

Akut alsó végtagi artériás keringészavarok szövődményeinek megelőzése farmakológiai és sebésztechnikai kondicionálási eljárásokkal

Doktori értekezés

dr. Garbaisz Dávid

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Jancsó Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Ferencz Andrea, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Wéber György, Ph.D., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Glasz Tibor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Kaszaki József, Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2015

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	6
1.1. Az akut végtagi iszkémia.....	6
1.1.1. Meghatározás, epidemiológia	6
1.1.2. Etiológiai tényezők, patofiziológia	7
1.1.3. Tünetek, klasszifikáció, diagnózis	7
1.1.4. Kezelési lehetőségek, kezelési algoritmus	9
1.2. Az alsó végtagi vázizomszövet iszkémia-reperfúziója.....	10
1.2.1. Iszkémiás károsodás.....	11
1.2.2. Reperfúziós károsodás	13
1.2.3. Az érkirekesztési módszerek jelentősége alsó végtagi IR modellalkotás során	15
1.2.4. Izomkárosodás alsó végtagi iszkémia-reperfúzió során: Rabdomiolízis	16
1.2.5. A mitokondriumok központi szerepe iszkémia-reperfúzió során	18
1.3. Alsó végtagi iszkémia-reperfúzió távoli szervi hatásai	22
1.3.1. Gyulladásos citokinek - a TNF- α és az IL-6 szerepe	24
1.3.2. Távoli szervi károsodás: vese	25
1.3.3. Távoli szervi károsodás: tüdő	30
1.4. Az iszkémiás-reperfúziós károsodás megelőzési lehetőségei	32
1.4.1. Sebésztechnikai kondicionálási eljárások	32
1.4.2. Farmakológiai kondicionálási eljárások.....	37
2. Célkitűzés.....	42
3. Módszerek.....	43
3.1. Kísérleti elrendezés, műtéttechnika	43
3.1.1. Törvényi háttér.....	43
3.1.2. Csoportbeosztás	43

3.1.3. Preoperatív időszak, anesztézia.....	44
3.1.4. Operáció	45
3.2. Kísérleti végpontok.....	49
3.2.1. I., II., III. kísérlet közös kísérleti végpontjai.....	50
3.2.2. Az I. kísérlet végpontjai: Alsó végtagi IR lokális vázizom és tüdőszövődményeinek megelőzése posztakondicionálás alkalmazásával.	52
3.2.3. A II. kísérlet végpontjai - A vázizomkárosodás mértékének a vizsgálata infrarenális aortakirekesztés és alsó végtagi tourniquet alkalmazását követően.....	54
3.2.4. A III. kísérlet végpontjai - Alsó végtagi IR lokális vázizom és veseszövődményeinek megelőzése NIM-811 farmakológiai kezeléssel.	54
3.3. Statisztikai elemzés.....	57
4. Eredmények.....	58
4.1. Az I. kísérlet eredményei.....	58
4.2. A II. kísérlet eredményei	65
4.3. A III. kísérlet eredményei	68
5. Megbeszélés	78
6. Következtetések.....	97
7. Összefoglalás	99
8. Summary	100
9. Irodalomjegyzék.....	101
10. Saját publikációk jegyzéke	119
11. Köszönetnyilvánítás	121

Rövidítések jegyzéke

ADP - adenzin – difoszfát	MCP-1 - monocyte chemotactic protein-
ANT - adenin nukleotid transzlokáz	MgSO ₄ – magnézium-szulfát
ARDS - Acute Respiratory Distress Syndrome	MnSOD – mangán kötött szuperoxid-dizmutáz
ATP – adenzin-trifoszfát	MODS - Multiple Organ Dysfunction Syndrome
BMM – belső mitokondriális membrán	MOF – Multiple Organ Failure
BR – benzodiazepin receptor	MPO – myeloperoxidáz
BUN - Blood Urea Nitrogen	mPTP - mitochondrial Permeability Transition Pore
C3a – komplement komponens 3a	MRA – mágneses-rezonancia angiográfia
C5 – komplement komponens 5	NAD – nikotinamid-adenin-dinukleotid
CK - kreatin – kináz	NBT – Nitroblue-tetrazolium
CTA – computer tomográfia angiográfia	NF-AT - nuclear factor activated T-cells
CuZnSOD - réz-cink kötött szuperoxid-dizmutáz	NFκB – nuclear-factor-κB
Cyp-D – cyclophillin-D	NIM-811 - N-metil-4-izoleucin cyclosporin
CsA – cyclosporin-A	NOS – nitrogén-monoxid szintáz
DNP - 2-4-dinitrofenol	ONOO ⁻ - peroxinitrit
DNS - dezoxiribonukleinsav	p – szignifikancia jele
EÁB - Egyetemi Állatkísérleti Bizottság	PAF – thrombocyta aktiváló faktor
EDTA - etilén – diamín – tetraecetsav	P _i – anorganikus foszfát
ELISA - enzyme – linked immunosorbent assay	PI3 - foszfatidilinozitol-3 kináz
ERK - extracellulárisan regulált kináz	PKCε – protein-kináz-C ε
FENa – frakcionált nátrium-ion exkrécio	PMN – polimorfonuklearis leukocyta
GABA – gamma amino-vajsav	PostC - posztkondicionált
GFR - Glomeruláris Filtrációs Ráta	PPIázok - peptidil-prolil cisz-transz izomerázok
HE – hematoxilin-eozin	RA – reperfúziós terület
HK - hexokináz	RIRR - ROS induced ROS release
Hsp72 – heat shock protein-72	RISK – reperfusion injury salvage kinase
ICAM-1 - Inter-Cellular Adhesion Molecule-1	RLU% - Relative Light Unit
IFN-γ – interferon-γ	ROS – reactive oxygen species
IL - interleukin	SAFE - survival activating factor enhancement
IR – Ischaemia – Reperfúzió	sCR1 – 1-es típusú oldható komplement receptor
KMM – külső mitokondriális membrán	SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome
LDF - laser-Doppler flowmeter	
LDH – laktát-dehidrogenáz	
LTB ₄ – leukotrién B4	
MAP – mean arterial pressure	

STAT3 - signal transducer and activator of transcription

TASC - Trans-Atlantic Inter-Society Consensus

TNF- α – tumor nekrosis faktor- α

TRIS – hidroximetil-aminometán

TUNEL – Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

TxA₂ – thromboxane-A₂

UH - ultrahang

VCAM - Vascular cell adhesion protein

VDAC – Voltage Dependent Anion Channel

W/D – Wet/Dry

1. Bevezetés

1.1. Az akut végtagi iszkémia

Alsó végtagi akut artériás érelzáródások és műtéti megoldásuk utáni iszkémiás-reperfúziós (IR) károsodás lokális, szisztémás és távoli szervi szövődményeinek a megelőzésére évtizedek óta történnek próbálkozások, azonban a mai napig nincs egységesen elfogadott terápiás módszer.

A napi klinikai gyakorlatban kizárólag tüneti terápia alkalmazása történik akár a lokális, akár a távoli szervi szövődményeket tekintve. Az egyedüli megoldás az lehet – különösen igaz ez a távoli szervi szövődményeket illetően - ha olyan terápiás eszközt találunk, mely a szubcelluláris patofiziológiai folyamatok kialakulása előtt hat, tehát a lokális vázizom károsodások szintjén képes csökkenteni és/vagy megelőzni a szövődményeket.

1.1.1. Meghatározás, epidemiológia

Az akut végtagi iszkémia a végtagi perfúzió hirtelen csökkenését jelenti, mely veszélyezteti a végtag életképességét. Klinikai megjelenési formája abban az esetben tekinthető akutnak, amennyiben a tünetek a kezdetet követően két héten belül felismerésre kerülnek.¹⁻³

Az akut végtagi iszkémia incidenciája körülbelül 1,5 eset/10000 fő/év.¹ Egy korábbi felmérés alapján 182 kórházból 86-ban jelentettek 539 akut végtagi iszkémiás esetet egy három hónapos periódust vizsgálva.⁴ Egy másik felmérésben, az akut végtagi iszkémia incidenciáját 1 eset/7000 fő/évnek találták.⁵

A mortalitás és a szövődmények aránya akut végtagi iszkémiában szenvedő betegek körében igen magas. A sürgős revaszkularizáció ellenére a betegek 10-15%-ában fordul elő amputáció a kórházi ellátás alatt.¹ A TASC II (Trans-Atlantic Inter-Society Consensus Document on Management of Peripheral Arterial Disease) ajánlás statisztikai adatai szerint nagyszámú populációt és több országos adatot figyelembe véve a major amputációk incidenciája 120-500/millió fő/év. Az akut végtagi iszkémia halálozási aránya körülbelül 15-20% a megjelenést követő egy éven belül, melyben

jelentős szerepe van a gyakran fennálló kísérőbetegségeknek is, melyek ezen érbetegségekre predisponálnak.¹

1.1.2. Etiológiai tényezők, patofiziológia

Az akut végtagi iszkémiát leggyakrabban régebben fennálló perifériás ateroszklerózis talaján kialakuló trombózis, alsó végtagi bypass graft trombózisa, illetve szív eredetű vagy az érbetegségtől proximálisan elhelyezkedő perifériás artéria aneurizmából származó tromboembólia okozza. Azon betegekben, akiknél nem áll fenn ateroszklerózis, külső artériás kompresszió, artéria disszekció, trauma vagy egy artériás trombózist eredményező hiperkoagulabilis állapot következtében alakulhat ki akut végtagi iszkémia.⁶

Az embólia és a trombózis előfordulási arányát tekintve 15%-ban fordul elő embólia és 85%-ban arterioszklerózis talaján kialakuló artériás trombózis.⁷

Embóliát okozhat leszakadt trombus, levegő, zsír, tumorrész, amnionfolyadék és idegentest. Az artériás embólia leggyakoribb forrása proximális szakaszon keletkezett, levált trombus. Kardiális eredetű (bal pitvar, bal kamra) embóliaforrás fordul elő az esetek 90%-ában.⁷ A vérőrendszer oszlási pontjai (bifurkáció) az embólusok leggyakoribb beékelődési helyei. Az egyik leggyakoribb előfordulási hely az a. femoralis, ahol 20-30%-os előfordulási aránnyal jelenik meg artériás embolizáció.⁸

Az artériás trombózis legtöbbször az arterioszklerotikus erek kritikus szűkületében, vagy szűkületei között alakul ki, így gyakran aterotrombózisról beszélünk. Meglévő krónikus betegség akut rosszabbodásáról van szó.

1.1.3. Tünetek, klasszifikáció, diagnózis

Az akut végtagi iszkémia tüneteit az angolszász rövidítésekből átvett „6P” foglalja össze, mely: fájdalom (pain), pulzus eltűnése (pulselessness), sápadtság (pallor), érzéskiesés (paraesthesia), mozgáskiesés (paralysis) és bőrhőmérséklet csökkenés (poikilothermia).²

Fájdalom: a betegségkimenetel szempontjából fontos a kezdetének az ideje, lokációja, intenzitása, valamint az időbeni karakterisztikája.

Pulzus eltűnése: A lábfejen tapintható pulzus diagnosztikus pontossága nagymértékben változó, ezért a pulzus hiánya vagy megléte önmagában nem diagnosztikus értékű tünet. Együtt értékelendő a boka szintjében történő vérnyomásméréssel, valamint a Doppler vizsgálattal.

Sápadtság és hőmérsékletcsökkenés: a végtagi szín és hőmérsékletváltozás gyakori vizsgálati lelet akut végtagi iszkémiában (habár a bőrhőmérsékletet befolyásolhatja a környezet hőmérséklete). Mindkét tünet jelenléte akkor igazán diagnosztikus értékű, ha különböznek az ellenoldali láb színétől és bőrhőmérsékletétől.

Érzéskiesés: Zsibbadtságérzés a betegek több mint felében előfordul.

Motoros kiesés: Kedvezőtlen diagnosztikus jelként könyvelhető el.

Az akut végtagi iszkémia klinikai klasszifikációja során a fő kérdés az iszkémia súlyossága, mely a legfontosabb a korai kezelés megválasztásában. Az akut végtagi iszkémia Rutherford szerinti stádiumbeosztása az 1. táblázatban kerül részletezésre.

1. táblázat: Az akut végtagi iszkémia stádiumbeosztása Rutherford szerint.²

Kategória	Leírás/prognózis	Vizsgálati lelet		Doppler jel	
		Szenzoros érzéskiesés	Izom gyengeség	Artériás	Vénás
I.	Életképes Nincs azonnali veszélyeztetettség	Nincs	Nincs	Hallható	Hallható
IIA	Kismértékű veszélyeztetettség Gyors kezeléssel megmenthető	Minimális a lábujjakon, vagy nincs	Nincs	Gyakran nem hallható	Hallható
IIB	Azonnali veszélyeztetettség, sürgős revaszkularizációval megmenthető	A lábujjakon túlterjedő, gyakran társul nyugalmi fájdalommal	Enyhe, közepes	Általában nem hallható	Hallható
III	Irreverzibilis, Nagyfokú szöveti elhalás	Nagyfokú, sokszor teljes érzéketlenség	Nagyfokú, bénulás, rigor	Nem hallható	Nem hallható

Az akut végtagi iszkémia anamnézisének és fizikális vizsgálatát képalkotó technikákkal szükséges kiegészíteni a pontos diagnózis érdekében. A Doppler vizsgálat alkalmas a véráramlás vizsgálatára a kisebb artériákban és segítségével kiszámolható a

boka-kar index, mellyel objektíven számszerűsíthető az iszkémia súlyossága és foka. Azon betegekben, akikben szükség van revaszkularizációra, indokolt a katéteres angiográfia végzése. A katéteres angiográfia a „gold standard” képalkotási módszer akut végtagi iszkémiában, hisz ettől várható részletes és pontos információ az iszkémia etiológiáját és kiterjedését illetően. Alternatív képalkotó eljárások lehetnek a duplex-UH, CT-angiográfia (CTA) és MR-angiográfia (MRA).

1.1.4. Kezelési lehetőségek, kezelési algoritmus

Az akut végtagi iszkémia kezelésének elsődleges célja, hogy megelőzzük a trombus propagációját, illetve az iszkémia súlyosabbá válását. Indikált az azonnali heparin antikoaguláció, mely iv. frakcionálatlan heparint jelent. Ismertek olyan endovaszkularis kezelési módszerek, mint a *direkt katéteres trombolízis*, *percutan aspirációs trombektómia*, azonban a dolgozat részletesebben csak a sebészeti eljárásokra tér ki.

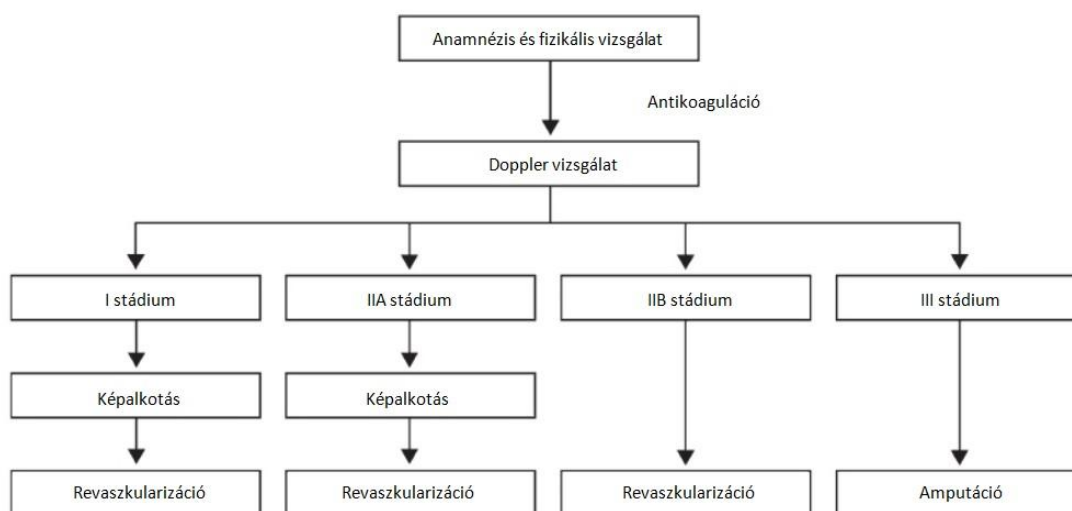
1.1.4.1. Sebészeti eljárások akut végtagi iszkémia kezelésére

Azonnali revaszkularizáció szükséges közepesen súlyos iszkémiás végtag esetén (Rutherford IIb), valamint megfontolandó azon betegek esetében, akiknél nagyon rövid ideje fennálló szenzorikus és motoros deficit áll fenn. A válassztott revaszkularizáció módszerét meghatározza (nyitott sebészeti vagy endovaszkuláris) az elzáródás anatómiai elhelyezkedése, az akut végtagi iszkémia etiológiája.²

Suprainguinalis elzáródás esetén a nyitott műtét az elsődleges választás. Például egy nagy embólus a proximális arteria iliacában vagy a disztális aortában katéteres embolektómiával kezelhető a leghatékonyabban. Infrainguinalis verőérelzáródás, mely lehet akár embólia, akár trombózis, többnyire endovaszkuláris módszerrel kezelendő.²

Az embólia okozta érelzáródás igényelhet csupán embolektómiát, melyet Fogarty-féle embolektómiás katéterrel végzünk. A trombotikus okklúciónak a kezelése sebészileg endarterektómiával vagy sokkal gyakrabban bypass-graft beültetéssel történik.

Akut végtagi iszkémia kezelésében az amputáció is szóba jöhet terápiás megoldásként. A Rutherford III klasszifikációs szint olyan előrehaladott iszkémiát jelent, melyben elsőként választandó módszer az amputáció, hiszen a végtag irreverzibilisen károsodott, nagyfokú szövetnekrózis áll fenn. (Forrás: TASC II ajánlás)



1. ábra: Az akut végtagi iszkémia kezelési algoritmus. I stádium: életképes végtag, nincs azonnali fenyegetettség; IIA stádium: kismértékben veszélyeztetett végtag; IIB stádium: azonnali fenyegetettség; III stádium: irreverzibilis károsodás. Képalkotási lehetőségek: angiográfia, duplex UH, CTA, MRA; Revaszkularizációs lehetőségek: endovaszkuláris, sebészi vagy hibrid. (Forrás: TASC II ajánlás)^{4, 2}

1.2. Az alsó végtagi vázizomszövet iszkémia-reperfúziója

Ha az iszkémia-reperfúzió (IR) pathofiziológiáját egészen egyszerűen szeretnénk kifejezni, akkor nem más, mint reduktív és oxidatív stressz egymásutánisága. Iszkémiának nevezzük a szövetek, szervek, szervrendszerek vérellátási hiányosságát és a következményesen kialakuló hipoxiáját. Az iszkémiás periódus alatt, a megszünt vérellátás következtében tápanyag és oxigén deficit keletkezik intracellulárisan, mely a sejt reduktív stresszhatását (NADH^+ felhalmozódását) eredményezi. Reperfúzió során

pedig az adott szövet vagy szerv vérellátása helyreáll, melynek következtében a sejtek tápanyag és oxigén ellátottsága is biztosított lesz, viszont cellularis és szubcelluláris folyamatok beindulása által paradox módon további károsodások alakulnak ki, melyben a képződött szabadgyökök miatt az oxidatív stressznek központi szerepe van.

Az iszkémia-reperfúzió végeredménye sejthalál, mely létrejöhet akár apoptotikus, akár nekrotikus úton. A sejthalál (apoptózis vagy nekrosis) formája az intracelluláris energiaraktárak mennyiségétől és minőségétől függ. Régen ismert tény, hogy egy szöveten belül IR során mindkét folyamat előfordul, hangsúlyozva a folyamat heterogenitását.

1.2.1. Iszkémiás károsodás

A vázizomzat képezi a metabolikusan aktív szövetek 95%-át az alsó végtagon, így az izomszövet iszkémiára adott válasza jelentősen meghatározza az alsó végtag túlélését.⁹ Az izomszöveti iszkémia kezdetekor az arteriolák jelentős dilatatioja következik be annak érdekében, hogy a szöveti véráramlást az alapáramlás többszörösére fokozzák, ezáltal minél több oxigént juttassanak a szövetbe az aerob anyagcsere folyamatok fenntartásához.¹⁰

Iszkémia alatt az izomsejt elsősorban a membránpotenciál és az intracelluláris ioneloszlás egyensúlyának a fenntartására törekszik energiaraktárainak felhasználásával. A korlátozott keringés következtében hiányt szenved a sejtek exogén szubsztrát ellátottsága – elsősorban oxigén és szabad zsírsavak – mely a vázizomszövetben jól fejlett anaerob energianyerési utak felerősödését okozza. Az iszkémia kezdetén az anaerob metabolizmus 8 másodpercen belül aktiválódik a véráramlás megszűnését követően, valamint 20 másodpercen belül az izom kontrakciós képessége hanyatlani kezd.^{11, 9}

A celluláris homeosztázis fenntartásában a sejt ATP és nagy energiájú kötéseket tartalmazó foszfát molekulái kiemelten fontos szerepet játszanak. Iszkémia során az ATP anaerob módon termelődik: a kreatin-foszfát felhasználásával és/vagy a glikogén metabolizmuson keresztül.

Meleg iszkémia első 3 órája során az ATP szint csökkenés mértéke kifejezetten lassú, mivel a kreatin-foszfát raktárak még képesek fedezni a hiányát. A harmadik óra

végén, a kreatin-foszfát raktárak teljesen kimerülnek és felgyorsul az ATP szint csökkenésének a mértéke, mivel az iszkémia alatt aktiválódó glikolízis önmagában nem képes lépést tartani a sejt működéséhez szükséges ATP szint igényével. Hat-hét óra után az ATP szint csökkenése kritikus értéket ér el, mely egyenes arányban áll a majdnem teljes vázizomzat elhalásával.⁹ Iszkémia során az energiaraktárak csökkenése és az izomsejt nekrosis kiterjedése egyenes arányban állnak egymással. Hayes és munkatársai¹² mutattak rá az izomsejtnekrosis és az ATP raktárak kimerülésének kapcsolatára. Már kis izomkárosodás bekövetkeztével is csökken az izomsejtek ATP szintje. Hosszabb ischaemiás időtartam után a csökkent ATP szint szorosan korrelál az izomnekrosis mértékével. Az ATP szint a normális 20%-a alá csökkenésekor teljes izomsejtnekrosis következik be.

A reduktív stressz alatt fellépő alacsony ATP szint miatt a sejtmembrán ATP dependens iontranszportereinek működési zavara figyelhető meg, mely végeredményben az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megnövekedéséhez vezet. Az iszkémia alatt csökkenő ATP szint a Na^+/K^+ ATPáz károsodását okozza, intracelluláris Na^+ - és vízbeáramlást, valamint K^+ -kiáramlást eredményezve. Az extracelluláris K^+ -tartalom megemelkedik. Ezzel együtt az anaerob glikolitikus anyagcsereutak felerősödése miatt megnövekedett lokális H^+ -koncentráció (piruvát laktáttá alakulása) a Na^+/H^+ -antiporter - mely az intracelluláris pH fő meghatározója - fokozott működéséhez vezet. Így a Na^+ intracelluláris koncentrációja tovább nő, mely egyrészt a sejt ödémáját okozza, másrészt a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -pumpa ionáramlásának irányára hatva Ca^{2+} -beáramlást idéz elő, így az intracelluláris Ca^{2+} -tartalom megemelkedik.¹³

Az iszkémia alatt megnövekvő intracelluláris Ca^{2+} -szintet a mitokondriumok pufferkapacitásuk révén próbálják kompenzálni, azonban - mint a későbbiekben szó esik róla - a reperfüzió során is tovább nő a sejtbe történő Ca^{2+} beáramlás és a mitokondriumok pufferkapacitása kimerül. Az összességében megemelkedett intracelluláris Ca^{2+} mennyisége olyan hatást vált ki, mely által olyan enzimek aktivációja következik be, mint a foszfolipázok, kalmodulin által regulált proteázok és endonukleázok, melyek aktívan részt vesznek a folyamatok végeredményeként létrejövő sejthalál kiváltásában.^{14, 9}

1.2.2. Reperfúziós károsodás

Az iszkémiát követő reperfúzió során az izomsejt működés és ATP termelődés biztosítottá válik a szükséges szubsztrátok (glükóz, szabad zsírsavak, oxigén) újbóli megjelenésével. Emellett az iszkémia során savas irányba eltolódott pH gyors normalizálódása is megtörténik. Az említett folyamatok csupán részben hasznosak a sejt számára, ugyanis az életet jelentő tápanyag és oxigén ellátottságon felül paradox módon ún. reperfúziós károsodás alakulhat ki.

A gyors extracelluláris pH normalizálódás következtében masszív H^+ kiáramlás veszi kezdetét az extracelluláris térbe, mellyel együtt jelentős Na^+ beáramlás történik a sejtbe. A Na^+/Ca^{2+} pumpa aktiválódik és már az iszkémia alatt növekedésnek indult intracelluláris Ca^{2+} szint tovább nő.

A reperfúzió hatására endoteliális és izomsejtmembrán sérülés következik be, mely nagyrészt a reperfúzió alatt potenciális károsító tényezőként jelenlévő oxidatív stressznek köszönhető. A reperfúzió során oxidatív stressz két fő folyamat eredményeként jön létre.

Normálisan az oxigén tetraavalens redukciója a mitokondriumban történik víz és szén-dioxid képződéssel. Amennyiben ez a redukció inkomplett - köszönhetően az elektrontranszport lánc folytonosság-megszakadásának - egy elektront hordozó oxigén molekulák, tehát reaktív oxigén származékok (ROS: reactive oxygen species) képződnek.

A másik fontos szabadgyökképződésért felelős folyamat az ún. respiratory burst, mely a reperfúzió során aktiválódó leukocitákból felszabaduló reaktív oxigén származékokat jelenti.

Egy harmadik potenciális forrása az oxigén szabadgyököknek a xantin-oxidáz általi hipoxantin redukció. A xantin-oxidáz az iszkémia hatására xantin-dehidrogenázból keletkezik és katalizációs aktivitása során termelődik szuperoxid-anion.

Az említett folyamatok során képződött oxigén-szabadgyökök károsítanak számos strukturális proteint és enzimet.⁹ Különösen károsító hatásúak a foszfolipid membránok szabad zsírsav molekuláira nézve, zsírsav-peroxil és lipid-peroxid gyökök képződnek. Ez a reakció a lipid-peroxidáció, mely teljesen dezintegrált sejtmembránhoz

vezethet, vagy abnormalis membránproteinek képződését idézheti elő, mely rendellenes ionmozgásokat tehet lehetővé a membránokon keresztül. A szabadgyökök károsító hatásúak a DNS-molekulára nézve is. Keresztkötéseket, nukleinsav-hasításokat és bázis-hidroxilációt indukálnak a DNS szálban.

A szabadgyökök aktiválják a redox–szenzitív transzkripciós faktorokat (NFκB), ezzel indukálva a különböző gyulladásos mediátorok (IL-1β, TNF-α) felszabadulását, hozzájárulva az iszkémizált szövet gyulladásos reakciójának létrejöttéhez.⁹

Az iszkémiás szövet reperfúziója során komplement kaszkád aktiváció is létrejön, mely biológiailag aktív peptidek képződéséhez vezethet, stimulálva az izomszövetben a leukociták felszaporodását és az ún. lítikus membránkárosító komplex képződését.

Az oxidatív stressz kapcsán már említésre került, hogy a reperfúzió során jelentős mértékű leukocita aktiváció veszi kezdetét a reperfúzió első 6-8 órájában. Fehérvérsejt-mediált lokális gyulladás alakul ki, melynek első lépése a leukociták endotheliumhoz kötődése neutrofil adhézións receptorok up-regulatio-jának (CD11/CD18), valamint különböző endoteliális leukocita adhézións molekulák (ICAM-1) megnövekedett expressziójának köszönhetően. Az adhéziónt követően leukocita aktiválódás történik, melynek következménye citotoxikus enzim felszabadulás (elasztáz, proteázok). A mieloperoxidáz koncentrációja – mely egy fontos markere a neutrofil leukociták szöveti jelenlétének – akár a százszorosára emelkedik az izomban a reperfúziót követő 48 óra után.⁹

A lokális károsodások részeként az izomsejtnekrózis mellett az igen sebezhető endotélsejtek dezintegrációja is kialakul már korábban az iszkémia során is, mely károsodás a reperfúzió kezdeti időszaka alatt éri el tetőfokát, illetve a keringési funkciókat befolyásoló hatása ekkor válik kifejezetté (endotél diszfunkció). Endotél diszfunkció különböző bioaktív ágensek csökkent képződésével (prosztaciklin, NO), illetve más anyagok (endotelin, tromboxán-A₂) fokozott elválasztásával jár.⁹ Az előbbiekhöz hasonlóan számos gén átíródása felgyorsul (adhézións molekulák, citokinek), vagy szuppresszálódik (cNOS, trombomodulin).¹⁵ Az endotélsejtek morfológiai elváltozásaként sejtduzzadás, bazális membránról való leválás és sejtfelszíni leukocita adhézións figyelhető meg. Öt óra iszkémiás károsodást követően a

reperfúzió során a vázizomzat kapillárisainak felének elzáródása, ill. irreverzibilis funkcionális károsodása következik be.^{16, 9}

A sejtes elemek megjelenésével együtt megnövekszik az érpermeabilitás, a plazmaproteinek extravazális kilépése következtében fokozódó intersticiális ödéma alakul ki, mely a mikrovaszkulátúra komprimációját okozhatja.

A fent említett folyamatok – mint endotél duzzadás, fokozott kapilláris permeabilitás, intersticiális ödéma és a lumenelzáródást okozó sejtes elemek (leukociták, trombociták) - eredményeként jön létre az ún. „no-reflow” jelenség, mely az iszkémiát prolongálhatja és reperfúziót a szövetre nézve „foltossá teheti”, így prologálva a vértlenséget a reperfúzió során is.¹⁷

Ezen faktorok kombinálódása (főként a magas intracelluláris Ca^{2+} -szint és reaktív szabadgyök képződés) végeredményben sérült kapilláris endotéliumhoz és sérült izomsejt membránhoz vezet. Az izomsejthalál bekövetkezhet akár nekrozis, akár apoptózis útján, melynek eredményeképpen a szisztémás keringésbe intracelluláris termékek szabadulnak fel.⁹

1.2.3. Az érkirekesztési módszerek jelentősége alsó végtagi IR modellalkotás során

Alsó végtagi artériás kirekesztés során a kirekesztett vázizomzat különböző mértékű károsodást szenved. Az izomkárosodás mértéke egyenes arányban nő az iszkémia időtartamával, majd elér egy pontot, amikor már irreverzibilis változások következnek be. Ezt a pontot nevezzük az izom iszkémiás toleranciájának. Az izomszövet iszkémiás toleranciája nagymértékben függ a meglévő vagy hiányzó reziduális kollaterális keringéstől.¹⁸ Vázizom iszkémia létrehozására az irodalom többféle patkánymodellt is ismer. Az ismert iszkémiás modellek különböző módszereket alkalmaznak az artériás keringés kirekesztésére, úm.: végtag körüli külső tourniquet¹⁸, arteria femoralis leszorítás¹⁹, arteria iliaca leszorítás²⁰ és infrarenális aorta leklippelés²⁰. A tourniquet-vel történő érkirekesztés az egyetlen módszer, amellyel komplett vázizom iszkémia érhető el reziduális keringés nélkül. Az összes további említett módszer egyike sem képes teljes iszkémiát létrehozni, módszertől függően mindegyik esetében marad bizonyos fokú reziduális keringés. Habár korábban leírták az

irodalomban, hogy az érkirekesztő technikák közül az infrarenális aorta leklippelés az az eljárás, amellyel szignifikáns mértékű iszkémiás vázizomkárosodás érehtő el²¹, a mai napig nincs egységesen alkalmazott és elfogadott módszer vázizom IR moellezésére és nem tudjuk pontosan, hogy milyen mértékű különbség adódik az izomrostkárosodás tekintetében a különböző IR modellek alkalmazásakor.

1.2.4. Izomkárosodás alsó végtagi iszkémia-reperfúzió során: Rabdomiolízis

A rabdomiolízis úgy definiálható, mint a vázizomszövet sérülése, amely különböző intracelluláris sejtalkotók és molekulák felszabadulását eredményezi a szisztémás keringésbe. A vázizomszövet a teljes testtömeg 40%-át alkotja, tehát amikor egy nagyobb károsodás éri ezt a szövettömeget, a sejtalkotók nagy mennyiségben jelennek meg az extracelluláris térben, mely meghaladja a különböző eliminációs mechanizmusok képességét. A rabdomiolízis már régóta leírt jelenség. Az első pontos leírása a szindrómának a II. Világháborúban megsérült katonák, valamint természeti katasztrófákat követő sérülések kapcsán került előtérbe. Ezen körülmények okán a rabdomiolízist ún. „crush-szindróma”-ként nevezte el Baywaters és Beall 1941-ben.²²

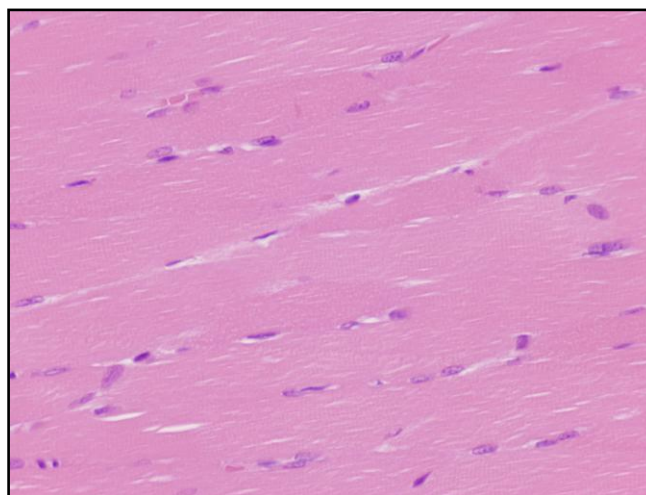
A fentiek mellett a rabdomiolízis fő okai közé a különböző gyógyszer mellékhatások, alkohol, droghasználat, infekciók, (pl.: influenza-A) toxinok (pl.: nehézfémek és vegyületeik), metabolikus zavarok (hiperglikémiás hiperozmoláris állapot) és iszkémiás-reperfúziós kór állapotok tartoznak.²³

A vázizomszövet az alsó végtag iszkémiára legérzékenyebb szövete. A végtagi reperfúziós szindrómának a legkritikusabb pontja - a vázizomszövet és az izomkárosodás foka - korrelál az iszkémia súlyosságával illetve időtartamával.²⁴

Az izom IR károsodásának korábbi patofiziológiai leírásából adódóan megállapíthatjuk, hogy az izomrostkárosodásban szerepet játszik az intracelluláris ATP szint csökkenés²⁵, különböző mikrocirkulációs változások (endotél diszfunkció¹⁶, no-reflow jelenség¹⁷), a Ca^{2+} -homeosztázis zavara, oxidatív stressz és a lokális gyulladásos válasz.

A multifaktoriális folyamatok eredményeként az izomsejtek integritása meg bomlik, mely intracelluláris metabolitok, ionok (K^+), enzimek (kreatin-kináz, laktát-

dehidrogenáz) felszabadulásával jár az extracelluláris mikrokörnyezetbe és a szisztémás keringésbe. A lokálisan felszabaduló anyagcseretermékek károsítják a mikrokeringést, a kapilláris permeabilitás fokozódásához vezetnek, melynek végeredményeként szöveti ödéma és emelkedő intrakompartmentális nyomás alakul ki.²⁶ A sérült endotélsejtekhez történő neutrofil leukociták kitapadása, valamint a magas (> 40 Hgmm) intrakompartmentális nyomás külső kapilláris kompressziót okozó hatása tovább rontja a szöveti perfúziót, hozzájárulva így egy másodlagos szöveti iszkémia kialakulásához és az izomkárosodás súlyosbodásához. Ezen folyamat összességét nevezi a irodalom „kompartment szindrómának”. Pontos definíció szerint az alsó végtagi kompartment szindróma: mikor az alsó végtagi fasciarekeszben uralkodó nyomás meghaladja az erekben lévő perfúziós nyomást, irreverzibilis szöveti iszkémiát és nekrozist eredményezve.²⁷ Körülbelül 40 Hgmm-es kompartmentális nyomás az, amely már másodlagos iszkémiát okoz.²⁸



2. ábra: A rhabdmiolízis fénymikroszkópos képe (HE, 60x), izomrost felroztózódás (fekete nyíl), harántcsíkoltat elvesztése (szaggatott nyíl).

A rhabdmiolítikus károsodás fénymikroszkópos jelei a szubcelluláris elváltozásokhoz képest időben később jelennek meg. Látható morfológiai elváltozásokként említhetjük a sejtduzzadást, a sejtek széttöredezését (felroztózódás) és a harántcsíkoltat elvesztését, valamint magi eltérésként a karyorhexist, karyopícnosist (2. ábra).

