH 2023; 64(2): 304-309.

IF: 1,7 Citáció: 1; független: -

Jávor P, Donka T, Horváth T, Sándor L, Török L, Szabó A, **Hartmann P**: Impairment of Mesenteric Perfusion as a Marker of Major Bleeding in Trauma Patients. JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE 2023; 12(10): 3571

IF: 3,6 Citáció: 2; független: 1

Csete K, Baráth B, Sándor L, Holovic H, Mátrai P, Török L, **Hartmann P**: Does Combined Reconstruction of the Medial Collateral and Anterior Cruciate Ligaments Provide Better Knee Function? A Systematic Review and Meta-Analysis. JOURNAL OF CLINICAL MEDICINE 2024; 13(13): 3882

IF: 3,6 Citáció: -; független: -

Kurokawa T, Csete K, Jávor P, Sándor L, Baráth B, Holovic H, Török L, **Hartmann P**: Anterior cruciate ligament reconstruction in the elderly: 5-Year follow-up study. INJURY: INTERNATIONAL JOURNAL OF THE CARE OF THE INJURED 2024; 55(Suppl. 3): 111529

IF: 2,2 Citáció: 2; független: 2

Könyv (Könyvfejezet)

Hartmann P, Varga G: Sebészet: Aszepszis és antiszepszis gyakorlata; higiénés kézmosás,

a műtői személyzet bemosakodása, beöltözése; viselkedés és mozgás a műtőben, steril környezetben. In: Dénes, Tamás; Hamar, Attila; Horváth, Kitti; Kovács, Rita; Maróti, Péter (szerk.) Módszertani kézikönyv skill képzésekhez. Budapest, Magyarország : Állami Egészségügyi Ellátó Központ (2019) 670 p. pp. 208-213., 16 p.

Oláh J, **Hartmann P**: Bőrgyógyászat: Bőrsebészet (benignus-eltávolítások eltávolítása, lipómák, ciszták). In: Dénes, Tamás; Hamar, Attila; Horváth, Kitti; Kovács, Rita; Maróti, Péter (szerk.) Módszertani kézikönyv skill képzésekhez. Budapest, Magyarország: Állami Egészségügyi Ellátó Központ (2019) 670 p. pp. 324-327., 4 p.

Tuboly E, **Hartmann P**: Sebészet: Műtétek – a helyi érzéstelenítés alapjai; kötések, kötéstípusok. In: Dénes, Tamás; Hamar, Attila; Horváth, Kitti; Kovács, Rita; Maróti, Péter (szerk.) Módszertani kézikönyv skill képzésekhez. Budapest, Magyarország: Állami Egészségügyi Ellátó Központ (2019) 670 p. pp. 231-239., 9 p.

Szabadalom

Erős G, **Hartmann P**, Degovics D, Kemény L: Pharmaceutical composition comprising a ryanodine receptor antagonist for facilitating wound healing. Benyújtás éve (szabadalom): 2013, Benyújtás száma: P1300720, Benyújtás országa: Magyarország

11 SZCIENTOMETRIA

Hartmann Petra tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása (2025.03.30)
MTA V. Orvosi Tudományok Osztálya

Tudományos közlemények	Száma		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk²	<u>57</u>			
szakkikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		<u>41</u>	<u>566</u>	<u>675</u>
szakkikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakkikk magyar nyelvű		<u>4</u>	<u>2</u>	<u>2</u>
szakkikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		<u>2</u>	<u>213</u>	<u>218</u>
összefoglaló közlemény		<u>9</u>	<u>190</u>	<u>203</u>
rövid közlemény		<u>1</u>	<u>6</u>	<u>6</u>
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		0	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	0		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV)		<u>57</u>	<u>977</u>	<u>1104</u>
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	<u>57</u>		<u>977</u>	<u>1104</u>
V. További tudományos művek	<u>12</u>			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratban megjelent teljes folyóiratcikkeket is		<u>11</u>	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		0	0	0
Olthalmak (szabadalmak)		<u>1</u>	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	<u>2</u>		<u>4</u>	<u>4</u>
Összes hivatkozás¹			<u>981</u>	<u>1108</u>
Hirsch index⁶	<u>18</u>			
g index⁶	<u>32</u>			

