

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

Doktori tézisek

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

Bevezetés

Alsó végtagi akut artériás érelzáródások és műtéti megoldásuk utáni iszkémia-reperfúzió (IR) következményeként lokális, szisztémás és távoli szervi szövődmények alakulhatnak ki.

Vázizomszöveti iszkémia alatt, a megszünt vérellátás következtében intracelluláris tápanyag és oxigén deficit keletkezik, melynek eredménye a sejt energiaháztartásának/ATP termelésének hanyatlása. Az alacsony ATP szint miatt a sejtmembrán ATP dependens iontranszportereinek működési zavara figyelhető meg, mely végeredményben az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció megnövekedéséhez vezet.

Reperfúzió során az izomzat vérellátása helyreáll, melynek következtében a sejtek tápanyag és oxigén ellátottsága is biztosított lesz, azonban paradox módon az izomrostok további károsodásokat szenvednek. Tovább emelkedik az intracelluláris Ca^{2+} -szint, valamint reaktív oxigén származékok képződése veszi kezdetét. Különböző mikrocirkulációs változások (endotél diszfunkció, „no-reflow jelenség”) illetve lokális gyulladás alakulnak ki.

Az IR károsodás patofiziológiájában a mitokondriumoknak központi szerep tulajdonítható, hiszen felelősek az energiatermelés döntő hányadáért, valamint fontos tényezők a sejthalál folyamatában, mivel kulcsszerepet játszanak az oxidatív stressz kialakulásában és a nekroapoptózis folyamatában. A mitokondriális membránban elhelyezkedő mPTP csatorna (mitochondrial permeability transition pore) reperfúzió kezdetén történő megnyílása jelenti a sejt nekroapoptózisának kezdeti lépését.

A vázizomszöveti iszkémia-reperfúzió végeredménye rhabdmiolízis, az izomsejtek integritásának megbomlása. A lokális szövődmények az újraindult vérkeringésen keresztül generalizálódhatnak, intracelluláris metabolitok, ionok (K^+), enzimek (kreatin-kináz, laktát-dehidrogenáz), mioglobin, különböző mediátorok (pro-inflammatorikus citokinek, komplement-faktorok, akut fázis fehérjék) és szabadgyökök szabadulnak fel a szisztémás keringésbe. Egy szisztémás gyulladósos válaszreakció (SIRS – systemic inflammatory response syndrome) veszi kezdetét, mely érintheti többek között a vizeletkiválasztó és a légzőszerveket létrehozva ezzel az ún. többszervi károsodást, majd elégtelenséget (multiple organ dysfunction syndrome, MODS; multi organ failure, MOF).

Alsó végtagi IR károsodás létrehozására az irodalom számos modellt ismer. Az ismert iszkémiás modellek különböző módszereket alkalmaznak az artériás keringés kirekesztésére, úm.: végtag körüli külső tourniquet, arteria femoralis leszorítás, arteria iliaca leszorítás és infrarenális aorta leklippelés. A tourniquet-vel történő érkirekesztés az egyetlen módszer, amellyel komplett vázizom iszkémia érhető el reziduális keringés nélkül, habár az infrarenális aorta leklippelés alkalmazásával is szignifikáns mértékű iszkémiás vázizomkárosodás érhető el. A mai napig nincs egységesen alkalmazott és elfogadott módszer vázizom IR modellezésére és nem tudjuk pontosan, hogy milyen mértékű különbség adódik az izomrostkárosodás tekintetében a különböző IR modellek alkalmazásakor.

Az alsó végtagi IR károsodás megelőzésére évtizedek óta történnek próbálkozások, azonban jelenleg sem áll rendelkezésünkre egységesen elfogadott terápiás módszer. Két fő irányvonalat különböztethetünk meg a prevenciós módszerek között, melyek a sebészeti és nem sebészeti (farmakológiai) kondicionálási eljárások.