A hisztológiai elváltozások korrelációban állnak az izomkontraktilitás fokával, az izomsejtek energia tartalékának mennyiségével és a gyógyulási képességgel. A kontrakció erősségét az ép rostok mennyisége határozza meg.²⁹

Rabdomiolízis során az izomsejt tartalom magas koncentrációban kerül a vérkeringésbe, mely a következő legfontosabb összetevőket foglalja magában: elektrolitok (kálium, kalcium és foszfátok), enzimek (kreatin-kináz, laktát-dehidrogenáz, aszpartát-transzamináz és aldoláz), fehérjéket (mioglobint), valamint a purin metabolizmus végtermékeit, mint húgysav.²³

Klinikailag a rabdomiolízis klasszikus tüneti triász: izomfájdalom, izomgyengeség és vörösesbarna vizelet. A betegvizsgálat során az izmok duzzadtak és érzékenyek lehetnek palpatoria, valamint a kompressziós nekrosis okozta bőrszín elváltozás is előfordulhat.

1.2.5. A mitokondriumok központi szerepe iszkémia-reperfúzió során

A mitokondriumok jelentős szerepet játszanak a sejtéletképesség fenntartásában, hiszen az energiatermelés döntő hányadáért felelősek az oxidatív foszforiláció által, valamint fontos tényezők a sejthalál folyamatában, mivel kulcsszerepet játszanak az oxidatív stresszben és a nekroapoptózisban (l. alább). Emellett szerepet játszanak még a citoplazmatikus és a mitokondriális mátrix kalcium homeosztázisának regulációjában, valamint a különböző metabolitok szintézisében és katabolizmusában. Amennyiben rendellenesség következik be bármely említett mechanizmusban, mitokondriális diszfunkcióról beszélünk, mely károsítja a sejt funkcióit.

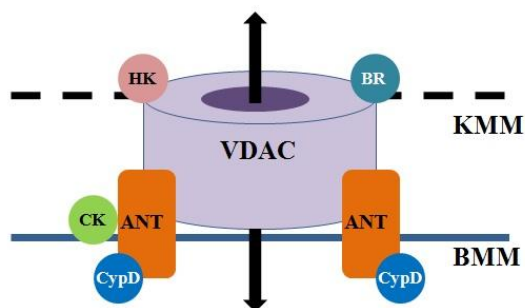
Perifériás akut érelzáródás során létrejövő IR következtében az iszkémia során bekövetkező elégtelen oxigénellátás, majd a reperfúzió alatt visszatérő oxigénkínálat jelenti a mitokondriális károsodás kulcs mechanizmusát, melynek több, a későbbi terápiás törekvésekben is meghatározó elemét ismerjük. A teljesség igénye nélkül a szerző a következő, legfontosabb patofiziológiai pontokat tárgyalja: (1) mitokondriális K^+ -ATP csatorna, (2) mPTP csatorna, (3) mitokondriális szabadgyökképződés.

1.2.5.1. Mitokondriális K^+ -ATP csatorna

Több mint 20 évvel ezelőtt fedezték fel a mitokondriális belső membránban elhelyezkedő ATP szenzitív kálium (K^+ -ATP) csatornát, melynek megnyílása nagy jelentőséggel bír a sejtek védelmében IR károsodás során. A G-fehérje asszociált szignáltranszdukciós út hatására a csatorna megnyílik, melynek következtében K^+ áramlik az intramitokondriális térbe. A beáramló kálium ionok következményeként kis mennyiségű ROS termelés veszi kezdetét, amely azonban nem jelent letális mennyiséget. Az alacsony fokú ROS képződés aktiválja a mitokondriális protein kináz-C ϵ -t (PKC ϵ), amely képes gátolni a későbbiekben tárgyalandó mPTP csatorna megnyílását, ezáltal a sejthalált.^{30, 31} Ezen túl a csatornanyitás hatására membránpotenciál csökkenés veszi kezdetét, gátlás alá kerül a mitokondriális Ca^{2+} uniporter és mérséklődik az intramitokondriális Ca^{2+} szint, mely szintén az mPTP csatorna zárt állapotának a fenntartását segíti elő. A mitokondriális ATP szenzitív K^+ csatorna mellett ismert még a Ca^{2+} szenzitív K^+ csatorna is, melynek szintén szerepe van a fiziológiás mitokondriális homeosztázis fenntartásában.

1.2.5.2. mPTP csatorna

Iszkémia-reperfúzió patofiziológiájában a mitokondriális membránban elhelyezkedő több alegységből felépülő „mitochondrial Permeability Transition Pore” (mPTP) csatorna központi szerepet játszik. Fiziológiás körülmények között a mitokondriális membrán szerkezetében főként a belső membrán impermeábilis, csupán



néhány metabolit és ion képes keresztülhaladni a struktúrán. Ez a képesség nélkülözhetetlen a megfelelő pH és membránpotenciál fenntartásához, valamint az ATP szintézishez az oxidatív foszforiláción keresztül.

3. ábra: Az mPTP csatorna felépítése. KMM: külső mitokondriális membrán; BMM: belső mitokondriális membrán; VDAC: töltés-dependens anion csatorna (porin); ANT: adenin-

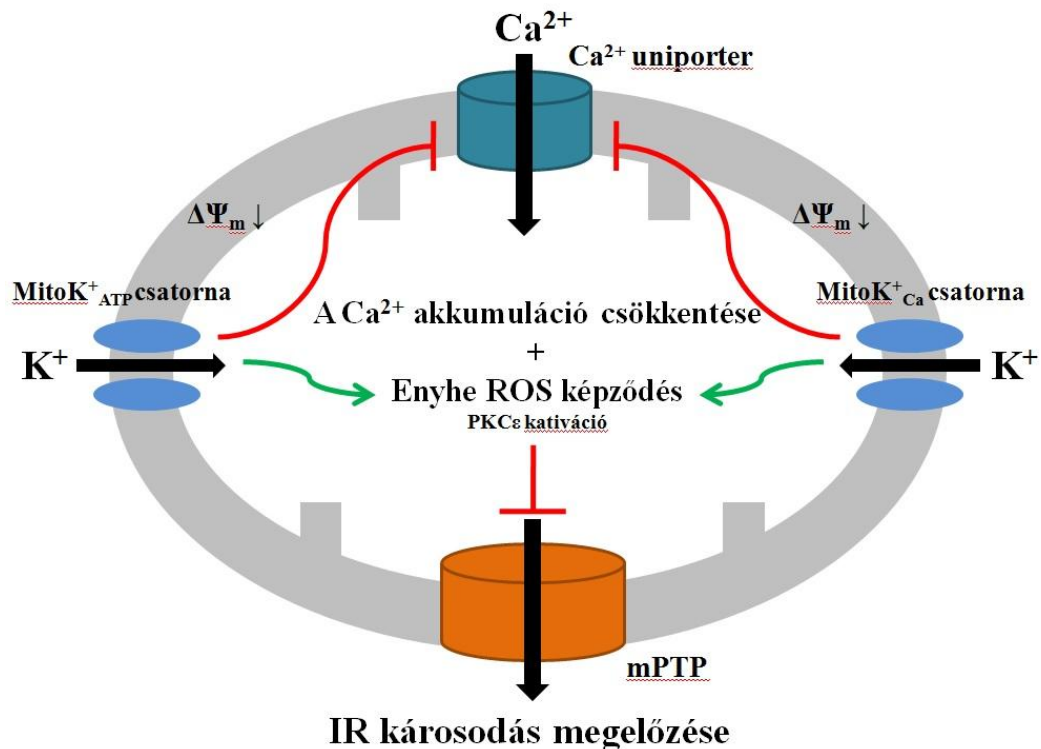
nukleotid transzlokátor; CypD: ciklofillin-D; CK: kreatin-kináz; HK: hexokináz; BR: benzodiazepin receptor

Reperfúzió során a nagy áteresztőképességű mPTP csatorna átengedi a szabadon oldott anyagokat 1,500 kDa méret alatt. Az mPTP csatorna egy hatalmas fehérjekomplexxként fogható fel, mely a mitokondriális külső és belső membránban helyezkedik el és magában foglalja az ún. töltés-függő anion csatorna (VDAC), az adenin-nukleotid transzlokátor (ANT), cyclophilin-D (CyP-D), kreatin-kináz, hexokinázok és benzodiazepin receptor alegységeket. (3. ábra)

Iszkémia alatt, a megjelenő oxigénhiány és ATP szint csökkenés kapcsán emelkedik a citoszolikus és következményesen az intramitokondriális Ca^{2+} szint. Hatására respiratórikus gátlás alakul ki, azonban ekkor még az mPTP csatorna a csökkent pH miatt gátlás alatt van, tehát zárt állapotú, de az ekkor beinduló folyamatok már mindenképpen hozzájárulnak a későbbi csatornanyitáshoz. A reperfúzió során tovább emelkedik a Ca^{2+} szint, emelkedik a pH, megkezdődik a szabadgyökképződés melyek mPTP nyitáshoz vezetnek. Ennek eredményeként szabályozatlan protonáramlás veszi kezdetét a mitokondriális membránon át, a mitokondriális membrán depolarizálódik, szétkapcsolódik az oxidatív foszforiláció és az organellum duzzadásnak indul.³² A Mg^{2+} , adenin-nukleotidok, alacsony pH, a CsA (ciklosporin-A) gátolják a csatornanyitást. Crompton és mtsai.³³ vetették fel elsőként, hogy a csatorna szerves részét képezi a sejthalálnak IR során. Griffith és mtsai.³⁴ bizonyították, hogy az mPTP csatorna az iszkémia alatt még nem nyílik meg, hanem a reperfúzió kezdetén aktiválódik. A mitokondriális membránpotenciálváltozás láncreakcióként hat a mitokondriális membránban lévő összes mPTP csatornára és egymásra hatva indukálják a csatornanyitást, mintegy hálózatot képezve. Ez a teljesen „nyitott csatorna állapot” vezet igazából a mitokondriális duzzadáshoz és következményes membrán dezorganizációhoz.³⁵

A csatornanyitás következtében megszakad az elektrontranszport lánc, felborítva a mitokondriális membrán potenciált és tovább indukálódik a reaktív oxigén termékek képződése.³⁶ A diszfunkcionális mitokondrium miatt tovább csökken az ATP koncentráció az ionikus és metabolikus homeosztázis felborulását tovább erősítve. Végeredményként proapoptotikus fehérjék felszabadulása történik, úgymint citokróm-c,

Smac/Diablo és apoptózis indukáló faktor, ezáltal következményesen kaszpáz-dependens és independens apoptotikus sejthalál és/vagy sejtnekrózis következik be.³²



4. ábra: A különböző mitokondriális membráncsatornák interakciói (Forrás: Nishida nyomán)³⁵

1.2.5.3. Mitokondriális szabadgyökképződés és oxidatív stressz

Iszkémia-reperfúzió során az iszkémiás szövet reoxigenizációja az egyik fő forrása a reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) és származékok képződésének (O_2^- , H_2O_2). A metabolikusan zavart mitokondriumban lévő légzési lánc működése következtében nagy mennyiségű ROS képződik. Emellett a ROS képződésben részt vesz az ATP lebontásában szerepet játszó xantin-oxidáz rendszer, a makrofágokban lévő NADPH oxidázok, valamint a kialakuló gyulladás következtében megjelenő és aktiválódó neutrofilek. A szuperoxid gyökök nitrogén-monoxiddal ($\text{NO}\cdot$) reagálva peroxinitrit ($\text{ONOO}\cdot$) képződését eredményezik, mely szintén fontos toxikus molekula az IR szövetkárosodásban.³²

Mitokondriális szabadgyökképződés tehát egyrésztől létrejöhet az IR alatt bekövetkező mitokondriális légzési lánc zavart működése következtében, mely hozzájárul az mPTP csatorna nyitásához, másrésztől pedig maga az mPTP csatorna megnyílása vezet további ROS képződéshez.

Mindent figyelembe véve a mitokondriális szabadgyökképződés kettős hatást válthat ki a sejtfunkciókat tekintve. A ROS kis mennyiségben paradox módon védelmet nyújthat a sejtkárosodással és az apoptózissal szemben^{37, 38}. Emellett a reaktív szabadgyököknek fontos fiziológiai szerepe van, mint szignáltranszdukciós molekulák a sejten belül (hormézis). Ezekkel a hatásokkal ellentétben a ROS képződés és/vagy az mPTP csatorna nyitása a felszabaduló apoptotikus faktorok és citokróm-c közvetítésével kezdeti lépésként hat az apoptotikus kaszkád beindításában is.³⁹

A reaktív szabadgyökök károsító hatása ellen a szervezet több védelmi rendszert fejlesztett ki, melyek IR során is kiemelt fontossággal bírnak. Ezen védelmi rendszerek közé tartoznak a MnSOD (mangán kötött szuperoxid-dizmutáz; SOD2), CuZnSOD (réz-cink kötött szuperoxid-dizmutáz; SOD1), citoszolikus, extracelluláris CuZnSOD (SOD3), a citoszolban lévő glutation alapú rendszer, kataláz, valamint glutation-peroxidáz.⁴⁰ Az antioxidáns védelmi rendszerek képesek kivédeni egy bizonyos mennyiségű ROS károsító hatását, azonban amint a képződött szabadgyökök mennyisége elér egy adott, nem tolerálható szintet, a rendszerek kimerülnek és nem képesek védelmet nyújtani.

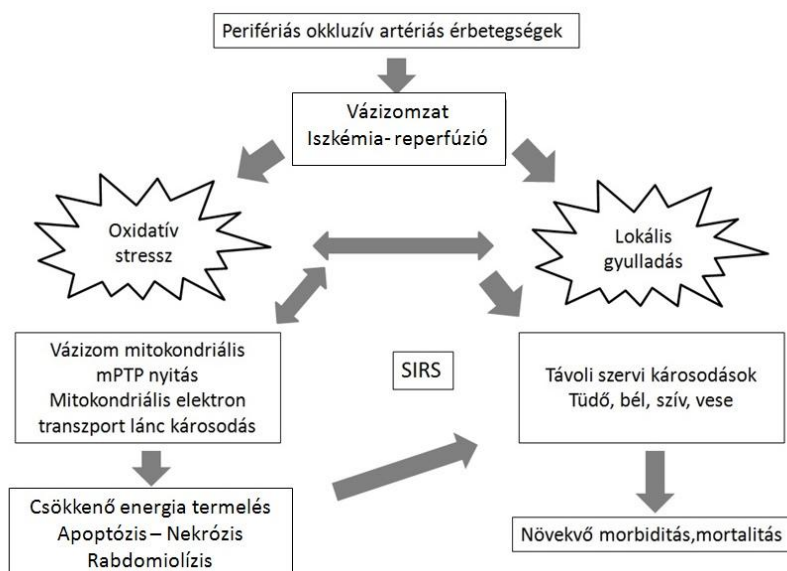
Alsó végtagi perifériás érbetegségben a károsodott mitokondrium a fent bemutatott folyamatok által megnöveli a ROS képződést. Kimutatták továbbá, hogy gyakran MnSOD deficiencia áll fenn perifériás érbetegségben, mely elsődleges védelmi vonal a ROS károsító hatásával szemben.⁴¹ Ezen tény is bizonyítja, hogy a szabadgyökök abnormálisan magas szintjét az antioxidáns védelmi rendszerek nem képesek hatástalanítani, az izomfehérjék és lipidek jelentős károsodását eredményezve.

1.3. Alsó végtagi iszkémia-reperfúzió távoli szervi hatásai

Attól függően, hogy mekkora tömegű izomszövet van kitéve az iszkémia károsító hatásának, a lokális hatások az újraindult vérkeringésen keresztül generalizálódhatnak, különböző mediátorok (pro-inflammatorikus citokinek,

komplement-faktorok, akut fázis fehérjék, véralvadási kaszkád elemei, neuroendokrin mediátorok), anyagcseretermékek, ionok, szabadgyökök szabadulnak fel és egy szisztémás gyulladásos válasz (SIRS – systemic inflammatory response syndrome) veszi kezdetét. A SIRS a citokinek (pl.: TNF- α , IL-6) abnormális regulációján keresztül létrejövő egész szervezetet érintő szisztémás gyulladás, melynek potenciális következménye lehet a MODS (multiple organ dysfunction syndrome), majd MOF (multiple organ failure). MODS kialakulásakor az iszkémiát követő reperfúzió során, a felszabaduló anyagok a vérkeringéssel eljutva a távoli szervekhez - vesék, tüdők, máj bél és szív – szervkárosodásokat és működési zavart okoznak, tehát a MODS egy többszervi (minimum két szerv) funkciókárosodás kialakulását jelenti, mely akár egész szervrendszereket is érinthet. A MOF, a MODS végső stádiuma, mikor kettő vagy több szerv működése teljesen leáll és az elégtelenül működő létfontosságú szervek (vese, tüdő, szív) egy potenciálisan halálos állapotot idéznek elő. A MOF a vezető halálok a kritikus állapotú betegekben⁴² és régóta dokumentált következménye a vázizom IR-nak⁴³, valamint az aorta okklúzió-reperfúciónak⁴⁴.

Alsó végtagi IR esetén a fent részletezett folyamatot reperfúziós-szindrómának nevezzük, mely a reperfúzió során a hipoxián átesett nagytömegű izomszövetből a szisztémás keringésbe felszabaduló nagy mennyiségű toxikus anaerob anyagcseretermékek, gyulladásos mediátornak, illetve a nekrotizált izomrostokból felszabaduló sejtalkotóknak köszönhetően kialakuló SIRS majd MODS és következményes MOF összességét jelenti.



5. ábra: Perifériás artériás érbetegségek lokális és távoli szervi szövődményeinek az összefüggése. (Forrás: Lejay alapján⁴⁰)

1.3.1. Gyulladásos citokinek - a TNF- α és az IL-6 szerepe

A SIRS során a citokinek kaszkádszerűen termelődnek korai vagy késői időpontban, tehát a citokin expansió karakterisztikáját tekintve két fázisra osztható. Az akut fázisban főként a TNF- α és IL-1 β jelenik meg 1-2 órával a lokális károsodás kezdetét követően. A szubakut fázisban főleg IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ koncentrációi nőnek meg a szérumban.⁴⁵

A *Tumor Nekrózis Faktor- α (TNF- α)*. A TNF- α -nak jelentős regulációs szerepe van a SIRS kialakulásában és fennállásában. Hatással van az endoteliális aktivációra, a nitrogén-monoxid szintézisre, a lázra, a neutrofil sejtek további felszaporodására, valamint a neutrofil és makrofág aktivációra és kemotaxisra. Több kutatás is kimutatta, hogy a TNF- α szintjének a csúcsa a károsító hatást követően 60-90 perccel következik be.^{46, 47}

A posztiszkémiás szövetekből felszabaduló TNF- α képes kiváltani a gyulladásos mediátorképződést távoli szervekben, mellyel megnöveli a neutrofilek számát és végső hatásként egy neutrofil-mediált károsodását okozza a távoli szerveknek. Az IR patofiziológiáját tekintve ebben rejlik a fő szerepe, mivel a neutrofil granulocitákban hatására fokozódik a szuperoxid és proteolitikus enzimtermelés, valamint olyan adhéziós glikoproteinek expressziója mint a CD11 és CD18. Utóbbi két glikoproteinnek jelentős szerepe van a lokális vagy távoli szervekben történő neutrofil migrációban,

ezáltal a szöveti gyulladás kialakulásában. Az endotheilális aktivációt kiváltó szerepe során különböző adhéziós molekulák termelését idézi elő, mellyel lehetővé válik a granulociták fokozott adhéziója az endotéliumhoz.

Az *interleukin-6 (IL-6)* termelésében számos sejt részt vesz, úm.: makrofágok, neutrofil granulociták, endotél sejtek és monociták. Meghatározó mediátora a láznak, megnöveli a felszabadulását az akut fázis proteineknek és a Toll-like receptorcsalád stimulációján keresztül elősegíti a kemotaxist, részt vesz az endoteliális aktivációban és a neutrofil sejtek felszabadulásában. Lázban az izomszövet és zsírszövet energiamobilizációját segíti elő, mellyel emeli a testhőmérsékletet.

Abdominális aorta aneurizma műtétet követően kimutatták, hogy az IL-6 szint megnövekedett a plazmában és emelkedett maradt a posztoperatív periódusban.⁴⁸ Felszabadulásának mértéke nem a műtét idejével arányos, hanem a károsodott szövetek mértékével.

Az IL-6-nak másodlagos jelentősége van az IR gyulladásos válaszreakciójában. A szöveti károsodás után több órával éri el magas szintjét.

1.3.2. Távoli szervi károsodás: vese

Az izomkárosodás során kialakuló akut veseelégtelenség már a múlt század elején ismert tény volt (Frankenthal, 1916). A keringésbe felszabaduló mioglobinnal vesekárosodást kiváltó szerepére elsőként Minami mutatott rá 1923-ban.⁴⁹

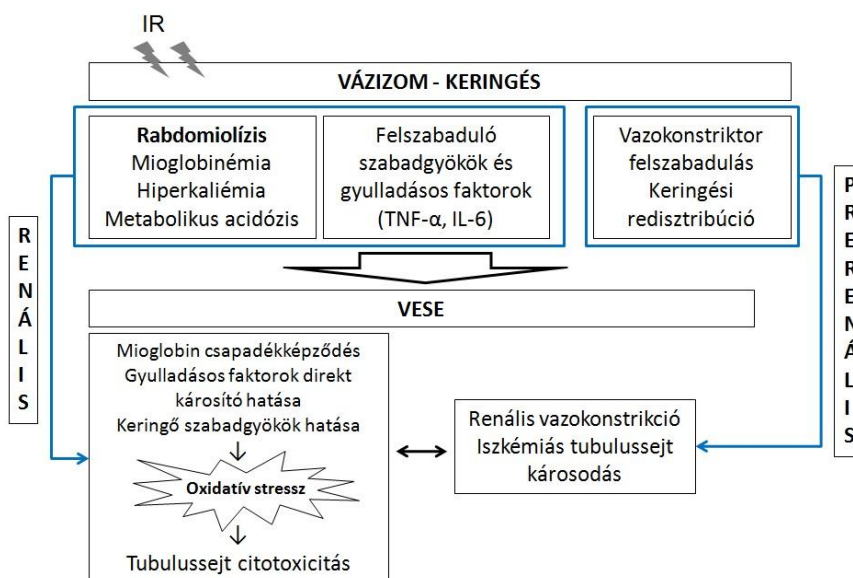
A rhabdmiolízissel járó iszkémiás-reperfúziós károsodás az összes akut veseelégtelenség 5-7%-áért felelős.⁵⁰ A rhabdmiolízis következtében kialakuló súlyos akut veseelégtelenség után a vesefunkció általában 3 hónapon belül helyreáll, azonban a kórkép mortalitása különösen magas, akár a 20%-ot is elérheti.⁵¹

Rhabdmiolízis során a sérült izomból toxikus anyagcseretermékek szabadulnak fel, mely súlyos anyagcserezavarral jár: metabolikus acidózis, hiperkalemia, hipokalcemia, mioglobinemia és mioglobinuria alakul ki. A rhabdmiolízis egyik legfontosabb szövődménye a vesekárosodás kialakulása. Az izomkárosodás következtében kialakuló anyagcserezavar és az akut veseelégtelenség együttesét a szakirodalom összefoglalóan „*myonephropathiás metabolikus szindrómának*” nevezi. Tünetei magában foglalják a feszült, ödémás, fájdalmas izmokat, acidózist, keringési

sokkot, valamint a vesében történő patológiai elváltozásokat.⁵² Rabdomiolízisben kialakuló akut veseelégtelenség patomechanizmusában prerenális és renális eredet is szerepet játszik.

A *prerenális* okok közé tartoznak a lokálisan felszabaduló vazokonstriktor anyagok, illetve a reperfüzió következtében fellépő szisztémás keringési redistribúció, melyek együttesen a vesében renális vazokonstriktiót és iszkémiás tubulussejt károsodást hoznak létre.

A *renális* oldal egyik legfontosabb része a károsodott izomrostokból a szisztémás keringésbe felszabaduló mioglobin, mely a vesében filtrálódva mioglobinuriához, pigmentcylinder képződéshez és tubulussejt károsodáshoz vezet. Emellett részt vesznek a folyamatban a metabolikus változások (metabolikus acidózis), a lokális vázizomszövetből felszabaduló szabadgyökök és gyulladásos mediátorok (TNF- α , IL-6).



6. ábra: Alsó végtagi IR vesehatásának folyamatábrája.

1.3.2.1. Az IR következtében kialakuló távoli szervi vesekárosodást kiváltó renális okok

Mioglobin – mioglobin csapadékképződés. A mioglobin specifikusan csak a szívizomban és a vázizomrostokban fordul elő, izomsérülés során kerül nagy mennyiségben a vérbe *mioglobinemiát* okozva. A mioglobin plazma félféltideje kb. 1-3 óra. Normál körülmények között a keringésben lévő mioglobin koncentrációja alacsony,

eliminációja a retikuloendoteliális rendszer által történik. A haptoglobin kötőkapacitásának telítődésével a szabad plazma mioglobin szint megemelkedik. A mioglobin plazmaszintjének 0,5-1,5mg/dl érték fölé emelkedésekor a molekula renális filtrációja megindul.⁵² Már 100g tömegű izom sérülése elegendő ahhoz, hogy a plazma mioglobin szint meghaladja ezt az 1,5 mg/dl-es értéket.⁵³

Mioglobinuriás veseelégtelenség fő jellemzője, a tubuláris lumenben kialakuló csapadékképződés. A kialakuló tubuláris csapadék obstrukcióhoz vezet, mely az egyéb említett kórfolyamatokkal együtt végül veseelégtelenség kifejlődésének és fenntartásának a fő tényezője.

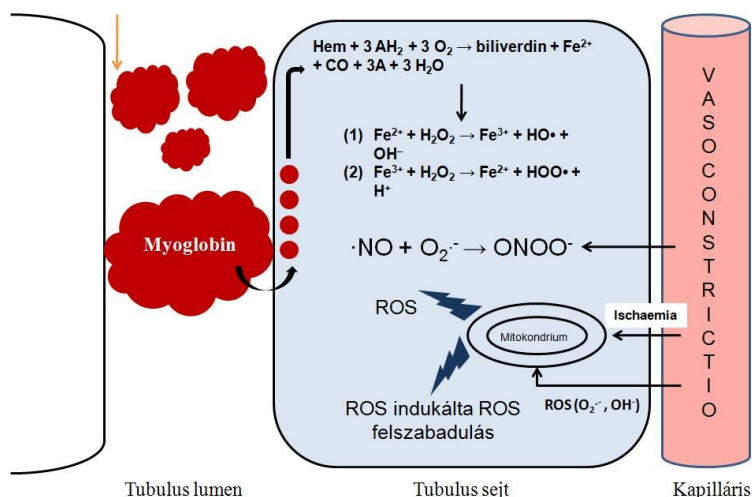
A mioglobin csapadékképződés mechanizmusát két tényező határozza meg: a mioglobin intratubuláris koncentrációja, valamint a filtrátum kémiai jellemzői (savas vegyhatása), amelyben kialakul. Az intratubuláris obstrukcióhoz a mioglobin csapadékszemcsék képződése mellett, a mioglobin indukálta tubuláris nekrózis során a deszkvamálódó nekrotikus sejtek is hozzájárulnak.

Veseszöveti oxidatív stressz. IR során a veseszövetben jelentősen megnő a reaktív szabadgyökök szintje, melynek fő oka a tubulussejtekben történő mioglobin lebomlás, viszont szerepet játszik benne a renális vazokonstrikció okozta szöveti oxigénellátás hiánya valamint a szisztémás keringésből a veseszövetbe eljutó keringő szabadgyökök.

Bunn és Jandl⁵⁴ mutatott rá a hemoglobinban lévő vas vesére gyakorolt hatására. A szabad hemoglobin a keringésben gyorsan disszociál α és β dimerekre, mely így szűrhetővé válik a glomeruláris membránon keresztül és ezt a proximális tubuláris sejtek endocitotikus reabszorpciója követi. A proximális tubuláris sejtekben a porfirin gyűrű gyorsan katabolizálódik, így a vas szabaddá válik. Mioglobinemia során a mioglobin kis mérete miatt akadály nélkül filtrálódik a tubulus lumenbe, majd a hemoglobin alegységekhez hasonlóan endocitózissal kerül, majd katabolizálódik. Ezek a folyamatok alátámasztják azt a felfogást, melyszerint a mioglobin indukálta citotoxicitás szabad vas által indukált.

Emellett nem csak a vesében képződő szabadgyökök okozzák a vesében kialakuló oxidatív stresszt, hanem lokálisan a vázizomszövetből felszabaduló reaktív oxigéngyökök is eljutnak a veseszövetbe és részt vesznek a tubulussejt citotoxicitásban,

részen direkt hatással, részben pedig az ún. RIRR („ROS induced ROS release”) mechanizmuson keresztül. (7. ábra)



7. ábra: Oxidatív stressz a vesében alsó végtagi IR során

1.3.2.2. Az IR következtében kialakuló távoli szervi vesekárosodást kiváltó prerenális okok

Rabdomiolízis kialakulásakor több lehetséges mechanizmus vezethet renális vazokonstrikcióhoz, következményes szöveti hipoperfúzióhoz, mely folyamatok jelentik a vesekárosodás *prerenális* oldalát.

Az iszkémiás-reperfúziós károsodás alatt létrejövő izomsejt nekrosis során megnövekszik a kapillaris permeabilitás, mellyel jelentős folyadék kiáramlás veszi kezdetét, kialakítva ezzel a szöveti ödémát. A megnövekedett kapillaris permeabilitás olyan mértéket ölthet, mely jelentős intravaszkuláris volumencsökkenéshez vezethet. Jól demonstrálja ezt azon irodalmi adat, mely szerint traumás sérülések után akár 18 liternyi folyadék is kiléphet extravazálisan a sérült végtagokba.⁵⁵⁻⁵⁷ Ha ezt az intravaszkuláris folyadékvesztiséget a sérülést követő időszakban agresszíven pótolják, (~1 liter/óra) a klinikailag előforduló rabdomiolízis indukálta akut veseelégtelenség előfordulása drámaian csökkenthető, hangsúlyozva ezzel a volumenhiány/renális vazokonstrikció patogén szerepét.⁵⁷

Hipovolémia hatására vazokonstriktorok (tromboxán, endotelin) szabadulnak fel, melyek a vese ereinek szűkítésével renális iszkémiát okozhatnak, amely következményesen a GFR csökkenéséhez vezet. A GFR a hipotenzió alatt alacsony értékre csökken, hiszen a perfúziós nyomás a glomeruláris kapillárisokban elégtelen ahhoz, hogy a Bowman-tokon keresztül megtörténjen a filtráció. Ezen folyamatok miatt az afferens arteriolák tartós vazokonstriktója következik be, mely vese iszkémiát, és veseelégtelenséget eredményez.⁵⁸

Renális vazokonstriktót okoznak a plazmában keringő különböző hormonok (katekolaminok, vasopresszin), és a helyileg szekretált mediátorok (angiotenzin II és tromboxán).

Nemcsak a kialakuló hipovolémia hatására szabadulnak fel érszűkítő anyagok, hanem a keringésbe kerülő mioglobin hatására is. A trombocita aktiváló faktor (PAF) a mezangiális és glomeruláris sejtekben képződik.⁵⁹ Mioglobinuriában fokozott PAF szint figyelhető meg, melynek hatására vaszkuláris simaizom konstriktió következik be. A PAF receptorok blokkolásával mioglobinuriás veseelégtelenségben a vesekárosodás mértéke csökkenthető.⁵²

Az iszkémia-reperfúzió során aktivált monocita-makrofágok által termelt citokinek is hozzájárulnak a vazoaktív ágensek felszabadulásához, melyek szerepet játszanak a veseelégtelenség kialakulásában.⁵² Ilyen vazokonstriktor például a 8-epi-prostaglandin-F- α_2 , mely egy potenciális preglomeruláris vazokonstriktor, a lipidperoxidáció során termelődik és hozzákötődik a tromboxán-A₂ receptorokhoz.⁶⁰

Izomsérülés bekövetkeztekor aktiválódik az endogén citokin kaszkád (pl.: TNF- α), melynek kóroki szerepe rhabdmiolízis indukálta akut veseelégtelenségben bizonyított. Az aktiválódó citokinek renális vazokonstriktót váltanak ki, károsítják a szív bal kamrájának funkcióját, változásokat indukálva ezzel a szisztémás keringési viszonyokban.⁶¹ Az előbbi hatásokon túlmenően a citokin felszabadulás káros hatással van a nitrogén-monoxid (NO) termelésére is, mely egy fontos endogén vazodilatátor.¹

Brezis⁶² tanulmányai mutattak rá a NO jelentős hatására a vese velőállományának oxigén ellátásában. Kísérletesen létrehozott szeptikus sokkban a NO-szintáz gátlása növeli az érszűkületet, ezzel egy súlyosabb szöveti károsodást és rapidabb halálozást eredményezve.⁶³ Ezen megállapítások után egyértelműnek tűnik, hogy a mioglobin által kiváltott NO-szint csökkenés közvetve hozzájárulhat a

rabdomiolízis által kiváltott renális hipoperfúzióhoz és következményes szöveti károsodáshoz.⁶⁴

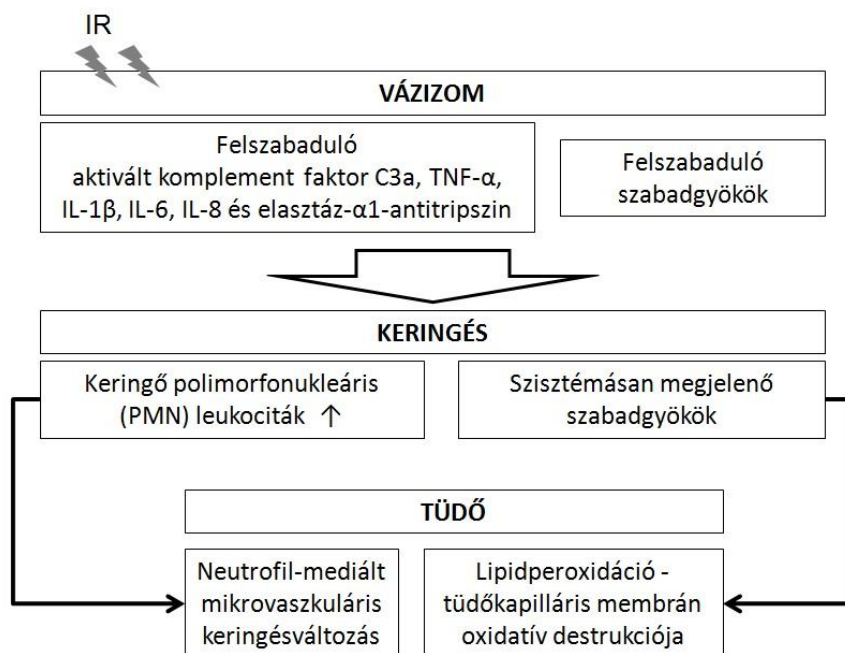
Lieberthal⁶⁵ kísérletei mutattak rá, hogy a mioglobinemia negatív hatással van a sejtszintű energetikai folyamatokra és a sokk által kiváltott szöveti károsodásra. A rabdomiolízis után kialakuló renális vazokonstrikció fontos tényezője a mioglobin indukálta akut veseelégtelenség kialakulásának, mely renális tubuláris ATP deficitet okoz.

1.3.3. Távoli szervi károsodás: tüdő

A másik nagy fontossággal bíró távoli szerv alsó végtagi IR során a tüdő. A patofiziológiai folyamatban a lokális károsodás során a szisztémás keringésbe felszabaduló mediátor molekulák és anyagok közvetve vagy közvetetten alakítják ki a szervkárosodást.