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	<u>6</u>	<u>124</u>
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	<u>27</u>	<u>210</u>
A tudományos fokozat (PhD 2011) elnyerése utáni teljes tudományos folyóiratcikkek száma	<u>51</u>	<u>975</u>
Az utolsó 10 év (2015-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	<u>45</u>	<u>905</u>
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	<u>201</u>	18,14%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		<u>92</u>
Jelentés, guideline	<u>1</u>	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni mély hálámat mindazoknak, akik az elmúlt közel 20 év során támogattak, inspiráltak, és szakmai segítséget nyújtottak kutatómunkám során. Különösen hálás vagyok a Szegedi Tudományegyetem Sebészeti Műtéttani Intézetének, ahova 2007-ben első gyermekem születése után kerültem, az akkor 3 éve tartó ortopédia-traumatológia szakképzésem megszakításával.

Legnagyobb köszönettel Dr. Szabó Andrea Tanárnőnek tartozom, aki életem egy kritikus időszakában bizalmat szavazott nekem, annak ellenére, hogy korábban nem volt érdemi tudományos tevékenységem. Lehetőséget adott, hogy PhD-hallgatóként csatlakozzam a mikrokeringési kutatócsoportjához, és nemcsak a kísérletek technikai kivitelezésére tanított meg, hanem arra a tudományos gondolkodásmódra is, amelynek alapelveit a mai napig követem a kutatómunka tervezésében és az eredmények értékelésében. Ezért a tanításáért örökké hálás leszek.

Külön köszönetet mondok Boros Mihály Professzor Úrnak, aki lehetővé tette számomra, hogy elméleti intézeti munkám mellett befejezhessem a szakképzésemet, majd a szakvizsgám után párhuzamosan gyakorolhassam orvosi hivatásomat is. Hálás vagyok a Sebészeti Műtéttani Intézet akkori és jelenlegi munkatársainak, akik önzetlen munkájukkal és támogatásukkal segítettek.

PhD fokozatom megszerzése (2011) után visszatértem a Traumatológiai Klinikára, hogy a szakvizsgálathoz szükséges gyakorlati időmet megszerezsem, majd megbízási szerződéssel folytattam a munkát. Kis megszakítással, második gyermekem születése miatt, végül 2021 óta ismét főállású munkatársként dolgozom itt.

Hálásan köszönöm Varga Endre Professzor Úr támogatását, aki révén bekapcsolódhattam a klinikai kutatásokba, és a mai napig fordulhatok hozzá kérdéseimmel. Klinikánk jelenlegi vezetőjének, Török László Tanár Úrnak szintén köszönettel tartozom, hogy szívügyének tekinti a klinikai kutatásokat és biztos háttérként segíti kutatásainkat, megteremtve ehhez a szükséges feltételeket és időt a munkatársak számára.

Hálával tartozom PhD és TDK hallgatóimnak, akik nemcsak tanítványaim, hanem teljes értékű kutatótársaim is voltak. Szerencsésnek érzem magam, hogy ilyen tehetséges, kreatív és szabadon gondolkodó emberekkel dolgozhattam együtt. Kutatásaim sikeréhez mindig az ő lelkesedésük, szorgalmuk és munkájuk járult hozzá.

Hartmann Petra_154_23

Végül, de nem utolsósorban, szívből köszönöm családomnak, férjemnek, Dr. Rakonczay Zoltánnak, valamint gyermekeimnek, Dorottyának és Zitának, akik mindig szeretettel és odaadással támogattak pályám során. Nélkülük ez a munka nem valósulhatott volna meg.

A Doktori műben bemutatott kutatásokat közvetlenül segítő főbb támogatások:

OTKA60752 (Szabó A.), OTKA75161 (Boros M);

OTKA109388 (Szabó A), OTKA116689 (Kaszaki J), OTKA 120232 (Boros M)

OTKA FK138839 (Hartmann P); MTA Bolyai János Kutatási Ösztöndíj (2021-2023, Hartmann P); „MTA doktora cím megszerzésére szükséges értekezés megírásának támogatására 14 év alatti gyermeket nevelő kutató számára” címmel kiírt ösztöndíj (2024, Hartmann P)