A sebésztechnikai kondicionálási eljárások akár az iszkémia előtt/alatt/után lokálisan vagy távoli szerven alkalmazva a keringésmóduláció révén befolyásolják a reperfüziós epizódot. Ezen módszerek közé tartozik a *posztkondicionálás*, mely a reperfüzió kezdetén alkalmazott többciklusú áramlásmegszakítás. Kardioprotektív hatása mellett több más szerven (bél, máj, vese) tett kedvező hatása is igazolt. Hatásmechanizmusában részt vesznek különböző aktivátor molekulák (adenozin, oxigén szabadgyökök), mediátor molekulák (NO) effektor molekulák/sejtalkotók (K^+ -ATP csatorna, mPTP csatorna), szignáltranszdukciós utak (RISK, SAFE), valamint hatással van a szöveti pH szabályozásra is.

A farmakológiai kondicionálási eljárások olyan farmakológiai vegyületeket jelentenek, melyek az iszkémia előtt, alatt vagy után alkalmazva képesek célzottan csökkenteni az IR károsodásból adódó szövődeményeket. Egy ilyen lehetséges farmakon a NIM-811 (N-metil-4-izoleucin ciclosporin), mely a ciclosporin-A egy nem immunosuppresszív derivátuma. A NIM-811 az mPTP csatorna nyitását specifikusan gátolja a csatorna ciklofillin-D molekulájához kötődve. Az irodalmi adatok alapján nem rendelkezik mellékhatásokkal, kedvező hatását több szerv (szív, máj, agy-gerincvelő, vese) tekintetében bizonyították már, azonban mindeddig alsó végtagi iszkémia-reperfüzió során nem alkalmazták.

Célkitűzés

I. kísérlet:

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

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 gyulladási 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 gyulladási 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?

Módszerek

Kísérleti elrendezés, műtéttechnika

Csoportbeosztás

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. (1. táblázat)

1. táblázat: Az I. kísérlet csoportbeosztása

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

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. (2. táblázat)

2. táblázat: A II. kísérlet csoportbeosztása

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

III. kísérlet: Alsó végtagi IR lokális vázizom és vese szövődményeinek 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. (3. táblázat)

3. 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

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 használtunk. A műtét előtti 12 órában csak vizet biztosítottunk számukra. Tartásuk a napszaki változásokat követően történt.

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.

A bal a. carotis communisba vezetett polietilén kanülön keresztül invazív vérnyomás monitorizálás történt a kísérletek teljes ideje alatt.

Operáció

I. kísérlet részletes műtéti leírása - Alsó végtagi IR lokális vázizom és tüdőszövetmennyéinek megelőzése posztkondicionálás alkalmazásával.

Medián laparotómia után a hasi aorta infrarenális szakaszának feltárása történt. Az aortára, közvetlenül a bifurkáció felett, az IR és PostC csoportban atraumatikus mikroklippet helyeztünk fel, mellyel 180 perces iszkémiát hoztunk létre mindkét alsó végtagban. A posztkondicionált csoportban 3 órával az iszkémia kezdetét követően posztkondicionálást végeztünk 2 percen keresztül, 6 ciklusban: 10 másodperc reperfüzióval, 10 másodperc reokklúzióval. Mind az IR, mind a PostC csoportban a mikroklipp eltávolítását 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 tüdőszövetmennyé mintavételre a reperfüzió negyedik órájának a végén került sor.

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 atraumatikus mikroklippel bilaterális alsó végtagi iszkémiát hoztunk létre. A B-csoportban mindkét alsó végtagra a comb proximalis részén azonos magasságban elasztikus gumiszalag alkalmazásával tourniquet minden állatnál standard módon hétszer körbetekerve és azonos szorítóerővel elszorítva került felhelyezésre az iszkémia létrehozásához. Mindkét csoportban 3 óra iszkémiát 4 óra reperfúzió követett. A reperfúzió végén, az állatok exsanguinálása történt. Vér és izomszövet mintavételre került sor laboratóriumi és szövettani vizsgálat céljából.

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

Median laparotómia végzését követően laser-Dopler flowmeter (LDF) mérőfej felhelyezésére került sor a bal vese elülső felszínére. A comb lateralis oldala felett hosszanti bőrmetszést követően szintén LDF mérőfej került felhelyezésre a m. biceps femoris felszínére, az alsó végtagi mikrocirkuláció monitorizálásának érdekében. 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 [Novartis, Basel, Svájc; 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 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. Mintavételre a reperfúzió 4. órájának a végén került sor.