A lokálisan felszabaduló és a szisztémás keringésbe kerülő mediátorok és anyagcseretermékek – úm.: C3a, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 és elasztáz- α_1 -antitripszin – megnövelik a keringő polimorfonukleáris leukociták (PMN) számát.⁶⁶ A tüdőben szekvesztrálódó PMN sejtek – melyek a légzőszervben fiziológiásan is nagy számban megtalálhatóak, hiszen egy elsődleges védelmi vonalról van szó a szervezet és a külvilág között⁶⁷ - a tüdő neutrofil-mediált mikrovaszkuláris keringésváltozását okozzák. A TNF- α , IL-1 és IL-6 megnövekedett szérumszintje alsó végtagi IR során befolyásolja a PMN mediált távoli szervi tüdőkárosodást. A pulmonális ICAM-1 és a neutrofil CD11b/CD18 adhéziós molekulák expressziója fokozódik a reperfúzió alatt, mely elősegíti a leukocitaszekvesztrációt a tüdőben. Több vizsgálat is igazolta, hogy alsó végtagi IR károsodás során a TNF- α , CD18 és P-szelektin gátlásával csökkent neutrofil szekvesztráció és alacsonyabb mennyiségű alveoláris ödéma volt észlelhető.⁶⁸

Az előbb említett patofiziológiai lépésekhez járul hozzá, és fokozza a károsodást a reperfúzió során a vázizomszövetben képződő oxigén szabadgyökök megemelkedett szérumszintje is.^{69,70} A szabadgyökök lipidperoxidáció révén a tüdőkapillárisok membránjának oxidatív destrukcióját okozzák.^{71,72} Ezzel egy időben azonban kezdetét veszti egy a szisztémás gyulladásra adott protektív szöveti válaszreakció, melynek során fokozódik a hősokk fehérjék (pl. hsp72) expressziója.⁷³



8. ábra: Alsó végtagi IR tüdőhatásának folyamatábrája.

A mikroerek artériás hipertenzióval és megnövekedett permeabilitással válaszolnak a károsító hatásokra, mely által nagyfokú exsudátum képződés és következményesen kialakuló ventilációs/perfúziós (V/Q) elégtelenség veszi kezdetét. A komplement rendszer aktiválódásának (sCR1) fontos szerepet tulajdonítanak a tüdőben történő exsudátum képződésben alsó végtagi IR-t követően.⁷⁴ C5-deficiens egereken végeztek kutatásokat, mely szerint alsó végtagi IR-t követően közel normális kapillárispermeabilitás figyelhető meg a tüdőben, melyet a radioaktívan jelölt albumin extravazációjával sikerült bizonyítani.⁷⁵

A pulmonáris hipertenzió létrehozásában fontos szerepe van a tromboxánoknak és leukotriéneknek (TxA₂, LTB₄) melyek ezen hatásuk mellett elősegítik a leukoszekvesztrációt és a kapilláris permeabilitás növekedését is.⁶⁹ Az említett eikozanoidok gátlása nagyban csökkenti a tüdőkárosodást.⁷⁶

A felsorolt változások végeredménye lehet az elhúzódozó végtagi verőérekrekesztést kísérő, akár az életet potenciálisan veszélyeztető ARDS (adult respiratory distress syndrome) kialakulása, mely klinikailag akután fellépő, diffúz bilaterális tüdőinfiltrátummal és csak kezdetben megtartott majd később csökkent kardiális funkcióval jár. A tüdőkárosodásnak különösen nagy a kockázata az 50-75%-os

mortalitással járó rupturált hasi aorta aneurizma érsebészeti rekonstrukciója után,⁷⁷ ahol a halálesetek 20%-ának ARDS az oka.⁷⁸⁻⁸⁰

1.4. Az iszkémiás-reperfúziós károsodás megelőzési lehetőségei

Az IR károsodás kivédése régóta foglalkoztatja mind a gyakorló-, mind a kutatóorvosokat, azonban a mai napig nincs az orvostudomány által egységesen elfogadott módszer a kórkép megoldására. Általános és nagyon gyakori problémáról van szó, mellyel több olyan diszciplinának kell szembenéznie nap, mint nap, mint a sebészet, érsebészet, transzplantációs sebészet, ortopéd-traumatológia és kardiológia.

Egy olyan eljárásra lenne szükség, mely könnyen, egyszerűen, gyorsan alkalmazható, specifikusan és mellékhatások nélkül hat, valamint végül, de nem utolsósorban olcsó is. Számos törekvést láthattunk az elmúlt több mint három évtized alatt és manapság azt mondhatjuk, hogy az IR károsodás kivédésére irányított kutatások hatalmas irodalommal és ismeretanyaggal bírnak.

Az irodalmi áttekintés alapján két fő irányvonalat különböztethetünk meg a prevenciós módszerek között, melyek a sebészeti és nem sebészeti (farmakológiai) kondicionálási eljárások. A sebésztechnikai kondicionálási eljárások ötlete és kutatásai egészen a 80-as évek elejéig nyúlnak vissza, azonban a különböző farmakológiai kondicionálási vegyületek az utóbbi évtizedben kerültek a vizsgálatok középpontjába, melyekben számos új potenciális lehetőség rejlik. A legtöbb kutatást akár a sebészeti, akár a nem sebészeti módszereket tekintve szívizom IR esetén végezték és végzik, tehát ezen kutatások sok esetben kiindulási alapot képeznek akkor is, ha az alsó végtagi érbetegségeket vizsgáljuk.⁸¹

1.4.1. Sebésztechnikai kondicionálási eljárások

Korábban ismert tény, hogy egy iszkémiás epizód végén a revaszkularizáció során hirtelen újraindított vérkeringés, további szisztémás szövödményekhez vezethet. Ma már több olyan módszert is ismerünk, melyek akár az iszkémia előtt/alatt/után lokálisan vagy távoli szerven alkalmazva a keringésmoduláció révén befolyásolják a

reperfúziós epizódot, azonban egy-két eljárást leszámítva nem terjedtek még el a klinikai gyakorlatban.

A manapság folytatott érsebészeti gyakorlatban hosszú idejű érkirekesztést követően gyakran az ún. *fokozatos reperfúziót* alkalmazzák, mikor a kirekesztett érszakaszra fokozatos, lassú felengedéssel engedik vissza a véráramlást, mely csak ezt követően az átmenet után áll vissza a normális szintre.⁸²

Egy másik lehetséges módszer az ún. *kontrollált reperfúzió*. A módszer alkalmazása során 30 perccel az iszkémia vége előtt egy normotermiás reperfúziós oldatot - mely 6:1 arányban (pl.: 600 ml vér : 100 ml oldat) kerül keverésre a beteg vérével – adható be fokozatosan a lezorítástól disztálisan az érszakaszba, majd csak ez után állítják helyre a szerv keringését. Habár a módszert először szívizom tekintetében mutatták be, Schlensak és mtsai.⁸³ alkalmazták alsó végtagi akut IR kapcsán is ígéretes eredményekkel. A vizsgált betegek 56%-ának tért vissza a normális végtagi funkciója.

1986-ban Murry és mtsai.⁸⁴ kísérletük során kutyákon megfigyelték, hogy ismételt rövid iszkémiás epizódokkal egy tartós iszkémiás periódust megelőzően sikerül protektív hatást elérni az iszkémizált miokardiumban. A jelenséget *iszkémiás prekondicionálásnak* nevezték el. A prekondicionálás fő védő hatása receptor-mediált jelenségekben rejlik. Hatására a sérült izomban többek között adenosin, bradikinin és opioidok szabadulnak fel. Ezek kötődnek és stimulálják a G-protein asszociált receptorokat a sejtmembránban mely által különböző szignáltranszdukciós utakat aktiválnak. A szignálmechanizmusok aktivációja bifázikus módon történik mivel a kinázok aktivációja és a receptorátrendeződés (1) a tartós iszkémia kezdetén (ϵ -izoformáját a protein kináz C-nek, NO mediált aktivációja a protein kináz G-nek, stb.); valamint (2) az iszkémia vége után a reperfúzió kezdeti perceiben (foszfatidilinozitol-3 [PI3] kináz / Akt és extracellulárisan regulált kináz [ERK] (a RISK – reperfusion injury salvage kinase út része) történik. Végző lépésként a receptor mediált szignáltranszdukció a mitokondriumokon konvergál és stabilizálja a mitokondriális membránt, gátolja az mPTP csatornanyitást, mellyel megelőzi a mitokondriális duzzadást és ruptúrát.⁸⁵

A prekondicionálást 1993-óta alkalmazzák már a humán gyakorlatban. Számos klinikai tanulmány is rámutat hatásosságára, többek között májműtétek során kialakuló iszkémiás-reperfúziós károsodás vonatkozásában⁸⁶⁻⁸⁸.

1993-ban figyelték meg, hogy egy másik távoli szerven (pl. alsó végtagon) létrehozott rövid ideig alkalmazott repetitív több ciklusú, összességében ártalmatlan iszkémia megvédte a szívet az infarktus ellen. A jelenséget *távoli szervi kondicionálásnak* nevezték el.⁸⁹

A távoli szervi kondicionálási eljárásokon belül ismert távoli szervi iszkémiás pre-, poszt-, és perkondicionálás. A távoli szervi iszkémiás perkondicionálás során a célszerv iszkémiája előtt, a távoli szervi iszkémiás posztkondicionálás során a célszerv iszkémiáját követően, távoli szervi iszkémiás perkondicionálás során pedig a célszerv iszkémiája alatt hoznak létre rövid ideig alkalmazott repetitív, több ciklusú iszkémiát egy másik távoli szerven.

1.4.1.1. Posztkondicionálás

Habár a perkondicionálás felfedezése egy fontos mérföldkő volt a miokardiális protekcióban, a gyakorlati jelentősége limitált azon ténynél fogva, hogy a módszer csak tervezetten a beavatkozás előtt alkalmazható. Az iszkémiás-reperfúziós károsodás döntő hányada a reperfúzió kezdeti időszakában alakul ki, ez a kezdeti néhány perc az az időszak, melynek során a későbbiekben zajló patológiás folyamatok szubcelluláris szinten elkezdődnek. Ebből következett az az elképzelés, hogy egy iszkémizálódott szerv keringés-helyreállításának karakterisztikájában történő változtatás pozitív hatással lehet a kialakuló szövődményeket illetően.

2003-ban Zhao és mtsai.⁹⁰ kutya szívizom iszkémiás modellen vizsgálva a hosszú idejű iszkémiát követően a reperfúzió kezdetén alkalmaztak többciklusú áramlásmegszakítást, mely a perkondicionálással megegyező mértékben képes volt csökkenteni az infarktus méretét. A módszert *posztkondicionálásnak* nevezték el. Az első kísérletes alkalmazását követően a posztkondicionálás hatásosnak bizonyult többek között máj⁹¹ és vese⁹² iszkémia-reperfúzió, valamint vékonybél autotranszplantáció⁹³ során.

A posztkondicionálás hatásának kialakulásában döntő tényező az alkalmazás megfelelő időpontja, a ciklusok száma és a reperfúziós-reokklúziós szakaszok időtartama. Patkány modellben tapasztalt eredmények szerint, amennyiben a posztkondicionálás 1 perccel a reperfúzió megindulása után kerül alkalmazásra, az

infarktus-csökkentő hatás elvész.⁹⁴ A poszt kondicionálás hatásosságának ez az egyik legfőbb szabálya, hogy késlekedés nélkül szigorúan a reperfüzió első perceiben kell alkalmazni, ugyanis a szubcelluláris biokémiai folyamatok (pl.: mPTP-csatorna nyitás) döntő része már ekkor kezdetét veszi, melyek pár perc után irreverzibilissé válnak.

A kardio- és vaszkuloprotektív hatás szempontjából másik esszenciális tényező az egyes ciklusok időtartama, s kevésbé számít a ciklusok száma. Kutyákban és nyulakban a 30 + 30 másodperces időtartam bizonyult hatékonynak.^{95, 96} Patkány esetében azonban kizárólag a 10, illetve 15 másodperces időtartamok képesek csökkenteni az infarktus méretét.^{97, 98}

A poszt kondicionálás pontos hatásmechanizmusa részben még feltáratlan, tekintve, hogy összetett folyamatról van szó, melyben részt vesznek különböző aktivátor molekulák (adenozin, oxigén szabadgyökök), mediátor molekulák (NO) effektor molekulák (K^+ -ATP csatorna, mPTP csatorna), szignáltranszdukciós utak (RISK, SAFE), valamint hatással van a szöveti pH szabályozásra is.

Iszkémia alatt az ATP-ből adenzin képződik, mely szerepet játszik a poszt kondicionálás védő hatásának kialakításában: csökkenti a reaktív oxigén gyökök és citokinek felszabadulását, valamint neutrofil granulocita aktivációt és adhéziót gátló hatása is bizonyított.⁹⁹⁻¹⁰¹ Poszt kondicionálás során az endogén adenzin kimosódása késleltetett, így az erekben hosszabb ideig marad magasabb koncentrációban, ezáltal eredményesebben képes kifejteni pozitív hatásait.¹⁰²

A nitrogén-monoxid a gyulladásos válaszreakció gátlásában és az iszkémia-reperfüzióra adott molekuláris válaszban játszik szerepet.¹⁰³ Az endoteliális nitrogén-monoxid szintáz enzim (eNOS) célpontja a poszt kondicionálás során aktiválódó jelátviteli utaknak, így szintje megemelkedik a módszer alkalmazásának hatására.

A poszt kondicionálás is hat a különböző receptormediált szignáltranszdukciós utakra. A G-protein asszociált receptorok stimulációja a felszabaduló adenzin, bradikinin és opioidok által több szignáltranszdukciós utat is aktivál. Ismerve a poszt kondicionálás alkalmazási módját, ezek a jelátviteli utak mind a módszer alkalmazása alatt, vagy az iszkémia utáni első percekben aktiválódnak. Szerepe van a RISK jelátviteli útnak (klasszikus „túlélő” kinázok, mint ERK, PI3 kináz/Akt), a SAFE (survival activating factor enhancement) útnak (TNF- α által aktivált, janus-aktivált kináz és a „signal transducer and activator of transcription [STAT3]), valamint a NO és

protein-kináz-G dependens útnak.^{104, 85} Az összes felsorolt jelátviteli út a mitokondriumon végződik és hatással van az mPTP csatornanyitásra, ezáltal pedig a mitokondriális stabilizációra.

A poszt-kondicionálás egy fontos célpontja a mitokondriumok mPTP csatornáinak. Iszkémia bekövetkeztekor a csatornák zárt állapotban vannak, majd a reperfüzió első percei során nyílnak meg. Ez a tény is megerősíti a reperfüzió kezdetén alkalmazott módszer fontosságát. Az mPTP csatornák megnyílása meghatározó szerepet játszik minden sejt nekrozisának vagy apoptózisának a beindításában. A csatornák nyitási mechanizmusára trigger faktorként hat a mitokondriális mátrix Ca^{2+} koncentrációjának növekedése, a mitokondriális belső membrán normális membránpotenciáljának megváltozása, a különböző szabadgyökök és zsírsavak magas koncentrációja. A csatornák nyitását gátló tényezők a sejtszintű acidózis, a megfelelően magas ATP, ADP, P_i , és NADH koncentrációk. Poszt-kondicionálás alkalmazásával csökken a csatornanyitás valószínűsége, mivel a módszer csökkenti a szabadgyök képződést és az intramitokondriális, magas Ca^{2+} szintet,⁹⁴ hatással van a csatornán konvergáló szignáltranszdukciós utakra, valamint megnöveli a NO szintet, mely szintén gátló hatással bír a csatornanyitási mechanizmusra.¹⁰⁵

A poszt-kondicionálás hatással van a sav-bázis háztartásra is. Egy iszkémizált szerv reperfüzióját követően 40 másodpercre van szükség a normális pH helyreállításához. A módszer során alkalmazott váltakozó reperfüzió-reokklúzió által azonban a szöveti acidózis időben elnyújtható, mivel korlátozza az acidózist kialakító metabolitok kimosódását a szövetekből. Az acidotikus pH képes gátolni a mPTP csatornák nyitását, ezáltal a sejtnekrozis kialakulását.¹⁰⁵

A klinikai gyakorlatban a különböző iszkémiás-reperfüziós károsodást csökkentő eljárások közül a poszt-kondicionálás látszik a legmegfelelőbb módszernek. Ennek magyarázata metodikájában rejlik, hiszen a reperfüzió kezdetén kerül alkalmazásra, tehát gyakorlatilag minden revaszkularizációt igénylő beavatkozás kapcsán végezhető. Napjainkban már alkalmazzák az invazív kardiológiában, percutan transluminális coronaria angioplasztika kapcsán, azonban egyéb diszciplínákban még nem került bevezetésre a humán klinikai gyakorlatban. Igen ígéretes módszernek tűnik, hiszen a coronaria elzáródás revaszkularizációja mellett, a transzplantációs sebészetben egy szerv recipiens keringésébe történő integrálásakor, valamint minden vértelenségben

végzett műtét után, tehát alsó végtagi kirekesztéssel járó érműtét kapcsán vagy az ortopéd-traumatológiai beavatkozások során is növelhető lenne vele a szöveti IR tolerancia.

1.4.2. Farmakológiai kondicionálási eljárások

A különböző sebésztechnikai kondicionálási eljárások hatásmechanizmusának mélyebb ismeretével kirajzolódtak az IR károsodás lehetséges patofiziológiai támadáspontjai, melyek szubcelluláris molekulákat, struktúrákat, ioncsatornákat, jelátviteli utakat foglalnak magukba. Megnőtt az igény arra, hogy fogást találva ezeken a konkrét célpontokon, célzottan, specifikusan befolyásoljuk az IR károsodást. Erre lehetnek alkalmasak a különböző vegyületek, melyek az iszkémia előtt, alatt vagy után alkalmazva képesek célzottan csökkenteni az IR károsodásból adódó szövődeményeket.

Mivel az IR károsodás kialakulásában az egyik legfontosabb lépés a sejtszintű ionhomeosztázis zavara, mely membrándepolarizációt és az intracelluláris Ca^{2+} toxikus mennyiségű akkumulációját okozza, a korai farmakológiai törekvések egy olyan vegyület kifejlesztésére irányultak mellyel lehetővé válik az ionzavar megelőzése illetve terápiája. Ezek a gyógyszerek: Ca^{2+} -csatorna blokkolók, Na^{+} -csatorna blokkolók, glutamát és GABA receptor blokkolók. Emellett számos kísérlet irányult már korábban is a NO szintézis aktivációjának gátlására és a szabadgyökfogó vegyületekre.¹⁰⁶

Manapság már inkább a mitokondriális protekción van a hangsúly, mivel bebizonyosodott, hogy az IR károsodásban központi szerepe van a mitokondriumoknak (energiatermelés, intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis regulációja, ROS képződés, apoptonekrózis, stb.). A következő gyógyszer csoportok képviselői rendelkeznek mitokondriális támadásponttal: a mitokondriális metabolizmus modulációjára ható szerek (*trimetazidine, ranolazine, dichloroacetát, karnitin-palmitoiltranszferáz inhibitorok, koenzim- Q_{10} , $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ csatorna blokkolók.*¹⁰⁶), mitokondriális K^{+} -ATP-csatorna aktivátorok (*diazoxid, minoxidil, nicorandil*), a mitokondriális ROS képződésre/eliminációra ható szerek (*Ginkgo biloba, transz-resveratrol, propofol, nitronok, carvedilol, ebselen, koenzim- Q_{10} , exogén SOD, xantin-oxidáz inhibitor és különböző vitaminok, mint C-, E-vitamin.*¹⁰⁶).

A felsorolt vegyületek közül azonban egyik sem bizonyult igazán hatásosnak és specifikusnak akár az experimentális akár a klinikai gyakorlatban, ezért az IR károsodás legfőbb célpontjára terelődött a figyelem, mely a mitokondriális membránban elhelyezkedő mPTP csatorna.

1.4.2.1. Az mPTP csatorna mint farmakológiai célpont és a cyclosporin-A hatásmechanizmusa

Az mPTP csatorna IR-ban betöltött jelentősége korábban már részletezésre került, mely szerint megnyílásának szerepe van a mitokondriális Ca^{2+} akkumulációban, a ROS képződésben, a mitokondriális duzzadásban és végső soron az apoptonekrózis indukciójában. Amennyiben ezen csatorna megnyílása specifikusan gátlható lenne, akkor a mitokondriális károsodás direkt megelőzése válna lehetővé és ezáltal pedig az IR károsodás szövődményei megelőzhetőek lennének.

Egy ilyen lehetséges farmakon a cyclosporin-A (CsA), mely képes gátolni az mPTP csatorna nyitását a csatorna ciklofillin-D molekulájához kötődve.

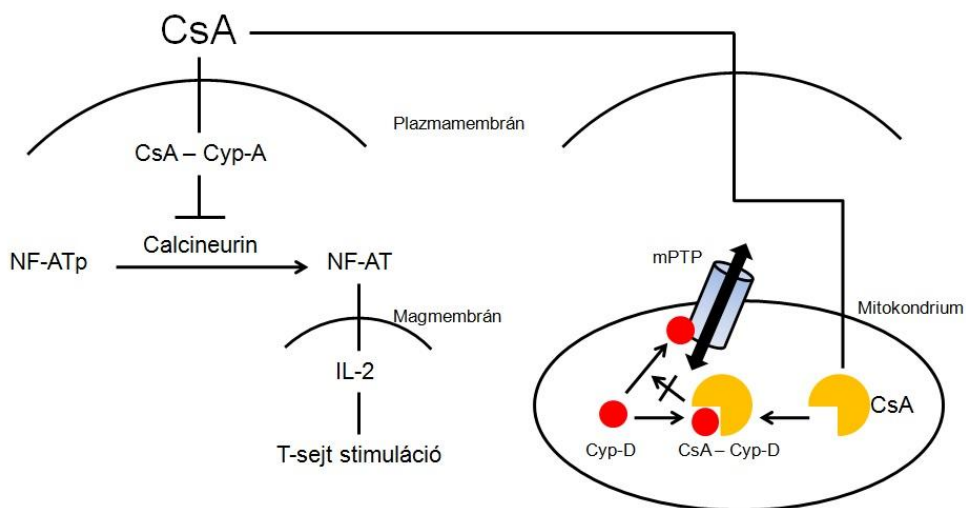
A CsA-t elsőként egy gombafajból (*Tolypocladium inflatum*) izolálta Hans Peter Frey biológus, melyet egy 1969-ben gyűjtött norvégiai talajmintában fedezett fel.¹⁰⁷ A CsA gyakran használatos a mindennapi klinikai orvosi gyakorlatban szervtranszplantációk során immunszuppresszió elérésére és különböző immunbetegségek súlyos eseteiben.

A CsA volt az első vegyület, melynek igazolták mPTP gátló hatását.¹⁰⁸ Lemasters és mtsai.¹⁰⁹ lézer scanning konfokális mikroszkópiát használtak, hogy a mitokondriális membránpermeabilitást kimutassák a sejten belül. A sejteket fluoreszcens festékkel töltötték fel, amely a mitokondriumban akkumulálódott és alkalmas mutatója a membránpotenciál változásnak. A hipoxia és az oxidatív stressz képes megváltoztatni a festék eloszlását, de a CsA hatására nem változott a festékeloszlás a sejten belül, tehát a vegyület védő hatásának bizonyult. Griffiths és Halestrap¹¹⁰ radioaktívan jelölt markert ($[^3\text{H}]2\text{-deoxyglukóz}$) használt az mPTP csatornanyitás monitorizálására IR-nak kitett izolált patkányszívben. A CsA előkezelés megelőzte a csatornanyitást és csökkentette a szívizom károsodását.

A CsA két támadásponton hat a szervezetben. Egyrészt kötődik a mitokondriális mPTP csatorna CyP-D molekulájához és megelőzi az interakcióját az ANT-val, mely által képtelen megnyílni a csatorna.¹¹¹

A ciklofillinek a PPIázok (peptidil-prolil cisz-transz izomerázok) egy családja, melyek a peptidkötött amino-terminális prolin maradékok egymásba alakulását katalizálják, megkönnyítve a fehérje konformáció változásait. A ciklofillineknek több mint tíz altípusuk ismert, melyek részt vesznek számos celluláris folyamatban, beleértve a transzkripcionális regulációt, immunválaszt, protein szekréciót és mitokondriális funkciót.^{112, 113} A CyP-D az mPTP csatornán belül az ANT-hez kötődve olyan konformációs változásokat idéz elő, melyek által a csatorna áteresztővé válik. A CyP-D az intramitokondriális Ca^{2+} -szint változását érzékeli, amelyhatására képes működésbe lépni.¹¹⁴

A CsA kötődik a citoszolban lévő ciklofillin-A (CyP-A) molekulához is. Komplexük gátolja a calcineurint, mely az ún. NF-AT [nuclear factor activated T-cells] transzkripciós faktor defoszforilációját végzi. A transzkripciós faktor defoszforilációja nélkül a sejt nem képes az IL-2 termelésére, mely esszenciális a T-sejt stimuláció kiváltásában. Ebben a folyamatban rejlik a CsA immunszuppresszív hatása. (9. ábra)



9. ábra: A CsA hatásmechanizmusa

A CsA megfelelő lenne az IR károsodás kivédésére az mPTP csatornagátló hatásánál fogva, azonban az IR kórképekben nem kívánatos a T-sejt proliferáció gátlásából adódó immunszuppresszív hatása. Ezen felül egyéb olyan súlyos mellékhatásai vannak, mint nefrotoxicitás, karcinogenezis, neurotoxicitás, infekciók elősegítése és hepatotoxicitás.

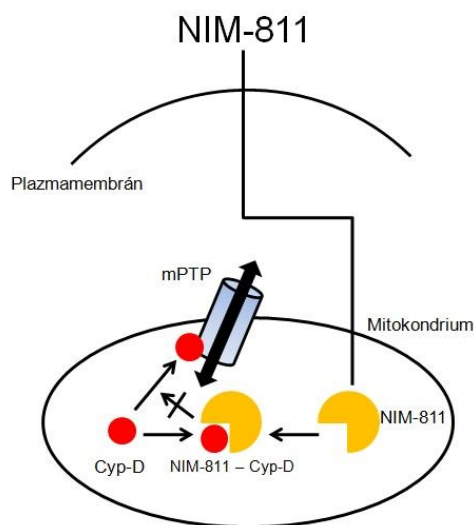
A mellékhatások ellenére rendelkezünk klinikai tapasztalatokkal is a CsA hatását illetően IR során. Egy pilot-study-ban kimutatták, hogy a CsA-t miokardiális infaktus revaszkularizációs kezelése előtt adva 20%-kal csökkentette az infarktusz nagyságát.¹¹⁵ Emellett egy fázis-III vizsgálat is folyamatban van a CsA IR-ban vizsgált hatására (NCT01502774).

A széles mellékhatásspektrum miatt előtérbe kerültek olyan vegyületek, melyek különböző molekulaszervezeti változtatások által megőrzik a CsA mPTP gátló hatását, azonban nem rendelkeznek az immunszuppresszív és egyéb káros mellékhatásokkal. Ilyen vegyületek a különböző ciclosporin analógok, mint a sanglifehrin-A¹¹⁶, Debio025¹¹⁷ és a NIM-811.

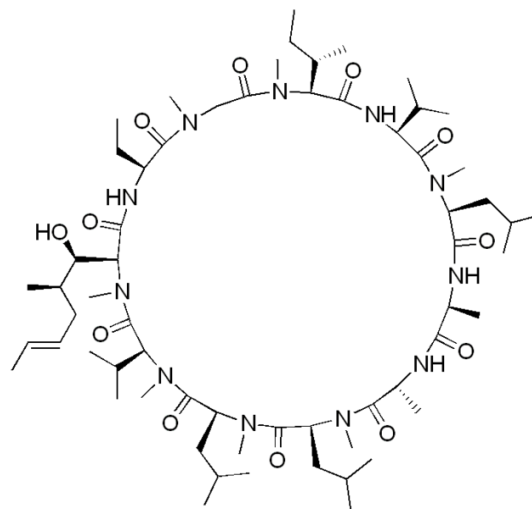
1.4.2.2. NIM-811

Az N-metil-4-izoleucin ciclosporin (NIM-811) a CsA egy nem immunszuppresszív derivátuma, mely nem kötődik a ciklofillin A-hoz, így nem gátolja a calcineurint, viszont a ciklofillin-D-hez kötődésével megakadályozza az mPTP óriáscsatorna megnyílását és a következményes mitokondriális károsodást.

A NIM-811 előnye a CsA-val szemben, hogy nincs ismert káros mellékhatása. In vivo kísérletekben, amelyekben graft-versus-host patkány modellt használtak, a NIM-811-et nem találták immunszuppresszívnek, ezzel ellentétben a CsA meggátolta a nyirokcsomó megnagyobbodást.¹¹⁸ Ezen kutatócsoport egy másik vizsgálatában kimutatta, hogy CsA adását követően 10 nappal megnövekedett a patkányok szérumban kreatinin szintje és csökkent a kreatinin clearance. Ha NIM-811-et kaptak a patkányok, akkor mindkét vesekárosodást jelző marker változatlan maradt, tehát alacsonyabb nefrotoxicitású mint a CsA.¹¹⁸



10. ábra: A NIM-811 hatásmechanizmusa képlete



11. ábra: A NIM-811 szerkezeti képlete

Argaud és mtsai.¹¹⁹ felnőtt nyúl modellt hoztak létre, amelyben az a. coronaria circumflexa ágat 30 percre leszorították, majd 4 óra reperfúziót engedtek. Két időpontban, 10 perccel a tartós iszkémia előtt, illetve 1 perccel a reperfúzió előtt adtak a csoportoknak CsA-t vagy NIM-811-et. Mindkét időpontban, mindkét gyógyszer szignifikánsan csökkentette az infarktus méretét. TUNEL festéssel vizsgálták a miokardiális apoptózis mértékét, mellyel bizonyították, hogy mindkét vegyület szignifikánsan csökkentette a TUNEL-pozitív kardiomiociták számát a kontroll csoporthoz képest. Ugyanezen kutatócsoport közölte, hogy NIM-811-gyel kezelt izolált mitokondriumok mPTP csatorna nyitásához magasabb Ca^{2+} -szint szükséges a kontroll csoporthoz képest.¹²⁰

Post-cardiac arrest szindrómában a NIM-811 kezelés képes volt növelni a rövid távú túlélést, az újraélesztés utáni szívfunkciót valamint szignifikánsan csökkentette a máj- és vesekárosodás mértékét.¹²¹

Az említett eredményeken kívül a NIM-811 kezelés hatásosnak bizonyult májtranszplantáció¹²² és vékonybél IR során¹²³, azonban alsó végtagi iszkémia reperfúzió tekintetében korábban még nem történt vizsgálat.

2. Célkitűzés

Ezen tényeket figyelembe véve kísérleteinkben célul tűztük ki az alábbi kérdések megválaszolását:

I. kísérlet:

1. Alsó végtagi iszkémiás-reperfúziós modelleiben a posztkondicionálás képes-e csökkenteni a lokális vázizomkárosodás mértékét?
2. A posztkondicionálás milyen mértékben csökkenti a szisztémás gyulladásos válaszreakciót alsó végtagi iszkémia-reperfúzió során?
3. Alsó végtagi iszkémia-reperfúzió következtében fellépő tüdőszövődményekre milyen hatással van a postconditionálás?

II. kísérlet:

1. Azonos alsó végtagi iszkémia-reperfúziós modellek alkalmazása során van-e különbség – és ha igen, milyen mértékű - az aortaklippel és a külső leszorítással (tourniquet) létrehozott vázizomkárosodás és következményes szisztémás gyulladásos válaszreakció mértéke között?

III. kísérlet

1. Három óra tourniquet-tel létrehozott iszkémia és 4 óra reperfúzió után a NIM-811 képes-e csökkenteni a lokális vázizomkárosodás mértékét?
2. A NIM-811 kezelés csökkenti-e a szisztémás gyulladásos válaszreakciót a TNF- α és IL-6 szintjeinek befolyásolásán keresztül?
3. A NIM-811 kezelés hogyan befolyásolja az alsó végtagi iszkémia-reperfúzió távoli szervi szövődményeként létrejövő vesekárosodást?

3. Módszerek

3.1. Kísérleti elrendezés, műtéttechnika

3.1.1. Törvényi háttér

A kísérletek az 1998. évi XXVIII. sz. állatvédelmi törvény, valamint a 243/1998 (XII. 31.) kormányrendelet szerint elvárt követelményeknek megfelelően történtek, illetve a 1858/000/2004 és 22.1/2409/3/2011 számú engedélyek alapján kerültek elvégzésre. Az állatkísérleteket a Semmelweis Egyetem EÁB (Egyetemi Állatkísérleti Bizottság) által kiállított állatkísérletek végzésére feljogosító 8/2011. számú bizonyítvány megszerzése után végeztük. A III. kísérlet a Novartis International AG (Basel, Svájc) hozzájárulásával került elvégzésre (MTD-37345), mely biztosította a NIM-811 farmakológiai vegyületet a kísérletek elvégzéséhez.

3.1.2. Csoportbeosztás

3.1.2.1. I. kísérlet: Alsó végtagi IR lokális vázizom és tüdőszövődményeinek megelőzése posztkondicionálás alkalmazásával.

Infrarenális aortaklipp segítségével 180 perces alsó végtagi iszkémia került létrehozásra, majd ezt követően 240 perc reperfúzió történt. Az iszkémia végén posztkondicionálást végeztünk, majd a reperfúziót követően a lokális, szisztémás és tüdő szövődmények vizsgálatára került sor, csoportonként 10-10 állaton. (2. táblázat)

2. táblázat: Az I. kísérlet csoportbeosztása

Csoport	Áloperált (hasfal megnyitás)	IR (csak iszkémia-reperfúzió)	PostC (IR + posztkondicionálás)
Állatszám	10 db	10 db	10 db

3.1.2.2. II. kísérlet: A vázizomkárosodás mértékének vizsgálata infrarenális aortakirekesztés és alsó végtagi tourniquet alkalmazását követően.

Az I. kísérletből levont következtetések alapján összehasonlításra került az aortaklipp és a tourniquet által létrehozott alsó végtagi IR károsodás lokális és szisztémás szövődményeinek mértéke. 180 perc iszkémiára és 240 perc reperfúzióra került sor mindkét eljárás esetén. A reperfúziót követően csoportonként 10-10 állatból történt mintavétel. (3. táblázat)

3. táblázat: A II. kísérlet csoportbeosztása

Csoport	A (aortaklipp; IR: 3+4h)	B (tourniquet; IR:3+4h)
Állatszám	10 db	10 db

3.1.2.3. III. kísérlet: Alsó végtagi IR lokális vázizom és veseszövődményeinek megelőzése NIM-811 farmakológiai kezeléssel.

Bilateralis alsó végtagi tourniquet alkalmazásával 180 perces alsó végtagi iszkémia, majd 240 perc reperfúzió létrehozására került sor. A reperfúzió kezdete előtt 5 perccel NIM-811 beadása történt a kezelt csoportokban és a reperfúziót követően a lokális, szisztémás és vese szövődmények vizsgálatát végeztük, csoportonként 10-10 állaton. (4. táblázat)

4. táblázat: a III. kísérlet csoportbeosztása

Csoport	Áloperált	NIM- áloperált (NIM-811 + oldószer)	IR (IR + oldószer)	NIM-IR (IR + oldószer + NIM-811)
Állatszám	10 db	10 db	10 db	10 db

3.1.3. Preoperatív időszak, anesztézia

Az I., II. és III. kísérlet preoperatív előkészületei és anesztéziai tulajdonságai megegyeznek, ezért együtt kerülnek feltüntetésre.

Kísérleteinkhez összesen 60 db 220-250g tömegű, spf, hím Wistar patkányt (Charles River Magyarország Kft. Budapest, Magyarország) használtunk. Az állatok az operációt megelőzően száraz tápot és vizet kaptak '*ad libitum*', a műtét előtti 12 órában csak vizet biztosítottunk számukra. Tartásuk a napszaki változásokat követő mesterséges világítás mellett, 22-24°C-os hőmérsékleten történt. A műtétek mindig azonos időben történtek, a cirkadián ritmus zavaró hatásait elkerülve.

Az anesztéziát intraperitoneálisan adott 75 mg/ttkg ketaminnal (Calypsol®) + 7,5 mg xylasinnal (Xylasin®) értük el, majd az altatás fenntartására 25 mg/ttkg ketamint és 2,5 mg/ttkg xylazint használtunk infúziós pumpa segítségével a jobb oldali vena jugularis internában elhelyezett polietilén kanülön keresztül. Az állatok folyadékpótlása 3ml/ttkg/óra mennyiségben történt szintén infúziós pumpa segítségével a kísérlet teljes ideje alatt.

Az állatok műtét alatti testhőmérséklete - mely rektális mérőfejen keresztül került regisztrálásra - fűthető műtőasztal (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) segítségével állandó $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten stabilizálódott.

3.1.4. Operáció

3.1.4.1. I., II. és III. kísérlet közös operatív részei

Az állatok intraperitoneális altatását követően mindhárom kísérlet során a bal oldali v. jugularis interna kipreparálásra került. A vénába polietilén kanült (PolyE Polyethylene Tubing; Harvard Apparatus, Holliston, MA) vezetve infúziós pumpa segítségével történt az altatás fenntartása, illetve a parenteralis folyadékpótlás a kísérletek teljes ideje alatt.

A fenntartó altatás megkezdését követően a bal a. carotis communis kipreparálása történt meg, melybe szintén polietilén kanül került bevezetésre. A kanülön keresztül invazív vérnyomás monitorizálás történt a kísérletek teljes ideje alatt.

3.1.4.2. I. kísérlet részletes műtéti leírása - Alsó végtagi IR lokális vázizom és tüdőszövődmenyeinek megelőzése poszt kondicionálás alkalmazásával.

Medián laparotómia után a hasi aorta infrarenális szakaszának feltárása történt. Az aortára, közvetlenül a bifurkáció felett, az IR és PostC csoportban atraumatikus mikroklippet (Aesculap YASARGIL FT260T; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Németország) helyeztünk fel, mellyel 180 perces iszkémiát hoztunk létre mindkét alsó végtagban. A poszt kondicionált csoportban 3 órával az iszkémia kezdetét követően poszt kondicionálást végeztünk 2 percen keresztül, 6 ciklusban: 10 másodperc reperfüzióval, 10 másodperc reokklúzióval. Mind az IR, mind a PostC csoportban a mikroklipp eltávolítását követően a hasfal zárásra került és 4 óra reperfüzió történt. Az áloperált csoportban (n=20) nem került felhelyezésre mikroklipp, minden más tekintetben, az időbeli viszonyokat is figyelembe véve pontosan úgy jártunk el, mint a másik két csoportban.

Artériás vérgázanalízis végzése történt a reperfüzió második illetve negyedik órájának a végén a bal a. carotisba vezetett kanülön keresztül. Szérum és tüdőszövettani mintavételre a reperfüzió negyedik órájának a végén került sor.

3.1.4.3. II. kísérlet részletes operatív leírása - A vázizomkárosodás mértékének a vizsgálata infrarenális aortakirekesztés és alsó végtagi tourniquet alkalmazását követően.

Az A-csoportban az I. kísérlet operációjának megfelelően median laparotomiát követően az infrarenális aorta kipreparálásra került, majd atraumatikus mikroklippel bilaterális alsó végtagi iszkémiát hoztunk létre. A B-csoportban mindkét alsó végtagra a comb proximális részén azonos magasságban elasztikus gumiszalag alkalmazásával tourniquet minden állatnál standard módon hétszer körbetekerve és azonos szorítóerővel elszorítva került felhelyezésre az iszkémia létrehozásához.¹²⁴ Mindkét csoportban 3 óra iszkémiát 4 óra reperfüzió követett. A reperfüzió végén, az állatok exsanguinálása történt a szív jobb kamráján keresztül. Vér és izomszövet mintavételre került sor laboratóriumi és szövettani vizsgálat céljából.



12. ábra: Az infrarenális aortaklipp felhelyezése



13. ábra: Az alsó végtagi tourniquet

3.1.4.4. III. kísérlet részletes operatív leírása - Alsó végtagi IR lokális vázizom és veseszövődményeinek megelőzése NIM-811 farmakológiai kezeléssel.

Az anesztézia fenntartásának kezdete és a carotis kanül behelyezése után median laparotómia végzése történt, majd a laser-Dopler flowmeter (LDF) mérőfej felhelyezésére került sor a bal vese elülső felszínére a vesetok megnyitását követően. Az LDF mérőfejen keresztül a veseparenchyma mikrocirkulációját monitorizáltuk a kísérlet teljes ideje alatt. A comb lateralis oldala felett 1 cm-es hosszanti bőrmetszést követően szintén LDF mérőfej került felhelyezésre a m. biceps femoris felszínére, az alsó végtagi mikrocirkuláció monitorizálásának érdekében. A véráramlás regisztrációja szintén a kísérlet teljes ideje alatt folyamatosan történt.

A II. kísérlet B-csoportjának megfelelően alsó végtagi tourniquet került felhelyezésre a proximalis femoralis régióban minden állatnál azonos magasságban és azonos szorítóerővel.

Három óra alsó végtagi iszkémia került létrehozásra, melynek vége előtt 5 perccel NIM-811 beadása történt intravénásan, bólusban a NIM-áloperált és NIM-IR csoportokban. A nem kezelt állatok (Áloperált, IR) a kezelt csoportokkal megegyező időben csak oldószert kaptak intravénásan, bólusban. A tourniquet eltávolítását követően 4 óra reperfúzió következett. Az áloperált csoportban nem került felhelyezésre tourniquet, minden más tekintetben, az időbeli viszonyokat is figyelembe véve a másik három csoporttal megegyező műtéti eljárás került alkalmazásra. A kísérlet alatt az állatok spontán ürült vizeletének két frakcióban történő felfogásával került meghatározásra az állatok vizeletmennyisége: (1) Az iszkémia előtt 60 percen keresztül

gyűjtött vizeletminta kontrollként szolgált. (2) A reperfúzió utolsó 3 órája alatt nyert spontán vizelet mennyisége a termináláskor hólyagpunkcióval lett kiegészítve. Mintavételre a reperfúzió 4. órájának a végén került sor. Az állatok exsanguinálása után a vérmintából laboratóriumi, valamint gyulladásos paraméterek vizsgálata történt.

A NIM-811 (Novartis, Basel, Svájc) az in vivo alkalmazáshoz (10 mg/ttkg) 1,3 ml Cremophor EL (polietoxilált ricinus olaj), 0,7 ml 94%-os etanol és 8 ml 0,9%-os NaCl oldat keverékében került feloldásra.¹²⁵ A bólus mennyisége minden állat esetében standard volt (0,44-0,5 ml) a testtömegük (220-250g) alapján kiszámítva.

3.2. Kísérleti végpontok

5. táblázat: Kísérleti végpontok összegzése

Kísérlet	Célkitűzés	Végpont	Levett minták
I.	Alsó végtagi IR lokális vázizom és tüdőszövődményeinek megelőzése posztkondicionálás alkalmazásával	Lokális vázizom szövődmények: szövettan; laboratóriumi vizsgálatok: CK, LDH; Szisztémás hatások: szérum TNF- α , IL-6 és szabadgyökszint; Tüdőszövődmények: szövettan, W/D (nedves/száraz tömeg) arány, szöveti mieloperoxidáz és hsp72 szint, artériás vérgázanalízis	szérum, vázizom és tüdőszövet, artériás vér
II.	A vázizomkárosodás mértékének a vizsgálata infrarenális aortakirekesztést és alsó végtagi tourniquet alkalmazását követően	Vázizomszövet vizsgálata: szövettan, NADH-enzimhisztokémia, szérum kreatin-kináz és laktát-dehidrogenáz; Szisztémás hatások: szérum TNF- α és IL-6	szérum, vázizomszövet
III.	Alsó végtagi IR lokális vázizom és veseszövődményeinek megelőzése NIM-811 farmakológiai kezeléssel	Lokális vázizom szövődmények: szövettan, NADH-enzimhisztokémia, W/D arány, kreatin-kináz, laktát-dehidrogenáz, K ⁺ , Szisztémás hatások: szérum TNF- α és IL-6 Veseszövődmények: szövettan, vizelet, szöveti szabadgyökszint	vázizom és veseszövet, szérum, vizelet

3.2.1. I., II., III. kísérlet közös kísérleti végpontjai

3.2.1.1. Lokális vázizom hatások

A vázizom szövettani vizsgálata

Minden állatból, csoportbeosztástól függetlenül azonos anatómiai helyről, a m. tibialis anteriorból vettünk mintát, melyeket 4 %-os formalinban fixáltuk 24 órán át, majd paraffinba ágyasztuk. A szövettani vizsgálatokat konvencionális fénymikroszkópos (Olympus BX50 mikroszkóp, Olympus Micro Bright Field, Williston, VT, USA) elemzéssel végeztük 3-5 μm vastag hosszanti-, és keresztmetszeteken, hematoxilin-eozin (HE) festést követően. A vizsgáló patológus a minták jelzését nem ismerte, a csoportbeosztás, ill. a beavatkozás módja és ideje tekintetében nem volt tájékozott.

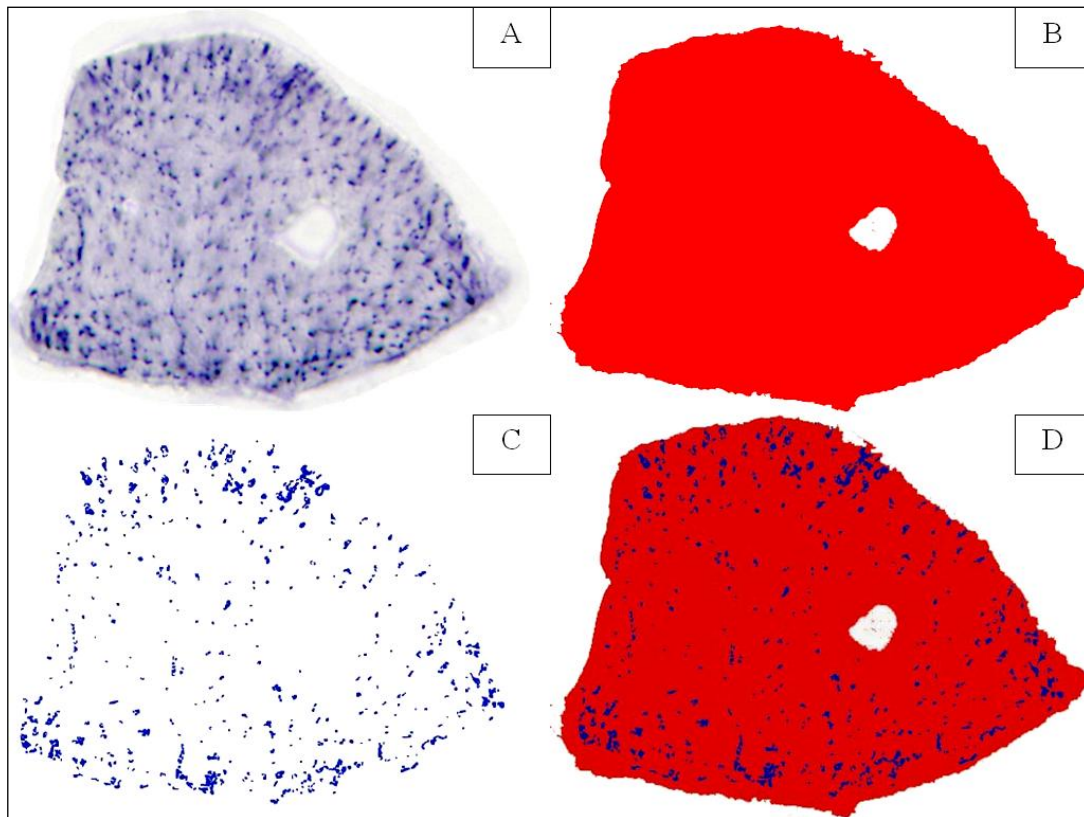
Izomrost életképesség vizsgálat

A NADH-tetrazolium reakció során a mitokondriumban lévő NADH-nitrotetrazolium-reduktáz enzim által katalizált reakcióban a NADH molekuláról egy H^+ ion transzportálódik az akceptor molekulára (nitroblue-tetrazolium-klorid), amely ezáltal redukálódik és kék színű terméket (formazán) képez. A reakció a mitokondriumok épségének, életképességének detektálására alkalmas.

A bal m. tibialis anteriorból vett izomszövet minták folyékony nitrogénben gyorsfagyasztásra kerültek és -80°C -on kerültek tárolásra a további feldolgozásig. Az izomszövet mintákból 3 μm vastag fagyasztott metszetek készültek kriosztát segítségével. A metszetek a forgalmazó (Sigma-Aldrich München, Németország) által biztosított nitroblue-tetrazolium (NBT; 1.8 mg/dl), NADH (15 mg/dl) és 0,05M-os TRIS puffer (pH 7,6) oldatában, fénymentes körülmények között 30 percig 37°C -on kerültek inkubálásra. Ezt követően mosás történt desztillált vízben. A reakció során fel nem használt NBT reagens aceton-oldat (30, 60, 90%) felszálló, majd leszálló koncentrációiban került eltávolításra a metszetekről. Ezt követően a fedés vízbázisú fedőanyaggal történt.

Minden metszeten 600x-os nagyítás mellett, tíz különböző terület került kifestésre randomizált módon. A minták további kvantitatív kiértékelése morfometriás szoftverrel (Leica Qwin Pro, Leica Microsystems GmbH, Weltzer, Németország) történt. Az izomrost életképesség az izomrost teljes területének és a teljes

festett terület arányból került kiszámításra. A kapott eredmények egészséges állatok metszeteinek átlagértékhez viszonyítva százalékosan kerültek ábrázolásra.¹²⁶



14. ábra: A morfolometriás szoftver által meghatározott területek vizuális ábrázolása. A: Natív izomrost, B: Teljes terület, C: Pozitív reakció, D: Teljes és pozitív terület összevetése

Laboratóriumi vizsgálatok

A rabdomiolízis vizsgálata során a szérum kreatin-kináz (CK), laktát-dehidrogenáz (LDH) és K^+ szint került meghatározásra. A vérminták centrifugálását követően (2x10 perc, 1050 g) az elválasztott szérumminták gyorsfagyasztásra kerültek folyékony nitrogénben és -80°C -os hőmérsékleten történt a tárolásuk az automata analizátorral (Beckman Coulter AU480/2011, Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA) végzett vizsgálatukig.

3.2.1.2. Szisztémás hatások

Szérum TNF- α szint meghatározás

A szérum TNF- α szintet szendvics ELISA módszerrel mértük a reperfüzió 4. órájában a kereskedelmi forgalomban elérhető kit segítségével (TNF- α immunoassay kit, R&D Systems, Minneapolis, USA). Az abszorbanciát 450 nm-en mértük; melyből a rekombináns TNF- α standard segítségével készített kalibrációs görbe alapján számítottuk ki a szérum TNF- α koncentrációkat.

Szérum IL-6 szint meghatározása

A szérum IL-6 szintet patkány IL-6-ra specifikus szendvics ELISA módszerrel mértük kereskedelmi forgalomban kapható kit segítségével (Quantikine® Rat IL-6 Immunoassay kit, R&D Systems, Minneapolis USA). Az abszorbanciát 450 nm-en mértük (háttérkérdéssel 540 nm-en) spektrofotométer segítségével.

3.2.2. Az I. kísérlet végpontjai: Alsó végtagi IR lokális vázizom és tüdőszövődményeinek megelőzése posztkondicionálás alkalmazásával.

3.2.2.1. Szisztémás hatások

Az oxidatív-stressz vizsgálata

A szabadgyök szint vizsgálatát szérum mintákból végeztük, Heide-Bögl-féle luminometriás módszerrel (Blázovics-féle módosítás)¹²⁷. A reakcióelegy hidrogén-peroxidot, luminolt és mikroperoxidázt (SIGMA-Aldrich, München, Németország) tartalmazott. Az eredményeket Relative Light Unit (RLU%) egységben adtuk meg, ahol a fényintenzitás (RLU%) arányos a mintában található szabadgyökök koncentrációjával.

3.2.2.2. Távoli szervi hatások: tüdő

Szövettan

Minden állatból, csoportbeosztástól függetlenül a jobb tüdő felső lebenye került eltávolításra, melyeket 4 %-os formalinban fixáltuk 24 órán át, majd paraffinba

ágyasztuk. A szövettani vizsgálatokat konvencionális fénymikroszkópos elemzéssel (Olympus BX microscope; Olympus Micro Bright Field, Williston, VT) végeztük 60 szoros nagyítás mellett, 3-5 µm vastag metszeteken, hematoxin-eozin (HE) festést követően. A vizsgáló patológus a minták jelzését nem ismerte, a csoportbeosztás, ill. a beavatkozás módja és ideje tekintetében nem volt tájékozott. A metszetek kiértékeléséhez egy az irodalomban alkalmazott tüdő pontrendszer¹²⁸ vettük alapul, melyet a vizsgáló patológus segítségével továbbfejlesztettünk. Az alábbi jellemzők szerint értékeltük a mintákat: (1) alveoláris ödéma, (2) atelektázia, (3) bevézés, (4) PMN infiltráció, (5) vaszkuláris pangás. Mindegyik jellemzőt pontszámmal értékeltük (0: normális, 1: enyhe, 2: közepes, 3: jelentős). A tüdőkárosodás kategorizálása a pontszámok összesítése szerint történt (0-3: normális, minimális; 4-7: enyhe; 8-10: közepes; 11-15: jelentős).

Tüdőszöveti ödéma vizsgálata (W/D arány)

A szöveti ödéma értékelésére az eltávolított tüdőrészeket állandó, +80 °C-os hőmérsékleten 48 órán keresztül szárítottuk, a dehidratált konzisztencia eléréséhez. A nedves és a száraz tömeg arányát számítottuk ki a következő képlet alapján: $W/D \text{ arány} = (\text{nedves tömeg} - \text{száraz tömeg}) / \text{száraz tömeg} \times 100 (\%)$. Ezáltal lehetővé vált a szöveti ödéma mértékének meghatározása.

Tüdőszöveti mieloperoxidáz (MPO) aktivitás

A tüdő szöveti mieloperoxidáz aktivitását módosított mieloperoxidáz assay segítségével mértük tüdőszöveti homogenizátumból.¹²⁹ A mérés magában foglalja a tetrametil-benzidin hidrogén-peroxid függő oxidációját, amely spektrofotometriával detektálható 450nm-en (UV-1601; Shimadzu, Japan) 37 °C-on. A minták fehérjetartalma utalt a MPO aktivitásra.

Szöveti hsp72 szint meghatározás

A hsp72 szöveti meghatározását Western-blot technikával végeztük tüdőszövet homogenizátumból. A sávok vizualizálása megnövelt kemilumineszcenciával történt, majd az eredmények detektálása és számszerűsítése az ImageJ szoftver (NIH, Bethesda, MD, USA) használatával készült.¹³⁰

Artériás vérgázanalízis

A reperfúzió kezdetén, a második és negyedik órában a bal a. carotis communisból artériás vérmintát vettünk. A mintákat Radiometer ABL80 (Radiometer Medical ApS Åkandevvej 21 DK-2700 Brønshøj Denmark) Astrup gépen vizsgáltuk meg. A reperfúzió 0., 2., és 4. órájában mértük a pO_2 , pCO_2 értékeket.

3.2.3. A II. kísérlet végpontjai - A vázizomkárosodás mértékének a vizsgálata infrarenális aortakirekesztés és alsó végtagi tourniquet alkalmazását követően.

A II. kísérletben vizsgált kísérleti végpontok módszerei megegyeznek az „I., II., III. kísérlet közös kísérleti végpontjai”-nak módszereit leíró fejezettel.

3.2.4. A III. kísérlet végpontjai - Alsó végtagi IR lokális vázizom és veseszövődmenyeinek megelőzése NIM-811 farmakológiai kezeléssel.

3.2.4.1. Lokális vázizom hatások

A szöveti ödéma vizsgálata (W/D arány)

A szöveti ödéma értékelésére az alsó végtagi vázizomzat fennmaradt részét használtuk. A reperfúzió végén az izom - a végtagból történő gondos kimetszését követően - azonnal mérésre került (nedves tömeg) majd hőlég sterilizáló segítségével állandó +80 °C-os hőmérsékleten 48 órán keresztül a súlyállandóság eléréséig szárítottuk. A szárítást követően újra mérésre került a kiszáritott izmok tömege (száraz tömeg). Az ödéma becslése a nedves / száraz tömegek százalékos arányának meghatározásával történt a következő képlet szerint: $W/D \text{ arány} = (\text{nedves tömeg} - \text{száraz tömeg}) / \text{száraz tömeg} \times 100 (\%)$.

A szöveti mikrocirkuláció mérése

Az alsó végtagi vázizomzat mikrocirkulációja laser Doppler flowmeterrel (MOOR Instruments Ltd, London, UK; DRT4, kétsatornás eszköz; $\lambda = 632,8$ nm; monokromatikus; 2 mW HeliumNeon Laser) került regisztrálásra a kísérlet alatt. A mérőfej a bal oldali m. biceps femoris felszínén került elhelyezésre. A mikrocirkuláció pontos jellemzésére a reperfúziós terület (RA) került kiszámításra, mely kutatócsoportunk korábbi matematikai számításain alapszik.¹³¹

3.2.4.2. Távoli szervi hatások: vese***Szövettani vizsgálat***

Minden állatból, csoportbeosztástól függetlenül azonos anatómiai helyről (bal vese) történt mintavétel, melyek 24 órás 4 %-os formalinos fixálását követően, paraffinba ágyazása történt. A szövettani vizsgálatok konvencionális fénymikroszkóp segítségével történtek, 3-5 μ m vastag metszeteken, hematoxin-eozin (HE) festést követően. A vizsgáló patológus a minták jelzését nem ismerte, a csoportbeosztás, ill. a beavatkozás módja és ideje tekintetében nem volt tájékozott. A metszetek fénymikroszkópos kiértékelése (60x-os nagyítás) során (Olympus BX microscope; Olympus Micro Bright Field, Williston, VT) a tubuláris, intersticiális károsodás jellemzőinek értékelése történt meg.

A szöveti károsodás pontos meghatározásának érdekében egy szövettani pontrendszer (score) került alkalmazásra.¹³² A vese szövet tubuláris károsodásának mértéke a károsodott tubulusok százalékos aránya szerint került pontozásra, melynek során figyelembe vettük a tubulussejt nekrozis és a csapadékképződés mértékét. 0: nincs károsodás; 1: $\leq 10\%$; 2: 10-25%; 3: 25-45%; 4: 45-75%; 5: $>75\%$. Tíz randomizált módon kiválasztott egymással nem átfedő terület került vizsgálatra metszetenként. A szövettani pontozásra egy független patológus segítségével került sor, aki nem volt tájékozott a minták csoportbeosztását tekintve.

Laboratóriumi vizsgálat

Az állatokból vett vérminták alvadésgátlása EDTA segítségével történt. Tíz perces szobahőmérsékleten végzett centrifugálást követően (1050 g) a hemolízismentes, sejtmentes szérum elválasztásra került a sejtes elemektől. Kémiai analízisek elvégzéséig

a minták -80°C-on kerültek tárolásra. 24 órán belül, 2,5-szeresre történt hígítás után spektrofotometrián alapuló, laboratóriumi automatán (Hitachi 747 Autoanalyzer, Tokyo, Japán) rutin tesztek felhasználásával történtek a mérések. A kapott értékek a hígítási arányból lettek visszaszámolva. Na^+ -, kreatinin-, karbamid- (BUN: blood urea nitrogen), szintek meghatározására került sor, melyek segítségével számított veseparaméterek (karbamid/kreatinin hányados, frakcionált Na^+ exkrécio: $(\text{FENa} = \text{U}_{\text{Na}} \times \text{P}_{\text{kreat.}} \times 100 / \text{U}_{\text{kreat.}} \times \text{P}_{\text{Na}^+})$) kerültek kiszámításra.

A vese mikrocirkulációjának mérése

A vese mikrocirkulációja a bal vese áramlási viszonyainak mérésével laser Doppler flowmeterrel (MOOR Instruments Ltd., London, UK; DRT4, kétcsatornás eszköz; $\lambda = 632,8 \text{ nm}$; monokromatikus; 2 mW HeliumNeon Laser) került regisztrálásra a kísérlet alatt.

A vese peroxinitrit koncentrációjának mérése

A homogenizált veseszövet minták 1.0 M-os NaOH (60:1) mosást követően spektrofotometriás mérésre kerültek 302 nm-es hullámhosszon. Kontrollként a mintákhoz 100 mM kálium-foszfátot (pH: 7,4) (60:1) adtunk. Az abszorbancia csökkenés mértéke semleges pH értéken került mérésre.¹³³

A vese hidrogén-peroxid koncentrációjának mérése

A H_2O_2 meghatározása veseszövet homogenizátumból történt. A mérés során 0,05 mg/ml tormaperoxidáz, 0,1 mg/ml o-dianizidin és Na-foszfát puffer (100mM, pH 6,5) került használatra. A hidrogén-peroxid koncentrációt spektrofotometria segítségével 400 nm hullámhosszon határoztuk meg, és az eredmények nmol/mg fehérje mértékegységben kerültek megadásra.¹³⁴

3.3. Statisztikai elemzés

Az adatok statisztikai és grafikus megjelenítése IBM SPSS Statistics 20.0 szoftverrel (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) illetve Microsoft Office Excel 2007 programmal történt. Az átlagértékek közötti különbségeket $p < 0,05$ konfidenciaintervallum esetén értékeltük szignifikáns különbségként, mely az ábrákon *, **, †, ‡, §, & és # karakterekkel került jelölésre. A p értéke maximum három tizedesjegyre került kifejezésre. Student féle kétmintás t-próbát, Mann-Whitney féle U-próbát, Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk valamint kétutas varianciaanalízist (ANOVA) használtunk LSD post-hoc teszttel.

4. Eredmények

4.1. Az I. kísérlet eredményei

4.1.1 Lokális vázizom hatások

A vázizom szövettani vizsgálata

A 3 óra iszkémia és 4 óra reperfúziót követően vett izomszövettani mintákból csupán enyhe morfológiai elváltozás volt megfigyelhető mind az IR, mind a PostC csoportban az Áloperált csoport egészséges szövettani képéhez képest. Kezdődő rhabdomyolízisre jellemző morfológiai kép mutatkozott. A metszeteken helyenként felbomlik az izomrost integritás és intracelluláris vakuolizáció figyelhető meg, azonban a két csoport között szignifikáns különbség nem mutatkozott.

Izomrost életképesség vizsgálat

4 órával a reperfúzió kezdete után jelentős mértékű izomrost-károsodás detektálható mindkét csoportban az Áloperált csoport izomrost életképességéhez képest. Az IR és a PostC csoportok között szignifikáns különbség nem mutatkozott. (6. táblázat)

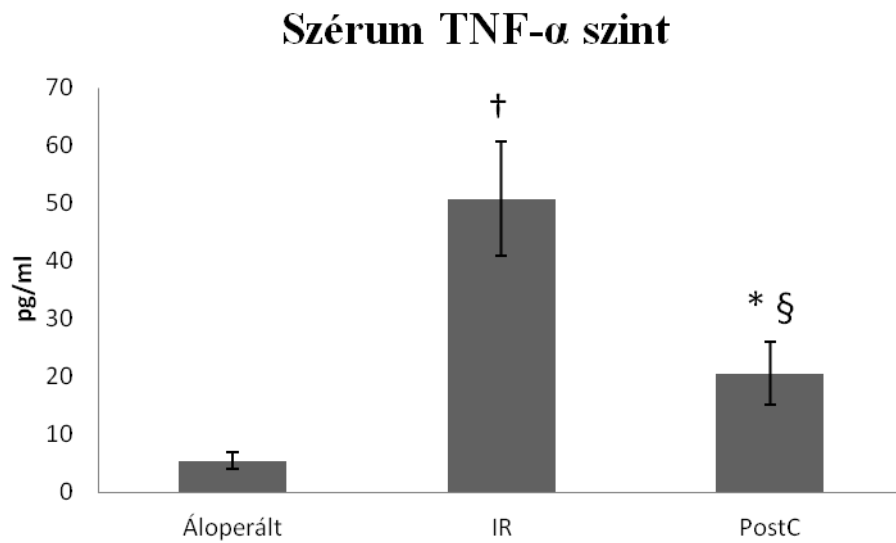
Laboratóriumi vizsgálatok

A szérumban a kreatin-kináz (CK), LDH és K^+ szintjeiben szignifikáns növekedés tapasztalható mind az IR, mind a PostC csoportokban az Áloperált csoporthoz képest, szignifikáns különbség azonban nem mutatkozott az IR és PostC csoport között, egyik marker tekintetében sem. (6. táblázat)

4.1.2. Szisztémás hatások

Szérumban TNF- α szint meghatározás

Az Áloperált csoportban mért értékhez képest szignifikánsan emelkedett volt a TNF- α szint mind az IR, mind a PostC csoportban. A PostC csoportban szignifikáns csökkenés tapasztalható az IR csoport értékeihez viszonyítva ($p=0,021$). (15. ábra; 6. táblázat)



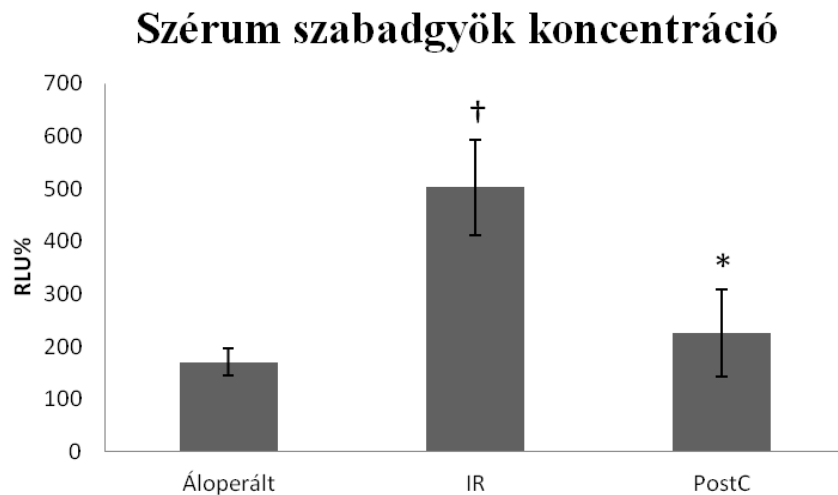
15. ábra: A TNF- α a szisztémás gyulladásos válaszreakció akut fázisában jelenik meg, melynek szérumszintjét a poszt kondicionálás eredményesen csökkentette. († $p < 0.05$ vs. Áloperált; * $p < 0.05$ vs. IR; § $p < 0.05$ vs. Áloperált)

Szérum IL-6 szint meghatározás

A szérum IL-6 koncentráció szignifikánsan megemelkedett az IR és a PostC csoportban az Áloperált csoporthoz viszonyítva. Nem mutatható ki azonban szignifikáns különbség a PostC csoport és az IR csoport IL-6 értékei között. (6. táblázat)

Oxidatív stressz

A luminometriás mérések alapján az oxidatív stressz mértéke az IR csoportban szignifikánsan magasabbnak bizonyult az Áloperált csoporthoz képest. A PostC csoportban mért teljes szabadgyök koncentráció szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az IR csoporthoz képest ($p = 0,032$) (16. ábra; 6. táblázat)



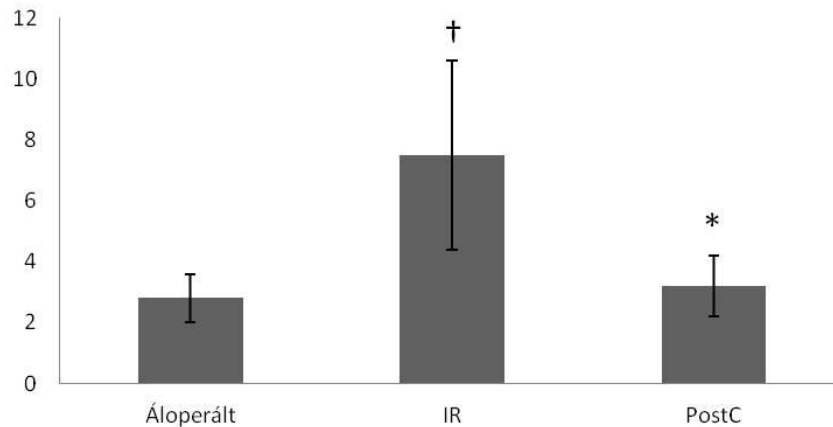
16. ábra: A megnövekedett reaktív szabadgyökképződés kiemelt szerepet játszik a generalizált gyulladás létrejöttében. A szérumban a szabadgyök koncentráció poszt-kondicionálás hatására szignifikánsan csökkent. († $p < 0.05$ vs. Áloperált; * $p < 0.05$ vs. IR)

4.1.3. Távoli szervi hatások: tüdő

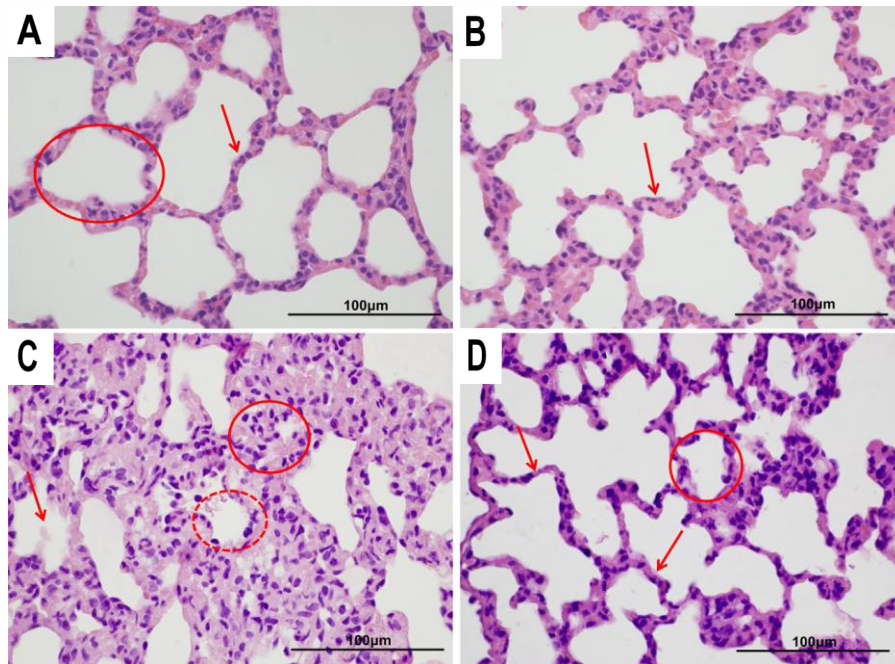
Szövettan

A számított tüdőszöveti pontszám szignifikánsan magasabb értéket mutat az IR csoportban az Áloperált csoporthoz viszonyítva. A PostC csoportban a szöveti károsodás szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az IR csoporthoz képest ($p = 0,017$) (17-18. ábra, 6. táblázat)

Tüdő szövettani pontszám



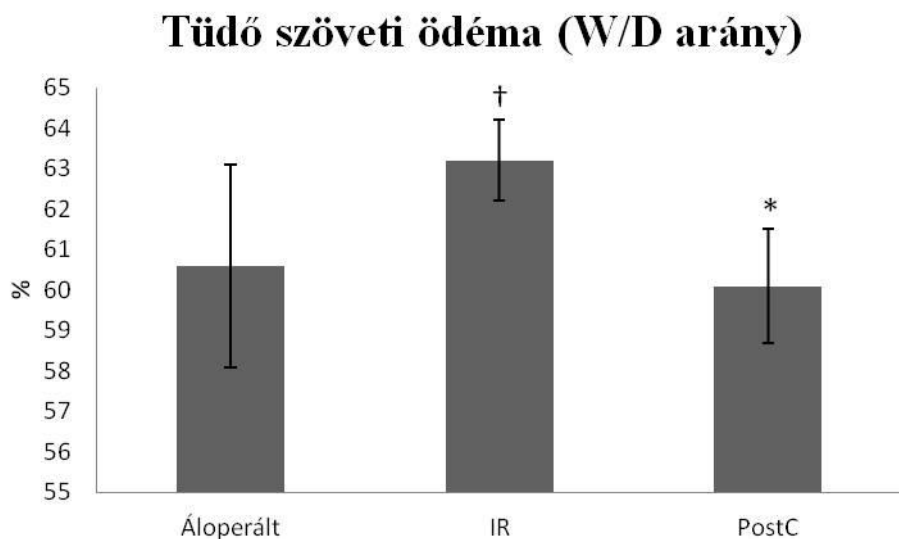
17. ábra: A tüdő szövettani képein látott alacsonyabb fokú hisztopatológiai elváltozások objektív megítélésére tüdő szövettani pontszám számítása történt, melynek eredménye alátámasztja a látott mikroszkópos képeket. († $p < 0.05$ vs. Áloperált; * $p < 0.05$ vs. IR)



18. ábra: Tüdőszövettani képek, HE, 60x **(A):** Egészséges tüdőszövettani kép, tág alveolusok (ellipszis) és fiziológiás vastagságú alveolus falak (nyíl). **(B):** Az áloperált csoportban közel ép szövettani struktúra látható, csupán enyhén megvastagodott alveolusfalakkal. **(C):** Az IR csoportban parciális atelektázia (szaggatott kör és nyíl) és vastagabb alveolus falak (kör) láthatóak. **(D):** A PostC csoportban alacsonyabb mértékű atelektázia figyelhető meg, az áloperálthoz hasonló szövettani kép. Tág alveolusok (kör), az alveolus falak vékonyabbak (nyíl).