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

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 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 vizsgálata

A NADH-tetrazolium 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 $3\ \mu\text{m}$ vastag fagyasztott metszetek készültek kriosztát segítségével. A metszetek a forgalmazó által biztosított nitroblue-tetrazolium (NBT), NADH és $0,05\text{M}$ -os TRIS puffer ($\text{pH } 7,6$) oldatában, fénymentes körülmények között 30 percig $37\ ^{\circ}\text{C}$ -on kerültek inkubálásra. Minden metszeten $600\times$ -os nagyítás mellett, tíz különböző terület került kifényképezésre 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 arányából került kiszámításra. A kapott eredmények egészséges állatok metszeteinek átlagértékhez viszonyítva százalékosan kerültek ábrázolásra.

Laboratóriumi vizsgálatok

A rabdmiolízis vizsgálata során a szérumban kreatin-kináz (CK), laktát-dehidrogenáz (LDH) és K^+ szint került meghatározásra. A vérminták centrifugálását követően (2×10 perc, $1050\ \text{g}$) az elválasztott szérumból gyorsfagyasztásra kerültek folyékony nitrogénben és -80°C -os hőmérsékleten történt a tárolásuk az automata analizátorral végzett vizsgálatukig.

Szisztémás hatások

Szérumban TNF- α és IL-6 szint meghatározás

A szérumban TNF- α és IL-6 szinteket szendvics ELISA módszerrel mértük a reperfüzió 4. órájában a kereskedelmi forgalomban elérhető kit segítségével. Az abszorbanciát $450\ \text{nm}$ -en mértük spektrofotométer segítségével.

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

Szisztémás hatások

Az oxidatív-stressz vizsgálata

A szabadgyök szint vizsgálatát szérumból végeztük, Heide-Bögl-féle luminometriás módszerrel (Blázovics-féle módosítás). Az eredményeket Relative Light Unit (RLU%) egységben adtuk meg, ahol a fényintenzitás (RLU%) arányos a mintában található szabadgyökök koncentrációjával.

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 ágyaztuk. A szövettani vizsgálatokat konvencionális fénymikroszkópos elemzéssel végeztük 60 szoros nagyítás mellett, 3-5 µm vastag metszeteken, 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. A metszetek kiértékeléséhez egy az irodalomban alkalmazott tüdő pontrendszert vettük alapul. Az alábbi jellemzők szerint értékeltük a mintákat: (1) alveoláris ödéma, (2) atelektázia, (3) bevérzés, (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.

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.

Artériás vérgázanalízis

A reperfúzió kezdetén, a második és negyedik órában a bal a. carotis communisból artériás vérmintát vettünk. A mintákat Radiometer ABL80 Astrup gépen vizsgáltuk meg. A reperfúzió 0., 2., és 4. órájában mértük a pO₂, pCO₂ értékeket.

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

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 mindenben az I. kísérletben részletezettek szerint jártunk el.

A szöveti mikrocirkuláció mérése

Az alsó végtagi vázizomzat mikrocirkulációja laser Doppler flowmeterrel 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.

Távoli szervi hatások: vese

Szövettani vizsgálat

Minden állatból, csoportbeosztástól függetlenül azonos anatómiai helyről (bal vese) történt mintavétel, melyek konzerválása az I. kísérletben leírtaknak megfelelően történt. A metszetek fénymikroszkópos kiértékelése (60x-os nagyítás) során a tubuláris, intersticiális károsodás jellemzőinek értékelése történt meg.

A szöveti károsodás pontos meghatározásának érdekében egy szövettani pontrendszer (score) került alkalmazásra. A veseszövet 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: ≤10%; 2: 10-25%; 3: 25-45%; 4: 45-75%; 5: >75%. A szövettani metszetek

vizsgálatára és pontozására egy független patológus segítségével került sor. A vizsgáló patológus a minták jelzését nem ismerte, a csoportbeosztás, ill. a beavatkozás módja és ideje tekintetében nem volt tájékozott.