Tüdő szöveti ödéma vizsgálata (W/D arány)

A tüdő szöveti nedvességtartalma szignifikánsan magasabbnak bizonyult az IR csoportban az Áloperált csoporthoz képest és a W/D arány szignifikánsan alacsonyabb értéket mutat a PostC csoportban az IR csoporthoz képest ($p=0,042$). (19. ábra; 6. táblázat)



19. ábra: A tüdő szöveti nedvességtartalom Wet/Dry (W/D) arány meghatározása alapján a tüdőben alacsonyabb fokú intersticiális folyadékkilépés történik. († $p < 0.05$ vs. Áloperált; * $p < 0.05$ vs. IR)

Szöveti MPO aktivitás

Az IR csoport megnövekedett MPO aktivitása mérhető az Áloperált csoporthoz képest. A PostC csoportban csökkenés tapasztalható az IR csoport értékeihez képest, de a különbség nem szignifikáns mértékű. (6. táblázat)

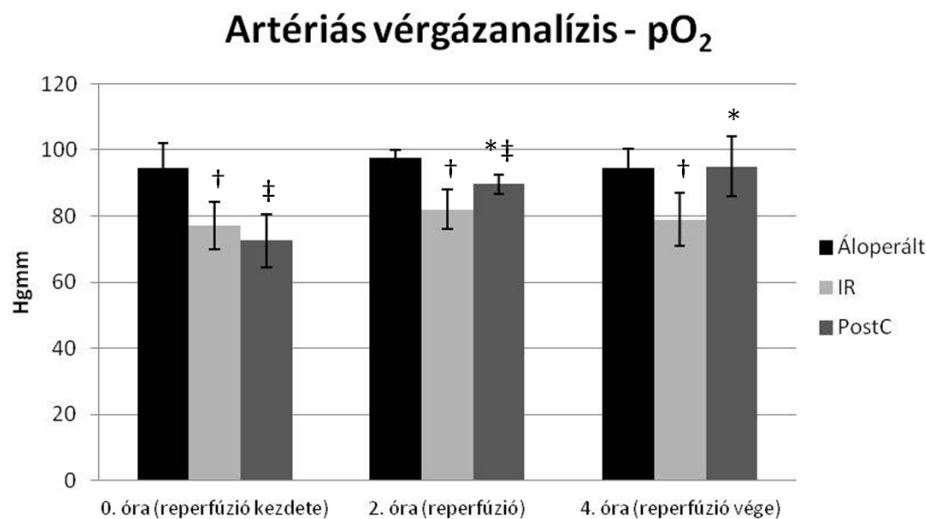
Szöveti hsp72 szint meghatározás

A tüdőszöveti hsp72 expresszió mértéke nem emelkedett meg szignifikánsan az IR csoportban az Áloperált csoporthoz képest. A PostC csoportban alacsonyabb hsp72 szint mérhető az IR csoporthoz képest, azonban a különbség nem szignifikáns mértékű. (6. táblázat)

Artériás vérgázanalízis

Az artériás pO_2 értéke csökkent az IR csoportban az Áloperált csoporthoz képest. A PostC csoportban szignifikánsan magasabb értékek mérhetők a reperfúzió alatti mintavételi időpontokban az IR csoporthoz viszonyítva (reperfúzió utáni 2. és 4. óra: $p=0,028$; $p=0,017$).

Az artériás pCO_2 érték megnövekedett az IR csoportban az Áloperált csoporthoz képest a reperfúzió második és negyedik órájában mérve, azonban a különbségek nem szignifikáns mértékűek. A PostC csoport esetében az artériás pCO_2 értékek csökkentek az IR csoport értékeihez képest, azonban a csökkenés nem tekinthető szignifikánsnak. (20. ábra; 6. táblázat)



20. ábra: A poszt kondicionálás szignifikáns mértékben javította az állatok artériás oxigenizációját, tehát a pulmonális oxigénfelvételt a reperfúzió ideje alatt.

(† $p<0.05$ vs. Áloperált; * $p<0.05$ vs. IR; ‡ $p<0.05$ vs. Áloperált)

6. táblázat: Az I. kísérlet eredményeinek összefoglalása.

		Áloperált	IR	PostC	P-érték (IR vs. PostC)
Lokális vázizomkárosodást jellemző paraméterek	CK (U/l)	284,2±48,2	853,8±240,5	776,2±230,3	N.Sz.
	LDH (U/l)	280,1±58,8	1467,4±570,5	1105,5±390,1	N.Sz.
	seK ⁺ (mM/l)	5,7±0,5	7,6±1,8	7,8±1,8	N.Sz.
	Izomrost életképesség (%)	98,5±19,2	41,5±18,5	42,2±28,1	N.Sz.
Szisztémás gyulladásos paraméterek	TNF-α (pg/ml)	5,5±1,5	50,8±9,8	20,6±5,5	p=0,021
	IL-6 (pg/ml)	187,0±10,2	305,2±29,5	304,0±14,5	N.Sz.
	Szabadgyök koncentráció (RLU%)	170,5±25,6	502,3±90,2	225,2±82,1	p=0.032
Tüdőkárosodást jellemző paraméterek	Szövettani pontszám	2,8±0,8	7,5±3,1	3,2±1,0	p=0,017
	MPO (U/mg)	16,2±5,2	21,0±7,2	12,9±2,1	N.Sz.
	hsp72	1,0±0,2	2,1±0,7	1,2±0,1	N.Sz.
	W/D arány (%)	60,6±2,5	63,2±1,0	60,1±1,4	p=0,042
	pO ₂ (Hgmm) 0.óra (reperfúzió kezdete)	94,6 ± 7,5	77,0±7,2	72,6±8,0	N.Sz.
	2. óra (reperfúzió)	97,6 ± 2,5	82,0 ± 6,0	89,6 ± 2,8	p=0,028
	4. óra (reperfúzió vége)	95,6 ± 5,6	79,0±7,9	97,7 ± 10,4	P=0,017
	pCO ₂ (Hgmm) 0. óra (reperfúzió kezdete)	36,6 ± 4,1	44,2 ± 5,0	40,8 ± 2,9	N.Sz.
	2. óra (reperfúzió)	38,6 ± 3,2	41,2 ± 6,7	36,2 ± 8,6	N.Sz.
	4. óra (reperfúzió vége)	38,6 ± 1,5	44,3 ± 3,5	38,4 ± 7,3	N.Sz.

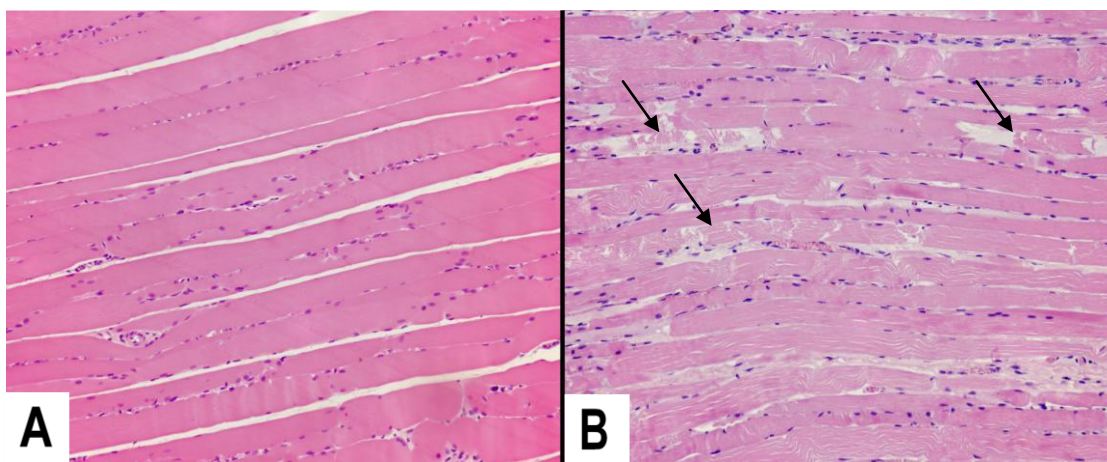
4.2. A II. kísérlet eredményei

4.2.1. Lokális vázizom hatások

A vázizom szövettani vizsgálata

Az A-csoportban, melyben aortaklipp került alkalmazásra, a reperfúzió végén minimális hisztopatológiai károsodás figyelhető meg a m. tibialis anteriorból készített izomszövettani metszeteken. Rabdomiolitikus rostok (intracellularis vakuolizáltság, izomrost integritás felbomlása) elvétve fordult elő, azonban a változás nem szignifikáns mértékű.

A tourniquet-val létrehozott okklúzió (B-csoport) hatására jelentős mértékű izomrost nekrosis látható (az izomrost integritás teljes felbomlása, súlyos magkárosodás, töredezett rostok). Nagyfokú ödéma jelent meg mind a kis mennyiségű ép és a nagy mennyiségű károsodott izomrostok között. Az elenyésző ép rostokban is intracelluláris vakuolizáltság látható. (21. ábra)



21. ábra: Vázizomszövettani képek, HE, 60x; A: aorta okklúzió, minimális hisztopatológiai elváltozás; B: tourniquet, rabdomiolitikus rostok (fekete nyíl).

Izomrost életképesség vizsgálata

A m. tibialis anteriorból vett izomminták vizsgálata alapján az aortaokklúzió (A-csoport) jelentős mértékű izomrost életképesség csökkenést eredményezett ($45,13 \pm 7,51\%$) az egészséges állatokhoz viszonyítva (100%).

A B-csoport esetében, melyben tourniquet került alkalmazásra, az izomrost életképesség sokkal jelentősebb mértékben csökkent ($7,91 \pm 3,25\%$). A különbség az aortaokklúzió (A) és a tourniquet (B) csoport között szignifikáns mértékű ($p < 0,001$). (22. ábra)

Laboratóriumi vizsgálatok

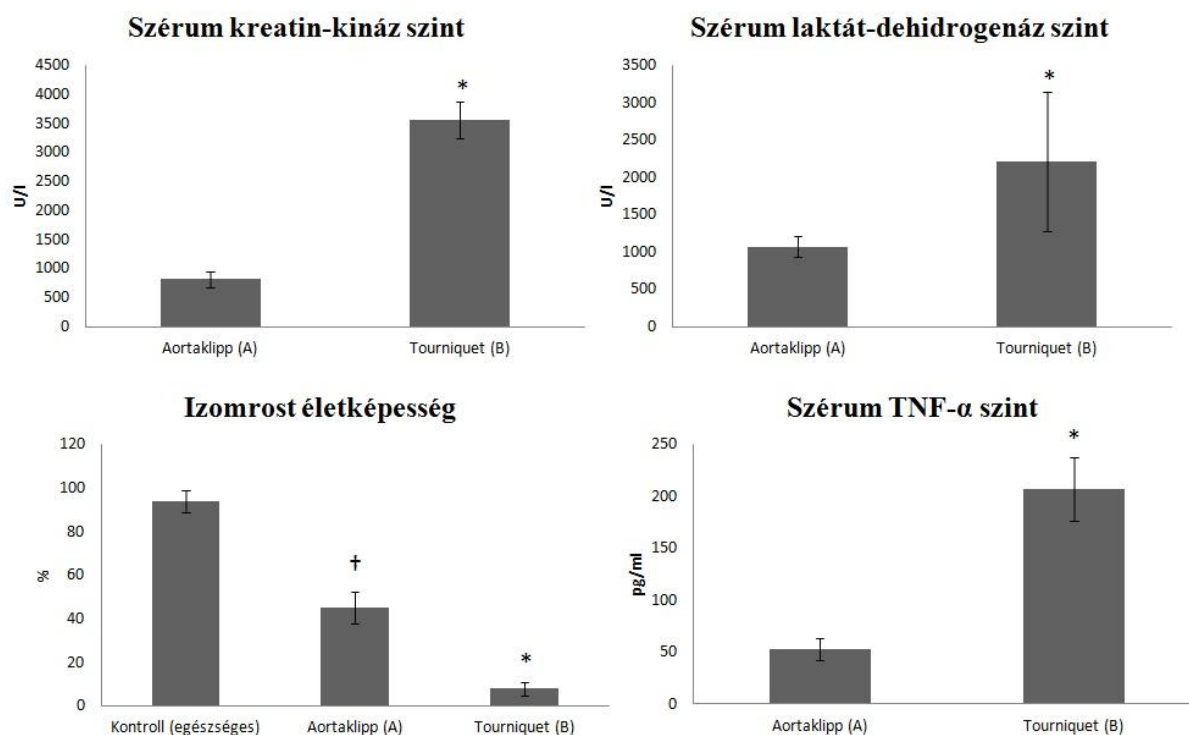
Három óra ischaemiát és 4 óra reperfúziót követően a szérumban a nekroenzim szintek jelentős különbséget mutatnak a két csoport között. A szérumban a CK koncentráció az aortaokklúziós A-csoportban (822 ± 140 U/l) szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult ($p < 0,001$) mint a tourniquet B-csoportban (3567 ± 318 U/l). A szignifikáns különbség ($p = 0,047$) megfigyelhető az LDH szinteket tekintve is (A: 1075 ± 144 vs. B: 2213 ± 928 U/l). (22. ábra)

Hasonló tendencia mutatkozik a szérumban a K^+ szintek esetében is. A tourniquet csoportban szignifikánsan magasabb szérumban K^+ szint jelenik meg, mint az aortaokklúziós csoportban (A: $7,79 \pm 0,96$ vs. B: $6,98 \pm 0,57$ mmol/l; $p = 0,048$).

4.2.2. Szisztémás hatások

TNF- α szint meghatározás

A B-csoport szérumban a TNF- α szintje ($207,1 \pm 30,9$ pg/ml) szignifikánsan magasabb ($p < 0,001$) értéket mutat az A-csoport ($52,5 \pm 10,4$ pg/ml) citokin szintjéhez képest. (22. ábra)



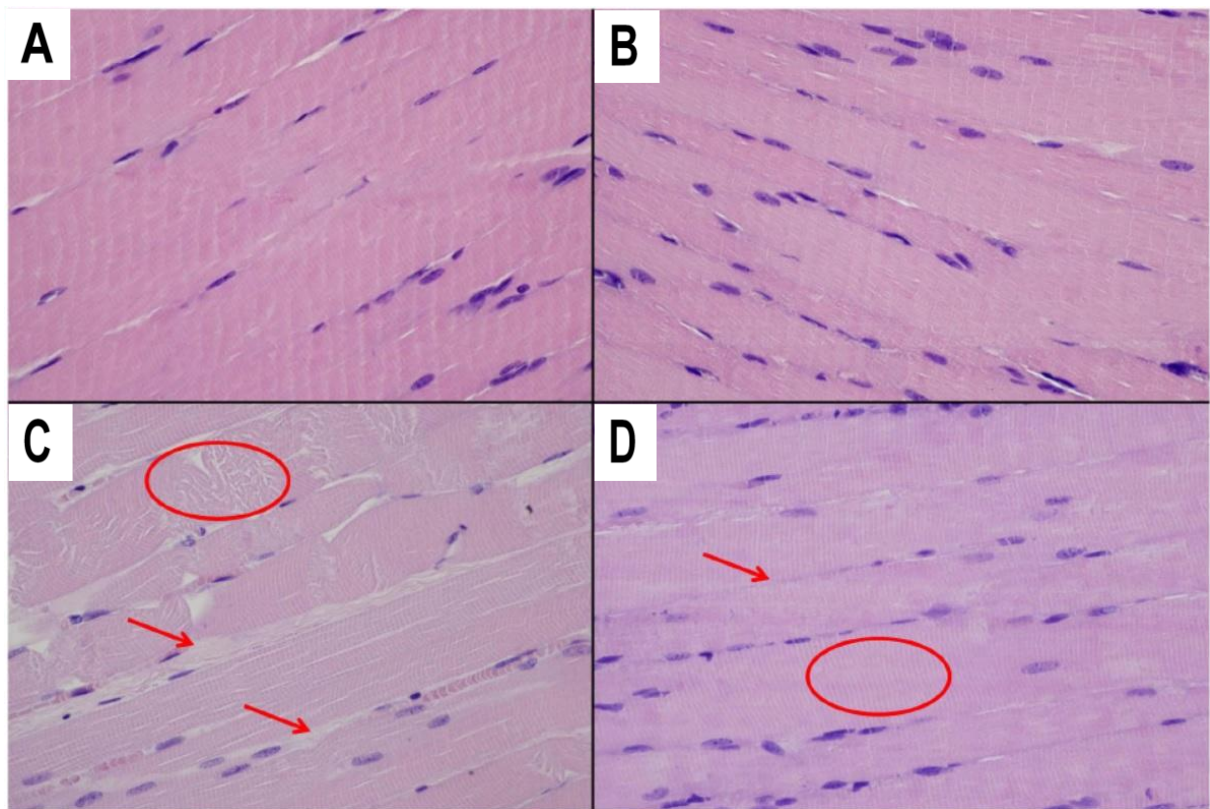
22. ábra: Szérum kreatin-kináz (CK) szint: * $p < 0,05$ vs. Aortaklipp (A); Szérum laktát-dehidrogenáz (LDH) szint: * $p < 0,05$ vs. Aortaklipp (A); Izomrost életképesség: † $p < 0,05$ vs. Kontroll, * $p < 0,05$ vs. Aortaklipp (A); Szérum TNF- α szint: * $p < 0,05$ vs. Aortaklipp (A)

4.3. A III. kísérlet eredményei

4.3.1. Lokális vázizom hatások

A vázizom szövettani vizsgálata

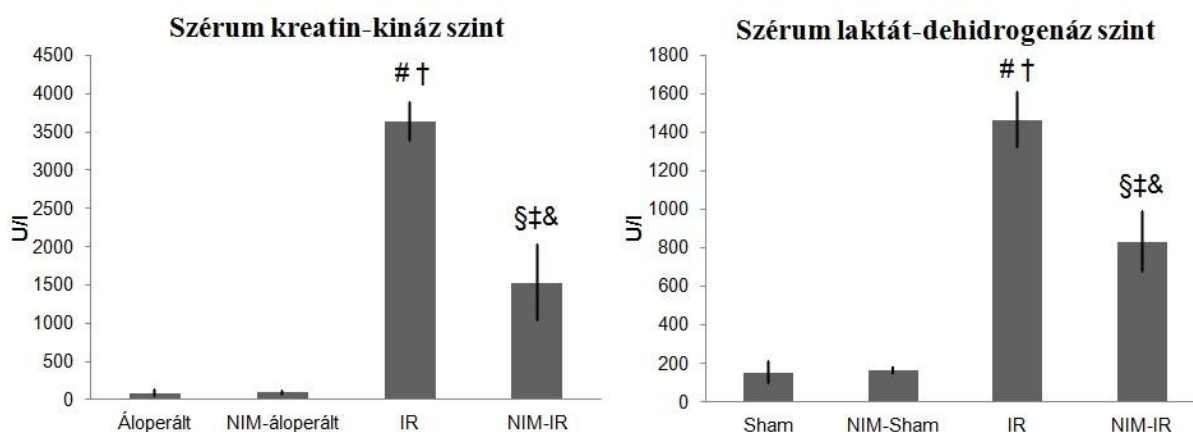
Az Áloperált és a NIM-áloperált csoport közel egészséges szövettani képéhez képest az IR csoport metszetein szegmentális nekrosis látszik, az elemi szálak az izomrostokon belül széttestek. A jelentős ödéma széttolja az izomrostokat. Ezzel szemben a NIM-IR csoport szövettani képein gyakorlatilag ép viszonyok láthatóak. (23. ábra)



23. ábra: Vázizom szövettani képek, HE, 60x. **(A-B):** Közel ép szövettani kép látható az Áloperált (A) és NIM-áloperált (B) csoportok metszetein, ép izomrostokkal és megfelelő szélességű szövetközi térrel. **(C):** Az IR csoportban szegmentális nekrosis (ellipszis), dezintegrált miofilamentumok és kiszélesedett intersticiális tér (nyíl) észlelhető. **(D):** A NIM-IR csoport metszetei ép izomrostokat mutatnak (ellipszis) nem látható kiszélesedett szövetközi tér (nyíl), hasonló az ép szövettani képhez.

Laboratóriumi vizsgálatok

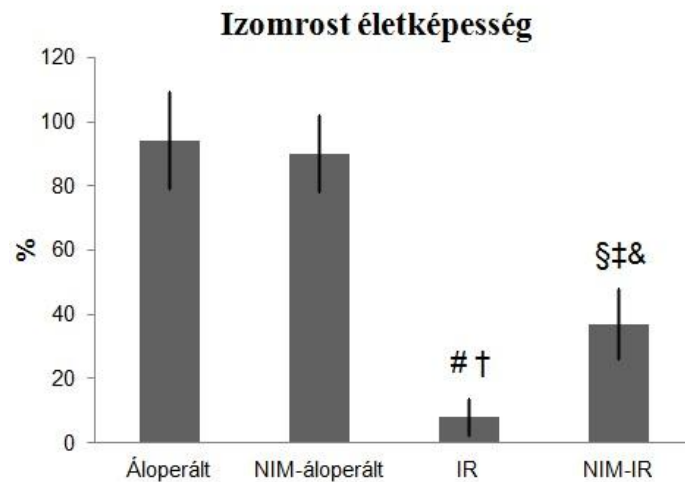
A szérumban a kreatin-kináz (CK) és a laktát-dehidrogenáz (LDH) szintjei alapján látható, hogy az áloperált csoportok közel azonos értékeihez képest az IR csoportban jelentős emelkedés történt mind a kreatin-kináz, mind az LDH szint tekintetében. A két vizsgált paraméter szignifikánsan alacsonyabb a NIM-IR csoportban, mint az IR csoportban (CK: $p < 0,001$; LDH: $p < 0,001$). A szérumban a K^+ szint emelkedett értéket mutat az IR csoportban az Áloperált és NIM-áloperált csoportokhoz képest. A NIM-IR csoportban szignifikánsan alacsonyabb fokú az emelkedés mértéke az IR csoporthoz képest ($p = 0,017$). (24. ábra; 7. táblázat)



24. ábra: Szérumban a kreatin-kináz (CK) szintje: # $p < 0,01$ vs. Áloperált; † $p < 0,01$ vs. NIM-áloperált; § $p < 0,01$ vs. IR; ‡ $p < 0,01$ vs. Áloperált; & $p < 0,01$ vs. NIM-áloperált; Szérumban a laktát-dehidrogenáz (LDH) szintje: # $p < 0,01$ vs. Áloperált; † $p < 0,01$ vs. NIM-áloperált; § $p < 0,01$ vs. IR; ‡ $p < 0,01$ vs. Áloperált; & $p < 0,01$ vs. NIM-áloperált; U/l – Unit/liter

Izomrost életképesség vizsgálata

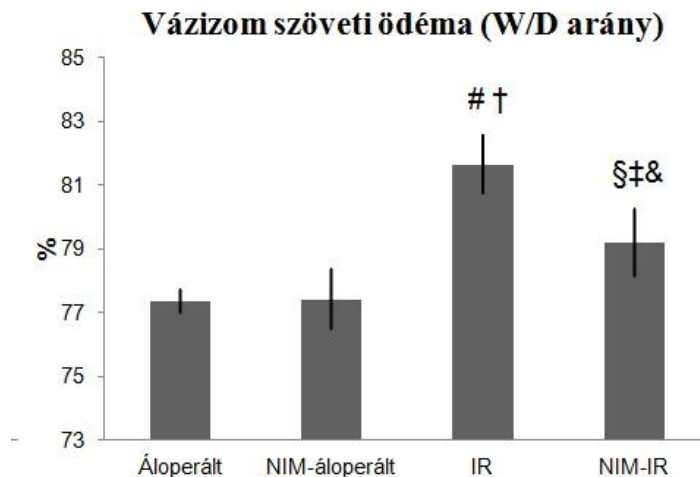
Az Áloperált és NIM-áloperált csoportok izomrost életképessége a közel 100%-os értéket mutatja, melyhez képest az IR csoport értéke szignifikánsan alacsonyabb. Az IR csoporthoz viszonyítva a NIM-IR csoportban szignifikánsan alacsonyabb mértékű izomrost életképesség tapasztalható ($p = 0,017$). (25. ábra; 7. táblázat)



25. ábra: Az IR károsodás patofiziológiájában a mitokondriumok központi szerepet játszanak, ezért a szubcelluláris szintű izomkárosodás pontosabb detektálására NADH-tetrazolium enzimhisztokémiát alkalmaztunk. (# $p < 0.01$ vs. Áloperált; † $p < 0.01$ vs. NIM-áloperált; § $p < 0.01$ vs. IR; ‡ $p < 0.01$ vs. Áloperált; & $p < 0.05$ vs. NIM-áloperált)

A szöveti ödéma vizsgálata (W/D arány)

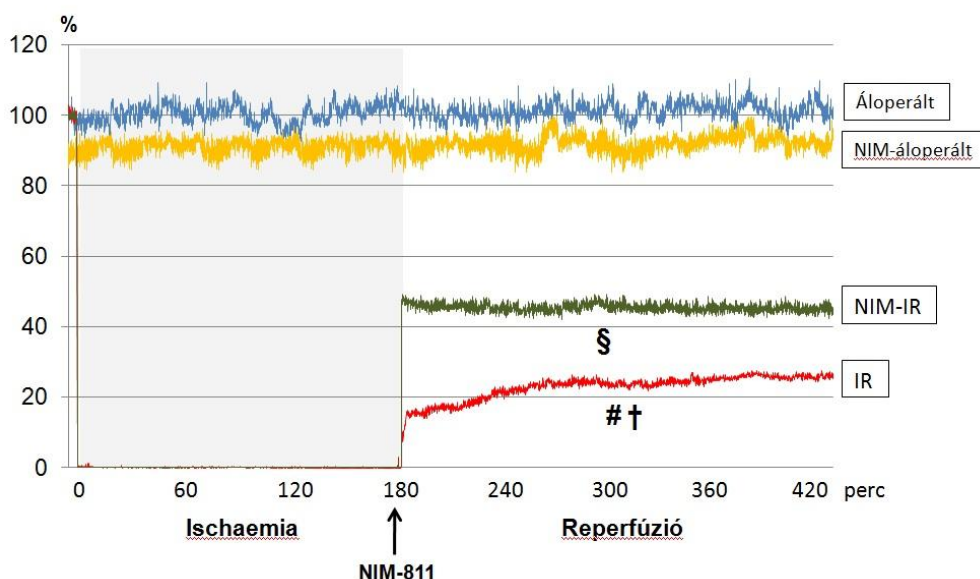
Az izomzat nedvességtartalmának kiszámítása során az Áloperált és NIM-áloperált csoportok eredményeihez képest az IR csoportban szignifikánsan magasabb értéket kaptunk. A NIM-IR csoportban szignifikánsan alacsonyabb a szöveti ödéma mértéke, mint az IR csoportban ($p = 0,014$). (26. ábra; 7. táblázat)



26. ábra: A vázizomszövet IR károsodása során megnövekvő érpermeabilitás következtében kialakuló intersticiális ödémát a NIM-811 kezelés szignifikáns mértékben csökkentette. (# $p < 0.01$ vs. Áloperált; † $p < 0.01$ vs. NIM-áloperált; § $p < 0.05$ vs. IR; ‡ $p < 0.05$ vs. Áloperált; & $p < 0.05$ vs. NIM-áloperált)

A szöveti mikrocirkuláció mérése

A reperfúziós terület (RA) kiszámításával szignifikánsan alacsonyabb mértékű szöveti véráramlás tapasztalható az IR csoportban az Áloperált és NIM-áloperált csoportok értékeihez képest. A NIM-IR csoportban a mikrocirkuláció egy szignifikánsan magasabb szinten stabilizálódik az IR csoporthoz képest ($p < 0,001$) (27. ábra, 7. táblázat)

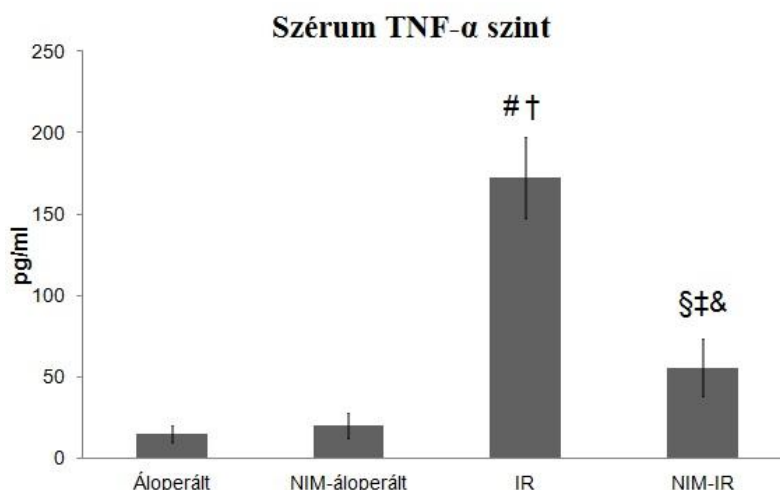


27. ábra: Az alsó végtagi vázizomzat mikrocirkulációja. A mikrocirkuláció integritása kiemelt fontosságú a végtag túlélése szempontjából alsó végtagi IR során. Az IR csoport reperfúziós áramlási értékeihez képest szignifikánsan magasabb áramlást regisztráltunk NIM-811 kezelés hatására (# $p < 0,05$ vs. Áloperált; † $p < 0,05$ vs. NIM-áloperált; § $p < 0,05$ vs. IR)

4.3.2. Szisztémás hatások

Szérum TNF- α és IL-6 szint meghatározás

Mind a TNF- α , mind az IL-6 szint jelentősen megemelkedett az IR csoportban az Áloperált és a NIM-áloperált csoportokhoz képest. A TNF- α szint szignifikánsan alacsonyabb a NIM-IR csoportban az IR csoporthoz képest ($p = 0,003$). Az IL-6 mérések eredményei alapján szignifikánsan alacsonyabb szint mérhető a NIM-IR csoportban az IR csoporthoz viszonyítva ($p = 0,040$) (28. ábra; 7. táblázat)



28. ábra: Alsó végtagi IR következtében fellépő szisztémás gyulladás akut fázisában megnő a proinflammatorikus citokinek szérumszintje. A TNF- α szint NIM-811 kezelés hatására szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult. (# $p < 0.01$ vs. Áloperált; † $p < 0.01$ vs. NIM-áloperált; § $p < 0.01$ vs. IR; ‡ $p > 0.05$ vs. Áloperált; & $p > 0.05$ vs. NIM-áloperált; pg/ml – pikogramm/milliliter)

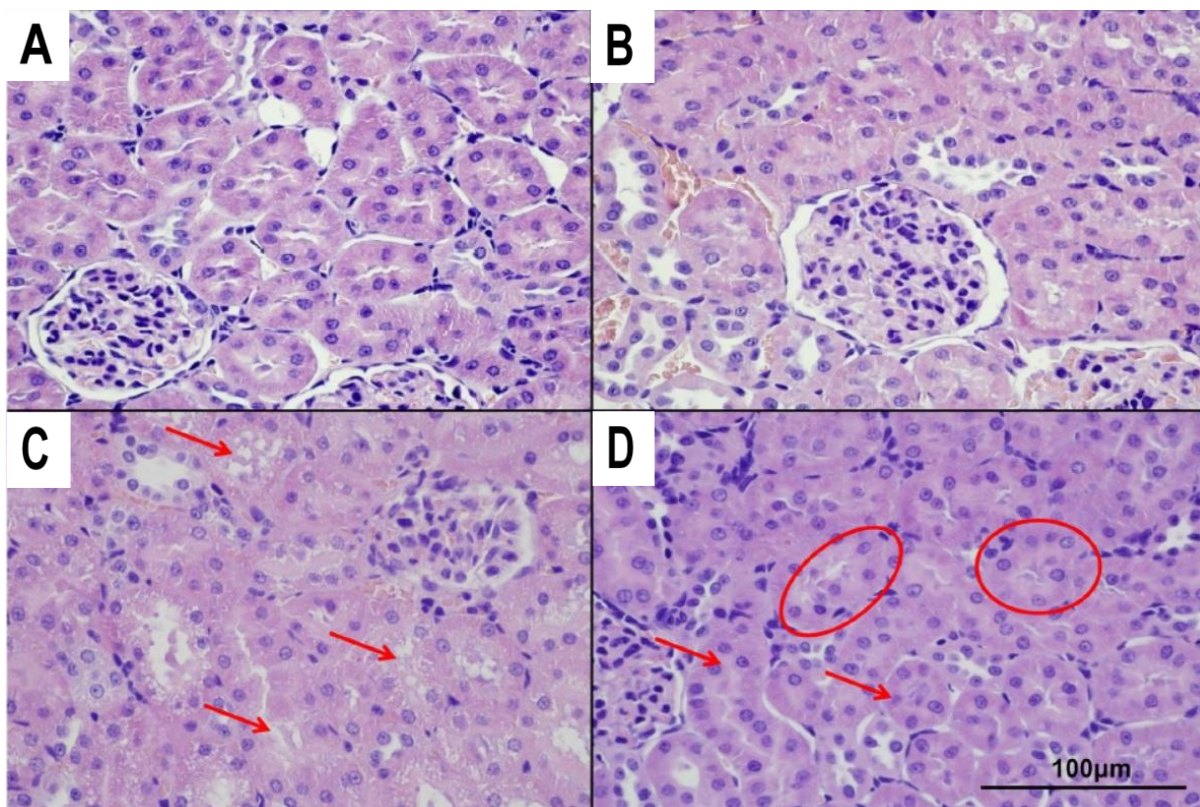
4.3.3. Távoli szervi hatások: vese

Szövettan

A vese morfológiai károsodásának megítélésékor a szövettani metszeteken az Áloperált és NIM-áloperált csoportok közel ép viszonyaihoz képest az IR csoportban károsodott tubulussejtek, intracelluláris vakuolizáltság, fellazult nekrotikus sejtek és elmosódott sejthatárok láthatóak.

Ezzel szemben a NIM-IR csoportban jóval kedvezőbb a vese szövettani képe, elvértve észlelhető sejtnekrózis, kifejezett sejthatárok mutatkoznak, a normális viszonyokhoz hasonló kép látható. (29. ábra)

Az alkalmazott hisztopatológiai pontszám szignifikánsan alacsonyabb értéket mutat a NIM-IR csoportban az IR csoport értékeihez képest ($p < 0,001$). (7. táblázat)

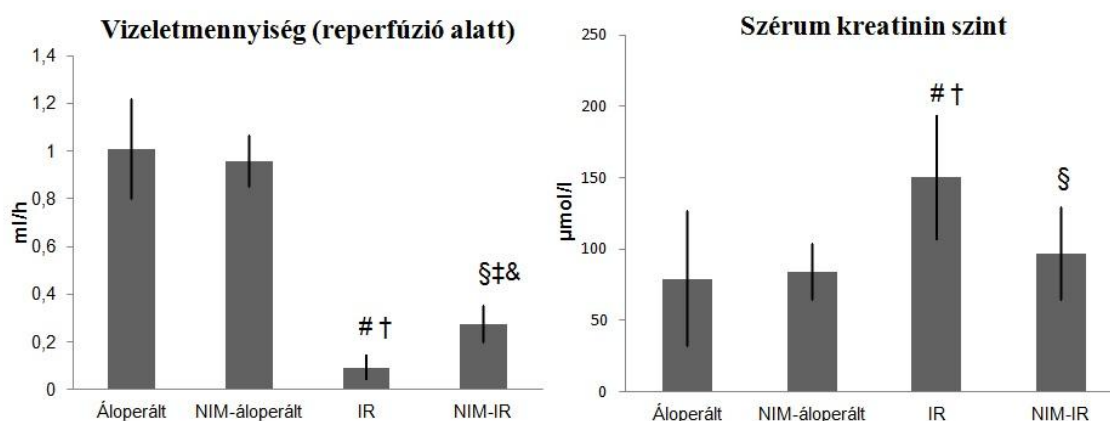


29. ábra: Vese szövettani képek. **(A-B):** Az Áloperált és NIM-áloperált csoportokban a vese kéregállomány szöveti képe ép struktúrát mutat. **(C):** Az IR csoportban súlyos károsodás mutatkozik, a tubulussejt integritás felbomlik és intracelluláris vakuolizáció látható (nyilak). **(D):** A NIM-IR csoportban sokkal enyhébb fokú tubulussejt nekrózis (nyil) és intakt tubuláris integritás (ellipszis), közel ép viszonyok láthatóak.

Vizeletmennyiség és laboratóriumi vizsgálat

A reperfúzió alatt mért vizeletmennyiségek alapján megállapítható, hogy az Áloperált és NIM-áloperált csoportok értékeihez képest az IR csoportban szignifikánsan alacsonyabb a vizeletkiválasztás mértéke. Az IR csoporthoz hasonlítva a NIM-IR csoportban szignifikánsan magasabb vizeletmennyiség mérhető ($p=0,022$).

Az Áloperált és NIM-áloperált csoportok kreatinin szintjéhez viszonyítva az IR csoport értékei szignifikáns emelkedést mutatnak. Az IR csoporthoz képest a NIM-IR csoport plazma kreatinin szintje szignifikánsan alacsonyabb mértékben emelkedett meg ($p=0,001$). (30. ábra; 7. táblázat)

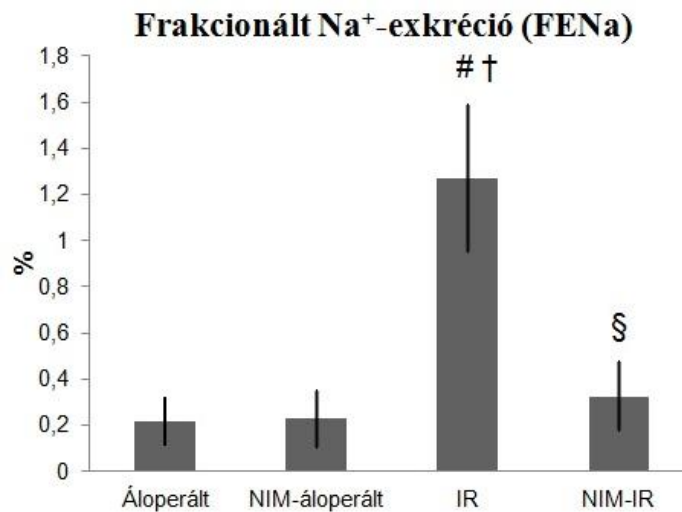


30. ábra: Vizeletmennyiség: # $p<0,01$ vs. Áloperált; † $p<0,05$ vs. NIM-áloperált; § $p<0,05$ vs. IR; ‡ $p<0,01$ vs. Áloperált; & $p>0,05$ vs. NIM-áloperált; Szérum kreatinin szint: (# $p<0,01$ vs. Áloperált; † $p<0,01$ vs. NIM-áloperált; § $p<0,05$ vs. IR)

Számított veseparaméterek

A frakcionált Na^+ exkréció az Áloperált és NIM-áloperált csoportok értékeihez viszonyítva az IR csoportban jelentős emelkedést mutat, melyhez képest a NIM-IR csoportban szignifikáns csökkenés tapasztalható ($p<0,001$). (31. ábra; 7. táblázat)

A plazma karbamid/kreatinin hányados az Áloperált és NIM-áloperált csoportok értékeihez hasonlóan csökkenést mutatott mind az IR, mind a NIM-IR csoportokban. Az IR és NIM-IR csoportok között azonban nem tapasztalható szignifikáns különbség, habár az utóbbi csoportban alacsonyabb mértékű a csökkenés. (7. táblázat)



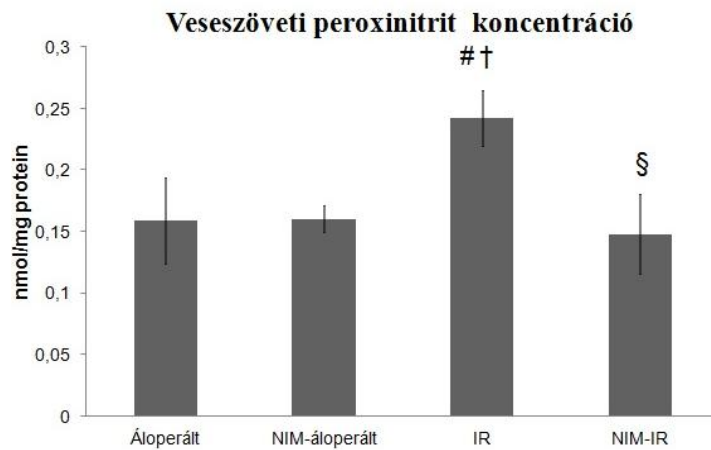
31. ábra: A frakcionált Na⁺-exkréció kifejezi, hogy a filtrált Na⁺ mennyiségének hány százaléka választódik ki a vizelettel, alkalmas paraméter a vesekárosodás eredetének a tisztázására. (# p<0.01 vs. Áloperált; † p<0.01 vs. NIM-áloperált; § p<0.01 vs. IR)

A vese mikrocirkulációjának mérése

Az iszkémia időtartama alatt az IR és NIM-IR csoportok értékeiben emelkedés tapasztalható az Áloperált és NIM-áloperált csoportok értékeihez képest. A reperfüzió kezdete után az IR és NIM-IR csoportok áramlási értékei csökkenő tendenciát mutatnak az áloperált csoportok értékeihez viszonyítva, azonban a reperfüziós terület (RA) kiszámítása alapján szignifikáns különbség egyik csoport között sem mérhető. (9. táblázat)

A vese peroxinitrit koncentrációjának mérése

Az Áloperált és NIM-áloperált csoportok értékeihez hasonlítva az IR csoportban szignifikáns emelkedés látható. A NIM-IR csoportban az IR csoporthoz képest szignifikáns csökkenés mérhető (p<0,001). (32. ábra; 7. táblázat)



32. ábra: A veseszöveti peroxinitrit koncentráció szignifikánsan alacsonyabb mértékű NIM-811 kezelés hatására. (# $p < 0.01$ vs. Áloperált; † $p < 0.05$ vs. NIM-áloperált; § $p < 0.01$ vs. IR)

A vese hidrogén-peroxid koncentrációjának mérése

Az IR csoportban szignifikánsan emelkedett a hidrogén-peroxid koncentráció az Áloperált és NIM-áloperált csoportok eredményeihez viszonyítva. A NIM-IR csoportban tapasztalható csökkenés az IR csoport értékeihez hasonlítva, azonban a különbség nem szignifikáns mértékű. (7. táblázat)

7. táblázat: A III. kísérlet eredményeinek összefoglalása

		Áloperált	NIM- áloperált	IR	NIM-IR	P-érték (IR vs. NIM- IR)
Vázizom károsodást jellemző paraméterek	LDH (U/l)	153,40±57,60	164,40±15,19	1464,0±143,82	832,5±153,78	p<0,001
	CK (U/l)	90,0±36,24	95,60±22,05	3632,22±256,66	1530,33±500,0	p<0,001
	K ⁺ (mmol/l)	4,0 ±0,56	4,20±0,65	7,79±0,96	6,53±1,05	p=0,017
	Izomrost életképesség (%)	94,10±15,0	90,0±12,0	7,94±5,71	36,97±11,06	p=0,001
	W/D (%)	77,35±0,36	77,41±0,91	81,64±0,89	79,17±1,05	p=0,014
	LDF RA (%)	101,23±2,63	91,98±2,47	22,81±14,86	45,43±23,74	p<0,001
Szisztémás paraméterek	TNF-α (pg/ml)	15,0±5,0	20,0±8,0	172,14±25,0	55,34±17,69	p=0,003
	IL-6 (pg/ml)	110,0±25,0	125,0±32,0	563,29±120,0	224,73±107,13	p=0,040
	MAP (reperfúzió alatt; Hgmm)	102,17±0,66	102,32±3,67	88,04±7,22	97,83±11,47	p=0,044
Vese károsodást jellemző paraméterek	Szöveti pontszám	1,08±0,20	1,33±0,25	4,0±0,81	2,64±0,37	P<0,001
	Vizeletmennyiség (reperfúzió alatt; ml/óra)	1,0±0,8	0,95±0,10	0,09±0,04	0,27±0,07	P=0,022
	Kreatinin (μmol/l)	79,14±47,23	83,94±19,37	150,17±42,91	96,95±32,21	P=0,001
	Karbamid/kreatinin	0,09±0,01	0,09±0,01	0,07±0,01	0,09±0,01	N.Sz.
	FENa (%)	0,21±0,10	0,22±0,12	1,27±0,32	0,32±0,15	p<0,001
	LDF RA (%)	97,90±1,76	90,85±4,73	86,67±15,63	83,01±16,93	N.Sz.
	Peroxininitrit (nmol/mg fehérje)	0,15±0,03	0,16±0,01	0,24±0,02	0,14±0,03	p<0,001
	Hidrogén-peroxid (mmol/mg fehérje)	2,49±0,80	2,52±0,37	3,26±0,67	2,93±0,81	N.Sz.

5. Megbeszélés

Az alsó végtagi akut iszkémia a végtagi perfúzió hirtelen csökkenését jelenti, mely a végtag túlélését potenciálisan veszélyezteti.² Incidenciája a TASC II ajánlás szerint több országos regisztert és különböző regionális vizsgálatokat tekintve összességében körülbelül 140/millió fő/év.² Leggyakoribb etiológiai tényezői közé tartozik a végtagi artériák vagy bypass graft akut trombózisa, szív eredetű, vagy artériás betegség következtében kialakuló tromboembólia, disszekció vagy traumás esemény.¹ Akut végtagi iszkémia revaszkularizációját követően a végtagi szövetek iszkémiás-reperfúziós (IR) károsodása történik. A szöveti IR a korábban életképes iszkémiás szövetek reperfúzióját követő celluláris károsodását jelenti.⁴⁴ Az IR károsodás szövődményei lokális és távoli szervi hatásokként jelennek meg. A keringés újraindulásával a lokális vázizomszövetből felszabaduló gyulladásos mediátorok és szabadgyökök szisztémás szövődményekhez vezethetnek. Eredményként egy szisztémás gyulladásos válaszreakció alakul ki, mely többszervi elégtelenségben végződhet, magában foglalva a két leggyakrabban érintett távoli szervet, a légző és vizeletkiválasztó szervrendszert.

Az akut alsó végtagi IR károsodásnak nincs megfelelő megelőzési vagy kezelési lehetősége, ezért nagy az igény egy hatékony módszer kifejlesztésére, mely képes az említett szövődmények mérséklésére. Két fő csoportra oszthatjuk az IR károsodás lehetséges megelőzési módszereit, úm.: sebésztechnikai – vagy másnéven keringésmoduláló - és farmakológiai kondicionálási eljárásokra. A poszt kondicionálás a keringésmoduláló eljárások csoportjába tartozik, melyről korábban már bizonyosodott, hogy több szerv tekintetében is alkalmas módszer az IR károsodás mértékének a csökkentésére.^{93, 135-137}

A poszt kondicionálás definícióját tekintve egy a reperfúzió kezdetén alkalmazott többciklusú áramlásmegszakítás, melyet elsőként Jakob Vinten-Johansen és mtsai.⁹⁰ miokardiális iszkémia-reperfúzió során alkalmaztak. Az 1986-ban Murry és mtsai.⁸⁴ által bemutatott prekondicionálás adott alapot hipotézisükhöz, mely szerint a poszt kondicionálás a prekondicionáláshoz hasonló mértékben képes csökkenteni az infarktus méretét. A prekondicionálás egy jól alkalmazható sebésztechnikai kondicionálási eljárás, mely a klinikai gyakorlatban is bevált módszer. Hátránya

azonban, hogy csupán egy előre tervezett IR kapcsán alkalmazható sikerrel az iszkémia kezdete előtt. A klinikai gyakorlatban azonban az IR károsodás leggyakrabban nem előre tervezetten, hirtelen alakul ki, tehát egy olyan módszerre van szükség mely egy már korábban kialakult iszkémia végén alkalmazható. Éppen ezért a posztkondicionálás a legmegfelelőbb pillanatban, a reperfúzió kezdetén beavatkozva képes csökkenteni a károsodás mértékét. Előnye, hogy nem igényel speciális műszeres felkészültséget, illetve definíciójából adódóan alkalmazása nem csak elektív műtétekre korlátozódik.

Első kísérletünkben a posztkondicionálás hatását vizsgáltuk alsó végtagi IR károsodás lokális vázizom és távoli szervi tüdőszövődményeinek a megelőzésére. Kísérleti modellünkben posztkondicionálást alkalmaztunk 6 ciklusban, 10 mp reperfúzióval és 10 mp reokklúzióval.

A posztkondicionálás megfelelő algoritmusának meghatározása kulcsfontosságú a protektív hatás eléréséhez, melyben kiemelten fontos a ciklusok száma és a reperfúziós/reokklúziós periódusok hossza. Úgy tűnik a ciklusok száma kevésbé jelentős tényező. Kin és mtsai.¹⁰² bizonyították, hogy 3 ciklus alkalmazása 6 ciklussal megegyező mértékű védő hatással bír. Ezzel szemben elmondható, hogy egy-egy ciklus hossza sokkal fontosabb jelentőségű. Az irodalmi adatok alapján általánosságban megállapítható, hogy a nagyobb testtömegű kísérleti egyedek esetében a hosszabb ciklushossz a hatékonyabb, míg a kisebb állatok tekintetében a rövidebb ciklushossz bizonyult megfelelőnek. Patkányokat tekintve a 10 és 15 másodperces ciklusok tűnnek hatékonyoknak, ezért alkalmaztuk ezen algoritmust.⁹⁸

Első kísérletünkben - melyben a posztkondicionálás hatását vizsgáltuk alsó végtagi IR lokális vázizom és tüdőszövődményeire - az infrarenalis aortára felhelyezett mikroklippel létrehozott 3 órás iszkémia és 4 órás reperfúzió után elsőként a lokális vázizom szövődményeket vizsgáltuk a vázizomkárosodásra specifikus markerek és paraméterek segítségével. Az izomkárosodás fénymikroszkópos vizsgálata alapján morfológiai eltérés nem jelentkezett az áloperált csoporthoz képest sem az IR, sem a PostC csoportban. A kapott eredmények látszólag ellentmondanak azon ténynek, hogy egy 3 órás artériás érkirekesztés kapcsán valamilyen szintű izomsejt károsodás szövettani képe bontakozik ki. Ennek magyarázataként szolgálhat, hogy az irodalom alapján több IR modell átvizsgálása kapcsán elengedhetetlen egy fontos szempont figyelembe vétele, mégpedig az iszkémia indukció módszere.

Wang és mtsai.¹³⁸ az iszkémiás posztkondicionálás hatását vizsgálták patkány alsó végtagi IR modellben. Három órás alsó végtagi iszkémiát hoztak létre, a modellünkkel ellentétben tourniquet alkalmazásával, mely alkalmas eszköz a véráramlás teljes megszüntetésére. Vázizom szövettani vizsgálataik során ödéma, sejtnekrózis, intersticiális bevérvések és neutrofil infiltráció mutatkozott a csak iszkémia-reperfúzió átesett kontroll csoport szövettani metszetein. Ezzel ellentétben a posztkondicionált csoportban szignifikánsan alacsonyabb fokú IR izomkárosodást figyeltek meg. Fontos különbség az említett és az általunk felállított kísérleti modellek között a kirekesztési technika különbözősége. Az aortaklappal történő infrarenális keringéskirekesztés következtében jelenlévő kollaterális keringés nagy szerepet játszik az izomrostok életképességének megtartásában, ezért nem jelentkezik kifejezett izomkárosodás kísérletünkben. Ezen felül a végtagi vázizomzat nagyobb iszkémia toleranciájának köszönhetően, a felállított modellben alkalmazott 180 perces iszkémiás idő nem elegendő mértékű a nagymértékű lokális károsodás létrehozásához. A vázizomszövettani eredményeinket a szérum nekroenzim szintek csupán kismértékű megemelkedése is alátámasztja. A fent említett kísérletben az áloperált csoporthoz képest szignifikánsan megemelkedett a szérum CK és LDH szint mind a kontroll mind a posztkondicionált csoportokban, és posztkondicionálás hatására szignifikánsan csökkentek a nekroenzimszintek az IR csoporthoz képest. Az általunk kapott eltérő eredmények szerint, a szérum CK és LDH szint szignifikánsan megnövekedett az Áloperált csoporthoz képest, azonban az IR és PostC csoport között nem mutatkozott szignifikáns különbség. Ezen eredményekre magyarázat lehet az infrarenális aortaklipp és tourniquet eltérő mértékű ischaemiát létrehozó hatása.

Annak ellenére, hogy celluláris szinten nem sikerült érdemi változást illetve különbséget kimutatni a csoportok között, szubcellulárisan, pl.: a mitokondriumokban már megjelenhet változás infrarenális aortaklappal történő iszkémia indukcióban is. A szubcelluláris szintű izomkárosodás pontosabb detektálására a NADH-tetrazolium enzimhisztokémiát alkalmaztuk. A reakció a mitokondriumok épségének, így az izomrostok életképességének¹²⁶ detektálására alkalmas. Az enzimreakció során képződő, detektálható színes reakciótermékek rostonszerű abszolút mennyisége a rostokban található működő mitokondriumok abszolút számával egyenesen arányos, a színreakció kisebb foka a mitokondriumok károsodásának mértékére utal.¹³⁹ Bár a

reakció nem a rhabdomyolízist elszenvedett rostok kimutatására szolgál, hanem a reverzibilisen károsodott rostok mitokondriumainak épségét jellemzi, mégis alkalmazhatóságát jelen kísérletben magyarázza, hogy a reverzibilis károsodások foka korrelál az irreverzibilis rostszerkezetek, a rhabdomyolízis mértékével.¹²⁶ Kísérletes eredményeink e módszer segítségével sem mutatnak érdemi különbséget a PostC és az IR csoportok között. Tsubota és mtsai.¹⁴⁰ a távoli szervi iszkémiás poszt kondicionálás hatását vizsgálták egér IR modellben. Kísérletükben 3 óra jobb alsó végtagi tourniquettel indukált iszkémiát 24 óra reperfüzió követett. A távoli szervi poszt kondicionált csoportban a bal alsó végtagon két ciklusban 5 perc reperfüzió és 5 perc iszkémia alkalmazásával poszt kondicionálást végeztek közvetlenül a jobb alsó végtagi reperfüzió kezdete előtt. Az izomnekrózis mértékét NADH-tetrazolium festéssel értékelték és a távoli szervi poszt kondicionált csoportban a nekrosis kiterjedése alacsonyabb mértékben jelent meg. A kísérletünkben kapott eltérő eredményekre magyarázat lehet az eltérő kísérleti modell és poszt kondicionálási algoritmus, illetve az aortaklipp alacsonyabb mértékű iszkémiát létrehozó szerepe. A fennmaradó kollaterális keringés elegendő ahhoz, hogy az izomrostok nagyrésze túléljen egy 3 órás artériás kirekesztést és szubcellulárisan a mitokondriális károsodás nem jelentkezik számottevő mértékben. Ettől függetlenül szubcellulárisan a gyulladásos citokinek transzkripciója kezdetét veszi, melyet kísérletünkben a gyulladásos paraméterek eredményei alátámasztanak.

A TNF- α és IL-6 a szisztémás gyulladásos válaszreakció két legfontosabb citokin markere.¹⁴¹ Az iszkémia-reperfüzió gyulladásos kaskád rendszerének beindításában kulcsszerepük van. A citokin termelésben elsősorban a fehérvérsejtek és endothel sejtek játszanak kulcsszerepet. IR során a gyulladásos citokin szintek, mint a TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IFN- γ és ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) megemelkednek akár miokardiális, akár az alsó végtagi vázizom iszkémia-reperfüziót követően.^{142, 143} A TNF- α a gyulladás akut fázisában szabadul fel, majd szintje lecsökken a szubakut fázisban.⁴⁵ Az IL-6 többnyire a szubakut fázisban jelenik meg.¹³⁶ A TNF- α endotelsejt membránváltozásokat okoz, melynek eredménye a kapilláris átteresztőképesség növekedése, valamint megnöveli az expresszióját az IL-6, IL-8 és az MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) citokineknek.¹⁴⁰ Az IL-6 is felelős a kapilláris permeabilitás növekedéséért, ezen felül nagy szerepe van a máj akut fázis válaszában

betöltött szerepének beindításában. Összességében elmondható, hogy az IR során termelődő citokinek kölcsönhatása kiemelten fontos a létrejövő endotelialis integritás felbomlásában, illetve a leukocita aktiváció és migráció indukálásában. Ezen molekuláris és celluláris kölcsönhatások és kaszkádrendszerek miatt fontos komplexen értékelni az eredményeket egy olyan alsó végtagi IR modellben, mely vizsgálja mind a lokális, mind a távoli szervi hatásokat.

Első kísérletünk TNF- α szint eredményei alapján elmondható, hogy a poszt-kondicionálás képes volt csökkenteni az IR során kialakuló gyulladásos válaszreakciót, az IL-6 szintben viszont nem történt érdemi változás. Irodalmi áttekintés során, egér alsó végtagi IR modelljében a poszt-kondicionálás csökkentette mind a TNF- α , mind az IL-6 szinteket az IR károsodás korai reperfüziós fázisában.¹³⁸ Ezen eredményeket csak részben igazolják a kísérletünkben kapott értékek. A szérumban IL-6 szint szubakut fázisban jelentkező magas szintjéhez vélhetően hosszabb reperfüziós időszakot kellene vizsgálni. A vizsgált 4 óra reperfüzió jelen kísérleti modellben nem elegendő az IL-6 expresszió létrejöttéhez, mivel a gyulladásos kaszkád kölcsönhatásaként az IL-6 szint időben később jelenik meg.

A megnövekedett reaktív szabadgyökképződés is kiemelt szerepet játszik a generalizált gyulladás létrejöttében. A luminometriás méréseink alapján, a szérumban szabadgyök koncentrációkat a poszt-kondicionálás képes volt szignifikánsan csökkenteni. Park és mtsai.¹⁴⁴ a poszt-kondicionálás protektív hatását vizsgálták patkány alsó végtagi vázizom iszkémiás-reperfüziós modelljében. Három órás vázizom iszkémiát hoztak létre izolált érkirekesztéssel, melyet 3 óra reperfüzió követett. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a poszt-kondicionálás hatására csökkent PMN leukocita akkumulációban és következményesen mérséklődött gyulladásos válaszreakcióban nagy szerepe van a csökkent ROS és a reaktív nitrogén származékok termelésnek. Az említett szabadgyököknek fontos szerepe van az IR károsodásban. Az oxigén szabadgyököknek direkt károsító hatásukon túl génaktiváló szerepet is tulajdonítanak, melynek eredményeként a gyulladásos citokinek termelődése tovább fokozódik. A keringésben megjelenő gyulladásos mediátorok a PMN akkumuláció megnövelésével további szabadgyök képződést indukálnak, létrehozva a gyulladásos kaszkád és szabadgyök-képződés ördögi körét.

A posztkondicionálás hatásmechanizmusát alapul véve, a gyulladásos citokinek expressziója és felszabadulási karakterisztikája megváltozik. Az NF- κ B szignáltranszdukciós mechanizmuson keresztül indukálja számos gyulladásos citokin (pl. TNF- α) és adhézións molekula (ICAM, VCAM, p-, e-, l-szelektinek, CD-31, stb.) transzkripcióját. Korábbi kutatások megemlítik, hogy az adenzin fontos szerepet játszik a posztkondicionálás hatásmechanizmusában, mivel csökkenti az NF- κ B aktivitását, ezáltal következményesen a legfontosabb gyulladásos citokin, a TNF- α expresszióját.^{145, 146} A posztkondicionálás hatására felszabaduló adenzin az adenzin receptorokon keresztül aktiválja a protein-kináz C-t mely a mitokondriális membránra transzlokálódva az ATP-szenzitív K⁺ csatornák nyitását idézi elő, mellyel képes csökkenteni a szabadgyök termelődést is.¹⁴⁷ Az alacsonyabb mértékű gyulladásos mediátorképződés ezáltal hatással van a neutrofil leukocitákból felszabaduló szabadgyökképződésre is.

A szisztémás gyulladásos folyamat vizsgálata után a posztkondicionálás tüdőszövődményekre kifejtett hatását értékeltük.

A tüdő morfológiai károsodása kevésbé kiterjedtnek bizonyult a PostC csoportban. A parciális atelektázia alacsonyabb mértékben jelent meg, az alveolusok tágabbak és az alveolusfalak vékonyabbak. A tüdőkárosodás objektív, szemikvantitatív megítélésére szükséges egy szövettani pontrendszer alkalmazása. Számos közlemény található az irodalomban, amelyekben az IR indukálta tüdőkárosodás morfológiai képét szemikvantitatív pontszám segítségével jellemzik. Xia és mtsai.¹⁴⁸ a tüdő direkt IR károsodását vizsgálták patkány modellben. Az általuk alkalmazott szövettani pontrendszer eredményei alapján elmondható, hogy a posztkondicionálás alkalmazásával lehetővé vált a tüdő IR károsodásának a csökkentése. Olguner és mtsai.¹⁴⁹ a prekondicionálás hatását vizsgálták unilaterális alsó végtagi IR során patkány modellben és az alkalmazott szövettani pontszám eredményei alapján a prekondicionálás képes volt a tüdőszövődmények csökkentésére. Az irodalomban nem található egy egységesen elfogadott és általánosan használt szövettani pontrendszer, ezért kiválasztottunk egy a kísérleti modellünkhöz hasonló korábbi modellben alkalmazott pontrendszert, mely kiegészítésre került.¹²⁸ Kísérleti eredményünk alapján, mely magában foglalja a szövettani metszetek mind fénymikroszkópos és szövettani

pontszám alapján történt értékelését, a poszt kondicionálás képes volt csökkenteni a tüdő morfológiai károsodását alsó végtagi IR után.

A tüdő morfológiai képének kedvező eredményei láttán a távoli szervi tüdőkárosodás patofiziológiai folyamata alapján folytattuk kísérletünket. Lokálisan a vázizomszövetből felszabaduló mediátorok megnövelik az aktivált PMN leukociták mennyiségét, amelyek akumulálódhatnak a távoli szervek mikroereiben. A neutrofil leukociták kitapadásában és szövetközi térbe jutásában jelentős szerepet játszik a sejtek felszínén megnövekedett adhézis molekula expresszió mértéke.⁴⁴ A citokinek – mint az IL-6 – gátolják a PMN apoptózist, ezáltal növelik a PMN leukociták funkcionális aktivitását és a szövetkárosító képességüket.¹⁵⁰ A szekvesztrálódott és aktiválódott leukociták a tüdő morfológiai, mikrovaskuláris és funkcionális károsodásához vezetnek.¹⁵⁰ A szöveti MPO aktivitás érzékeny markere a gyulladásos szövetben szekvesztrálódott és aktiválódott PMN sejteknek.¹⁴⁹ Az MPO tüdőbeli aktivitásának kimutatása gyakran vizsgált paraméter IR károsodás kísérleti modelljeiben, habár értéke fiziológiásan is emelkedett, hisz normál körülmények között is nagy mennyiségű leukocita található a tüdő mikroereiben, melyet „leukocita marginális pool”-nak nevezünk.⁶⁷ Kísérletünkben a tüdő MPO aktivitása 4 óra reperfüziót követően alacsonyabbnak bizonyult a PostC csoportban az IR csoporthoz viszonyítva, ezért következtetésként levonható kísérletünk MPO eredményeiből, hogy a poszt kondicionálás képes a tüdőszövetben történő leukocita szekvesztrálódás és aktiválódás mennyiségének és mértékének a csökkentésére. Park és mtsai.¹⁴⁴ izolált vázizom IR modellben 3 óra ischaemiát és 3 óra reperfüziót hoztak létre, melyben a poszt kondicionálás szignifikánsan csökkentette a vázizomszövet MPO aktivitását. Hasonló következtetésre jutottak Tsubota és mtsai.¹⁴⁰ egér alsó végtagi IR modellben is, melyben a távoli poszt kondicionálást vizsgálták 3 óra ischaemiát és 24 óra reperfüziót követően. Takhtfooladi és mtsai.¹⁵¹ szintén patkány alsó végtagi IR során vizsgálták a melatonin antioxidáns hatását a tüdőszövődményekre nézve 2 óra ischaemiát és 24 óra reperfüziót követően. A melatonin képes volt szignifikánsan csökkenteni a távoli szervi tüdőszövődményként fellépő MPO aktivitás növekedést. Az irodalmi adatok alátámasztják saját eredményeinket, mely szerint a PMN mediált szisztémás gyulladás és tüdőkárosodás csökkenthető poszt kondicionálással. Mivel a lokálisan felszabaduló

citokinek kulcsszerepet játszanak a leukocita aktivációban, szérumban citokin szint eredményeink is megerősítik ezt a tényt.

Infrarenális aortaműtétek után, a tüdő szöveti nedvességtartalma megnövekedhet⁷⁸; ezért kísérletünkben megvizsgáltuk az intersticiális ödéma mennyiségét (W/D arány). A felszabaduló citokineknek és szabadgyököknek köszönhetően a tüdőszövetben megnövekedett kapilláris permeabilitás következik be, ezért ödémaképződés veszi kezdetét. A W/D arány alapján információt nyerhetünk a tüdő szöveti nedvességtartalmáról^{152, 153}, százalékosan kifejezve a tüdőszövetben kialakuló intersticiális és alveolaris ödémát. Egy korábbi kísérletben kimutatták, hogy a tüdő direkt IR károsodását követően a poszt-kondicionálás képes volt csökkenteni a tüdő W/D arányát.¹⁵⁴ Sharma és mtsai.¹⁵⁵ is megerősítik, hogy ha a tüdő direkt IR károsodást szenved, megnövekszik az érpermeabilitás és intersticiális ödéma alakul ki. Alsó végtagi patkány IR modellben szintén W/D arány számítása alapján bizonyították, hogy a melatonin képes szignifikánsan csökkenteni a tüdő szöveti nedvességtartalmát.¹⁵¹ Bilateralis patkány alsó végtagi IR modellben vizsgálták a $MgSO_4$ hatását a tüdőkárosodásra nézve és a W/D arány számítása alapján szignifikánsan alacsonyabb fokú tüdőszöveti ödéma alakult ki a kezelés hatására.¹⁵⁶

Eredményeink alapján – melyeket az irodalmi adatok alátámasztanak - alacsonyabb fokú szöveti ödéma alakult ki a PostC csoportban az IR csoporthoz hasonlítva. A W/D arány alapján megállapítható, hogy a tüdő extracelluláris szöveti nedvességtartalma csökkenthető poszt-kondicionálással, mely az alacsonyabb fokú érpermeabilitásból adódhat.

Az artériás pO_2 a pulmonalis oxigénfelvételtől, míg az artériás pCO_2 az alveolaris ventilációról ad információkat. Kísérletünkben a poszt-kondicionált állatok artériás vér oxigenizációja javuló tendenciát mutatott, szignifikánsan magasabb értéket kaptunk a reperfüzió második és negyedik órájának a végén. Az IR csoporttal összehasonlítva az artériás pCO_2 értéke csökkent, melyből következtetésként levonható, hogy az alveoláris ventiláció is javult. Hasonló eredményre jutottak Yasa és mtsai.¹⁵⁷ is, akik nyúl alsó végtagi IR modellben 60 perc iszkémiát és 4 óra reperfüziót hoztak létre. Kísérletünkben a távoli szervi tüdőkárosodás csökkentésének a mértékét vizsgálták levosimendan alkalmazásával, melynek effektora a poszt-kondicionálás hatásmechanizmusában is fontos szerepet játszó ATP szenzitív K^+ csatorna. A

levosimendan szignifikánsan csökkentette a távoli szervi tüdőkárosodást és javította a tüdőfunkciót a vizsgált vérgázparaméterek eredményei alapján.

Kísérletünk vérgáz paramétereinek kedvező értékei az alacsonyabb mértékű atelectasianak, a vékonyabb alveolaris falaknak, az alacsonyabb mértékű leukocita infiltrationnak és a csökkent intersticiális ödémának köszönhetőek.

Olyan károsító hatásokra, mint az IR, a gyulladásra adott endogén protektív szöveti válaszreakció mértéke megnövekszik. Ezen intracelluláris protektív mechanizmusnak a jelenléte hatékonyan vizsgálható a szöveti hsp72 szint mérésével. A hősokk fehérjék molekuláris chaperonokként viselkednek, részt vesznek a károsodott fehérjék szerkezetének kijavításában és az intracelluláris fehérje konformációs homeosztázis fenntartásában.¹⁵⁸ Korábbi kísérletekben bizonyították a hsp72 védő hatását különböző szervek IR károsodása során, úm.: máj^{159, 160}, szív¹⁶¹, agy¹⁶² és vese¹⁶³. Korábbi tanulmányok kimutatták továbbá azt is, hogy a hsp72 fokozott termelődése kapcsolatban áll a mitokondriális citokróm-c felszabadulás csökkent mértékével¹⁶⁴, valamint a poszt kondicionálás agyi iszkémia alatt képes volt növelni az agy szöveti hsp72 szintjét¹⁶⁴. Kísérletünkben a hsp72 expresszió megnövekedett az IR csoportban, mely az alsó végtagi IR károsító hatása következtében fellépő súlyos tüdőkárosodására vezethető vissza. Ezzel ellentétben a PostC csoportban a szöveti hsp72 szint csak egy enyhe, nem szignifikáns mértékben emelkedett meg. Feltételezésünk szerint ezen protektív fehérje alacsonyabb expressziója a tüdőszövet alacsonyabb mértékű károsodásának a következménye. Egy alacsonyabb károsodás során a sejtnak nincs szüksége a saját protektív mechanizmusainak a nagyobb mértékű triggerelésére. Ezen megállapításaink korrelációban állnak más kísérletek eredményeivel is. Gedik és mtsai.¹⁶⁵ infrarenális aorta kirekesztést követően a heparin jótékony hatását vizsgálták, mely képes volt csökkenteni a távoli szervi tüdőszövődményeket, és a tüdőszöveti hsp70 alacsonyabb mértékben expresszáldott. Eredményeik megerősítik feltételezésünket, mely szerint „ezen citoprotektív fehérje szintje megnövekszik IR során és direkt kapcsolatban van a szöveti károsodás és gyulladás fokával”.

Az első kísérletünk lokális vázizom vizsgálati eredményei alapján merült fel a kérdés, hogy vajon milyen mértékű különbség adódhat az alsó végtagi IR modellekben alkalmazott különböző érkirekesztő módszerekkel létrehozott vázizom iszkémia

fokában. Alsó végtagi IR modellek felállítása során a fennmaradó kollaterális keringés jelentősége mindig központi kérdésként merül fel²¹. Az I. kísérlet során az alsó végtagi iszkémia elérése infrarenális aortakirekesztéssel történt, azonban a lokális vázizomkárosodás 3 óra ischaemiát és 4 óra reperfüziót követően - a vázizom szövettani képei alapján - nem mutatott markáns eltérést az áloperált csoporthoz képest még az IR csoportban sem. Emellett a további vizsgálataink (laboratóriumi, izomrost életképesség, szérum gyulladásos paraméterek) rámutatnak, hogy szubcelluláris szintű károsodás fellép aortaklipp alkalmazását követően is. Ekkor kezdtük vizsgálni a vázizomkárosodás mértékét tourniquet-val létrehozott IR modellben.

A komplett iszkémia (a vérellátás teljes megszűnése, beleértve a kollaterális keringést is) létrehozása a legalkalmasabb, hogy megítéljük az IR szövetekre kifejtett hatásait, mivel az iszkémia mértéke állandó és a modell könnyen reprodukálható. A tourniquet széles körben alkalmazott módszer, mivel a nagy alsó végtagi vázizomzatban képes komplett iszchémiát, így nagymértékű izomkárosodást létrehozni¹⁶⁶. A tourniquet alkalmazása bevált módszer ortopédsebészeti szituációk modellezésére, melyek során a teljes iszkémia esszenciális a vértelenségben történő operációhoz. Ezzel ellentétben akut iszkémia klinikai szituációjának a modellezésére nem minden esetben alkalmazható, mivel egy klinikailag fellépő akut érelzáródás során legtöbbször fennmarad bizonyos mértékű kollaterális keringés és így komplett iszkémia nem áll fenn.

Az infrarenális aorta kirekesztése elegendő ahhoz, hogy szignifikánsan csökkenjen a végtagi véráramlás és olyan mértékű iszchémiát hozzunk létre a legtöbb állatmodellben, mely izomsejtnekrózist okoz, még az esetlegesen fennmaradó kollaterális keringés ellenére is²¹. A különböző érkirekesztési technikáknak a hátránya, hogy nem ítéltető meg egységesen és standard módon a fennmaradó kollaterális keringés mértéke, mely így befolyásolhatja a kísérleti eredményeket és a modell reprodukálhatóságát¹⁶⁷.

A fent részletezésre került tények alapján a II. kísérletünkben az infrarenális aorta okklúzió és alsó végtagi tourniquet hatását hasonlítottuk össze patkány modellben. Annak ellenére, hogy az alsó végtagi IR széles körben kutatott témakör, még mindig nem rendelkezünk kielégítő eredményekkel arra vonatkozóan, hogy a kollaterális erek jelentős mértékű reziduális keringést tartanak-e fent infrarenális aorta okklúzió patkány

modellben. Ezen felül korábban nem vizsgálták parallel az alsó végtagi tourniquet és az infrarenális aorta okklúzió hatását azonos kísérleti körülmények között.

A korábbi kísérleti modellünkben már alkalmazott 3 órás alsó végtagi iszkémiát aortaklippel hoztuk létre, majd egy következő kísérleti elrendezésben az iszkémia tourniquettel került létrehozásra. A 3 óra alkalmas időtartamnak tűnik a csoportok közötti különbség értékelésére, hiszen ezen időtartam még reverzibilis károsodásnak tekinthető tourniquet alkalmazása esetén illetve infrarenális aortakirekesztéssel is létrehozható már érzékelhető izomkárosodás¹⁶⁷. Az iszkémiás időtartamot 4 óra reperfúzió követte, mely elegendő idő a lokális IR vázizomkárosodás kialakulásához. A vázizom szövettani és laboratóriumi vizsgálatok során látható, hogy a tourniquet jelentősen nagyobb mértékű károsodást okozott, mint az aortaokklúzió.