Laboratóriumi vizsgálat

Az állatokból vett vérminták feldolgozása az „I., II., III. kísérlet közös kísérleti végpontjai” fejezetben leírtaknak megfelelően történt. Na⁺-, kreatinin-, karbamid- (BUN: blood urea nitrogen), szintek meghatározására került sor, melyek segítségével számított veseparaméterek (karbamid/kreatinin hányados, frakcionált Na⁺ exkréció: $FENa = U_{Na+} \times P_{kreat.} \times 100 / U_{kreat.} \times P_{Na+}$) kerültek kiszámításra.

A vese mikrocirkulációjának mérése

A vese mikrocirkulációja a bal vese áramlási viszonyainak mérésével laser Doppler flowmeterrel 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.

Statisztikai elemzés

Az adatok statisztikai megjelenítése IBM SPSS Statistics 20.0 szoftverrel (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) történt. Az átlagértékek közötti különbségeket $p < 0,05$ konfidenciaintervallum esetén értékeltük szignifikáns különbségként. 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.

Eredmények

Az I. kísérlet eredményei

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 rabdomiolízisre 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.

Laboratóriumi vizsgálatok

A szérum nekroenzim- (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.

Szisztémás hatások

Szérum TNF- α és IL-6 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 ($p=0,021$). 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.

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 ($p=0,032$).

Távoli szervi hatások: tüdő

Szövettan

A számított tüdőszövettani pontszám szignifikánsan magasabb értéket mutat az IR csoportban az Áloperált csoporthoz viszonyítva. A PostC csoportban a szövettani károsodás szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az IR csoporthoz képest ($p=0,017$).

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 ($p=0,042$).

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.

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.

Artériás vérgázanalízis

Az artériás pO_2 értéke csökkent az IR csoportban az Áloperált csoporthoz képest. A PostC csoportban szignifikánsan magasabb értékek mérhetőek 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.

A II. kísérlet eredményei

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. Rabdmiolitikus rostok (intracellularis vakuolizáltság, izomrost integritás felbomlása) elvértve 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.

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. A különbség az aortaokklúzió (A) és a tourniquet (B) csoport között szignifikáns mértékű ($p < 0,001$).

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 szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult ($p < 0,001$) mint a tourniquet B-csoportban. A szignifikáns különbség ($p = 0,047$) megfigyelhető az LDH szinteket tekintve is.

Hasonló tendencia mutatkozik a szérumban a K^+ szintek esetében is. A tourniquet csoportban szignifikánsan magasabb szérumban K^+ szint jelenik meg, mint az aortaokklúziós csoportban ($p = 0,048$).

Szisztémás hatások

TNF- α szint meghatározás

A B-csoport szérumban a TNF- α szintje szignifikánsan magasabb ($p < 0,001$) értéket mutat az A-csoport citokin szintjéhez képest.

A III. kísérlet eredményei

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 szétestek. A jelentős ödéma szétolja az izomrostokat. Ezzel szemben a NIM-IR csoport szövettani képein gyakorlatilag ép viszonyok láthatóak.

Laboratóriumi vizsgálatok

A szérumban lévő enzimek szintjeinek eredményei 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 lévő 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 ($p = 0,017$).

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 ($p = 0,017$).

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 ($p = 0,014$).

A szöveti mikrocirkuláció mérése

A reperfüziós 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 ($p < 0,001$).

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 ($p=0,040$)

Távoli szervi hatások: vese

Szövettan

A vese morfológiai károsodásának megítélésekor 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.

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

Vizeletmennyiség és laboratóriumi vizsgálat

A reperfüzió 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 ($p=0,001$).

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 ($p<0,001$).

A plazma karbamid/kreatinin hányados az Áloperált és NIM-áloperált csoportok értékeihez hasonlítva 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.

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.

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 ($p < 0,001$).

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 gyulladáshoz való 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.

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, Harsányi 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 reszuszcitáció 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 dysfunctiók ellenszere? Magyar Sebészet, 65 (4): 222-229.