A szérumban CK és LDH nekroenzimszintek megemelkedése vázizom IR során fontos markereknek tekinthetők. Korábbi kutatások is bizonyították, hogy a CK szint jelentősen megemelkedik tourniquet alkalmazása során^{168, 169}. Ezeket az eredményeket erősítik meg a kísérletünkben tapasztalt változások is.

Infrarenális aortakirekesztéssel létrehozott alsó végtagi iszkémia lassabb és sokkal elnyújtottabb megemelkedését okozza a szérumban CK szintnek a reperfúzió első 4 órájában¹⁶⁹.

Akut artériás érelzáródás következtében fellépő alsó végtagi iszkémia rabdomiolízissel jár, melynek következtében megnő a szérumban K^+ szint, mely fontos IR markernek tekinthető¹⁷⁰, és magas értéke kiterjedt rabdomiolízist jelez.¹⁷¹ Korábbi IR állatkísérletek során is bizonyították a rabdomiolízis során megemelkedő szérumban K^+ szintet.¹⁷² Kísérletünkben mindkét csoportban a szérumban káliumszint jelentős emelkedése tapasztalható, mely összhangban van az irodalmi adatokkal.

A vázizomkárosodás laboratóriumi vizsgálata alapján összességében elmondható, hogy az infrarenális aortakirekesztés alkalmazásával mind a CK, LDH és K^+ szint alacsonyabb mértékben emelkedik meg, mint a tourniquet esetén. Ezt támasztják alá a vázizomszövettani vizsgálatok is. Korábbi kutatások kimutatták, hogy 3 óra tourniquettel létrehozott iszkémia izomrost nekrozist eredményezett, de nem történt irreverzibilis izomkárosodás^{173, 167}. Kísérletünkben a tourniquet indukálta iszkémia a vázizom fénymikorszkópos valamint izomrost életképességi vizsgálata alapján nagyobb mennyiségű nekrotikus rostot és az izomrostéletképesség szignifikáns

csökkenését okozta összehasonlítva az infrarenális aortaokklúzióval, mely esetén majdnem változatlan morfológiai kép ábrázolódott.

A TNF- α fontos szerepet játszik a neutrofil aktivációban és az adhézíós molekulák endotél sejteken és granulocitákon történő expressziójában¹⁴¹, így a gyulladásos folyamat iniciátor molekulájának tekinthető. Szérumszintjének a meghatározása alkalmas paraméter a korai gyulladásos válasz mértékének megítélésére. Kísérletünkben mindkét csoportban az iszkémia hatására megnövekedett a szérum TNF- α szint, mely összhangban van a korábbi irodalmi adatokkal, melyek szerint iszkémiás izomkárosodás hatására megnövekszik ezen proinflammatorikus citokin szintje^{143, 174}. A tourniquet csoportban szignifikánsan magasabb TNF- α szint mutatkozik, melyből az a következtetés vonható le, hogy sokkal súlyosabb gyulladásos reakció történik a komplett iszkémia hatására. Ezzel ellentétben az infrarenális aortaokklúzió nem okoz olyan súlyos gyulladásos választ.

Az akut végtagi iszkémia során kialakuló IR károsodás távoli szervi szövödményeit tekintve a tüdő mellett a vese tekinthető a másik legfontosabb szervnek. Ezen oknál fogva III. kísérleti modellünk felállításával olyan terápiás lehetőséget kerestünk, amely alkalmas ezen érsebészeti betegség műtét utáni lokális vázizom és veseszövödményeinek a kezelésére. A különböző farmakológiai intervenciók^{119, 175} alkalmas módszerek lehetnek iszkémia-reperfúzió során a lokális vázizomszövet és távoli szervi vesekárosodás kivédésében.¹⁷⁶

A transzplantációs gyakorlatban immunszuppresszió elérésére a ciclosporin –A (CsA) régóta használatos gyógyszer és hatékonyságát IR károsodás során korábbi kutatások széles körben vizsgálták.¹⁷⁷ Ezen felül az irodalomban fellelhetők publikációk, amelyekben klinikai eredményekről is beszámolnak¹⁷⁸, de a klinikai gyakorlatban a CsA nem használatos IR károsodás megelőzésére. A legfőbb probléma a CsA-val, hogy számos mellékhatása van, többek között immunszuppresszió, nefrotoxicitás, hepatotoxicitás. A számos mellékhatás miatt egyelőre kérdéses ezen gyógyszer alkalmazhatósága a humán gyakorlatban.

A CsA IR károsodást kivédő szerepét és célpontját szubcellulárisan, a mitokondriumok szintjén kell keresni. Az iszkémiás-reperfúziós károsodásban vezető szerepet játszanak a mitokondriumok. Amennyiben a mitokondriális membrán depolarizálódik, ez jelentősen veszélyezteti az energiatermelést és sejtkárosodáshoz,

majd sejthalálhoz vezet. A mitokondriális membránban elhelyezkedő óriáscsatornák az ún.: mitochondrial permeability transition pore (mPTP) csatornák megnyílása kulcsfontosságú az IR károsodásban. Számos protein részt vesz a csatorna felépítésében, melyek közül a ciklofillin-D meghatározó fontosságú.³⁶ Az mPTP csatornák inhibitora a CsA, mely az mPTP csatorna ciklofillin-A és -D molekulájához is kötődik, létrehozva a csatornanyitást gátlása mellett az immunszuppresszív mellékhatásokat is.^{108, 179-181}

Ideális lenne egy olyan farmakológiai vegyület, amely alkalmas az iszkémiás-reperfüziós károsodás kivédésére, mellékhatások nélküli, specifikus, a használata egyszerű, gyors és hatékony. Az N-metil-4-izoleucin ciclosporin (NIM-811) a CsA egy nem immunszuppresszív derivátuma, mely nem kötődik az immunszuppresszív hatásokért felelős ciklofillin-A-hoz, viszont a ciklofillin-D-hez kötődésével megakadályozza az óriáscsatorna megnyílását. A NIM-811 hatalmas előnye a CsA-val szemben, hogy nincs ismert káros mellékhatása. Rosenwirth és mtsai.¹¹⁸ in vivo kísérletekben, amelyekben graft-versus-host patkány modellt használtak, a NIM-811-et nem találták immunszuppresszívnek, ezzel ellentétben a CsA meggátolta a nyirokcsomó megnagyobbodást.¹¹⁸ Ezen kutatócsoport egy másik vizsgálatában kimutatta, hogy CsA adását követően 10 nappal megnövekedett a patkányok szérum kreatinin szintje és csökkent a kreatinin clearance. Ha NIM-811-et kaptak a patkányok, akkor mindkét vesekárosodást jelző marker változatlan maradt, tehát alacsonyabb nefrotoxicitású mint a CsA.¹¹⁸

Harmadik kísérletünkben kérdésfelvetésünk arra irányult, hogy vajon a NIM-811 képes-e befolyásolni az alsó végtagi rhabdomyolízis mértékét, valamint a következményes távoli szervi vesekárosodás kialakulását 3 óra alsó végtagi ischaemiát és 4 óra reperfüziót követően, patkány modellben.

Második kísérletünk eredményei alapján egyértelmű következtetést vonhatunk le arra vonatkozóan, hogy komplett ischaemiát kizárólag alsó végtagi tourniquet alkalmazásával érhetünk el. Olyan modell felállítása volt a célunk, melyben kísérletes körülmények között állandó, minden állatban azonos módon reprodukálható alsó végtagi iszkémia hozható létre, nagyfokú izomkárosodással. Ezáltal egy ilyen, nagymértékű alsó végtagi IR károsodás során objektíven lehetővé válik egy új specifikus farmakológiai szer hatásának a vizsgálata.

Az alsó végtagi IR károsodás lokális vázizom-szövődményeinek vizsgálatával kezdődött kísérletünk értékelése. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a NIM-811 képes csökkenteni az infarktus méretét szívizom iszkémia-reperfúzióját követően. Argaud és mtsai.¹¹⁹ kísérletükben felnőtt nyulak 30 perces a. circumflexa leztorítása és 4 óras reperfúziója során azt találták, hogy a CsA és NIM-811 kezelés szignifikáns mértékben csökkentette az infarktus méretét. Lim és mtsai.¹⁸² a CsA hatását vizsgálták eger miokardiális iszkémiás-reperfúziós modellben. Kimutatták, hogy i.v. CsA kezelés IR során képes csökkenteni az infarktus méretét a kontroll csoporthoz képest. A ciclosporin-A kedvező hatásait már számos IR-kórképben sikerrel kimutatták^{120, 183, 115, 184}, sőt alsó végtagi IR esetében is alkalmasnak találták¹⁸⁵, azonban idáig alsó végtagi érbetegségeken kialakuló IR során a NIM-811 hatását még nem vizsgálták, pedig a rhabdmiolízis és ennek távoli szervi szövődményei igen gyakoriak alsó végtagi artériás érműtétek után.

Az irodalomban összesen két közlemény található, amelyek autogén transzplantáció és replantáció alkalmazásával vizsgálták és hatásosnak találták a NIM-811-et vázizomszövet IR során^{186, 175}. Vázizom vizsgálati eredményeinkben mi is hasonló következtetésre jutottunk. Az IR csoport izomszövettani metszetein jelentős nekrozis, izomrost szétesés és ödéma látható, szemben a NIM-IR csoport szinte egészséges képével. Cheng és mtsai.¹²³ a NIM-811 hatását vizsgálták patkány vékonybél IR modellben. Az általunk kapott vázizom szövettani eredményekkel összhangban azt találták, hogy a NIM-811 hatékony vékonybél iszkémiás-reperfúziós károsodásának a csökkentésére. A 3 óras kirekesztés alatt létrejövő rhabdmiolízis során anyagcseretermékek, nekroenzimek és ionok szabadulnak fel a szisztémás keringésbe. Kísérletünkben a NIM-811 kezelés szignifikánsan csökkentette ezen nekroenzimek és ionok mennyiségét, mely a NIM-811 sejthalált gátló tulajdonságából (mPTP csatorna gátlás) adódóan az alacsonyabb mértékű izomrost szétesésnek tulajdonítható. Eredményeinket alátámasztják azon irodalmi adatok, melyek szerint különböző kondicionálási eljárások (prekondicionálás, poszt kondicionálás), valamint a CsA és a NIM-811 alkalmazásával vázizomszövet IR modelljében az LDH szint és a rhabdmiolízis szignifikáns mértékben csökkent.¹⁷⁵

A vázizomszövet IR károsodása során megnövekszik az érpermeabilitás, a plazmaproteinek extravazációja következtében fokozódó intersticiális ödéma alakul

ki.¹⁸⁷ Vizsgálatunkban a W/D arány alapján értékeltük az alsó végtagi szöveti ödéma mértékét. A NIM-811 kezelés hatására szignifikánsan alacsonyabb mértékű szöveti nedvességtartalmat mértünk az IR csoporthoz képest. Ezen megállapításunkkal megegyeznek a korábbi vizsgálatok eredményei, melyek a CsA hatását vizsgálták a vázizom intersticiális folyadéktartalmát illetően. Troitzsch és mtsai.¹⁸⁸ a CsA hatását vizsgálták nyúl vázizom IR modellben. Kísérletükben 4 órás iszkémiát 2 óra reperfüzió követett. A W/D arány eredményei alapján a CsA kezelt csoportban csökkent ödéma képződést figyeltek meg.

Az IR károsodás patofiziológiájában központi szerepet játszanak a mitokondriumok, ezért a szubcelluláris szintű izomkárosodás pontosabb detektálására alkalmaztuk a NADH-tetrazolium enzimhisztokémiát. A reakció a mitokondriumok épségének, így az izomrostok életképességének detektálására alkalmas.¹⁸⁹ Mowlavi és munkatársai¹⁹⁰ patkány vázizom IR modellben NADH-enzimhisztokémiával kimutatták, hogy a CsA képes növelni az izomrost életképességet a kontroll csoporthoz viszonyítva. Ezt támasztják alá saját eredményeink is tekintve, hogy a NIM-IR csoportban szignifikánsan magasabbnak bizonyult a működő mitokondriumok száma. A NIM-811 a mitokondriális mPTP csatornákra ható vegyület, gátolja a potenciálisan végzetes csatornanyitást a reperfüzió kezdetén.¹¹⁹ A csatornanyitás gátlásával megelőzhető a mitokondriális nagy energiájú foszfát metabolizmus változása és a mitokondriális diszfunkció¹⁹¹, ezáltal magasabb marad az életképes mitokondriumok száma. Szintén Troitzsch és mtsai.¹⁸⁸ vizsgálatukban mitokondriális életképesség index számításával kimutatták, hogy a CsA kezelés képes megőrizni a vázizomszövet életképességét IR károsodást követően.

Kísérletünkben megvizsgáltuk a vázizomszövet mikrocirkulációs változásait, melyek monitorizálása során az IR csoport reperfüziós áramlási értékeihez képest szignifikánsan magasabb áramlást regisztráltunk NIM-811 kezelés hatására. Ennek hátterében a sejtszintű energiaháztartás integritásának megőrzése állhat. Az energiaháztartás kisebb mértékű zavara alacsonyabb fokú izomsejt nekrozist és gyulladást eredményez, melynek következményeként alacsonyabb mennyiségű intersticiális nedvességtartalom alakul ki, amely hozzájárul a mikrovaszkularis erek elzáródásának és külső komprimációjának mérséklődéséhez, ezáltal az un. „no-reflow” jelenség¹⁶ megjelenési valószínűsége is csökken. A mikrocirkuláció integritása kiemelt

fontosságú a végtag túlélése szempontjából alsó végtagi IR során. Komplet iszkémia hatására a mikrocirkulációs keringés teljes mértékben megszűnik. Korábban kimutatták, hogy 4 óra reperfüziót követően a vázizom kapillárisok áramlási sebességében 50%-os csökkenés figyelhető meg.¹⁹² Rieber és mtsai.¹⁹³ is beszámoltak a CsA mikrocirkulációra kifejtett pozitív hatásairól humán szív IR-t követően szívtranszplantáció során. A vegyület képes volt a mikroerek funkciómegőrzésére, melynek fontos hatása van a graft hosszútávú funkcióira nézve szívtranszplantációt követően.

Az alsó végtagi IR károsodás szisztémás szövődményeinek hátterében a lokális gyulladásos folyamat generalizálódása áll (SIRS), ezért folytattuk kísérletünket a szisztémás gyulladásos paraméterek vizsgálatával.¹⁹⁴ A SIRS kialakulását bizonyítja a 3 órás kirekesztés után bekövetkező szignifikáns keringésmegingás mind az IR, mind a NIM-IR csoportban. A folyamat során gyulladásos mediátorok és citokinek szabadulnak fel, melyek közül a pro-inflammatorikus citokineket tartják kulcsszereplőknek. Kísérletünkben a TNF- α szint mérése során NIM-811 kezelés hatására szignifikánsan alacsonyabb értéket kaptunk és az IL-6 szint is csökkent. Eredményeinkkel megegyeznek Squadrito és munkatársainak¹⁹⁵ adatai, mely szerint szívizom iszkémia-reperfüziót követően a ciclosporin-A képes volt csökkenteni a szisztémás TNF- α szintet ezáltal a szisztémás gyulladás kialakulását.

A szisztémás gyulladás vizsgálatát követően a veseszövődmények értékelésére került sor. A rhabdmiolízisben szenvedő betegek nagymértékben veszélyeztetve vannak akut veseelégtelenség kialakulására.⁵⁰ Miller és mtsai.¹⁹⁶ is bizonyították a kapcsolatot alsó végtagi artériás érműtéteket követő iszkémia és a posztoperatív vesekárosodás között. Reperfüziós szindróma esetén létrejövő veseelégtelenségben a verőereken alkalmazott kirekesztési idő a legfontosabb prediktív kockázati tényező. Vázizom IR során kialakuló rhabdmiolízis a legfontosabb veseelégtelenséget meghatározó tényező thoracoabdominalis aortaműtéteket követően¹⁹⁶.

Jelen kísérleti modellünkben a NIM-811 kezelés az alsó végtagi vázizomrostok mitokondriális mPTP csatornáira kifejtett hatása a fő támadáspont, mely által közvetve van hatással a vesekárosodásra. Hasonló elv alapján Cour és mtsai.¹²¹ szív megállás után újraélesztett nyulakban vizsgálták a NIM-811 hatását az un. post-cardiac arrest

szindróma vesehatásaira és eredményeikben azt találták, hogy a kezelés javította a rövidtávú túlélést és a vesefunkciót.

A rabdomiolitikus veseszövődményekben a csapadékképződés és tubuláris sejtkárosodás központi szerepet játszik. A vese szövettani vizsgálata során az IR csoportban tubuláris sejtnekrózis és intracelluláris vakuolizáltság jelenik meg, mellyel szemben a NIM-IR csoportban jelentősen javuló szövettani kép látható, melyet alátámaszt a számított veseszövettani pontszám eredménye is. A NIM-IR csoportban a vázizom vizsgálati eredmények alapján alacsonyabb fokú izomkárosodást tapasztaltunk, melyből adódóan alacsonyabb a bomlástermékek és gyulladásos faktorok felszabadulása, mely magyarázat lehet a javuló veseszövettani képekre.

Felmerül a kérdés, hogy rendelkezik-e direkt hatással a NIM-811 a vesében lévő mitokondriumokra nézve, hiszen szisztémásan kerül használatra a gyógyszer. Jelen patofiziológiai folyamat elsődleges lépése a vázizomkárosodás kialakulása és következményesen a felszabaduló gyulladásos faktorok és molekulák, amelyek károsító hatásúak a vesére nézve. Ezen oknál fogva a vázizomzat tekinthető az elsődleges terápiás célpontnak. Mindazonáltal, a veseszöveti mikrocirkuláció eredményei alátámaszthatják, hogy a NIM-811-nek nincs a vesére kifejtett direkt hatása.

A vese mikrocirkuláció vizsgálata során a véráramlás nem változott szignifikánsan az IR és NIM-IR csoport között. Renális vazokonstrikció kialakul mindkét csoport tekintetében, mely az irodalmi adatok alapján is fellép rabdomiolízis során⁵⁸, azonban jelen kísérleti körülmények között a NIM-811 kezelés nem volt hatással a vese mikrocirkulációs változásaira. A tény, hogy a NIM-811 képes volt csökkenteni az alsó végtagi kirekesztés következtében fellépő vesekárosodást, valamint az, hogy nem volt képes befolyásolni a vese mikrocirkulációját arra enged következtetni, hogy a NIM-811 veseprótektív hatását nem közvetlen a veseszövetben és főként nem a keringés modulálásán keresztül fejt ki.

Alsó végtagi IR távoli szervi vesekárosodásában a szabadgyökstressz fontos szerepet játszik.^{197, 58} A szabadgyök képződésnek két fő útvonalát ismerjük, az oxidatív és a sokkal gyorsabban lejárászó nitroztív reakciókat. A nitroztív stressz során a szuperoxid szabadgyökök (O_2^-) a nitrogén-monoxiddal (NO) reakcióba lépve az un. reactive nitrogen species-eket eredményezik, létrehozva a peroxinitrit ($ONOO^-$) aniont. A peroxinitrit számos sejtkárosító hatással rendelkezik¹⁹⁸⁻²⁰². Kísérletünkben a NIM-

811 alkalmazás következtében szignifikánsan csökkent a vesében képződő peroxinitrit mennyisége. Megvizsgáltuk az oxidatív stressz mértékét is, de jelen kísérleti modellben nem következett be számottevő változás a kezelés hatására. Ez azt feltételezi, hogy a szuperoxid anion semlegesítése nem a hidrogén-peroxid, hanem a sokkal gyorsabb reakció, a peroxinitrit képződés irányában tolódik el és a NIM-811 kezelés kedvező irányban befolyásolja a nitroatív stressz károsító hatását. Ezen megállapításunk szorosan korrelál Packer és mtsai.²⁰³ eredményeivel. Vizsgálatukban kimutatták, hogy a peroxinitrit indukálja a mitokondriális mPTP csatorna nyitását izolált mitokondriumokban, mely zavart kelt a sejt Ca^{2+} -homeosztázisában ezzel hozzájárulva a sejtkárosodáshoz. Ez a folyamat megelőzhető cyclosporin-A adásával.

A rabdomiolízis során kialakuló veseelégtelenséget prerenális és renális okok hozzák létre, döntően a tubuláris károsító hatások érvényesülésével. A szövettani metszetek fénymikroszkópos vizsgálata és a szövettani pontszám eredményei azt mutatják, hogy a tubuláris károsodás mérséklődik NIM-811 kezelés hatására. Ezek alapján, laboratóriumi vizsgálatokon és számított veseparamétereken keresztül megvizsgáltuk, hogy a kedvezőbb hatás megjelenik-e a vese funkciókban is. A vizeletkiválasztás mértéke szignifikánsan magasabbnak bizonyult a NIM-IR csoportban, mely független az állatok folyadékfelvételétől, hiszen a teljes kísérlet során minden állat standard 5 ml/ttkg/óra folyamatos folyadékinfúziót kapott a jugularis vénás kanülön keresztül.

A vesefunkciók részletesebb vizsgálatához számított veseparaméterek alkalmazására került sor. Kísérletünkben NIM-811 kezelés hatására szignifikáns mértékben csökkent a szérum kreatinin szint. A számított vesefunkciós paraméterek segítségünkre voltak azon tény alátámasztásában, hogy ez valóban a kevésbé károsodott tubularis sejteknek köszönhető-e. A NIM-IR csoportban magasabb a BUN/kreatinin hányados, mely egyrészt az alacsonyabb kreatinin szintnek és a magasabb BUN értéknek köszönhető. A karbamid glomeruláris excretio után tubuláris reabszorpcióra kerül, mely nem történik meg, ha a tubulussejtek károsodottak/elhaltak. Tehát a magasabb BUN/plazma-kreatinin szint a NIM-IR állatoknál kisebb mértékű tubuláris károsodására enged következtetni.

A frakcionált Na^+ -exkrécio kifejezi, hogy a filtrált Na^+ mennyiségének hány százaléka választódik ki a vizelettel. A Na^+ nagy része a proximalis tubularis sejteken

keresztül reabszorpcióra kerül. Minél nagyobb mértékben károsodottak a tubularis sejtek, annál nagyobb mértékű lesz a Na^+ kiválasztása a filtrált vizeletben. A NIM-IR csoport szignifikánsan csökkent frakcionált Na^+ -exkréció mértéke szintén alátámasztja a NIM-811 kedvező hatását a tubularis funkcióra nézve.

A III. kísérletünkben tehát rávilágítottunk egy olyan új farmakológiai kondicionálási eljárásra, mely alkalmas lehet alsó végtagi iszkémia-reperfúzió szövődményeinek a csökkentésére.

A dolgozat rövid összegzéseként elmondható, hogy a posztkondicionálás ígéretes módszernek tűnik alsó végtagi IR távoli szervi szövődményeinek a pozitív irányú befolyásolására, hiszen kedvezően hatott az általunk felállított alsó végtagi IR patkánymodell szisztémás és tüdőszövődményeire. Az érkirekesztési módszerek közül megvizsgáltuk a tourniquet és aortaklipp közötti különbséget az izomkárosodás mértékére nézve, mellyel rávilágítunk a modellalkotás jelentőségére IR károsodás vizsgálata során. A farmakológiai kondicionálási eljárások közül a NIM-811 kezelés pedig eredményesen csökkentette a lokális vázizom, szisztémás és veseszövődményeket tourniquet-tel létrehozott alsó végtagi IR esetén.

6. Következtetések

I. kísérlet:

1. Az elvégzett izomrost életképességi és laboratóriumi nekroenzim vizsgálatok alapján megfigyelhető vázizomkárosodás az általunk felállított kísérleti modellben, azonban a posztkondicionálás a fénymikroszkópos szövettani kép szerint nem csökkentette szignifikánsan a lokális vázizomkárosodás mértékét.
2. A posztkondicionálás képes volt csökkenteni a szisztémás gyulladás mértékét a szérum gyulladásos paraméterek vizsgálata alapján. A vizsgált 4 órás reperfúziós időtartam elegendőnek bizonyult a szérum szabadgyök szint és az akut fázisban megjelenő TNF- α szint változásának kimutatásához, azonban a szubakut fázisban megjelenő IL-6 szint a reperfúzió első 4 órája alatt nem mutatott érdemi változást posztkondicionálás hatására.
3. A patkány alsó végtagi iszkémia-reperfúzió következtében fellépő tüdőkárosodás mértéke eredményesen csökkenthető posztkondicionálás alkalmazásával. A módszer hatására kevésbé jelenik meg a tüdőszöveti leukocita szekvesztrálódás és aktiválódás, mérsékeltebb szöveti ödéma alakul ki, mely a távoli szervi tüdőkárosodás patofiziológiai folyamatát tekintve az alacsonyabb mértékű kapillárispermeabilitásból adódhat. A posztkondicionálás következtében a reperfúzió ideje alatt szignifikáns mértékben javult az állatok pulmonális oxigénfelvétele.

II. kísérlet:

1. A vázizom szövettani, izomrost életképességi és laboratóriumi vizsgálatai alapján látható, hogy az alsó végtagi tourniquet szignifikánsan nagyobb mértékű károsodást okozott, mint az aortaklappal történő okklúzió. A tourniquet-tel létrehozott iszkémia szignifikánsan magasabb TNF- α szintet eredményezett, melyből az a következtetés vonható le, hogy sokkal súlyosabb gyulladásos reakció történik a komplett iszkémia hatására. Ezzel ellentétben az infrarenális aortaokklúzió nem okoz olyan súlyos gyulladásos választ.

III. kísérlet:

1. Három óra tourniquet-tel létrehozott alsó végtagi iszkémia, majd 4 óra reperfúziót követően a NIM-811 kezelés szignifikáns mértékben csökkentette a lokális vázizomkárosodás mértékét. A vázizomszöveti ödéma mértéke szignifikáns csökkenést mutat, valamint a vázizomszövet mikrocirkulációs változásainak monitorizálása során szignifikánsan magasabb áramlási értékeket regisztráltunk.
2. Kísérletünkben a NIM-811 kezelés képes volt csökkenteni a szérum TNF- α és IL-6 szinteket, tehát a szisztémás gyulladásos válaszreakció mértékét.
3. Alsó végtagi iszkémiás-reperfúziós patkány modellben alkalmazott NIM-811 kezelés eredményesen csökkentette a távoli szervi diszfunkcióként megjelenő vesekárosodást. Az alkalmazott farmakológiai szer hatására kevésbé alakultak ki a vesében hisztopatológiai eltérések, valamint szignifikáns mértékben javultak a vesefunkciók. A szabadgyök stressz mértékét meghatározó vizsgálataink alátámasztják, hogy kísérleti modellünkben a veseszöveti nitrozatív stressz jelentős szerepet játszik, melyet a NIM-811 kezelés szignifikáns mértékben képes csökkenteni.

7. Összefoglalás

Bevezetés: Alsó végtagi akut artériás érelzáródások és műtéti megoldásuk utáni iszkémiás-reperfúziós (IR) károsodás lokális, szisztémás és távoli szervi szövődményeinek a megelőzésére számos próbálkozás történt az elmúlt évtizedek során, azonban a mai napig nincs egységesen elfogadott terápiás módszer. A terápiás eszközök kifejlesztésének két fő kutatási irányvonala különböztethető meg, melyek a sebésztechnikai és farmakológiai kondicionálási eljárások.

Célkitűzés: Célul tűztük ki olyan akut alsó végtagi iszkémiás-reperfúziós patkánymodellek létrehozását, melyekben potenciálisan megjelennek az IR távoli szervi szövődményei. A távoli szervek két leginkább érintett képviselője – tüdő, vese – károsodásának mérséklését szeretnénk volna elérni a sebésztechnikai posztkondicionálás és farmakológiai NIM-811 kezelés alkalmazásával. Célunk volt továbbá az aortaklippel és tourniquet-tel létrehozott IR károsodás mértékének összehasonlítása.

Módszerek: Kísérleteinkhez hím Wistar patkányokat használtunk. A posztkondicionálás hatékonyságának vizsgálatát aortaklippel, míg a NIM-811 kezelés hatását tourniquet-tel létrehozott iszkémiás-reperfúziós modellben vizsgáltuk. A lokális vázizomkárosodás megítélésére fénymikorszkópos szövettani, laboratóriumi, izomrost életképességi vizsgálatokat alkalmaztunk. A szisztémás szövődmények jellemzése gyulladásos citokinek, ill. szabadgyökök szérumszintjének mérésén keresztül történt. A távoli szervi szövődményként megjelenő tüdő és vese károsodásokat szövettani, laboratóriumi, spektrofotometriás, szöveti ödéma index és funkcionális vizsgálatok meghatározásával jellemeztük.

Eredmények: A posztkondicionálás eredményesen befolyásolta a szisztémás és tüdőszövődményeket aortaklippel létrehozott alsó végtagi IR modellben. A tourniquet-tel létrehozott alsó végtagi IR szignifikánsan súlyosabb vázizomkárosodás és szisztémás gyulladásos válaszreakció létrehozására képes az aortaklipp károsító hatásához viszonyítva. A NIM-811 kezelés hatékonynak bizonyult tourniquet-tel indukált alsó végtagi IR lokális, szisztémás és vese- és tüdőszövődményeinek a tekintetében.

Következtetés: A posztkondicionálás és NIM-811 kezelés hatásos lehet akut alsó végtagi IR során megjelenő tüdő- és vesekárosodás kivédésében.

8. Summary

Introduction: Ischemic-reperfusion (IR) injury following acute occlusion of lower limb arteries can cause local, systemic and remote organ complications. A lot of effort was put into preventing these complications, however commonly accepted therapeutic methods are not available as yet. We can distinguish between two main research lines of preventive methods, namely surgical and pharmacological conditional techniques.

Objective: Our aim was to develop acute rat lower limb IR models in which the remote organ complications of IR can potentially appear. We wished to reduce the damage of the mostly affected organs, as the lung and kidney using surgical postconditioning and pharmacological NIM-811 treatment. Furthermore, our goal was to compare the damaging effect of aortic cross clamping and lower limb tourniquet on rat skeletal muscle.

Materials/Methods: Male Wistar rats were used in our experiments. Postconditioning was examined in rat IR model in which aortic cross clamping was used. NIM-811 was investigated in a rat IR model where ischemia was induced by lower limb tourniquet. To determine the local skeletal muscle damage, light microscopic histological, laboratory and muscle fiber viability methods were used. To characterize the systemic complications, we measured the serum level of inflammatory cytokines and serum free radicals. Remote lung and kidney complications were characterized by histological, laboratory, spectrophotometry, functional methods and tissue wet content measurement.

Results: Postconditioning was efficient in attenuating the systemic and remote lung complications in aortic cross clamping lower limb IR rat model. Significantly more severe skeletal muscle damage and systemic inflammatory response were generated by lower limb tourniquet compared to the damaging effects of aortic cross clamping. NIM-811 could have the potential of reducing rhabdomyolysis, systemic inflammation and impairment of the kidney following tourniquet induced lower limb IR injury.

Conclusion: Postconditioning and NIM-811 treatment may be efficient to reduce lung and kidney injury during acute lower limb IR.

9. Irodalomjegyzék

1. Creager MA, Kaufman JA, Conte MS. (2012) Clinical practice. Acute limb ischemia. *N Engl J Med*, 366(23): 2198-2206.
2. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. (2007) Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*, 45 Suppl S: S5-67.
3. Rajan DK, Patel NH, Valji K, Cardella JF, Brown DB, Brountzos EN, Clark TW, Grassi CJ, Meranze SG, Miller DL, Neithamer CD, Rholl K, Roberts A, Schwartzberg MS, Swan TT, Thorpe PE, Towbin RB, Sacks D. (2009) Quality improvement guidelines for percutaneous management of acute limb ischemia. *J Vasc Interv Radiol*, 20(7 Suppl): S208-218.
4. Campbell WB, Ridler BM, Szymanska TH. (1998) Current management of acute leg ischaemia: results of an audit by the Vascular Surgical Society of Great Britain and Ireland. *Br J Surg*, 85(11): 1498-1503.
5. Trummer G, Brehm K, Siepe M, Heilmann C, Schlensak C, Beyersdorf F. (2010) The management of acute limb ischemia. *Minerva Chir*, 65(3): 319-328.
6. Jaffery Z, Thornton SN, White CJ. (2011) Acute limb ischemia. *Am J Med Sci*, 342(3): 226-234.
7. Walker TG. (2009) Acute limb ischemia. *Tech Vasc Interv Radiol*, 12(2): 117-129.
8. Acsády G, Nemes A. Érsebészeti. In: Gaál Cs. (szerk.), *Sebészeti*, 6. kiadás, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2007: 1015-1077.
9. Walker PM. (1991) Ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Ann Vasc Surg*, 5(4): 399-402.
10. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. (2011) Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(5): H1723-1741.
11. Owen P, Dennis S, Opie LH. (1990) Glucose flux rate regulates onset of ischemic contracture in globally underperfused rat hearts. *Circ Res*, 66(2): 344-354.
12. Hayes G, Liauw S, Romaschin A, Walker PM. (1988) Separation of reperfusion injury from ischemia-induced necrosis. *Surgical Forum*, 39: 306-308.

13. Szijártó A, Aranyi P, Turóczy Zs, Kupcsulik P, Gyurkovics E. (2009) Ischaemiás-reperfüziós károsodás csökkentésének gyakorlati és elvi lehetőségei az érsebészetben. Irodalmi áttekintés. *Érbetegségek*, 16(4): 113-120.
14. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. (2002) Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*, 105(2): 248-258.
15. Davies MG, Huynh, T.T.T, Hagen, P.-O. Endothelial physiology. In: P.A Grace, RT Mathie (eds.), *Ischemia-reperfusion injury*. Blackwell Science, Oxford, 1999: 157-179.
16. Olivas TP, Saylor TF, Wong HP, Stephenson LL, Zamboni WA. (2001) Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion. *Plast Reconstr Surg*, 107(3): 785-788.
17. Ames A, 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. (1968) Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol*, 52(2): 437-453.
18. Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. (1994) Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 19(4): 623-631.
19. Kuntscher MV, Schirmbeck EU, Menke H, Klar E, Gebhard MM, Germann G. (2002) Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. *Plast Reconstr Surg*, 109(7): 2398-2404.
20. Koksál C, Bozkurt AK, Sirin G, Konukoglu D, Ustundag N. (2004) Aprotinin ameliorates ischemia/reperfusion injury in a rat hind limb model. *Vascul Pharmacol*, 41(4-5): 125-129.
21. Seifert FC, Banker M, Lane B, Bagge U, Anagnostopoulos CE. (1985) An evaluation of resting arterial ischemia models in the rat hind limb. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 26(5): 502-508.
22. Bywaters EG, Beall D. (1941) Crush Injuries with Impairment of Renal Function. *Br Med J*, 1(4185): 427-432.
23. Zimmerman JL, Shen MC. (2013) Rhabdomyolysis. *Chest*, 144(3): 1058-1065.
24. Belkin M, Brown RD, Wright JG, LaMorte WW, Hobson RW, 2nd. (1988) A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg*, 156(2): 83-86.
25. Walker PM, Lindsay T, Liauw S, Romaschin AD. (1989) The impact of energy depletion on skeletal muscle. *Microcirc Endothelium Lymphatics*, 5(3-5): 189-206.

26. Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN. (1988) Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol*, 254(5 Pt 2): H823-827.
27. van Essen GJ, McQueen MM. (1998) Compartment syndrome in the lower limb. *Hosp Med*, 59(4): 294-297.
28. Garner MR, Taylor SA, Gausden E, Lyden JP. (2014) Compartment syndrome: diagnosis, management, and unique concerns in the twenty-first century. *Hss j*, 10(2): 143-152.
29. Harman JW, Gwinn RP. (1949) The recovery of skeletal muscle fibers from acute ischemia as determined by histologic and chemical methods. *Am J Pathol*, 25(4): 741-755.
30. Garlid KD, Costa AD, Quinlan CL, Pierre SV, Dos Santos P. (2009) Cardioprotective signaling to mitochondria. *J Mol Cell Cardiol*, 46(6): 858-866.
31. Horinaka S. (2011) Use of nicorandil in cardiovascular disease and its optimization. *Drugs*, 71(9): 1105-1119.
32. Lemasters JJ, Qian T, He L, Kim JS, Elmore SP, Cascio WE, Brenner DA. (2002) Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxid Redox Signal*, 4(5): 769-781.
33. Crompton M, Costi A, Hayat L. (1987) Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J*, 245(3): 915-918.
34. Griffiths EJ, Halestrap AP. (1995) Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*, 307 (Pt 1): 93-98.
35. Nishida H, Matsumoto A, Tomono N, Hanakai T, Harada S, Nakaya H. (2010) Biochemistry and physiology of mitochondrial ion channels involved in cardioprotection. *FEBS Lett*, 584(10): 2161-2166.
36. Ravikumar R, McEwen ML, Springer JE. (2007) Post-treatment with the cyclosporin derivative, NIM811, reduced indices of cell death and increased the volume of spared tissue in the acute period following spinal cord contusion. *J Neurotrauma*, 24(10): 1618-1630.
37. Baines CP, Goto M, Downey JM. (1997) Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 29(1): 207-216.

38. Chen W, Gabel S, Steenbergen C, Murphy E. (1995) A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic preconditioning in perfused rat heart. *Circ Res*, 77(2): 424-429.
39. O'Rourke B, Cortassa S, Aon MA. (2005) Mitochondrial ion channels: gatekeepers of life and death. *Physiology (Bethesda)*, 20: 303-315.
40. Lejay A, Meyer A, Schlagowski AI, Charles AL, Singh F, Bouitbir J, Pottecher J, Chakfe N, Zoll J, Geny B. (2014) Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*, 50: 101-105.
41. Pipinos, II, Judge AR, Zhu Z, Selsby JT, Swanson SA, Johanning JM, Baxter BT, Lynch TG, Dodd SL. (2006) Mitochondrial defects and oxidative damage in patients with peripheral arterial disease. *Free Radic Biol Med*, 41(2): 262-269.
42. Neary P, Redmond HP. Ischaemia-reperfusion injury and the systemic inflammatory response syndrome. In: Grace PA, Mathie RT (eds.), *Ischaemia-Reperfusion Injury*. Blackwell Science, London, 1999: 123-136.
43. Fantini GA, Conte MS. (1995) Pulmonary failure following lower torso ischemia: clinical evidence for a remote effect of reperfusion injury. *Am Surg*, 61(4): 316-319.
44. Carden DL, Granger DN. (2000) Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 190(3): 255-266.
45. Dinarello CA. (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2): 503-508.
46. Kan H, Xie Z, Finkel MS. (1999) TNF-alpha enhances cardiac myocyte NO production through MAP kinase-mediated NF-kappaB activation. *Am J Physiol*, 277(4 Pt 2): H1641-1646.
47. Socha LA, Gowardman J, Silva D, Correcha M, Petrosky N. (2006) Elevation in interleukin 13 levels in patients diagnosed with systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Med*, 32(2): 244-250.
48. Galle C, De Maertelaer V, Motte S, Zhou L, Stordeur P, Delville JP, Li R, Ferreira J, Goldman M, Capel P, Wautrecht JC, Pradier O, Dereume JP. (2000) Early inflammatory response after elective abdominal aortic aneurysm repair: a comparison between endovascular procedure and conventional surgery. *J Vasc Surg*, 32(2): 234-246.
49. Minami S. (1923) Über Nierenveränderungen nach Verschüttung. *Virchows Arch Patho Anat* 245 (1): 247.
50. Holt SG, Moore KP. (2001) Pathogenesis and treatment of renal dysfunction in rhabdomyolysis. *Intensive Care Med*, 27(5): 803-811.

51. Gálffy I, Széphelyi K, Százados M, Varga T, Rácz K, Gősi G, Windisch M. (2007) Akut veseelégtelenség definíciója, előfordulási gyakorisága, rizikófaktorai és kimenetele érsebészeti betegekben. Irodalmi áttekintés. *Érbetegségek*, 1: 49-55.
52. Slater MS, Mullins RJ. (1998) Rhabdomyolysis and myoglobinuric renal failure in trauma and surgical patients: a review. *J Am Coll Surg*, 186(6): 693-716.
53. Knochell JP. Rhabdomyolysis and myoglobinuria. In: Suki WN, Eknoyan G (eds.), *The Kidney in systemic disease*. JohnWiley and Sons, New York, 1981: 263-284.
54. Bunn HF, Jandl JH. (1969) The renal handling of hemoglobin. II. Catabolism. *J Exp Med*, 129(5): 925-934.
55. Better OS. (1990) The crush syndrome revisited (1940-1990). *Nephron*, 55(2): 97-103.
56. Malik GH. (1998) Rhabdomyolysis and Myoglobin-induced Acute Renal Failure. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 9(3): 273-284.
57. Zager RA. (1996) Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int*, 49(2): 314-326.
58. Lucas CE. (1976) The renal response to acute injury and sepsis. *Surg Clin North Am*, 56(4): 953-975.
59. Schlondorff D, Goldwasser P, Neuwirth R, Satriano JA, Clay KL. (1986) Production of platelet-activating factor in glomeruli and cultured glomerular mesangial cells. *Am J Physiol*, 250(6 Pt 2): F1123-1127.
60. Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ, 2nd. (1990) Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem*, 184(1): 1-10.
61. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. (1990) Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med*, 113(3): 227-242.
62. Brezis M, Heyman SN, Dinour D, Epstein FH, Rosen S. (1991) Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys. *J Clin Invest*, 88(2): 390-395.
63. Wright CE, Rees DD, Moncada S. (1992) Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res*, 26(1): 48-57.

64. Maree A, Peer G, Schwartz D, Serban I, Blum M, Wollman Y, Cabili S, Iaina A. (1994) Role of nitric oxide in glycerol-induced acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant*, 9 Suppl 4: 78-81.
65. Lieberthal W, LaRaia J, Valeri CR. (1992) Role of thromboxane in mediating the intrarenal vasoconstriction induced by unmodified stroma free hemoglobin in the isolated perfused rat kidney. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*, 20(2-4): 663-667.
66. Barry MC, Kelly C, Burke P, Sheehan S, Redmond HP, Bouchier-Hayes D. (1997) Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. *Br J Surg*, 84(4): 513-519.
67. Kuebler WM. (2005) Inflammatory pathways and microvascular responses in the lung. *Pharmacol Rep*, 57 Suppl: 196-205.
68. Eliason JL, Wakefield TW. (2009) Metabolic consequences of acute limb ischemia and their clinical implications. *Semin Vasc Surg*, 22(1): 29-33.
69. Anner H, Kaufman RP, Jr., Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. (1988) Reperfusion of ischemic lower limbs increases pulmonary microvascular permeability. *J Trauma*, 28(5): 607-610.
70. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. (1991) Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg*, 78(6): 651-655.
71. Berger MM. (2006) Antioxidant micronutrients in major trauma and burns: evidence and practice. *Nutr Clin Pract*, 21(5): 438-449.
72. Maxwell SR, Lip GY. (1997) Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*, 58(2): 95-117.
73. Black SC, Lucchesi BR. (1993) Heat shock proteins and the ischemic heart. An endogenous protective mechanism. *Circulation*, 87(3): 1048-1051.
74. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. (1997) Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 14(3): 195-203.
75. Kyriakides C, Austen WG, Jr., Wang Y, Favuzza J, Moore FD, Jr., Hechtman HB. (2000) Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma*, 48(1): 32-38.
76. Anner H, Kaufman RP, Jr., Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. (1987) Pulmonary leukosequestration induced by hind limb ischemia. *Ann Surg*, 206(2): 162-167.

77. Adam DJ, Mohan IV, Stuart WP, Bain M, Bradbury AW. (1999) Community and hospital outcome from ruptured abdominal aortic aneurysm within the catchment area of a regional vascular surgical service. *J Vasc Surg*, 30(5): 922-928.
78. Groeneveld AB, Raijmakers PG, Rauwerda JA, Hack CE. (1997) The inflammatory response to vascular surgery-associated ischaemia and reperfusion in man: effect on postoperative pulmonary function. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 14(5): 351-359.
79. Huber TS, Harward TR, Flynn TC, Albright JL, Seeger JM. (1995) Operative mortality rates after elective infrarenal aortic reconstructions. *J Vasc Surg*, 22(3): 287-293; discussion 293-284.
80. Paterson IS, Klausner JM, Pugatch R, Allen P, Mannick JA, Shepro D, Hechtman HB. (1989) Noncardiogenic pulmonary edema after abdominal aortic aneurysm surgery. *Ann Surg*, 209(2): 231-236.
81. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Franco S, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Huffman MD, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Magid D, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, McGuire DK, Mohler ER, Moy CS, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Schreiner PJ, Sorlie PD, Stein J, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. (2013) Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 127(1): e6-e245.
82. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. (1986) Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 92(3 Pt 2): 613-620.
83. Schlensak C, Doenst T, Bitu-Moreno J, Beyersdorf F. (2000) Controlled limb reperfusion with a simplified perfusion system. *Thorac Cardiovasc Surg*, 48(5): 274-278.
84. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5): 1124-1136.
85. Przyklenk K. (2013) Reduction of myocardial infarct size with ischemic "conditioning": physiologic and technical considerations. *Anesth Analg*, 117(4): 891-901.
86. Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC. (2000) Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg*, 232(2): 155-162.

87. Heizmann O, Loehe F, Volk A, Schauer RJ. (2008) Ischemic preconditioning improves postoperative outcome after liver resections: a randomized controlled study. *Eur J Med Res*, 13(2): 79-86.
88. Li SQ, Liang LJ, Huang JF, Li Z. (2004) Ischemic preconditioning protects liver from hepatectomy under hepatic inflow occlusion for hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 10(17): 2580-2584.
89. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. (1993) Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 87(3): 893-899.
90. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(2): H579-588.
91. Teixeira AR, Molan NT, Kubrusly MS, Bellodi-Privato M, Coelho AM, Leite KR, Machado MA, Bacchella T, Machado MC. (2009) Postconditioning ameliorates lipid peroxidation in liver ischemia-reperfusion injury in rats. *Acta Cir Bras*, 24(1): 52-56.
92. Serviddio G, Romano AD, Gesualdo L, Tamborra R, Di Palma AM, Rollo T, Altomare E, Vendemiale G. (2008) Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*, 23(5): 1504-1512.
93. Ferencz A, Takacs I, Horvath S, Ferencz S, Javor S, Fekecs T, Shanava K, Balatonyi B, Weber G. (2010) Examination of protective effect of ischemic postconditioning after small bowel autotransplantation. *Transplant Proc*, 42(6): 2287-2289.
94. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2004) Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res*, 62(1): 74-85.
95. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, Sun HY, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. (2004) Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg*, 78(3): 961-969; discussion 969.
96. Philipp SD DJ, Cohen MV. (2004) Postconditioning must be initiated in less than 1 minute following reperfusion and is dependent on adenosine receptors and P13-kinase. *Circulation*, 110: III-168.
97. Kin H LM, Amerson BS, Zatta AJ, Kerendi F, Halkos ME, Zhao Z-Q, Headrick JP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. (2004) Cardioprotection by

- “postconditioning” is mediated by increased retention of endogenous intravascular adenosine and activation of A2a receptors during reperfusion. *Circulation*, 110: III-168.
98. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. (2004) Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circ Res*, 95(3): 230-232.
 99. Darling CE, Jiang R, Maynard M, Whittaker P, Vinten-Johansen J, Przyklenk K. (2005) Postconditioning via stuttering reperfusion limits myocardial infarct size in rabbit hearts: role of ERK1/2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(4): H1618-1626.
 100. Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S, Valen G, Vaage J. (2004) Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *Eur J Cardiothorac Surg*, 25(6): 1006-1010.
 101. Sun HY, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J, Zhao ZQ. (2005) Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288(4): H1900-1908.
 102. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao ZQ, Guyton RA, Headrick JP, Vinten-Johansen J. (2005) Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res*, 67(1): 124-133.
 103. Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Zatta AJ, Kin H, Halkos ME, Kerendi F. (2005) Postconditioning--A new link in nature's armor against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 100(4): 295-310.
 104. Hausenloy DJ, Lecour S, Yellon DM. (2011) Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement pro-survival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin. *Antioxid Redox Signal*, 14(5): 893-907.
 105. Hausenloy DJ, Yellon DM. (2004) New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*, 61(3): 448-460.
 106. Morin D, Hauet T, Spedding M, Tillement J. (2001) Mitochondria as target for anti-ischemic drugs. *Adv Drug Deliv Rev*, 49(1-2): 151-174.
 107. Svarstad HB, HC; Dhillon, SS. (2000) From Norway to Novartis: Cyclosporin from *Tolypocladium inflatum* in an open access bioprospecting regime. *Biodiversity and Conservation*, 99(11): 1521–1541.

108. Fournier N, Ducet G, Crevat A. (1987) Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr*, 19(3): 297-303.
109. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. (1995) Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. *Biochem J*, 307 (Pt 1): 99-106.
110. Halestrap AP, Connern CP, Griffiths EJ, Kerr PM. (1997) Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects hearts from ischaemia/reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*, 174(1-2): 167-172.
111. Woodfield K, Ruck A, Brdiczka D, Halestrap AP. (1998) Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem J*, 336 (Pt 2): 287-290.
112. Duina AA, Chang HC, Marsh JA, Lindquist S, Gaber RF. (1996) A cyclophilin function in Hsp90-dependent signal transduction. *Science*, 274(5293): 1713-1715.
113. Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, Tintelnnot-Blomley M, Lemasters JJ. (2003) Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem*, 10(16): 1485-1506.
114. Crompton M, Virji S, Ward JM. (1998) Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biochem*, 258(2): 729-735.
115. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, Andre-Fouet X, Revel D, Kirkorian G, Monassier JP, Derumeaux G, Ovize M. (2008) Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 359(5): 473-481.
116. Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. (2003) Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 60(3): 617-625.
117. Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, Derumeaux G, Ovize M. (2007) Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293(3): H1654-1661.
118. Rosenwirth B, Billich A, Datema R, Donatsch P, Hammerschmid F, Harrison R, Hiestand P, Jaksche H, Mayer P, Peichl P, et al. (1994) Inhibition of human

- immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analog. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(8): 1763-1772.
119. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M. (2005) Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 38(2): 367-374.
 120. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. (2005) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*, 111(2): 194-197.
 121. Cour M, Loufouat J, Paillard M, Augeul L, Goudable J, Ovize M, Argaud L. (2011) Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *Eur Heart J*, 32(2): 226-235.
 122. Zhong Z, Theruvath TP, Currin RT, Waldmeier PC, Lemasters JJ. (2007) NIM811, a mitochondrial permeability transition inhibitor, prevents mitochondrial depolarization in small-for-size rat liver grafts. *Am J Transplant*, 7(5): 1103-1111.
 123. Cheng CH, Lin HC, Lai IR, Lai HS. (2013) Ischemic postconditioning attenuate reperfusion injury of small intestine: impact of mitochondrial permeability transition. *Transplantation*, 95(4): 559-565.
 124. Rosenthal SM, Tabor H. (1945) Electrolyte changes and chemotherapy in experimental burn and traumatic shock and hemorrhage. *Arch Surg*, 51: 244-252.
 125. Lin HC, Lee TK, Tsai CC, Lai IR, Lu KS. (2012) Ischemic postconditioning protects liver from ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial permeability transition. *Transplantation*, 93(3): 265-271.
 126. Turoczi Z, Aranyi P, Lukats A, Garbaisz D, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats. *PLoS One*, 9(1): e84783.
 127. Blazovics A, Kovacs A, Lugasi A, Hagymasi K, Biro L, Feher J. (1999) Antioxidant defense in erythrocytes and plasma of patients with active and quiescent Crohn disease and ulcerative colitis: a chemiluminescent study. *Clin Chem*, 45(6 Pt 1): 895-896.
 128. Yang CH, Tsai PS, Wang TY, Huang CJ. (2009) Dexmedetomidine-ketamine combination mitigates acute lung injury in haemorrhagic shock rats. *Resuscitation*, 80(10): 1204-1210.

129. Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE. (1996) Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int J Microcirc Clin Exp*, 16(2): 89-97.
130. Kurucz I, Tombor B, Prechl J, Erdo F, Hegedus E, Nagy Z, Vitai M, Koranyi L, Laszlo L. (1999) Ultrastructural localization of Hsp-72 examined with a new polyclonal antibody raised against the truncated variable domain of the heat shock protein. *Cell Stress Chaperones*, 4(2): 139-152.
131. Szijarto A, Hahn O, Lotz G, Schaff Z, Madarasz E, Kupcsulik PK. (2006) Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser Doppler flowmetry. *J Surg Res*, 131(1): 150-157.
132. Li W, Zhang Q, Wang M, Wu H, Mao F, Zhang B, Ji R, Gao S, Sun Z, Zhu W, Qian H, Chen Y, Xu W. (2013) Macrophages are involved in the protective role of human umbilical cord-derived stromal cells in renal ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res*, 10(3): 405-416.
133. Huie RE, Padmaja S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun*, 18(4): 195-199.
134. Villegas E, Gilliland, S.E. (1998) Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* at 5°C. *J Food Sci*, 63: 1070-1074.
135. Guo JY, Yang T, Sun XG, Zhou NY, Li FS, Long D, Lin T, Li PY, Feng L. (2011) Ischemic postconditioning attenuates liver warm ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS-NO-HIF pathway. *J Biomed Sci*, 18: 79.
136. Gyurkovics E, Aranyi P, Stangl R, Onody P, Ferreira G, Lotz G, Kupcsulik P, Szijarto A. (2011) Postconditioning of the lower limb--protection against the reperfusion syndrome. *J Surg Res*, 169(1): 139-147.
137. Jiang B, Liu X, Chen H, Liu D, Kuang Y, Xing B, Chen Z. (2010) Ischemic postconditioning attenuates renal ischemic/reperfusion injury in mongrel dogs. *Urology*, 76(6): 1519.e1511-1517.
138. Wang T, Zhou YT, Chen XN, Zhu AX. (2014) Putative role of ischemic postconditioning in a rat model of limb ischemia and reperfusion: involvement of hypoxia-inducible factor-1 α expression. *Braz J Med Biol Res*, 47(9): 738-745.
139. Carmo-Araujo EM, Dal-Pai-Silva M, Dal-Pai V, Cecchini R, Anjos Ferreira AL. (2007) Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies. *Int J Exp Pathol*, 88(3): 147-154.
140. Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. (2010) Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine

- hindlimb through adenosine receptor activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 40(6): 804-809.
141. Welbourn R, Goldman G, O'Riordain M, Lindsay TF, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. (1991) Role for tumor necrosis factor as mediator of lung injury following lower torso ischemia. *J Appl Physiol* (1985), 70(6): 2645-2649.
 142. Cain BS, Harken AH, Meldrum DR. (1999) Therapeutic strategies to reduce TNF-alpha mediated cardiac contractile depression following ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*, 31(5): 931-947.
 143. Sinay L, Kurthy M, Horvath S, Arato E, Shafiei M, Lantos J, Ferencz S, Bator A, Balatonyi B, Verzar Z, Suto B, Kollar L, Weber G, Roth E, Jancso G. (2008) Ischaemic postconditioning reduces peroxide formation, cytokine expression and leukocyte activation in reperfusion injury after abdominal aortic surgery in rat model. *Clin Hemorheol Microcirc*, 40(2): 133-142.
 144. Park JW, Kang JW, Jeon WJ, Na HS. (2010) Postconditioning protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery*, 30(3): 223-229.
 145. Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Banerjee A, Harken AH. (1998) Adenosine reduces cardiac TNF-alpha production and human myocardial injury following ischemia-reperfusion. *J Surg Res*, 76(2): 117-123.
 146. Ke JJ, Yu FX, Rao Y, Wang YL. (2011) Adenosine postconditioning protects against myocardial ischemia-reperfusion injury though modulate production of TNF-alpha and prevents activation of transcription factor NF-kappaB. *Mol Biol Rep*, 38(1): 531-538.
 147. Salie R, Moolman JA, Lochner A. (2012) The mechanism of beta-adrenergic preconditioning: roles for adenosine and ROS during triggering and mediation. *Basic Res Cardiol*, 107(5): 281.
 148. Xia ZY, Gao J, Ancharaz AK, Liu KX, Xia Z, Luo T. (2010) Ischaemic post-conditioning protects lung from ischaemia-reperfusion injury by up-regulation of haeme oxygenase-1. *Injury*, 41(5): 510-516.
 149. Olguner C, Koca U, Kar A, Karci A, Islekel H, Canyilmaz M, Mavioglu O, Kizildag S, Unlu G, Elar Z. (2006) Ischemic preconditioning attenuates the lipid peroxidation and remote lung injury in the rat model of unilateral lower limb ischemia reperfusion. *Acta Anaesthesiol Scand*, 50(2): 150-155.
 150. Harkin DW, Barros D'Sa AA, McCallion K, Hoper M, Campbell FC. (2002) Ischemic preconditioning before lower limb ischemia--reperfusion protects against acute lung injury. *J Vasc Surg*, 35(6): 1264-1273.

151. Takhtfooladi H, Takhtfooladi M, Moayer F, Mobarakeh S. (2014) Melatonin attenuates lung injury in a hind limb ischemia-reperfusion rat model. *Rev Port Pneumol*. 21(1): 30-5.
152. Boutros CN, Zegdi R, Lila N, Combillau M, Fornes P, Carpentier A, Noel Fabiani J. (2005) Pulmonary expression of inducible heme-oxygenase after ischemia/reperfusion of the lower extremities in rats. *J Surg Res*, 129(2): 306-312.
153. Sun XF, Wang LL, Wang JK, Yang J, Zhao H, Wu BY, Wang YF, Wang L. (2007) Effects of simvastatin on lung injury induced by ischaemia-reperfusion of the hind limbs in rats. *J Int Med Res*, 35(4): 523-533.
154. Xu B, Gao X, Xu J, Lei S, Xia ZY, Xu Y, Xia Z. (2011) Ischemic postconditioning attenuates lung reperfusion injury and reduces systemic proinflammatory cytokine release via heme oxygenase 1. *J Surg Res*, 166(2): e157-164.
155. Sharma AK, Linden J, Kron IL, Laubach VE. (2009) Protection from pulmonary ischemia-reperfusion injury by adenosine A2A receptor activation. *Respir Res*, 10: 58.
156. Kao MC, Jan WC, Tsai PS, Wang TY, Huang CJ. (2011) Magnesium sulfate mitigates lung injury induced by bilateral lower limb ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res*, 171(1): e97-106.
157. Yasa H, Yakut N, Emrehan B, Ergunes K, Ortac R, Karahan N, Ozbek C, Gurbuz A. (2008) Protective effects of levosimendan and iloprost on lung injury induced by limb ischemia-reperfusion: a rabbit model. *J Surg Res*, 147(1): 138-142.
158. Csermely P, Yahar I. Heat Shock Proteins. In: Keri Gy (ed.), *Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research*. Taylor & Francis Inc, New York, 2003: p.67.
159. Carini R, Albano E. (2003) Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology*, 125(5): 1480-1491.
160. Jaeschke H. (2003) Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 284(1): G15-26.
161. Donnelly TJ, Sievers RE, Vissern FL, Welch WJ, Wolfe CL. (1992) Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion? *Circulation*, 85(2): 769-778.

162. Fredduzzi S, Mariucci G, Tantucci M, Ambrosini MV. (2001) Generalized induction of 72-kDa heat-shock protein after transient focal ischemia in rat brain. *Exp Brain Res*, 136(1): 19-24.
163. Akcetin Z, Pregla R, Darmer D, Heynemann H, Haerting J, Bromme HJ, Holtz J. (1999) Differential expression of heat shock proteins 70-1 and 70-2 mRNA after ischemia-reperfusion injury of rat kidney. *Urol Res*, 27(5): 306-311.
164. Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, Shiina H, Kayama T, Swanson RA, Dillman WH, Liu J, Panter SS, Weinstein PR. (2003) Overexpression of rat heat shock protein 70 is associated with reduction of early mitochondrial cytochrome C release and subsequent DNA fragmentation after permanent focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(6): 718-727.
165. Gedik HS, Korkmaz K, Erdem H, Karakilic E, Lafci G, Ankarali H. (2012) Protective effect of heparin in the end organ ischemia/reperfusion injury of the lungs and heart. *J Cardiothorac Surg*, 7: 123.
166. Barie PS, Mullins RJ. (1988) Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *J Surg Res*, 44(3): 284-307.
167. Makitie J, Teravainen H. (1977) Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat. *Acta Neuropathol*, 37(2): 101-109.
168. Nanobashvili J, Neumayer C, Fugl A, Punz A, Blumer R, Prager M, Mittlbock M, Gruber H, Polterauer P, Roth E, Malinski T, Huk I. (2003) Ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle: plasma taurine as a measure of tissue damage. *Surgery*, 133(1): 91-100.
169. Sapega AA, Heppenstall RB, Chance B, Park YS, Sokolow D. (1985) Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. A biochemical and ultrastructural study. *J Bone Joint Surg Am*, 67(2): 303-314.
170. Silva MG, Castro AA, Ramos EA, Peixoto E, Miranda F, Jr., Pitta Gde B, Costa Rde F, Juliano Y. (2005) Histological and biochemical serum effects of alpha-tocopherol on ischemia/reperfusion-related injuries induced in the pelvic limb of rats. *Acta Cir Bras*, 20(5): 375-381.
171. Walker PM. (1986) Pathophysiology of acute arterial occlusion. *Can J Surg*, 29(5): 340-342.
172. Woodruff TM, Arumugam TV, Shiels IA, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SM. (2004) Protective effects of a potent C5a receptor antagonist on experimental acute limb ischemia-reperfusion in rats. *J Surg Res*, 116(1): 81-90.
173. Hamori J, Kovach AG, Takacs L, Takacs-Nagy L, T-Szabo M, Zachariev G. (1956) Regeneration in the biochemical, functional and histological changes

- found in the muscle of rats after ischaemic shock. *Acta Physiol Hung*, 10(2-4): 313-325.
174. Wakai A, Winter DC, Street JT, O'Sullivan RG, Wang JH, Redmond HP. (2001) Inosine attenuates tourniquet-induced skeletal muscle reperfusion injury. *J Surg Res*, 99(2): 311-315.
 175. Naparus A, Ashrafpour H, Hofer SO, Zhong T, Huang N, Cahoon NJ, McAllister SE, Neligan PC, Roy T, Lipa JE, Pang CY. (2012) Efficacy and mechanism of hypoxic postconditioning in salvage of ex vivo human rectus abdominis muscle from hypoxia/reoxygenation injury. *Eur J Pharmacol*, 686(1-3): 90-96.
 176. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. (2011) Therapeutic interventions against reperfusion injury in skeletal muscle. *J Surg Res*, 171(1): 175-182.
 177. Gill RS, Bigam DL, Cheung PY. (2012) The role of cyclosporine in the treatment of myocardial reperfusion injury. *Shock*, 37(4): 341-347.
 178. Gomez L, Li B, Mewton N, Sanchez I, Piot C, Elbaz M, Ovize M. (2009) Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients. *Cardiovasc Res*, 83(2): 226-233.
 179. Halestrap AP, Davidson AM. (1990) Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J*, 268(1): 153-160.
 180. Halloran PF. (1996) Molecular mechanisms of new immunosuppressants. *Clin Transplant*, 10(1 Pt 2): 118-123.
 181. Zoratti M, Szabo I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*, 1241(2): 139-176.
 182. Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. (2007) Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*, 75(3): 530-535.
 183. Matsumoto S, Friberg H, Ferrand-Drake M, Wieloch T. (1999) Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19(7): 736-741.
 184. Puglisi RN, Strande L, Santos M, Schulte G, Hewitt CW, Whalen TV. (1996) Beneficial effects of cyclosporine and rapamycin in small bowel ischemic injury. *J Surg Res*, 65(2): 115-118.

185. Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, Charles AL, Lejay A, Gharib A, Diemunsch P, Geny B. (2013) Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J Vasc Surg*, 57(4): 1100-1108.e1102.
186. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, Forrest CR, Lipa JE, Pang CY. (2008) Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(2): R681-689.
187. Odeh M. (1991) The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome. *N Engl J Med*, 324(20): 1417-1422.
188. Troitzsch D, Moosdorf R, Hasenkam JM, Nygaard H, Vogt S. (2013) Effects of cyclosporine pretreatment on tissue oxygen levels and cytochrome oxidase in skeletal muscle ischemia and reperfusion. *Shock*, 39(2): 220-226.
189. Freeman R, King B. (1972) Technique for the performance of the nitro-blue tetrazolium (NBT) test. *J Clin Pathol*, 25(10): 912-914.
190. Mowlavi A, Ghavami A, Song YH, Neumeister M. (2001) Limited use of cyclosporin A in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Ann Plast Surg*, 46(4): 426-430.
191. Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. (2009) Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*, 83(2): 213-225.
192. Menger MD, Sack FU, Barker JH, Feifel G, Messmer K. (1988) Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res Exp Med (Berl)*, 188(3): 151-165.
193. Rieber J, Klauss V, Konig A, Henneke KH, Spes C, Regar E, Werner F, Meiser B, Reichart B, Theisen K, Mudra H. (1998) Effects of tacrolimus and cyclosporine on the coronary microcirculation after heart transplantation: a prospective study with serial intracoronary flow measurements. *Transplant Proc*, 30(4): 1098-1099.
194. Norwood MG, Bown MJ, Sayers RD. (2004) Ischaemia-reperfusion injury and regional inflammatory responses in abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 28(3): 234-245.
195. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Saitta A, Campo GM, Arlotta M, Quartarone C, Ferlito M, Caputi AP. (1999) Cyclosporin-A reduces leukocyte accumulation and protects against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol*, 364(2-3): 159-168.

196. Miller CC, 3rd, Villa MA, Achouh P, Estrera AL, Azizzadeh A, Coogan SM, Porat EE, Safi HJ. (2008) Intraoperative skeletal muscle ischemia contributes to risk of renal dysfunction following thoracoabdominal aortic repair. *Eur J Cardiothorac Surg*, 33(4): 691-694.
197. Goksin I, Adali F, Enli Y, Akbulut M, Teke Z, Sackan G, Ocak E, Ozcan AV. (2011) The effect of phlebotomy and mannitol on acute renal injury induced by ischemia/reperfusion of lower limbs in rats. *Ann Vasc Surg*, 25(8): 1118-1128.
198. Klebl BM, Ayoub AT, Pette D. (1998) Protein oxidation, tyrosine nitration, and inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in low-frequency stimulated rabbit muscle. *FEBS Lett*, 422(3): 381-384.
199. Muriel P, Sandoval G. (2000) Nitric oxide and peroxynitrite anion modulate liver plasma membrane fluidity and $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase activity. *Nitric Oxide*, 4(4): 333-342.
200. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA. (1994) Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 269(42): 26066-26075.
201. Szabo C. (2003) Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett*, 140-141: 105-112.
202. Szabo C, Ohshima H. (1997) DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide*, 1(5): 373-385.
203. Packer MA, Murphy MP. (1994) Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. *FEBS Lett*, 345(2-3): 237-240.

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke:

Garbaisz D, Turoczi Zs, Fulop A, Rosero O, Aranyi P, Onody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Zs, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Therapeutic option for managing lung injury induced by infrarenal aortic cross-clamping. J Surg Res, 185(1): 469-76.

Garbaisz D, Turoczi Zs, Aranyi P, Fulop A, Rosero O, Hermes E, Ferencz Á, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Attenuation of skeletal muscle and renal injury to the lower limb following ischemia-reperfusion using mPTP inhibitor NIM-811. PLoS One, 26;9(6): e101067.

Garbaisz D, Turoczi Zs, Fülöp A, Rosero O, Arányi P, Ónody P, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Zs, Harsányi L, Szijártó A. (2013) Alsó végtagi ischaemiás-reperfúziós károsodás hosszú távú tüdőszövődményeinek megelőzése poszt kondicionálással. Magyar Sebészet, 66(3): 146–154.

Rosero O, Németh K, Turóczi Zs, Fülöp A, **Garbaisz D**, Györffy A, Szuák A, Dorogi B, Kiss M, Nemeskéri A, Harsányi L, Szijártó A. (2014) Collateral circulation of the rat lower limb and its significance in ischemia–reperfusion studies. Surg Today, 44(12):2345-53

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke:

Gyurkovics E, Arányi P, Turóczi Zs, **Garbaisz D**, Varga M, Hegedüs V, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2010) Postconditioning attenuates remote organ injury after lower limb arterial occlusion. Interventional Medicine & Applied Science, 2(4): 169–177.

Onody P, Stangl R, Fulop A, Rosero O, **Garbaisz D**, Turoczi Zs, Lotz G, Rakonczay Z, Balla Zs, Hegedus V, Harsanyi L, Szijarto A. (2013) Levosimendan: a cardiovascular drug to prevent liver ischemia-reperfusion injury? PLoS One, 11; 8(9): e73758.

Aranyi P, Turoczi Z, Garbaisz D, Lotz G, Geleji J, Hegedus V, Rakonczay Z, Balla Z, Harsanyi L, Szijarto A. (2015) Postconditioning in major vascular surgery: prevention of renal failure. J Transl Med, 13 (1):21.

Rosero O, Onody P, Stangl R, Turoczi Zs, Fulop A, **Garbaisz D**, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Postconditioning of the small intestine: which is the most effective algorithm in a rat model? J Surg Res, 187 (2): 427-37.

Turóczi Zs, Arányi P, Lukáts Á, **Garbaisz D**, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. (2014) Muscle Fiber Viability, a Novel Method for the Fast Detection of Ischemic Muscle Injury in Rats. PLoS One, 13;9(1): e84783.

Turoczi Zs, Fulop A, Lukats A, **Garbaisz D**, Lotz G, Harsanyi L, Szijarto A. (2014) Postconditioning protects skeletal muscle against a long-lasting vascular occlusion. J Invest Surg, 27(5): 282-90

Rosero O, Ónody P, Kovács T, Molnár D, Lotz G, Tóth Sz, Turóczi Zs, Fülöp A, **Garbaisz D**, Harsányi L, Szijártó A. (2014) Impaired Intestinal Mucosal Barrier Upon Ischemia-Reperfusion: “Patching Holes In The Shield With A Simple Surgical Method. Biomed Res Int. 2014: 210901.

Szijártó A, Turóczi Zs, Arányi P, **Garbaisz D**, Varga M, Stangl R, Lotz G, Kupcsulik P. (2010) Hosszú idejű végtagi verőér-elzáródás és izomszövet-életképesség vizsgálata kísérletes állatmodellben. Magyar Sebészet, 63(6): 374–379.

Arányi P, Turóczi Zs, **Garbaisz D**, Varga M, Lotz G, Kupcsulik P, Szijártó A. (2011) Poszt kondicionálás: érsebészeti technika posztoperatív veseelégtelenség megelőzésére – kísérletes modell. Hypertonia és Nephrologia, 15(3): 117-124.

Szijártó A, Fülöp A, Turóczi Zs, **Garbaisz D**, Dudás E, Szabó J, Nánási R, Kupcsulik P. (2011) Rupturált hasi aorta aneurysma kísérletes modellje. A folyadék reszuscitáció technikai megfontolásai. Aneszteziológia és Intenzív Terápia, 41 (2): 61-70

Ónody P, Rosero O, Kovács T, **Garbaisz D**, Hegedüs V, Lotz G, Harsányi L, Szijártó A. (2012) Poszt kondicionálás – A távoli szervi dysfunciók ellenszere? Magyar Sebészet, 65 (4): 222-229.

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani TDK és PhD témavezetőmnek *Dr. Szijártó Attilának*, aki lehetővé tette részvételemet kutatócsoportjában és több éves támogatásával, tanácsaival, türelmével segítette munkámat!

Köszönet illeti *Dr. Kupcsulik Péter* és *Dr. Harsányi László Professzor Urakat*, akik megteremtették a feltételeket a kísérletek végzéséhez és lehetőséget adtak munkám elvégzésére!

Külön köszönöm kollégám *Dr. Turóczy Zsolt* segítségét, akivel a kutatócsoportban kezdetektől fogva együtt dolgoztunk segítve egymás munkáját!

Köszönöm kutatótársaimnak, *Dr. Arányi Péternek*, *Dr. Varga Márknak*, *Dr. Ónody Péternek*, *Dr. Rosero Olivérnek*, *Dr. Fülöp Andrásnak*, *Dr. Stangl Ritának*, *Dr. Czigány Zoltánnak* a kísérletek végzésében nyújtott segítségükért!

Köszönet illeti *Dr. Lotz Gábort* a szövettani minták feldolgozásában és kiértékelésében nyújtott segítsége miatt! Hálás köszönet *Prof. Dr. Blázovics Annának*, *Prof. Tretter Lászlónak*, *Dr. Hermes Editnek*, *Dr. Rakonczay Zoltánnak*, *Dr. Kékesi Violetának*, akiktől kooperációban dolgozva rengeteg segítséget kaptam kutatásaimhoz.

Köszönöm az I. sz. Sebészeti Klinika Kísérletes Sebészeti Részleg valamennyi munkatársának, hogy segítséget nyújtottak a kísérletek elvégzéséhez!

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni *szüleimnek*, *családomnak* és feleségemnek *Viviennek* a sok megértést, türelmet és segítséget, melyek nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre!